



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA
FACOLTÀ DI SCIENZE MM. FF. NN.

Corso di Laurea Magistrale in
FISICA DELLA MATERIA

**Misura quantitativa dell'effetto di alcuni
farmaci antivirali sulle proprietà
meccaniche di membrane modello**

**Quantitative measurement of the effect
of some antiviral drugs on mechanical
properties of model membranes**

Relatore:
Prof. Luigi CRISTOFOLINI

Candidato:
Matteo PARMIGIANI

Correlatori:
Prof. Pietro CICUTA
Dott. Davide ORSI

Anno Accademico 2011/2012

Indice

Introduzione	4
1 Proprietà chimiche e fisiche delle membrane fosfolipidiche e loro interazione coi farmaci	6
1.1 Fosfolipidi	6
1.2 Strutture fosfolipidiche	8
1.2.1 Doppi strati, micelle e liposomi	8
1.2.2 Membrane cellulari	9
1.3 Struttura molecolare e proprietà dei monostrati fosfolipidici . .	11
1.3.1 Isoterme di monostrati di molecole anfifiliche	11
1.3.2 Teoria di base della tensiometria	14
1.4 Farmaci	16
1.5 Fondamenti di reologia interfacciale	21
1.5.1 Generalità	21
1.5.2 Mezzo bidimensionale puramente elastico	21
1.5.3 Mezzo bidimensionale puramente viscoso	24
1.5.4 Modelli meccanici di mezzi bidimensionali continui . .	25
1.6 Reologia interfacciale di taglio su monostrati fosfolipidici . . .	27
1.6.1 Generalità	27
1.6.2 La tecnica della reologia interfacciale di taglio	27
1.6.3 Fluidi <i>newtoniani</i>	32
1.6.4 Principio di sovrapposizione tempo-temperatura	32

2	Strumentazione e materiali	34
2.1	ISR	34
2.2	Vasca per isoterme	38
2.3	Camtel CIR 100	38
2.4	Materiali	42
3	Risultati sperimentali	45
3.1	Isoterme II-A su DPPC e farmaci	45
3.1.1	Analisi di Aivlosin	47
3.1.2	Confronto di isoterme su DPPC e farmaci	52
3.2	Misure ISR	58
3.3	Misure con Camtel CIR 100	75
3.4	Confronto ISR, CIR e letteratura	80
	Conclusioni	84
	Bibliografia	86

Introduzione

In questo lavoro sono state studiate le proprietà meccaniche di monostrati di *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine* (DPPC), un fosfolipide che agisce da surfattante negli alveoli polmonari dei mammiferi [1]. Il DPPC permette la respirazione garantendo la stabilità di una struttura ad alta densità superficiale quale appunto è la struttura alveolare, abbassando la tensione superficiale.

I monostrati studiati sono formati seguendo la tecnica di Langmuir che consiste nel comprimere tramite barriere mobili i fosfolipidi dispersi all'interfaccia aria-acqua. Si ottengono membrane modello che in prima approssimazione simulano i più complessi doppi strati fosfolipidici delle vere membrane cellulari.

Lo studio è stato condotto portandosi a valori di pressione superficiale prossimi a quelli fisiologici, comprese tra 20 e 50 mN/m. In questo intervallo il monostrato si trova nella fase di liquido-compresso, ovvero i fosfolipidi sono compattati con le teste polari in contatto con l'acqua e le code apolari respinte lontano dall'interfaccia acquosa.

In queste condizioni, la viscosità delle membrane è dell'ordine dei mN/m e il reometro interfacciale presente nei laboratori del Dipartimento di Fisica risulta adatto a studiarne le variazioni in funzione di diversi parametri quali il grado di compattamento e la presenza di farmaci interagenti con le membrane modello.

La presente tesi è così organizzata: i principi teorici alla base del funzionamento dello strumento sono dettagliatamente illustrati nel primo capitolo

dove viene riassunta anche la trattazione teorica della reologia interfacciale.

Nel secondo capitolo si descrive la strumentazione utilizzata presso il Dipartimento di Fisica di Parma e presso il *Cavendish Laboratory* di Cambridge, UK, dove è stata eseguita una parte delle misure.

Nel terzo capitolo sono riportati i risultati ottenuti, accompagnati dall'analisi e da una interpretazione. Si è trovata conferma che il comportamento della membrana di DPPC alle pressioni superficiali fisiologiche indagate è fortemente viscoso, con una componente elastica trascurabile. I risultati ottenuti dall'interazione di farmaci macrolidi con la membrana modello mostrano un fenomeno di adsorbimento e successivo desorbimento in funzione della pressione superficiale della membrana stessa. Si è avviata la caratterizzazione di questo fenomeno tramite accurate misure reologiche con i due diversi tipi di reometri precedentemente illustrati.

Capitolo 1

Proprietà chimiche e fisiche delle membrane fosfolipidiche e loro interazione coi farmaci

1.1 Fosfolipidi

Assieme ai glicolipidi ed al colesterolo, i fosfolipidi costituiscono i principali lipidi di membrana.

Una molecola di fosfolipide è costruita a partire da quattro categorie di molecole distinte: acidi grassi, una piattaforma a cui gli acidi grassi sono attaccati (es: glicerolo, sfingosina), un fosfato e infine un alcol legato al fosfato [2]. Mentre gli acidi grassi forniscono una barriera idrofobica, il resto della molecola è idrofilico e in questo modo interagisce con l'ambiente acquoso circostante.

Se la piattaforma di attacco degli acidi grassi è il *glicerolo* (triolo), i fosfolipidi derivati prendono il nome di *fosfogliceridi* ed alla piattaforma sono attaccate due catene di acidi grassi e un alcol fosforilato. I carboni C-1 e C-2 del glicerolo sono esterificati con i gruppi carbossilici delle due catene di acidi grassi. Invece il gruppo ossidrilico del C-3 è esterificato con l'acido fosforico. Questo composto si chiama *fosfatidato* ed è il fosfogliceride più semplice, a

partire dal quale si formano tutti gli altri [2].

Se la piattaforma di attacco è la *singosina* (amminoalcol con una lunga catena idrocarburica insatura), i fosfolipidi derivati da questa sono gli *singolipidi* che costituiscono un'altra grande classe di lipidi di membrana.

Le catene di acidi grassi possono essere sature se tutti i legami dei C che costituiscono la catena sono legami semplici (i C sono tutti ibridizzati sp^3), sono insature se sono presenti dei doppi legami all'interno della catena (alcuni C ibridizzati sp^2).

Per via della loro natura anfifilica, i fosfolipidi sono dei composti che abbassano la tensione superficiale di un liquido, o la tensione all'interfaccia tra due liquidi, o tra un liquido e un solido. In Figura 1.1 è raffigurato quanto descritto.

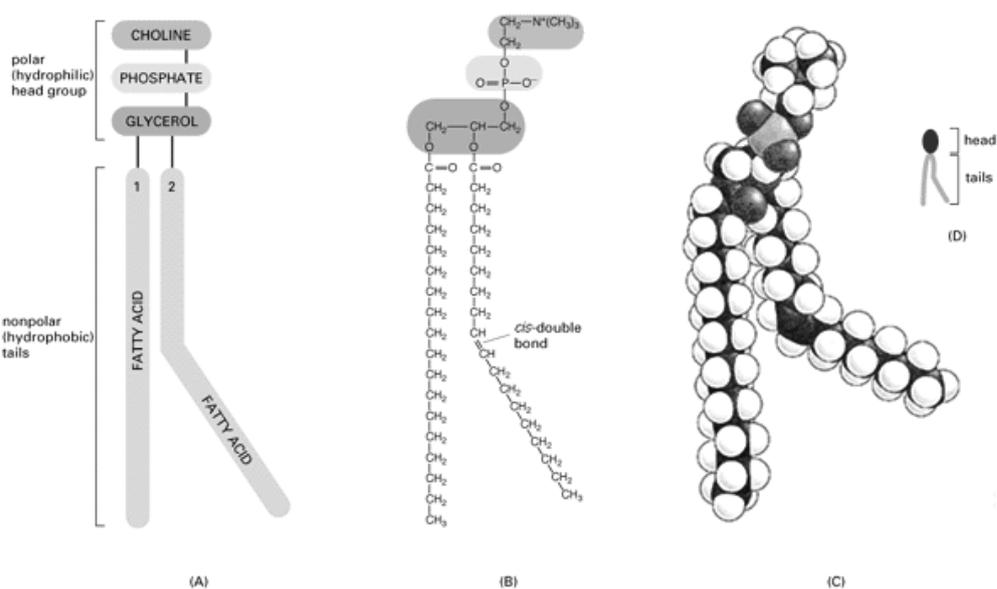


Figura 1.1: Formula di struttura di un tipico fosfolipide (fosfatidilcolina) in cui sono evidenziati i gruppi che lo compongono [3].

1.2 Strutture fosfolipidiche

1.2.1 Doppi strati, micelle e liposomi

A causa della loro natura anfifilica, quando vengono mescolati con l'acqua, i fosfolipidi hanno la tendenza a formare aggregati che costituiscono una fase separata dall'ambiente acquoso circostante. Le lunghe catene idrofobiche tendono ad interagire tra loro mentre le teste idrofiliche, che sono polari, tenderanno a interagire con le molecole d'acqua, pure loro polari. Questo raggruppamento ha lo scopo di ridurre la quantità di superficie idrofobica esposta all'acqua e di ridurre il numero di molecole H_2O che si trovano nello strato organizzato all'interfaccia acqua-lipide e, in definitiva, aumentare l'entropia del sistema. Sono le interazioni idrofobiche a spingere verso la formazione e successivamente il mantenimento di queste strutture [4].

Micelle

Le micelle sono strutture sferiche di dimensioni relativamente piccole (diametro inferiore ai 20 nm [2]) che contengono al massimo qualche migliaio di fosfolipidi. La disposizione è tale che le catene idrofobiche stanno all'interno, nascoste all'acqua e le teste idrofiliche sono rivolte verso l'esterno in contatto con la fase acquosa.

La formazione delle micelle è favorita quando l'area della sezione trasversale della testa polare è superiore a quella della catena (es: acidi grassi, lisofosfolipidi) [4].

Doppi strati

Quando le aree della sezione trasversale della testa e della coda sono simili, non potendosi formare micelle, i fosfolipidi si aggregano in un doppio strato. Le porzioni idrofobiche dei due monostrati interagiscono tra di loro, mentre le teste polari sono disposte sulla superficie in contatto con l'acqua. Le dimensioni di un doppio strato possono essere dell'ordine di $10^6 nm$ [2].

Liposomi

Queste strutture si formano per ripiegamento su se stesso di un doppio strato fosfolipidico. In questo modo i *bilayers* perdono l'idrofobicità dei bordi che restano esposti all'acqua nella struttura aperta e acquistano la massima stabilità in ambiente acquoso. I liposomi includono acqua nella loro cavità interna isolata dal resto del sistema [4].

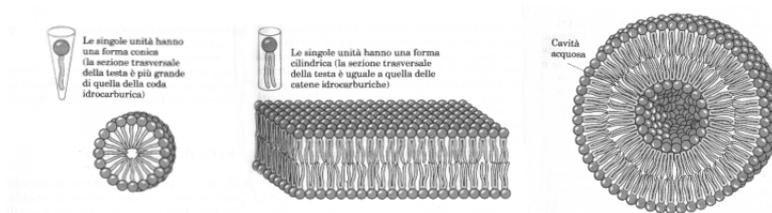


Figura 1.2: Raffigurazione delle possibili strutture formate dai fosfolipidi. Da sinistra verso destra: micella, doppio strato e liposoma [4].

1.2.2 Membrane cellulari

Il livello più complesso di assemblamento delle molecole fosfolipidiche è senz'altro rappresentato dalle membrane cellulari. Queste sono costituite da un doppio strato chiuso a formare un liposoma ma a differenza di questo, oltre ai fosfolipidi, sono presenti anche altri elementi quali le proteine di membrana, carboidrati e colesterolo. Oltre ad un elevato numero di diversi tipi di fosfolipidi, sono presenti anche diversi tipi di proteine che si dividono essenzialmente in due categorie: periferiche se interagiscono con le teste polari dei fosfolipidi e integrali se invece interagiscono con le code idrofobiche e pertanto attraversano l'intero doppio strato.

Basandosi sulle proprietà dinamiche delle proteine nelle membrane, S. L. Singer e G. Nicolson proposero nel 1972 un modello a mosaico fluido per l'organizzazione complessiva delle membrane biologiche [5]. Le membrane furono intese come soluzioni bidimensionali di lipidi orientati e proteine globulari. Il doppio strato svolge il doppio ruolo di solvente per le proteine

integrali e di barriera di permeabilità. La libertà di movimento è sia laterale nella matrice, sia può avvenire il fenomeno del trasferimento da un versante all'altro della membrana. Mentre il primo fenomeno è rapido e non è impedito da nulla, nel secondo caso la richiesta energetica ne allunga parecchio la scala temporale. Perciò una molecola fosfolipidica, per subire il flip-flop attraverso una membrana, impiega un intervallo di tempo pari a circa 10^9 volte quello che impiega per diffondere nella direzione laterale di 50 Å [6].

Continue ricerche hanno però rivelato alcune semplificazioni e limitazioni nella teoria originale. Per esempio, i canali proteici sono descritti come aventi un canale acquoso continuo attraverso il loro centro, e ciò è ormai noto essere generalmente falso tranne alcune eccezioni. Inoltre, la libera diffusione della superficie della cellula è spesso limitata ad aree di pochi decimi di nanometro. Questi limiti alla fluidità laterale sono dovuti agli agganci del citoscheletro, eterogeneità nelle fasi lipidiche e strutture di proteine aggregate. Studi contemporanei indicano anche che una parte molto minore di quello che si pensava è costituita da puro lipide e infatti buona parte della della superficie cellulare è legata a proteine. A dispetto di queste limitazioni, il modello a mosaico fluido resta popolare e spesso utilizzato come riferimento generale per la struttura delle membrane cellulari [7], [8]. L'aumento di insaturazione nelle catene degli acidi grassi dei fosfolipidi di membrana favorisce l'abbassamento del punto di fusione T_m , in quanto queste insaturazioni, tutte di tipo *cis*, sfavoriscono l'impacchettamento delle catene. In Figura 1.3 è riportata un'immagine di come appare la membrana modello.

1.3 Struttura molecolare e proprietà dei monostrati fosfolipidici 11

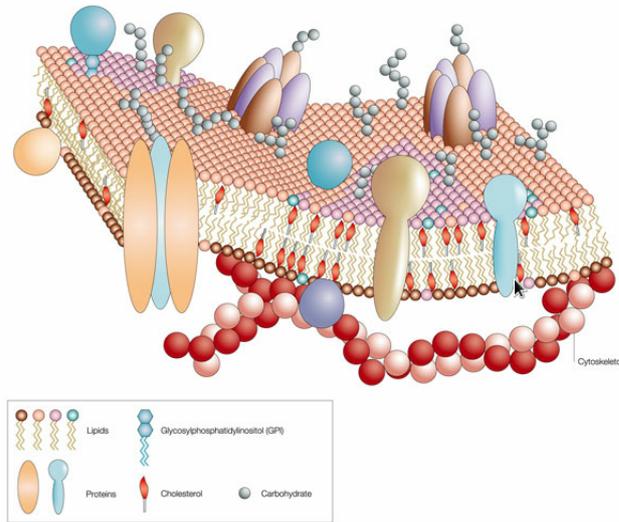


Figura 1.3: Rappresentazione di una membrana modello. I simboli in legenda sono, in ordine da sinistra a destra e dall'alto in basso: lipidi, (GPI), proteine, colesterolo, carboidrato. Le sfere rosse e rosa sono il citoscheletro [9].

1.3 Struttura molecolare e proprietà dei monostrati fosfolipidici

1.3.1 Isoterme di monostrati di molecole anfifiliche

La superficie di un liquido possiede sempre un eccesso di energia libera dovuta al fatto che le molecole più esterne, non essendo circondate completamente da altre come nel caso *bulk*, non possono formare legami che stabilizzino il sistema. Esempio è il caso dei legami a ponte di H per l'acqua che, ovviamente, non si formano sul lato delle molecole esposto verso l'esterno. La tensione superficiale (γ) di un'interfaccia piana è data dall'equazione differenziale:

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial s} \right)_{T,P,n_i} \quad (1.1)$$

dove G è l'energia libera di Gibbs del sistema, s è l'area della superficie, e la temperatura T , la pressione P e la composizione molecolare n_i sono tenute costanti. La tensione superficiale dell'acqua a 20 °C e 1 atm è 73 mN/m.

121.3 Struttura molecolare e proprietà dei monostrati fosfolipidici

Quando un qualunque materiale anfifilico, come ad esempio dei fosfolipidi in soluzione di un solvente non miscibile con acqua, viene disperso sulla superficie acquosa si diffonde velocemente per coprire tutta l'area a propria disposizione. Quando il solvente evapora restano le molecole con le teste polari immerse in acqua e le code apolari che sono respinte verso l'esterno.

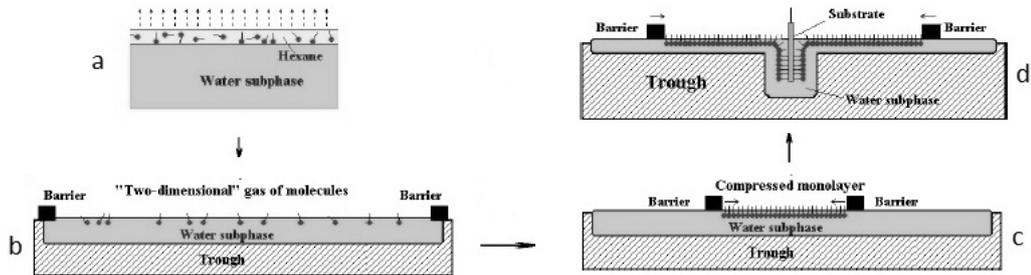


Figura 1.4: (a) Appena disperso il campione di fosfolipide in soluzione è necessario lasciare che il solvente evapori, (b) quando l'area per molecola è molto elevata il sistema si trova nella fase di gas bidimensionale, (c) comprimendo le barriere si forzano le code idrofobiche ad allinearsi verticalmente. In (d) è schematizzata la procedura di deposizione del monostrato su un substrato [10].

Quando la distanza intermolecolare è grande, le loro interazioni sono scarse e il sistema è visto come una fase di gas bidimensionale. In questa condizione il film influenza poco la tensione superficiale dell'acqua che sarà pertanto simile a quella dell'acqua pura. Se viene utilizzato un sistema di barriere mobili per comprimere il film, l'area a disposizione per ciascuna molecola si riduce e si introduce pertanto un fenomeno repulsivo tra di esse. Questo equivalente bidimensionale della pressione prende il nome di pressione superficiale e viene indicata con la lettera greca (Π).

$$\Pi = \gamma - \gamma_0 \quad (1.2)$$

dove γ è la tensione superficiale del sistema in assenza di un monostrato disperso e γ_0 è la tensione superficiale dell'acqua col monostrato presente.

1.3 Struttura molecolare e proprietà dei monostrati fosfolipidici 13

Per circa un secolo, la principale risorsa per ottenere informazioni sulla termodinamica dei monostrati è stata la misura dell'isoterma Π -A. Un esempio generico è riportato in Figura 1.5.

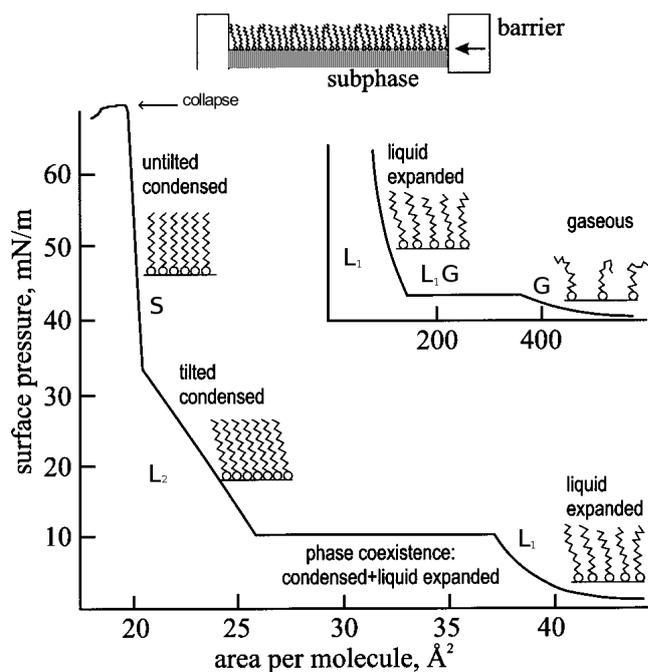


Figura 1.5: Rappresentazione schematica di una tipica isoterma di molecole anfifiliche [11].

L'area del monostrato varia muovendo le barriere sulla superficie dell'acqua. La tensione superficiale è misurata con una targhetta seguendo una procedura descritta in 1.3.2. In Figura 1.5 sono evidenziate chiaramente le varie fasi attraverso cui passa il monostrato. La fase iniziale molto diluita, con un area per molecola dell'ordine di centinaia di Å² è descritta come un gas bidimensionale (G). Al diminuire dell'area per molecola, il monostrato procede nella fase comunemente chiamata di liquido espanso (LE). In questa fase non è rilevabile alcun segnale di diffrazione di raggi X, presumibilmente, le teste delle molecole sono traslazzionalmente disordinate e le catene sono conformazionalmente disordinate.

Un'ulteriore compressione del monostrato produce una transizione da li-

141.3 Struttura molecolare e proprietà dei monostrati fosfolipidici

quido espanso a liquido condensato (LC) attraverso un *plateau* che indica una transizione del primo ordine. Il *plateau* non è perfettamente orizzontale nella maggior parte dei casi, e questo ha causato parecchi dibattiti sul considerarla o meno una transizione di fase. Le attuali teorie su questo andamento non orizzontale sono basate sulla formazione di piccoli aggregati molecolari o micelle superficiali [12]. La variazione entropica associata a questo cambiamento di fase è esprimibile come:

$$\Delta S = \frac{d\Pi_c}{dT} \Delta A \quad (1.3)$$

dove $\Pi_c(T)$ è la pressione di transizione [11].

Il monostrato è meno comprimibile nello stato di liquido condensato che in quello di liquido espanso. Procedendo con la compressione si osserva talvolta un ulteriore piegamento spiegabile come una transizione da liquido compresso a solido (S). E' difficile da osservare e l'unica differenza dallo stato LC pare essere il piegamento delle code idrofobiche rispetto alla superficie dell'acqua [11]. Nella fase solida sono perfettamente perpendicolari all'interfaccia aria-acqua, mentre nella fase liquido-compresso formano un angolo inferiore a 90°. Questo è stato osservato ai raggi X [11].

Molecole anfifiliche

In Figura 1.6 sono mostrate le strutture di molecole anfifiliche tipicamente studiate. Ciascuna molecola consiste di una coda idrofobica (in genere idrocarburi) e una testa formata da un gruppo idrofilico immersa in acqua. I gruppi che formano la testa possono essere neutri (b), oppure ionizzati sotto opportune condizioni di pH della subfase (a). Le molecole anfifiliche più frequentemente incontrate in natura, e quindi più interessanti da studiare, sono i fosfolipidi.

1.3.2 Teoria di base della tensiometria

La tensione superficiale Π viene misurata immergendo parzialmente in acqua una targhetta rettangolare di materiale assorbente (*Wilhelmy plate*) e andan-

1.3 Struttura molecolare e proprietà dei monostrati fosfolipidici 15

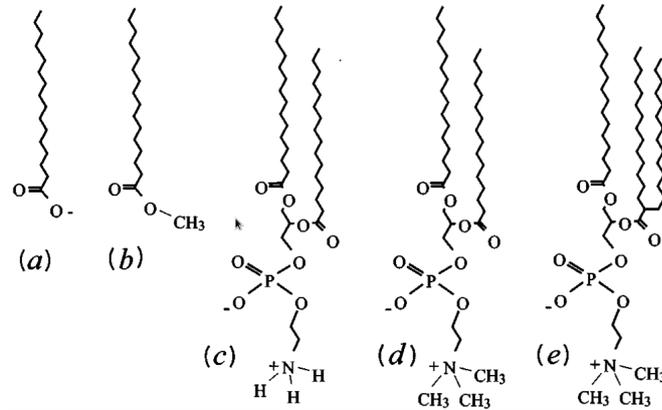


Figura 1.6: Esempi di comuni molecole lipidiche che formano film di Langmuir sulla superficie dell'acqua: (a) acido grasso, (b) metil estere di acido grasso, (c)-(e) fosfolipidi: (c) *diacylphosphatidylethanolamine*, (d) *diacylphosphatidylcholine*, (e) *diacylphosphatidylcholine* con una ramificazione alifatica [11].

do a vedere quale deve essere la forza necessaria per equilibrare l'attrazione dovuta alla tensione superficiale stessa [13]. Si prenda un parallelepipedo di dimensioni l , w_P e t_P come mostrato in Figura 1.7, con densità ρ_P e immerso ad una profondità h in un liquido a densità ρ_L .

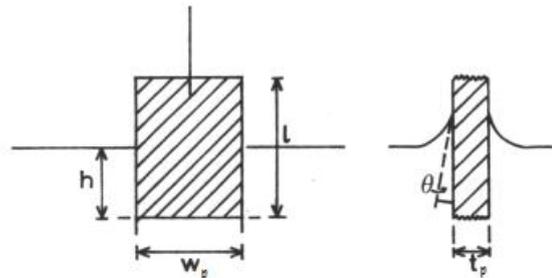


Figura 1.7: Rappresentazione schematica di una targhetta per misurare Π [13].

La forza netta che agisce su questa targhetta è orientata verso il basso e può essere formulata come segue:

$$F = \rho_P g l w_P t_P + 2\gamma(t_P + w_P) \cos \theta - \rho_L g t_P w_L h \quad (1.4)$$

Forza = peso + tensione superficiale – spinta di galleggiamento

θ è l'angolo di contatto con il liquido, γ è la tensione superficiale e g è l'accelerazione di gravità.

Prima di fare una qualunque misura si azzera il riferimento in modo da eliminare il termine di peso [14]:

$$F = 2\gamma(t_P + w_P) \cos \theta - \rho_L g t_P w_L h \quad (1.5)$$

Forza = tensione superficiale – spinta di galleggiamento

L'equazione 1.5 determina le forze che agiscono sulla targhetta nel caso di un tensiometro dinamico.

Quando si effettua una misura assoluta, la targhetta viene tenuta in contatto minimo con il liquido in modo che il suo bordo inferiore sia all'altezza della superficie del liquido stesso [14]. Questo accorgimento elimina il termine di spinta di galleggiamento, riducendo l'equazione 1.5 a:

$$F = 2\gamma(t_P + w_P) \cos \theta \quad (1.6)$$

Infine, se l'angolo di contatto liquido - targhetta è 0° , e $t_P \ll w_P$, l'espressione si riduce ulteriormente ed esplicitando la tensione superficiale si ottiene:

$$\gamma = \frac{F}{2w_P} \quad (1.7)$$

dove γ è in mN/m, la forza in mN e la larghezza della targhetta in m [14].

1.4 Farmaci

Interazione dei farmaci con le membrane fosfolipidiche modello

Molti farmaci con differenti strutture chimiche ed effetti farmacologici sono noti per legarsi alle membrane fosfolipidiche e per alterarne le proprietà fisiche. Esempi tipici includono alcuni anestetici [15], [16], steroidi [17], farmaci anti-psicotici [18], così come alcuni farmaci contro il cancro [19], alcuni antibatterici [20], degli antivirali e antibiotici come gli aminoglicosidi

[21] o i macrolidi [22]. L'attività biologica e/o la tossicità di molti farmaci dipende direttamente dalla loro interazione con le membrane biologiche [23]. I farmaci utilizzati in questo lavoro appartengono alla categoria dei macrolidi. Questi costituiscono un gruppo di farmaci (tipicamente antibiotici) la cui attività dipende dalla presenza di un anello macrolide (di solito costituito da 14-, 15-, 16- termini) di tipo lattonico (estere ciclico) al quale sono attaccati uno o più deossi-zuccheri (un gruppo OH viene rimpiazzato da un H semplice) [24]. La struttura tipica di un farmaco macrolide è riportata nelle Figure 1.8 e 1.9.

La maggior parte di macrolidi sono prodotti da *Actinomycetes*, un particolare tipo di batteri, e altri batteri. Anche funghi, licheni, alghe, alcuni tipi di piante, alcuni vertebrati, invertebrati e insetti sono organismi produttori di macrolidi [25].

Gli antibiotici macrolidi sono utilizzati per trattare le infezioni causate da batteri Gram-positivi, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* che provocano infezioni alle vie respiratorie e ai tessuti molli. Essi agiscono bloccando la sintesi di proteine dei batteri interferendo con le loro subunità ribosomiali [26]. In questo lavoro sono stati studiati due antibiotici macrolidi: Aivlosin e Claritromicina. Di seguito ne viene data una breve caratterizzazione.

Aivlosin

Aivlosin (*3-acetyl-4 isovaleryltiylosin*) è un antibiotico che ha recentemente trovato impiego come possibile antivirale, brevettato per trattare malattie dei maiali (*Porcine Proliferative Enteropathy, Swine Dysentery and Enzootic Pneumonia*) e del pollame (*Mycoplasma Pneumonia, Necrotic Enteritis*). Aivlosin è stato disponibile nella forma *tartrata* sotto forma di granuli, con peso molecolare 1192 u.m.a. La forma salina usata in questo lavoro è facilmente solubile in acqua.

Aivlosin è assorbito rapidamente e si concentra nei tessuti bersaglio, particolarmente nei polmoni e nell'intestino. È molto efficiente dal punto di

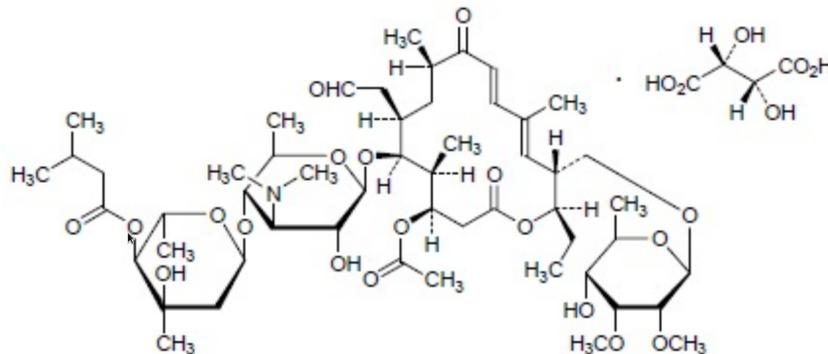


Figura 1.8: Formula di struttura di Aivlosin [27].

vista clinico e raggiunge il picco di livello terapeutico nel plasma sanguigno entro due ore dalla somministrazione [28].

Aivlosin è stato scelto per questo lavoro proprio per la sua caratteristica di innovazione, il suo basso costo e perchè ad alte concentrazioni, sembra avere un effetto sia di antibiotico che di antivirale [29]. Infatti può essere usato per trattare un largo numero di virus incluso PRRS (*Porcine reproductive and respiratory syndrome*), virus, virus influenzali, virus dell'epatite C, virus Ebola, SARS CoV, virus Coxsackie B3 e B5, oltre che per trattamenti simultanei di infezioni batteriche e virali.

Sono stati riscontrati alcuni effetti collaterali negli animali. Effetti maternotossici sono stati osservati nei roditori alle concentrazioni di 400 mg per Kg di peso corporeo. Nei topi è stato osservato un leggero calo del peso fetale a concentrazioni che non causano effetti maternotossici [30].

Clarithromicina

Clarithromicina è un antibiotico macrolide chimicamente affine a Eritromicina e Azitromicina. Chimicamente è *6-O-methylerythromycin*. La sua formula molecolare è $C_{38}H_{69}NO_{13}$ e il peso molecolare è 748 u.m.a. . E' utilizzato per trattare faringiti, tonsilliti, sinusiti mascellari acute, esacerbazioni batteriche acute di bronchiti croniche, polmonite e infezioni alla pelle negli esseri umani [32].

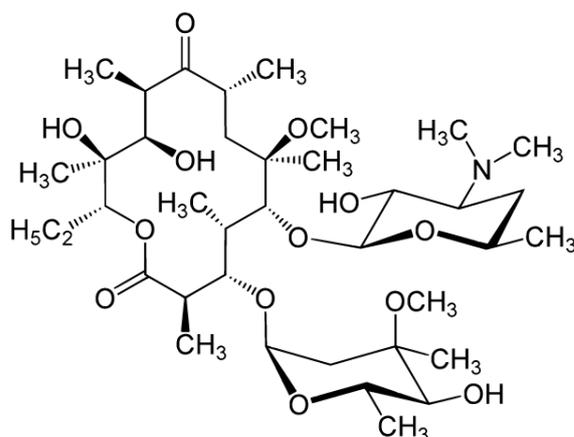


Figura 1.9: Formula di struttura della Claritromicina [31].

Possibili effetti collaterali di Claritromicina possono includere: nausea, vomito, diarrea, dolori addominali [33].

Clarithromicina si presenta in forma di polvere cristallina, difficilmente solubile in acqua pura ma solubile in ambiente acido ($\text{pH} < 7$). Claritromicina è stata scelta in questo lavoro per via del suo carattere anfifilico e per la sua alta solubilità a bassi valori di pH . È stato scoperto un effetto antivirale anche per questo farmaco. Un possibile meccanismo d'azione contro i virus è il seguente: quando il virus entra nella cellula, le sue molecole sono racchiuse in piccole vescicole (liposomi); quando il pH all'interno dei liposomi è minore che all'esterno, la solubilità di Claritromicina dovrebbe essere favorita al loro interno, dove potrebbe combattere il virus localmente ad una concentrazione superiore al normale. È possibile che questo meccanismo sia analogo a quello di Aivlosin [29].

In aggiunta, Claritromicina ha una struttura simile a quella di Azitromicina e, come altri farmaci della categoria dei Macrolidi, può rappresentare un valido controllo sui diversi effetti sui sistemi lipidici e un confronto con Aivlosin.

Entrambi gli antibiotici introdotti sono basi deboli: mentre possono muoversi attraverso le membrane nella forma non modificata, nella forma proto-

nata sono intrappolati nella regione a basso pH all'interno dell'endosoma (è un corpo vescicolare, presente nella cellula, il cui compito è quello di partecipare all'endocitosi, ovvero al meccanismo cellulare che permette il transito attraverso la membrana di macromolecole e corpuscoli, le cui dimensioni non consentono l'ingresso attraverso i meccanismi del trasporto di membrana).

1.5 Fondamenti di reologia interfacciale

1.5.1 Generalità

La reologia di interfaccia (o reologia 2-D) può essere matematicamente formulata considerando i casi di sistemi bidimensionali puramente elastici e puramente viscosi, che possono essere presi come buone approssimazioni per monostrato di surfattanti insolubili nel caso in cui la viscosità delle due fasi (subfase acquosa e fase 2-D) siano sufficientemente piccole.

Nella seguente trattazione verranno considerate solo piccole perturbazioni, perchè solo in questo caso è possibile derivare le semplici relazioni lineari ed è possibile applicare il principio di sovrapposizione appena esposto.

1.5.2 Mezzo bidimensionale puramente elastico

Si consideri un monostrato di surfattante insolubile, in fase solida. Il tensore dello *stress* applicato alla superficie, $\hat{\sigma}$, sarà rappresentato dalla somma del termine non perturbato $\hat{\sigma}_0$ e della perturbazione $\Delta\hat{\sigma}$ [34]:

$$\hat{\sigma}_0 = \sigma_0 \cdot \begin{vmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{vmatrix} + \begin{vmatrix} \sigma_{11} - \sigma_0 & \sigma_{12} \\ \sigma_0 & \sigma_{22} - \sigma_0 \end{vmatrix} \quad (1.8)$$

Ciascun termine $\sigma_{i,j}$ rappresenta la componente i -esima della forza per unità di lunghezza che agisce lungo la direzione perpendicolare all'asse individuato da j . In quanto tensore, $\hat{\sigma}$, non dipende dalla scelta del sistema di riferimento; in aggiunta, è bene ricordare che non sempre è simmetrico come dovrebbe risultare dall'applicazione di una tensione ad una superficie bidimensionale, ma può sempre essere scomposto nella somma di una componente simmetrica e di una anti-simmetrica.

Lo spostamento dei punti di una superficie piana, in conseguenza di uno *stress* σ , è determinato dal vettore spostamento $\vec{u}(x, y, t) = (u_x(x, y, t), u_y(x, y, t))$. Siccome una traslazione dell'intera superficie non produce alcun spostamento, è necessario che venga sottratta questa componente dal tensore degli

spostamenti. Si ottiene quindi [34]:

$$\hat{\gamma} \equiv \left\| \begin{array}{cc} \frac{\partial u_x}{\partial x} & \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_x}{\partial y} + \frac{\partial u_y}{\partial x} \right) \\ \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_x}{\partial y} + \frac{\partial u_y}{\partial x} \right) & \frac{\partial u_y}{\partial y} \end{array} \right\| \quad (1.9)$$

questo è il cosiddetto tensore di deformazione. Non esiste, in generale, una proporzionalità diretta tra $\Delta\hat{\sigma}$ e $\hat{\gamma}$ in quanto lo *stress* è costituito da due termini:

$$\Delta\hat{\sigma} = \Delta\hat{\sigma}_i + \Delta\hat{\sigma}_d = \left\| \begin{array}{cc} (\Delta\sigma_{xx} + \Delta\sigma_{yy})/2 & 0 \\ 0 & (\Delta\sigma_{xx} + \Delta\sigma_{yy})/2 \end{array} \right\| + \left\| \begin{array}{cc} (\Delta\sigma_{xx} - \Delta\sigma_{yy})/2 & \sigma_{xy} \\ \sigma_{yx} & (\Delta\sigma_{xx} - \Delta\sigma_{yy})/2 \end{array} \right\| \quad (1.10)$$

dove $\Delta\hat{\sigma}_i$ è la parte isotropica del tensore, mentre $\Delta\hat{\sigma}_d$ corrisponde al residuo non isotropico.

In via del tutto simile, per il tensore di deformazione si ha:

$$\hat{\gamma} = \hat{\gamma}_i + \hat{\gamma}_d = \left\| \begin{array}{cc} \left(\frac{\partial u_x}{\partial x} + \frac{\partial u_y}{\partial y} \right) / 2 & 0 \\ 0 & \left(\frac{\partial u_x}{\partial x} + \frac{\partial u_y}{\partial y} \right) / 2 \end{array} \right\| + \left\| \begin{array}{cc} \left(\frac{\partial u_x}{\partial x} - \frac{\partial u_y}{\partial y} \right) / 2 & \left(\frac{\partial u_x}{\partial y} + \frac{\partial u_y}{\partial x} \right) / 2 \\ \left(\frac{\partial u_x}{\partial y} + \frac{\partial u_y}{\partial x} \right) / 2 & \left(\frac{\partial u_y}{\partial y} - \frac{\partial u_x}{\partial x} \right) / 2 \end{array} \right\| \quad (1.11)$$

e per una superficie puramente elastica risultano valide le seguenti espressioni [34]:

$$\Delta\hat{\sigma}_i = k_i \hat{\gamma}_i \quad (1.12)$$

$$\Delta\hat{\sigma}_d = k_d \hat{\gamma}_d \quad (1.13)$$

dove k_i e k_d sono due costanti indipendenti che caratterizzano le proprietà elastiche di un mezzo continuo bidimensionale soggetto a piccole perturbazioni.

Deformazione isotropica

Si consideri una piccola porzione quadrata di un monostrato di surfattante allo stato solido di lato L e lo si sottoponga ad una deformazione isotropica ΔL [34] come mostrato in Figura 1.10. L'area $A = L^2$ subirà una

deformazione $\Delta A = 2L\Delta L$ (trascorrendo il termine quadratico in ΔL) da cui $\Delta L/L = \Delta A/2A$. In aggiunta, per una deformazione isotropa vale

$$\frac{\partial u_x}{\partial x} = \frac{\partial u_y}{\partial y} = \frac{\Delta L}{L} \quad (1.14)$$

Si avrà pertanto, dalla 1.10 e dalla 1.11

$$\Delta \hat{\sigma} = \Delta \hat{\sigma}_i = \begin{vmatrix} \Delta \sigma & 0 \\ 0 & \Delta \sigma \end{vmatrix} = \Delta \sigma \cdot \hat{1} \quad (1.15)$$

$$\hat{\gamma} = \hat{\gamma}_i = \begin{vmatrix} \frac{\Delta A}{2A} & 0 \\ 0 & \frac{\Delta A}{2A} \end{vmatrix} = \frac{\Delta A}{2A} \cdot \hat{1} \quad (1.16)$$

Da tutto ciò segue che

$$\Delta \sigma = k_i \frac{\Delta A}{2A} \quad (1.17)$$

da cui si ritrova nuovamente il modulo elastico di superficie, definito come $E \equiv \frac{\Delta \sigma}{\Delta A/A}$:

$$k_i = 2E \quad (1.18)$$

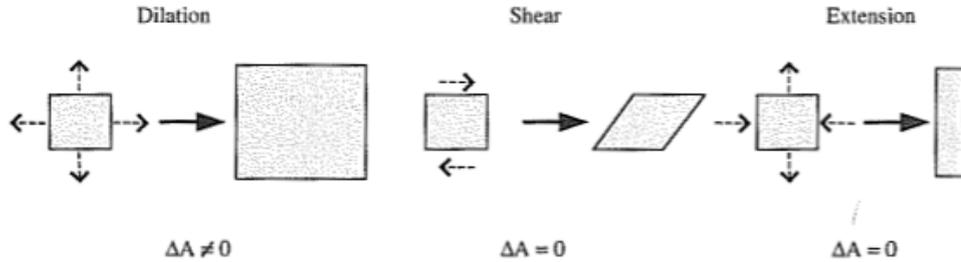


Figura 1.10: Rappresentazione dei principali modi di dilatazione di un sistema bidimensionale. *Dilation* = dilatazione, *Shear* = deformazione di taglio, *Extension* = estensione, [35].

Deformazione di taglio

Si consideri ora un monostrato di surfattante sottoposto ad una deformazione di puro taglio lungo l'asse x [34] come mostrato nella seconda immagine di Figura 1.10.

In questa situazione si ha che solo $\frac{\partial u_x}{\partial y} \neq 0$ e $\Delta\sigma_{xx} = \Delta\sigma_{yy} = 0$, perciò, da 1.10 e da 1.11 si ottiene:

$$\Delta\hat{\sigma} = \Delta\hat{\sigma}_d = \Delta\sigma_{xy} \left\| \begin{array}{cc} 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{array} \right\| \quad (1.19)$$

$$\hat{\gamma} = \hat{\gamma}_d = \frac{1}{2} \frac{\partial u_x}{\partial y} \left\| \begin{array}{cc} 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{array} \right\| \quad (1.20)$$

Sostituendo i risultati trovati in 1.13, si ottiene:

$$\Delta\sigma_{xy} = \frac{k_d}{2} \frac{\partial u_x}{\partial y} \quad (1.21)$$

in cui si definisce il modulo di *stress* di taglio:

$$k_d = 2G \quad (1.22)$$

1.5.3 Mezzo bidimensionale puramente viscoso

La formulazione tensoriale delle equazioni reologiche per un liquido puramente viscoso bidimensionale si ottiene rimpiazzando le componenti del vettore di spostamento u_x e u_y con le componenti della velocità della perturbazione v_x e v_y .

Al tensore della velocità di deformazione va sottratta la componente antisimmetrica che rappresenta la rotazione compatta di tutto il film e che non ne cambia lo stato fisico. Risulta perciò un tensore di velocità di deformazione [34]:

$$\hat{\gamma} \equiv \hat{v} = \hat{v}_i + \hat{v}_d \quad (1.23)$$

$$\hat{v}_i \equiv \left\| \begin{array}{cc} \left(\frac{\partial v_x}{\partial x} + \frac{\partial v_y}{\partial y} \right) / 2 & 0 \\ 0 & \left(\frac{\partial v_x}{\partial x} + \frac{\partial v_y}{\partial y} \right) \end{array} \right\| \quad (1.24)$$

$$\hat{v}_d \equiv \left\| \begin{array}{cc} \left(\frac{\partial v_x}{\partial x} - \frac{\partial v_y}{\partial y} \right) / 2 & \left(\frac{\partial v_x}{\partial y} + \frac{\partial v_y}{\partial x} \right) / 2 \\ \left(\frac{\partial v_x}{\partial y} + \frac{\partial v_y}{\partial x} \right) / 2 & \left(\frac{\partial v_x}{\partial y} - \frac{\partial v_y}{\partial x} \right) \end{array} \right\| \quad (1.25)$$

In analogia con 1.12 e 1.13 si definiscono [34]:

$$\Delta\hat{\gamma}_i = m_i \hat{v}_i \quad (1.26)$$

$$\Delta\hat{\gamma}_d = m_d\hat{v}_d \quad (1.27)$$

dove m_i e m_d sono costanti legate alla viscosità superficiale di taglio η e alla viscosità superficiale di dilatazione η_d .

Deformazione isotropica

Nel caso di deformazione dovuta alla pura dilatazione si ha [34]:

$$\frac{\partial v_x}{\partial y} = \frac{\partial v_y}{\partial x} = 0, \quad \frac{\partial v_x}{\partial x} = \frac{\partial v_y}{\partial y} = \frac{\dot{L}}{L} = \frac{\dot{A}}{2A} \quad (1.28)$$

Dall' equazione 1.24

$$\hat{v} = \hat{v}_i = \frac{\dot{A}}{2A}\hat{1} \quad (1.29)$$

e combinando 1.15, 1.26 e 1.29 si ottiene la viscosità superficiale di dilatazione:

$$\eta_d = \Delta\sigma/\frac{\dot{A}}{A}, \quad m_i = 2\eta_d \quad (1.30)$$

Deformazione di taglio

Nel caso invece di deformazione puramente di taglio [34]:

$$\hat{v} = \hat{v}_d = \frac{1}{2} \frac{\partial v_x}{\partial y} \left\| \begin{array}{cc} 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{array} \right\| \quad (1.31)$$

Combinando 1.27, 1.19 e 1.31 si ottiene la viscosità superficiale di taglio:

$$\eta \equiv \Delta\gamma_{xy}/\frac{\partial v_x}{\partial y}, \quad m_d = 2\eta \quad (1.32)$$

1.5.4 Modelli meccanici di mezzi bidimensionali continui

E' noto dagli esperimenti che i mezzi bidimensionali (vale anche per quelli tridimensionali) reali mostrano un carattere che è sia elastico (legato a processi reversibili) che viscoso (legato a processi irreversibili).

Tra i vari modelli che si usano per descrivere fenomenologicamente queste condizioni miste si possono brevemente citare il *modello di Kelvin-Voigt* e il *modello di Maxwell* [36].

Il primo è rappresentato dalle equazioni tensoriali [34]:

$$\Delta\hat{\sigma}_i = 2E\hat{\gamma}_i + 2\eta_d\hat{\dot{\gamma}}_i \quad (1.33)$$

$$\Delta\hat{\sigma}_d = 2G\hat{\gamma}_d + 2\eta\hat{\dot{\gamma}}_d \quad (1.34)$$

Come si può osservare dalla Figura 1.11, questo modello è schematizzato

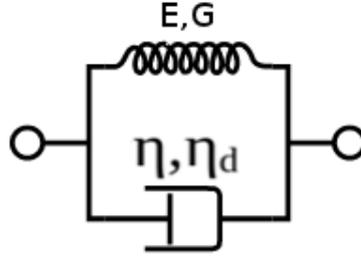


Figura 1.11: Modello di Kelvin-Voigt: il ramo superiore rappresenta la componente elastica, il ramo inferiore quella viscosa, immagine modificata da [34].

da una componente che simula la viscosità in parallelo ad una che simula l'elasticità del mezzo. Qualitativamente parlando, ciò significa che se viene applicato uno *stress* rapido al sistema, si ha una risposta elastica su tempi brevi che viene soppiantata dal carattere viscoso su tempi lunghi. Quando si rilascia lo *stress*, il sistema ha la tendenza a raggiungere nuovamente l'equilibrio, ma l'elemento viscoso rallenta il rilassamento.

Il secondo invece è rappresentato dalle equazioni tensoriali [34]:

$$\Delta\hat{\sigma}_i + (E/\eta_d)\Delta\hat{\sigma}_i = 2E\hat{\dot{\gamma}}_i \quad (1.35)$$

$$\Delta\hat{\sigma}_d + (G/\eta)\Delta\hat{\sigma}_d = 2G\hat{\dot{\gamma}}_d \quad (1.36)$$

In questo caso l'elemento viscoso e quello elastico sono accoppiati in serie. In via del tutto qualitativa questo modella un comportamento caratterizzato da una risposta elastica per *stress* che agiscono su scale temporali brevi,



Figura 1.12: Modello di Maxwell: la componente viscosa è in serie con quella elastica, immagine modificata da [34].

mentre per *stress* che agiscono su scale temporali maggiori la risposta sarà prevalentemente viscosa.

1.6 Reologia interfacciale di taglio su monostrati fosfolipidici

1.6.1 Generalità

La reologia di monostrati fosfolipidici dispersi all'interfaccia aria-acqua è da molti anni un importante argomento di ricerca scientifica in quanto le proprietà dinamiche di questi surfattanti cambiano considerevolmente in una geometria confinata bidimensionale rispetto al caso *bulk*. Sebbene siano sufficienti piccoli sforzi per deformare questi sistemi, l'informazione che si ricava dalla misura della forza di taglio applicata (per diverse deformazioni γ e per diversi tassi di deformazione $\dot{\gamma}$) in diverse condizioni termodinamiche (temperatura T e pressione superficiale Π) completa considerevolmente le informazioni che si possono ottenere dalle sole isoterme $\Pi - A$. Con questa tecnica reologica risulta dunque possibile uno studio della dinamica dei monostrati di fosfolipidi non accessibile in altro modo [37].

1.6.2 La tecnica della reologia interfacciale di taglio

Nella prima parte del presente lavoro è stata impiegata un'apparecchiatura ISR (*Interfacial Stress Rheology*) per verificare alcune misure precedente-

mente effettuate su campioni di DPPC interagenti con i farmaci Aivlosin e Claritromicina. Da questo lavoro emergeva un comportamento viscoelastico dei monostrato modellizzabile col modello di Maxwell [38].

Le misure ISR sono ottenute inducendo un'oscillazione su un aghetto uniformemente magnetizzato che fluisce sulla superficie dell'acqua, circondato dal monostrato fosfolipidico. Lo *stress* sinusoidale $\sigma(\omega)$ è dato dal gradiente di campo magnetico generato al centro di una coppia di bobine in configurazione di Helmholtz. Lo *strain* $\gamma(\omega)$ che ne deriva e lo sfasamento tra i due $\delta(\omega)$ è misurato da una telecamera che rileva il movimento dell'ago. I due parametri registrati dal pc sono: il rapporto delle ampiezze AR (*Amplitude Ratio*), definito come il rapporto tra l'ampiezza di oscillazione dell'ago e l'ampiezza dello *stress*, e la differenza di fase δ .

Con l'obbiettivo di effettuare le misure di reologia su monostrati, si procede con una caratterizzazione preliminare della risposta inerziale dell'ago magnetizzato appoggiato all'interfaccia aria-acqua, in assenza di film superficiali e compiendo una scansione in frequenza.

Per modellizzare il comportamento di questo sistema si usa come riferimento la teoria dell'oscillatore armonico forzato-smorzato [39], [40].

L'equazione del moto contiene una componente viscosa e una componente di richiamo elastico, a sua volta costituita da due termini: il primo è dato dal gradiente dovuto alla curvatura del campo magnetico al centro delle bobine, mentre il secondo termine è dato dal gradiente che si crea per effetto dell'aggiunta, in una delle due bobine, di una corrente sinusoidale:

$$m\ddot{x} = -d\dot{x} - k(x - x_0) \quad (1.37)$$

dove k è la costante elastica il cui valore è determinato dalla curvatura e dall'intensità del campo magnetico al centro delle bobine e dalle proprietà magnetiche intrinseche dell'ago paramagnetico e m è la massa inerziale dell'ago, in quanto è l'unico oggetto in movimento, x_0 rappresenta la posizione assunta dal baricentro dell'ago, considerato puntiforme per semplicità di calcolo, in funzione dello stimolo sinusoidale esterno e può essere esplicitamente scritto come $F e^{i\omega t}$.

d è il coefficiente di trascinamento (*drag*) che, da simulazioni teoriche di fluidodinamica, per un corpo di forma cilindrica che fluisce nella direzione parallela al suo asse longitudinale sull'interfaccia aria-acqua, risulta esprimibile come:

$$d = \frac{2\pi\eta L}{\ln(0.43L/l_0)} \quad (1.38)$$

dove L è la lunghezza del cilindro, η è la viscosità *bulk* dell'acqua e l_0 è una quantità che definisce la scala di lunghezze della distanza alla quale la velocità del fluido bidimensionale può variare [41]. Siccome nel caso di ago appoggiato all'interfaccia aria-acqua, in assenza di film fosfolipidico, è difficile stabilire una divisione netta tra la regione *bulk* e la regione confinata in 2-D, si procede determinando d dal fit della curva sull'acqua e si ottiene $l_0 \simeq a$, dove a è il raggio dell'ago.

Applicando la sostituzione di x_0 in (1.37) si ottiene:

$$m\ddot{x} + d\dot{x} + kx = kFe^{i\omega t} \quad (1.39)$$

Si cerca poi una soluzione del tipo $x = \gamma e^{i\omega t}$ mettendo questa espressione in (1.39) ed eliminando l'esponenziale in quanto fattore moltiplicativo comune a tutti i termini:

$$\gamma(-m\omega^2 + id\omega + k) = kF \quad (1.40)$$

Il modulo dell'ampiezza dell'oscillazione forzata-smorzata e lo sfasamento *stress-strain* risultano essere:

$$|\gamma(\omega)| = \frac{\sigma}{\sqrt{(k - m\omega^2)^2 + (d\omega)^2}} \quad (1.41)$$

$$\delta(\omega) = \arctan\left(-\frac{d\omega}{k - m\omega^2}\right) \quad (1.42)$$

dove $\sigma = kF$ è l'ampiezza dello *stress* espresso in Newton.

I valori dei parametri dell'oscillatore (precedentemente ottenuti sullo stesso strumento [42]) possono essere determinati effettuando un fit sulla curva AR per l'acqua pura. In aggiunta, ad alte frequenze si ha:

$$AR \propto \frac{\alpha}{m\omega^2} \quad (1.43)$$

questo consente la determinazione del fattore di calibrazione α , specifico per ogni sessione di misura.

La forza che agisce sul dipolo magnetico $|\vec{m}|$, e che induce un'oscillazione della sua posizione, è data dal prodotto tra questo e il gradiente del campo magnetico al centro delle bobine:

$$f = |\vec{m}| \frac{\partial B_{tot}(t)}{\partial x} \quad (1.44)$$

Supponendo che la corrente sinusoidale venga aggiunta sulla seconda bobina si ha:

$$B_{tot}(t) = B_1 + B_2(t) = \frac{\mu_0 I R^2}{2(R^2 + (x + \frac{R}{2})^2)^{\frac{3}{2}}} + \frac{\mu_0 (I + I_0 e^{i\omega t}) R^2}{2(R^2 + (x - \frac{R}{2})^2)^{\frac{3}{2}}} \quad (1.45)$$

da cui il gradiente:

$$\frac{\partial B_{tot}(t)}{\partial x} = \frac{3}{2} \frac{\mu_0 I R^2 (x + \frac{R}{2})}{(R^2 + (x + \frac{R}{2})^2)^{\frac{5}{2}}} + \frac{3}{2} \frac{\mu_0 (I + I_0 e^{i\omega t}) R^2 (x - \frac{R}{2})}{(R^2 + (x - \frac{R}{2})^2)^{\frac{5}{2}}} \quad (1.46)$$

dove μ_0 è la costante di permeabilità magnetica, R è il raggio delle bobine di Helmholtz, I è la corrente che circola nelle bobine e x è la distanza dal centro del sistema di due bobine.

In presenza di film fosfolipidico, si definisce il modulo dinamico di superficie $G_s^*(\omega)$ come il fattore di proporzionalità tra lo *stress* e lo *strain* [37]:

$$\sigma_s e^{i\omega t} = G_s^*(\omega) \gamma_0 e^{i[\omega t - \delta(\omega)]} \quad (1.47)$$

Nella specifica geometria di questo strumento ISR, σ_s equivale all'ampiezza della forza che agisce sull'ago divisa per $2L$ (perimetro dell'ago considerando il lato corto nullo), in quanto la resistenza superficiale è simmetricamente applicata da entrambi i lati del cilindro immerso. γ_0 equivale all'ampiezza dell'escursione dell'ago divisa per la distanza ago-vefrino, W , come verrà poi illustrato nella sezione (2.1).

Riarrangiando l'equazione (1.47) e risolvendo per $G_s^*(\omega)$, è possibile determinare le componenti reale e immaginaria del modulo dinamico di superficie complesso:

$$G_s^*(\omega) = \frac{\sigma_s}{\gamma_0} e^{i\delta(\omega)} = G_s'(\omega) + iG_s''(\omega) \quad (1.48)$$

dove $G'_s(\omega)$ è il modulo elastico di superficie e $G''_s(\omega)$ è il modulo viscoso di superficie. La capacità di creare un moto sinusoidale dell'ago consente di determinare la differenza di fase δ e di conseguenza $G'_s(\omega)$ e $G''_s(\omega)$.

Per descrivere la risposta di materiali complessi ad uno *stress* di taglio viene comunemente usata la viscosità dinamica, $\mu_s^*(\omega)$, che può essere facilmente derivata dal modulo dinamico di superficie [37]:

$$\mu_s^*(\omega) \equiv \mu'_s(\omega) - i\mu''_s(\omega) = \frac{G_s^*(\omega)}{i\omega} = \frac{G''_s(\omega)}{\omega} - i\frac{G'_s(\omega)}{\omega} \quad (1.49)$$

dove $\mu'_s(\omega)$ e $\mu''_s(\omega)$ sono, rispettivamente, parte reale e parte immaginaria.

La risposta misurata con un monostrato confinato alla superficie aria-acqua contenente, in aggiunta, un contributo che proviene dal sistema (resistenza della subfase acquosa, curvatura della superficie, inerzia dell'ago, etc.). Il modo più semplice per trattare questa situazione consiste nell'assumere che siano tutti termini additivi, il che porta alla seguente equazione per il modulo dinamico di superficie [37]:

$$G_s^* = \frac{W}{2L} \left(\frac{1}{AR_{monostrato}} e^{-i\delta_{monostrato}} \right) = \frac{W}{2L} \left(\frac{1}{AR_{meas}} e^{-i\delta_{meas}} - \frac{1}{AR_{system}} e^{-i\delta_{system}} \right) \quad (1.50)$$

In realtà, l'accoppiamento tra la subfase e la superficie è più complicato in quanto una forza applicata alla superficie può essere dissipata nella subfase invece che attraverso il film. Per evitare che la misura risenta di queste considerazioni, ci si porta nella situazione in cui lo *stress* superficiale domina sullo *stress* della subfase.

Si definisce pertanto un valore sperimentale, il numero di Boussinesq, Bo_{exp} , che consente di definire in quale condizione ci si trova [37]:

$$Bo_{exp} \equiv \frac{AR_{system}}{AR_{meas}} \quad (1.51)$$

Quando Bo_{exp} è grande, gli effetti del sistema sono piccoli e non è necessario sottrarre il contributo dell'oscillazione dell'ago sull'acqua pura.

1.6.3 Fluidi *newtoniani*

I fluidi *newtoniani* sono caratterizzati da una viscosità dinamica costante, indipendente dalla frequenza angolare. Questo porta ad avere una dipendenza lineare del modulo viscoso superficiale dalla pulsazione, come si ottiene prendendo solo la parte reale dell'equazione 1.49:

$$G_s''(\omega) = \eta\omega \quad (1.52)$$

Pertanto, nel *range* di frequenze in cui il fluido è *newtoniano*, la curva *stress-strain* è lineare e passa per l'origine.

1.6.4 Principio di sovrapposizione tempo-temperatura

I materiali polimerici, per via della loro natura viscoelastica, mostrano un comportamento che dipende sia dal tempo (frequenza), sia dalla temperatura, durante misure reologiche. Siccome in genere non è possibile, per limiti strumentali, raggiungere un range di frequenze molto ampio con una singola misura, si sfrutta il principio empirico di sovrapposizione tempo-temperatura (*Time-Temperature Superposition, TTS*) per ottenere una caratterizzazione più completa del materiale.

Questo principio permette di *shiftare* i dati ottenuti da misure effettuate a diverse temperature, in modo da sovrapporli ai dati relativi ad una temperatura di riferimento. Intuitivamente ciò è possibile perchè è noto [43] che i processi coinvolti nel rilassamento molecolare, o nel riarrangiamento dei materiali viscoelastici, avvengono su scale temporali minori (ovvero frequenze maggiori) a temperature maggiori. Inoltre c'è un'equivalenza diretta tra la frequenza di misurazione e la temperatura [44].

La curva finale che si ottiene da questa manipolazione dei dati è detta *master curve*.

I coefficienti di *shift* lungo l'asse orizzontale delle frequenze sono descritti utilizzando uno dei due modelli empirici ricavati da esperimenti. Il primo

modello è l'equazione di Williams-Landel-Ferry (WLF) [45]:

$$\ln a_T = \frac{-C_1(T - T_0)}{C_2 + (T - T_0)} \quad (1.53)$$

dove C_1 e C_2 sono costanti, T_0 è la temperatura di riferimento in Kelvin, T è la temperatura a cui viene effettuata la misura e a_T è il fattore di *shift*.

L'altro modello è formalizzato tramite l'equazione di Arrhenius:

$$\ln a_T = \frac{E}{R(T - T_0)} \quad (1.54)$$

dove E è l'energia di attivazione associata con il rilassamento, R è la costante dei gas, T è la temperatura di misura, T_0 è la temperatura di riferimento e a_T è il fattore di *shift*. Questa equazione è usata tipicamente per descrivere il comportamento fuori dalla regione di transizione vetrosa, ma anche per ottenere l'energia di attivazione associata alla transizione vetrosa stessa.

Per entrambe le equazioni, i coefficienti ricavati interpolando i dati presi a temperature sopra T_g (temperatura di transizione vetrosa), non sono applicabili a fattori di scala relativi a temperature sotto tale transizione di fase.

Nella pratica, i motivi per cui questo principio non è applicabile sono svariati. Ad esempio il sistema può avere diversi meccanismi di rilassamento con una diversa dipendenza dalla temperatura, oppure ci si può trovare in prossimità della temperatura transizione di fase vetrosa in cui giocano un ruolo importante sia il rilassamento energetico che entropico. Il *TTS* non funziona neppure per materiali che cambiano chimicamente o fisicamente durante le misure di reologia, e neppure per materiali polimerici inhomogenei, in quanto le diverse componenti hanno, in genere, un diverso comportamento in funzione della temperatura [46].

Capitolo 2

Strumentazione e materiali

2.1 ISR

Apparato strumentale

In questo lavoro è stato utilizzato un apparato strumentale di *Interfacial Shear Rheology* costruito presso i laboratori del Dipartimento di Fisica dell'Università di Parma [42] che costituisce uno sviluppo delle idee esposte in [37], [47].

La vaschetta di Langmuir utilizzata per le misure ISR in riferimento alla sezione 1.6.2 è fatta in Teflon, materiale idrofobico, e le dimensioni sono: 310 mm \times 85 mm \times 7 mm. Due barriere, anch'esse in Teflon, vengono mosse simmetricamente l'una verso l'altra per variare la concentrazione di surfattante disperso all'interfaccia e formare il monostrato (sezione 1.3.1). La pressione superficiale viene misurata con una bilancia di Wilhelmy che viene opportunamente calibrata in modo che segni $\Pi = 0$ mN/m quando il bordo inferiore della targhetta di carta assorbente è a contatto con la superficie dell'acqua e segni $\Pi = 72$ mN/m quando l'acqua ha $T = 22^\circ\text{C}$ ed è sospesa in aria (sezione 1.3.2).

Le due bobine in configurazione di Helmholtz hanno un raggio pari a 16 cm e sono poste in modo che l'asse passante per il loro centro giaccia nel piano individuato dalla superficie della subfase acquosa contenuta nella va-

schetta (Figura 2.1). La sonda è un ago in acciaio inossidabile di lunghezza 13.4 mm, spessore 0.35 mm e massa $m=9.9 \cdot 10^{-6}$ Kg, opportunamente annerito per aumentarne il contrasto sullo sfondo bianco della vaschetta in Teflon e opportunamente risciacquato in cloroformio prima di ogni misura per controllarne la pulizia. L'ago viene magnetizzato fino alla saturazione prima di ciascuna misura tramite un magnete permanente e viene quindi posto all'interfaccia aria-acqua.

Il canale di contenimento dell'ago, semiimmerso nella subfase, con le pareti in vetro e la base in Teflon è appoggiato al centro delle bobine e la distanza tra le pareti è pari a 1 cm. La natura idrofilica del vetro produce un menisco che aiuta l'ago a stare in posizione allineata ed a oscillare lungo una ben determinata direzione. La pulizia delle pareti in vetro è altresì importante in quanto le impurezze sul vetro contribuiscono a formare degli avvallamenti nella superficie della subfase che introducono potenziali armonici non desiderati falsando la resistenza che sente la sonda.

Il campo magnetico generato dalle bobine è tale che, tipicamente, un'onda sinusoidale di frequenza 0.25 Hz e ampiezza $I=1$ mA genera una forza dell'ordine di 50 nN sulla sonda, risultante in uno spostamento di circa 10 μm [42].

Lo spostamento dell'ago è raccolto da una telecamera (*fast CCD USB camera*) equipaggiata con un obiettivo a focale lunga (*Mitutoyo MPLAN-APO-20x*). È montata su un supporto tale da consentire un movimento parallelo all'asse delle bobine, trasversale e verticale. Le bobine sono alimentate da due diversi generatori di corrente. Per la bobina che porta la corrente sinusoidale sommata a quella costante si usa un generatore (*KEPCO Bipolar Operational Power*) che è in grado di ricevere un segnale di input direttamente dalla scheda audio del computer con cui ci si interfaccia e trasmetterlo alla bobina. L'altra bobina è alimentata da un comune generatore (*TTi QL355TP Power Supply*).

I valori di pressione superficiale e area compresa tra le barriere mobili vengono acquisiti da una scheda DAQ (*National Instrument SCB-68*). Un

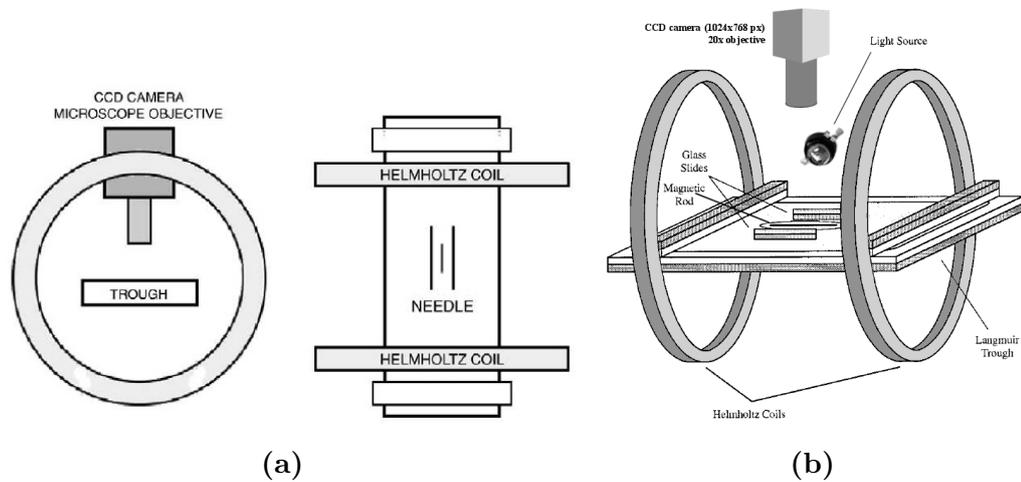


Figura 2.1: (a) Immagine semplificativa dell'apparato strumentale in direzione parallela all'asse passante per il centro delle bobine di Helmholtz e visto dall'alto. (b) Rappresentazione tridimensionale dell'apparato strumentale, [42], [37].

generatore di funzioni (*Philips PM 5134 function generator*) impone sia alla DAQ, sia alla telecamera la frequenza a cui acquisire il segnale con un segnale di trigger. In Figura 2.1 e 2.2 sono riportate immagini schematiche di quanto appena esposto.

La temperatura viene imposta al sistema tramite un termostato (*LAUDA ecoline RE 307*) ed è controllata tramite una termocoppia (*Ni-Cr + e Ni-Al -*) che ne garantisce l'esattezza con un errore di $\pm 0.1^\circ\text{C}$. Tutto il sistema è chiuso con paratie di alluminio per evitare che fattori esterni, come ad esempio correnti d'aria, possano influenzare la misura. Un sistema di illuminazione consente alla telecamera di acquisire l'oscillazione della sonda.

Misure

Dopo un'accurata pulizia della vaschetta, delle barriere e del canale con abbondanti risciacqui di acqua milli-Q e sapone, si versa la subfase acquosa sulla quale viene disperso il fosfolipide tramite siringa *Hamilton*. Si attende un tempo sufficientemente lungo per consentire l'evaporazione del solvente

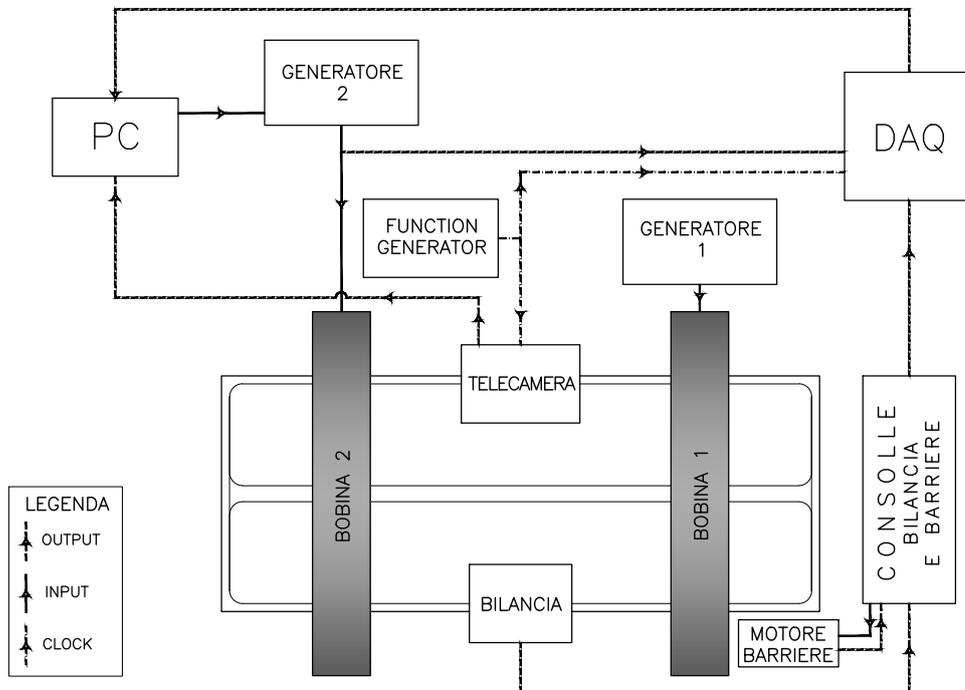


Figura 2.2: Raffigurazione schematizzata dell'apparato strumentale ISR [48].

e dopodichè si appoggia l'ago all'interfaccia aria-acqua nel canale in vetro, presente prima della dispersione. Si comprimono le barriere in modo da ottenere la pressione superficiale desiderata nel range di pressioni della fase di liquido compresso (LC).

Tramite un computer si applica un treno d'onde sinusoidale. Si imposta il numero di oscillazioni per ogni frequenza (da 40 per le frequenze maggiori fino a 20 per le frequenze minori), il range di frequenze (tipicamente tra 0.5 Hz e 0.08 Hz, ma anche range più ampi, fino a 2.8 Hz, sono stati provati), il numero di diverse frequenze utilizzate (15 o 10) e l'ampiezza associata alle diverse frequenze (questo range dipende dal tipo di campione e dalla pressione superficiale a cui viene condotta la misura come mostrato in Figura 3.10).



Figura 2.3: Fotografia dell'apparato strumentale ISR usato presso i laboratori dell'Università di Parma.

2.2 Vasca per isoterme

Per ottenere isoterme più accurate è stato utilizzato un altro apparato strumentale appositamente dedicato. La vaschetta in Teflon di dimensioni superiori alla precedente ($429.4 \text{ mm} \times 99 \text{ mm} \times 9.6 \text{ mm}$) consente di disperdere un quantitativo maggiore di campione e di controllare meglio la compressione delle barriere mobili, anch'esse in Teflon, e di conseguenza la formazione del monostrato. La struttura in alluminio di supporto all'intera strumentazione è fornita da *Nordtest Srl.* mentre la *Wilhelmy balance* è della *KSV Instrument.* L'interfaccia software che consente di gestire completamente la strumentazione e l'elaborazione dei dati è anch'essa della *KSV Instrument.*

2.3 Camtel CIR 100

Sherriff e Warburton [49] svilupparono un reometro interfacciale ad anello oscillante che è in grado di sfruttare la risonanza meccanica. Grazie ad un si-

stema elettronico a retroazione è possibile cambiare la frequenza di risonanza e riportare il sistema alla risonanza ad una qualunque frequenza arbitraria entro il range sul quale la risonanza può essere variata. Questa procedura risulta in più semplici espressioni per i parametri viscoelastici [50], [51], [52], [53].

La tecnica consiste nel misurare le oscillazioni di un piccolo anello in lega Pt-Ir (*Du Nouy ring*) posizionato alla superficie del sistema in studio, utilizzando il principio della risonanza normalizzata. La componente che effettua la misura vera e propria, costituita dall'anello in lega Pt-Ir, è sospesa ad una bobina percorsa da corrente che può ruotare in un campo magnetico, come un galvanometro.

Le misure sono condotte posizionando il piano dell'anello alla superficie del liquido e facendolo oscillare ad una data frequenza con un piccolo angolo. Le oscillazioni vengono impostate fornendo una tensione sinusoidale al galvanometro che induce un momento torcente sull'anello, e il movimento risultante viene registrato come tensione di uscita usando una sonda in prossimità di un sensore di spostamento fisso, come viene mostrato in Figura 2.4.

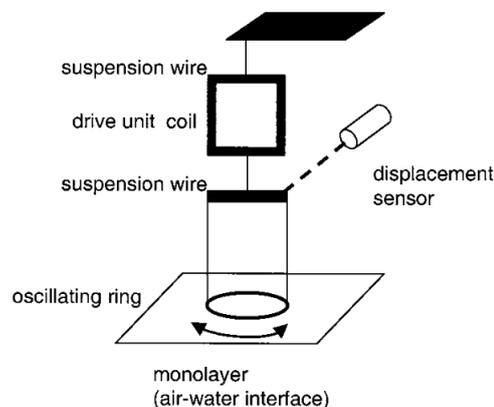


Figura 2.4: Schema di funzionamento dell'anello oscillante [54].

Il dispositivo in uso presso il *Cavendish Laboratory* è stato commercializzato dalla Camtel con il nome di CIR 100.

Il reometro opera tramite oscillazione forzata in un range nominale di $10^{-3} \div 20$ Hz, anche se viene tenuto fisso alla frequenza di 2 Hz per limiti

intrinseci. Sotto i 2 Hz, G'_s e G''_s sono ottenuti dal rapporto delle ampiezze *stress - strain* e dal ritardo di fase tra i due. Da 2 Hz fino al limite massimo G'_s e G''_s vengono determinati tramite il metodo della risonanza normalizzata che usa un sistema di retroazione per riportare le condizioni di risonanza ad una data frequenza ed una data ampiezza di oscillazione. Prima di misurare le proprietà del monostrato formato all'interfaccia, viene effettuata una misura di riferimento sull'acqua pura [55]. G'_s e G''_s del monostrato sono estratti sottraendo la risposta registrata per la superficie costituita da acqua pura dalla risposta della superficie ricoperta dal film. Questa procedura assume che il momento torcente trasmesso al film e alla subfase sia additivo e disaccoppiato.

Apparato strumentale

Il reometro effettivamente utilizzato è una versione modificata dello strumento CIR-100 commercializzato dalla Camtel. Il sensore che controlla l'oscillazione dell'anello e ne legge il segnale di risposta viene montato, tramite un'opportuna base d'appoggio, sopra una vasca di Langmuir per isoterme. Un dispositivo elettronico (*CIR2000RH*) che funge da interfaccia è posto tra il computer dotato di software dedicato (*CIR2000*) ed il sensore. Da computer è possibile controllare tutti i parametri della misura ed analizzare i dati.

Un secondo dispositivo elettronico (*16/12 bit Micro-Processor Interface IU4* della NIMA TECHNOLOGY) interfaccia il computer, dotato di un altro software dedicato, con la bilancia di Wilhelmy e le barriere mobili della vasca di Langmuir in Teflon (*Langmuir-Blodgett Trough, Type:611* della NIMA TECHNOLOGY) che controllano la formazione del monostrato. La temperatura del sistema viene controllata da un termostato (*BC 20 Fisher Scientific*).

Tramite computer è possibile gestire i due dispositivi in modo da ottenere contemporaneamente i dati della misura reologica e della misura dell'isoterma.

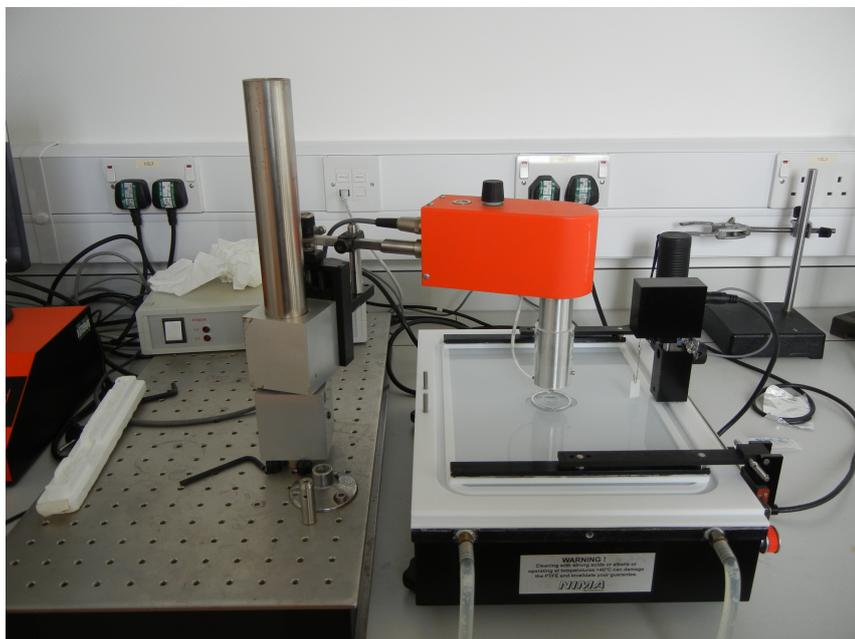


Figura 2.5: Fotografia dell'apparato strumentale CIR-100 utilizzato presso il *Cavendish Laboratory* di Cambridge (UK).

Misura

La vaschetta di Langmuir viene pulita accuratamente attraverso trattamenti successivi con sapone DECON, etanolo e acqua milli-Q.

Una prima misura di calibrazione viene effettuata appoggiando l'anello di Du Nuoy sulla superficie della subfase, all'interno dell'anello di contenimento, senza fosfolipide disperso in modo da avere un riferimento necessario alle successive misure. Si disperde con una siringa *Hamilton* la soluzione di fosfolipide e solvente e si attende che quest'ultimo evapori prima di appoggiare nuovamente l'anello e avviare la compressione. Quando l'isoterma raggiunge $\Pi \simeq 15$ mN/m, si lancia la misura reologica i cui parametri vengono definiti tramite software. Una scatola in plexiglass è usata per isolare il sistema da impurezze dell'aria.

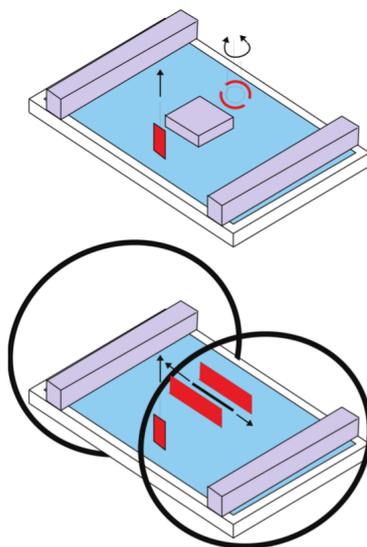


Figura 2.6: Diagrammi delle configurazioni sperimentali per le misure reologiche effettuate in questo lavoro. (Sopra) CIR-100, (Sotto) ISR, [56].

2.4 Materiali

DPPC

Il fosfolipide utilizzato è stato acquistato presso la Sigma-Aldrich in polvere. La nomenclatura esatta è *1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocoline*, e il numero CAS è: 63-89-8. Il peso molecolare è 734.1 u.m.a. [57]

Il campione per le misure viene preparato pesando con una bilancia di precisione 1 mg di polvere e aggiungendo 1 ml di Cloroformio HPLC in modo da ottenere una concentrazione di 1 mg/ml. Il campione in polvere e la soluzione devono essere conservati a -20°C per preservarne le caratteristiche [57]. In Figura 2.4 è riportata la formula di struttura del DPPC.

Aivlosin

Il farmaco Aivlosin è stato acquistato presso la ECO Animal Health in forma di polvere. Il prodotto viene comunemente chiamato Tylvalosin Tartrato, mentre il nome Aivlosin è un marchio registrato. La nomenclatura chimica è:

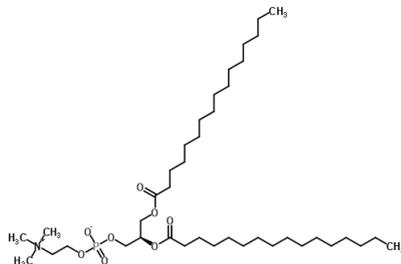


Figura 2.7: Formula di struttura del DPPC [58].

3-O-Acetyl-4-O-isovaleryltylsin; oppure *3-Acetyl-4-isovaleryltylsin*. Il numero CAS è 63428-13-7 [59].

La solubilità in acqua è buona ed è raccomandata la conservazione in luogo fresco e asciutto e con la confezione ben chiusa [59].

Claritromicina

Il farmaco Claritromicina è stato acquistato presso la Sigma-Aldrich in polvere. Il numero CAS che lo identifica univocamente è: 81103-11-9. Il peso molecolare è: 747.95 u.m.a.; viene raccomandata la conservazione in luogo fresco e asciutto e nella confezione ben chiusa [57]. A causa della sua scarsa solubilità in acqua, si prepara una soluzione formata dal quantitativo in milligrammi di polvere necessario per ottenere la concentrazione desiderata, HCl 1M e un quantitativo di acqua milli-Q tale da diluire HCl di un ordine di grandezza.

Buffer

La soluzione buffer utilizzata è stata preparata aggiungendo ad 1l di acqua milli-Q 10ml di soluzione MES M-1317 1M (*2-Morpholinoethanesulfonic acid*) della Sigma-Aldrich (n. CAS: 4432-31-9) [60]. Per le misure effettuate presso i laboratori di Cambridge è stato utilizzato il MES M-8250 (*2-*

(*N-Morpholino*)ethanesulfonic acid hydrate) della Sigma-Aldrich (n. CAS: 4432-31-9) [61]. Questo campione si presenta in polvere.

In entrambi i casi la soluzione che si ottiene ha $\text{pH} \simeq 4$ e tramite titolazione con NaOH 1M della Sigma Aldrich ci si porta a valori di $\text{pH} \simeq 6.2$.

Capitolo 3

Risultati sperimentali

3.1 Isotherme Π -A su DPPC e farmaci

Il primo passo necessario per la caratterizzazione di un film di Langmuir è la misura dell'isoterma Π -A. Tenendo costante la temperatura del sistema si esegue una compressione del campione fosfolipidico disperso all'interfaccia aria-acqua. La velocità tipica di compressione impostata per queste misure è nel range di 6-10 cm²/min. Questo è risultato essere il range di velocità ottimale per formare un monostrato correttamente.

Osservando Figura 3.1 si possono infatti notare le fasi tipiche che caratterizzano una curva isoterma di un fosfolipide come il DPPC e che sono state genericamente esposte nel paragrafo 1.3.1. Per un valore di area per molecola superiore a 90 Å² il sistema si trova nella condizione di gas bidimensionale. Non c'è interazione tra le molecole di fosfolipide e pertanto la tensione superficiale della subfase acquosa è uguale a quella dell'acqua pura. Ciò si traduce in $\Pi = 0$. Avviando la chiusura delle barriere mobili si riduce l'area a disposizione di ciascuna molecola e questo ne provoca l'interazione. La tensione superficiale diminuisce e pertanto Π aumenta. Scendendo fino a 75 Å² circa si attraversa la fase di liquido espanso (LE). Le molecole di fosfolipide iniziano a interagire e le code apolari si respingono vicendevolmente. In una successiva fase, che viene raggiunta per valori di $\Pi = 6 \div 10$ mN/m, si

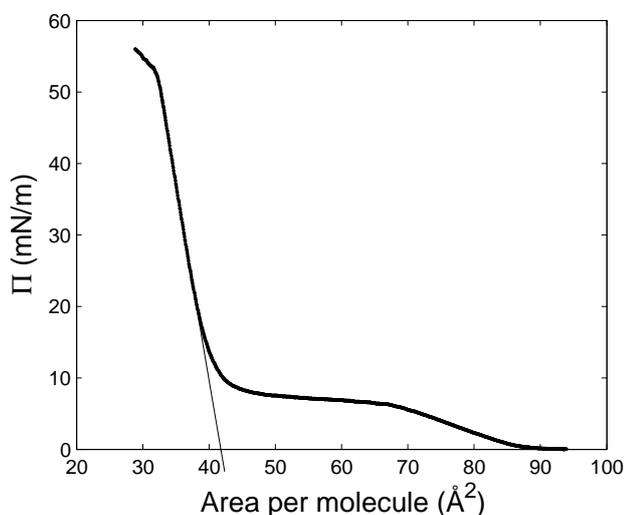


Figura 3.1: Isoterma di DPPC a $T=22$ °C, subfase: buffer (pH= 6.2), prima compressione.

osserva il tipico *plateau* che caratterizza la transizione dalla fase puramente di liquido espanso alla fase di liquido compresso (LC). Al diminuire dell'area per molecola non corrisponde un aumento di pressione superficiale in quanto le molecole si riarrangiano portando le code apolari verso l'alto, lontano dalla superficie acquosa. A partire da un'area per molecola di circa 50 \AA^2 e una corrispondente pressione superficiale di circa 10-12 mN/m, si entra nella fase di liquido compresso in cui le molecole subiscono un impacchettamento sempre maggiore. Come si può notare dalla figura, per una piccola diminuzione di area per molecola si ottiene una grande variazione di Π . Questa fase prosegue fino a quando sopra $\Pi = 50 \text{ mN/m}$ avviene il collasso del film. Questo succede quando l'area a disposizione di ciascuna molecola diventa insufficiente e quindi i fosfolipidi sono costretti ad accavallarsi o ad andare sotto la superficie dell'interfaccia aria-acqua. La rottura del perfetto monostato causa un andamento visibilmente irregolare dell'isoterma. Ciò è utile per capire qual è la pressione limite che può sopportare la membrana. Nel caso di Figura 3.1, alla temperatura $T= 22^\circ\text{C}$, usando come subfase un buffer a $\text{pH} = 6.2$, il film di DPPC collassa sopra $\Pi = 52 \text{ mN/m}$. Il valore di

collasso dipende dalle condizioni di misura appena specificate e dal tipo di fosfolipide impiegato.

Queste fasi sono state identificate e caratterizzate in maniera certa tramite GIXRD (*Grazing Incidence X-Ray Diffraction*) [11]. Portando la retta che riproduce l'andamento della parte LC dell'isoterma a $\Pi = 0$ mN/m si ottiene il valore limite di area per molecola, ovvero il valore di area minimo che una molecola di DPPC può occupare a causa del suo ingombro sterico. Per il DPPC usato l'area limite è 43 \AA^2 ed è consistente con valori riportati in letteratura [62].

L'intervallo di Π fisiologiche è tra 20 mN/m e 50 mN/m dove la membrana si trova nella fase di liquido-compresso. In questo intervallo di Π sono state condotte tutte le misure reologiche di questo lavoro.

3.1.1 Analisi di Aivlosin

Siccome Aivlosin è un antibiotico di cui sono stati recentemente scoperti usi di antivirale, sono presenti solo studi parziali sul suo comportamento precedenti a questo lavoro. Si è resa perciò necessaria una serie di misure volte a individuare la miglior concentrazione in subfase tale da non portare un'eccessiva quantità di farmaco all'interfaccia.

Isoterma di Gibbs

In Figura 3.2 è mostrato come la Π varia in funzione della concentrazione di farmaco disperso in subfase senza alcuna presenza di fosfolipide. In ciascuna misura si è atteso un tempo superiore a 1500 s in modo che il moto di ascesa di molecole di Aivlosin all'interfaccia aria-acqua si fermasse e si raggiungesse un equilibrio tra il farmaco nel bulk e quello in superficie. Questo intervallo di tempo è stato scelto anche in relazione alla caratteristica di rapido assorbimento del farmaco già sperimentata [63]. Per la concentrazione di $0.01 \mu\text{M}$ si è atteso un tempo nettamente inferiore in quanto fin da subito era chiaro che il valore di pressione superficiale non si scostava da $\Pi = 0$ mN/m. Siccome quest'ultima misura mostra che alla concentrazione di $0.01 \mu\text{M}$ la quantità di

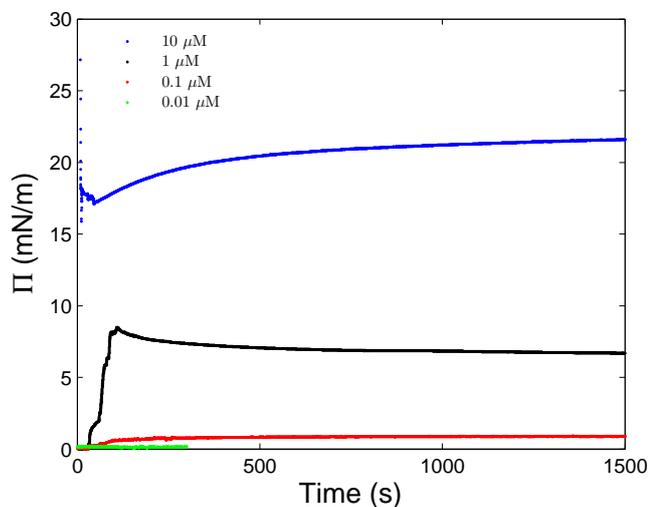


Figura 3.2: Andamento di Π in funzione del tempo per diverse concentrazioni di Aivlosin disperso in subfase di acqua milli-Q a $T = 22^\circ\text{C}$. Non c'è fosfolipide all'interfaccia aria-acqua.

farmaco che sale in superficie è nulla, probabilmente a causa della bassissima concentrazione, si sceglie come concentrazione ideale per effettuare le misure $C = 0.1 \mu\text{M}$ dove la pressione superficiale sale fino ad un valore di circa 1 mN/m.

In Figura 3.3 viene riportato l'andamento della tensione superficiale di saturazione in funzione della concentrazione. Da questi dati è possibile ricavare l'*eccesso superficiale*, un parametro che da informazioni sull'attività, e di conseguenza le caratteristiche, di una sostanza in soluzione. Sia $R = 8.31\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ la costante dei gas, $T = 295\text{K}$ la temperatura del sistema, γ la tensione superficiale e C la concentrazione di farmaco in subfase aquosa, l'eccesso superficiale si ottiene dall'*isoterma di assorbimento di Gibbs* espressa dall'equazione 3.1. In generale si definisce isoterma una qualunque funzione di stato graficata in funzione della pressione, della concentrazione, etc. a temperatura costante [64].

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \left(\frac{\partial \gamma}{\partial \ln C} \right)_{T,p} \quad (3.1)$$

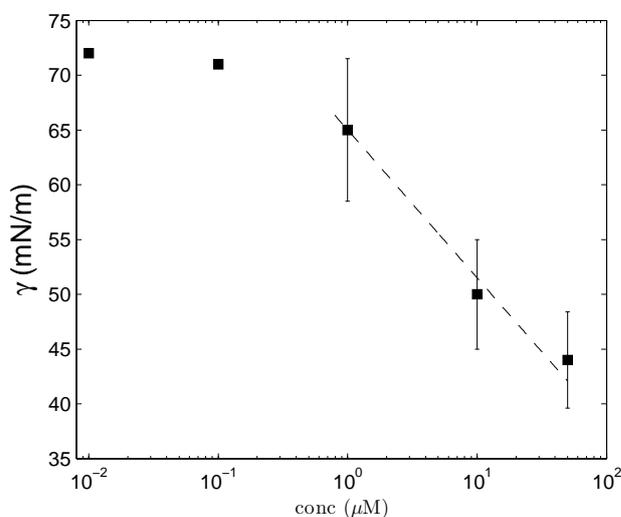


Figura 3.3: Andamento della tensione superficiale ($\gamma = 72 \text{ mN/m} - \Pi$) di saturazione in funzione della concentrazione C di Aivlosin disperso in subfase di acqua milli-Q. Il fit consente di ottenere l'*eccesso superficiale* dall'equazione 3.1.

Questa equazione si ottiene dalla formulazione generale delle isoterme di assorbimento di Gibbs sotto opportune ipotesi: la soluzione è assunta ideale (ovvero: $\mu = \mu^0 + RT \ln C$, in cui μ è il potenziale chimico e μ^0 è il potenziale chimico nello stato di riferimento), la concentrazione del solvente all'interfaccia è nulla e la superficie dell'interfaccia viene assunta idealmente bidimensionale. Quest'ultima approssimazione viene corretta da modelli più avanzati, come ad esempio il *modello di Guggenheim* [65].

Dall'equazione 3.1 si osserva che se la tensione superficiale diminuisce all'aumentare del soluto nella fase *bulk* si ha $\Gamma > 0$. Ciò corrisponde ad un suo trasferimento in superficie e tale soluto viene chiamato *surfattante*. Se il soluto evita di salire in superficie, la tensione superficiale cresce all'aumentare della concentrazione e $\Gamma < 0$ [66].

Come atteso, dall'equazione 3.1, si ottiene per Aivlosin un valore di eccesso superficiale positivo: $\Gamma = 2.16 \cdot 10^{-6} \text{ moli m}^{-2}$.

Sono stati utilizzati solo i dati alle concentrazioni $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ e $50 \mu\text{M}$ in quanto per i dati alle concentrazioni minori è necessario introdurre ulteriori

approssimazioni non considerate nel modello di Gibbs.

Compressione di Aivlosin

Si segnala in aggiunta a queste osservazioni che anche il tipo di subfase influisce sulla Π di equilibrio.

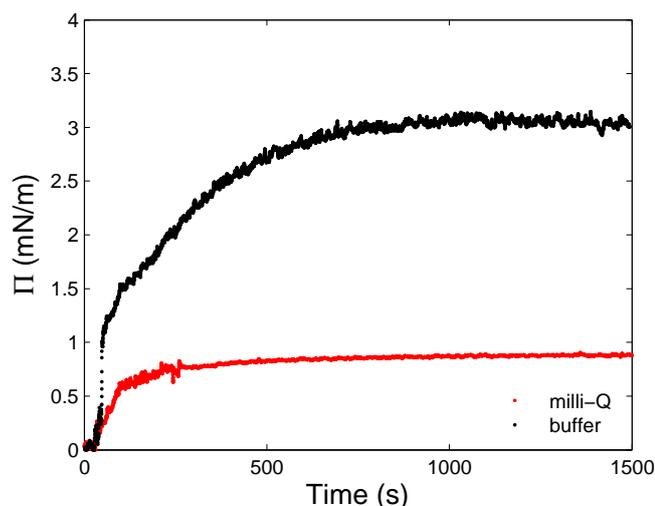


Figura 3.4: Π in funzione del tempo per Aivlosin $0.1 \mu\text{M}$ disperso in acqua milli-Q (rosso) e in buffer a $\text{pH} = 6.2$ (nero) a $T = 22^\circ\text{C}$.

Come si nota da Figura 3.4, il farmaco ha una maggiore tendenza a salire verso l'interfaccia aria-acqua se disperso in buffer (preparato con MES m-8252 in polvere presso i laboratori di Cambridge) a $\text{pH} = 6.2$ rispetto al caso in cui viene disperso in acqua milli-Q, ovvero acqua ultra pura. Siccome la costante di dissociazione acida di seconda ionizzazione è $\text{pK}_{a_2} = 7.6$ [67], nell'ambiente acido del buffer prevale la forma di singolo anione. A pH neutro, il caso dell'acqua milli-Q considerando trascurabile l'acidificazione dovuta alla dissociazione di CO_2 , prevale il doppio anione. Questo è più carico e quindi più stabile in subfase acquosa a causa del maggior costo di energia elettrostatica se dovesse salire all'interfaccia. Questo spiega il motivo per cui si ha una frazione maggiore di farmaco che sale all'interfaccia in ambiente acido del buffer rispetto al caso di acqua pura. Si prosegue con buffer per

uniformità con tutte le altre misure.

La caratteristica di Aivlosin di penetrare rapidamente nelle membrane cellulari sembra che sia dovuta al gruppo *isovaleryl*, che è idrofobico e interagisce favorevolmente con le code apolari dei fosfolipidi [67].

Dopo aver lasciato che Aivlosin raggiunga un equilibrio tra il *bulk* e l'interfaccia aria-acqua, si avvia una compressione con le barriere mobili. La velocità di chiusura impostata è di $30 \text{ cm}^2/\text{min}$. Ciò che si osserva è la formazione di un film all'interfaccia, costituito dalle sole molecole del farmaco, come è visibile in Figura 3.5, causato dalla progressiva chiusura della barriere mobili.

La debole pendenza dell'isoterma per valori di area inferiori a 300 cm^2

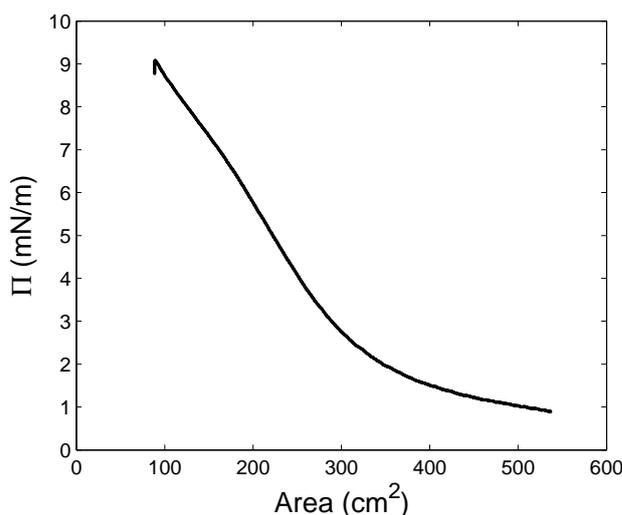


Figura 3.5: Isoterma a $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$ eseguita su Aivlosin fuito all'interfaccia aria-acqua. Subfase: acqua milli-Q; velocità di compressione: $30 \text{ cm}^2/\text{min}$. Comprimendo le barriere si osserva la formazione di un film all'interfaccia aria-acqua.

mostra che, sebbene la diminuzione dell'area per ciascuna molecola di farmaco provochi un aumento della pressione superficiale, quello viene in buona parte riassorbito nella subfase. La compressione procede fino a che le barriere toccano il fine-corsa, ovvero ad un'area di 90 cm^2 . Non si osserva alcun

tipo di collasso del film creatosi e ciò è un'ulteriore conferma all'ipotesi che le molecole di farmaco in eccesso tornino nel *bulk*. Il carattere anfifilico non è così marcato come per le molecole dei surfattanti, quali appunto sono i fosfolipidi. Ad una successiva riapertura completa delle barriere mobili la pressione superficiale si attesta sul valore di $\Pi = 0.6$ mN/m, leggermente inferiore al valore di equilibrio raggiunto prima di iniziare a comprimere ($\Pi = 1$ mN/m, circa), come si può osservare in Figura 3.6.

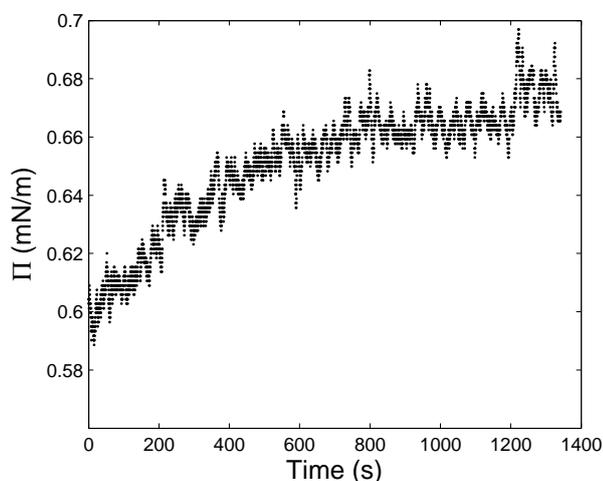


Figura 3.6: Π in funzione del tempo per Aivlosin $0.1 \mu\text{M}$ disperso in acqua milli-Q a $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$ dopo la riapertura delle barriere. $\Pi \simeq 1$ mN/m dimostra che alla riapertura delle barriere Aivlosin ritrova lo stesso equilibrio iniziale tra la fase *bulk* e la fase superficiale.

3.1.2 Confronto di isoterme su DPPC e farmaci

Lo studio della curva Π -A ha consentito inoltre l'analisi comparata della formazione del monostrato su un substrato di buffer ($\text{pH} = 6.2$) e su un substrato di buffer con disperso il farmaco Claritromicina a concentrazione $50 \mu\text{M}$ e Aivlosin a concentrazione $0.1 \mu\text{M}$.

Come si può notare dalla Figura 3.7, il primo segno della presenza di farmaco in subfase è un innalzamento della Π per valori di area per mole-

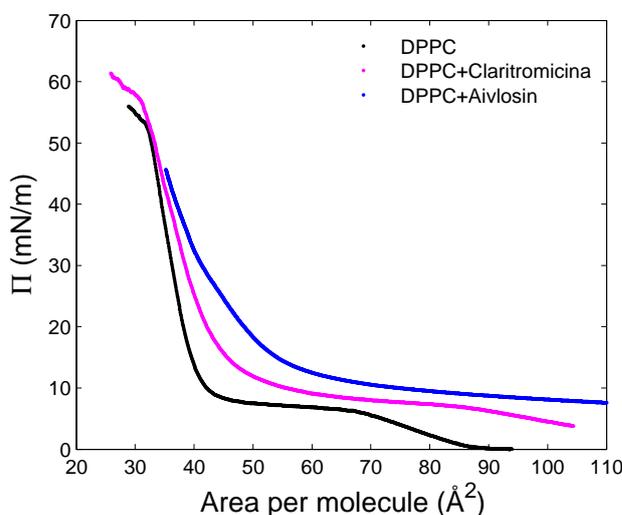


Figura 3.7: Confronto tra isoterme di DPPC su buffer (nero), DPPC su buffer con disperso Claritromicina a concentrazione $50 \mu\text{M}$ (magenta) e DPPC su buffer con disperso Aivlosin a concentrazione $0.1 \mu\text{M}$ (blu) a $T=22^\circ\text{C}$. La minore pendenza della fase di liquido-compresso delle isoterme del DPPC con farmaco in buffer è un probabile indicatore dell'espulsione del farmaco alle altre Π .

cola maggiori di 90 \AA^2 anche se il fosfolipide è stato disperso in quantità tale da essere nella fase di gas bidimensionale. Il confronto con l'isoterma senza farmaco in subfase mostra che a quel valore di area per molecola, le molecole non interagiscono, pertanto l'iniziale pressione superficiale ($\Pi \simeq 8 \text{ mN/m}$) della curva con farmaco è indice della presenza in superficie di un piccolo quantitativo di farmaco che presenta carattere anfifilico. Questo è un risultato atteso in quanto il farmaco interagisce con la membrana modello andando a inserirsi tra le molecole fosfolipidiche.

La presenza del farmaco causa l'innalzamento sensibile della pressione superficiale a cui avviene la transizione LE-LC. Questa avviene infatti a $\Pi \simeq 10 \text{ mN/m}$ circa, invece che $\Pi = 7 \text{ mN/m}$. In aggiunta si osserva che la fase LC ha una pendenza inferiore a causa della presenza del farmaco. In particolar modo, nell'isoterma ottenuta con Aivlosin in subfase, si vede chiaramente un cambio di pendenza della fase LC a $\Pi \simeq 30 \text{ mN/m}$ che lascia ipotizzare con

concretezza l'espulsione del farmaco dalla membrana modello. L'espulsione di macromolecole (farmaci, proteine) dallo strato di Langmuir di fosfolipidi, quando la pressione superficiale supera una certa soglia, è un fatto comune [65], ed è stato riscontrato ad esempio in monostri di Langmuir interagenti con la Proteina Basica della Mieline [68], [69]. Il valore di area limite ottenuto con un procedimento analogo a quello rappresentato in Figura 3.1 è 47.5 \AA^2 per molecola per la misura eseguita con Claritromicina ed è consistente con quello ottenuto per l'isoterma del puro DPPC. Il valore di area limite ottenuto dall'isoterma con Aivlosin è 55 \AA^2 per molecola. Questo risultato permette di ipotizzare che salendo verso le alte Π i due farmaci vengono gradualmente espulsi dalla membrana modello. In questi termini si spiega anche la minore pendenza della fase LC. Infatti, al diminuire dell'area a disposizione di ciascuna molecola l'impacchettamento aumenta ma contemporaneamente avviene il processo competitivo della espulsione dell'antibiotico verso la subfase acquosa.

Infine si osserva che la presenza del farmaco non sembra avere influenza sulla Π limite della membrana nel caso di Claritromicina in subfase. Il collasso avviene poco oltre $\Pi = 55 \text{ mN/m}$, valore consistente con quanto ottenuto per isoterme di DPPC senza alcun farmaco interagente. Nella misura con Aivlosin in subfase si ha invece un calo della Π di collasso che si attesta su valori di $\Pi \simeq 45 \text{ mN/m}$.

Modulo di compressibilità

L'isoterma Π -A ottenuta comprimendo il monostri di DPPC consente di calcolare il modulo di compressibilità del film. Il modulo di compressibilità del monostri è una misura della resistenza del film ad un cambiamento di area e può essere calcolato direttamente dalla pendenza dell'isoterma Π -A seguendo l'equazione 3.2, dove A è l'area per molecola in \AA^2 e Π è la pressione superficiale.

$$\varepsilon_{stat} = -A \frac{d\Pi}{dA} \quad (3.2)$$

Il film risulta meno comprimibile nello stato di liquido condensato (LC) rispetto a quello di liquido espanso (LE). proseguendo nella compressione, si osserva tipicamente un ripiegamento dell'isoterma che corrisponde ad un picco nella curva di compressibilità. Il modulo di compressibilità cala in corrispondenza del ripiegamento a causa del collasso del film. Questo ripiegamento è stato osservato e trattato come una transizione di fase per la prima nel 1922 [70]. In Figura 3.1.2 è riportato il modulo di compressibilità in

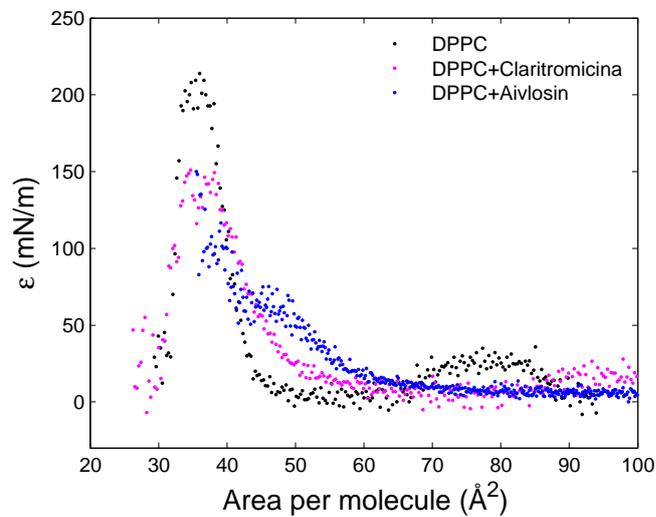


Figura 3.8: Modulo di compressibilità del monostrato di DPPC e dei monostrati trattati con i farmaci. Per valori di $A \simeq 38 \text{ \AA}^2$ si osserva che ε del DPPC è sensibilmente maggiore dei monostrati trattati con i farmaci.

funzione dell'area per molecola della membrana di solo DPPC, usato come riferimento, e delle membrane trattate con i farmaci. Si osserva un picco a $A \simeq 38 \text{ \AA}^2$ nella curva ricavata dall'isoterma del monostrato del DPPC puro e in quella del monostrato trattato con Claritromicina e Aivlsin. L'altezza massima del picco è invece maggiore nel caso del riferimento, $\varepsilon \simeq 210 \text{ mN/m}$, in accordo con la letteratura [71], rispetto alla membrana trattata con Claritromicina e Aivlosin, $\varepsilon \simeq 150 \text{ mN/m}$.

In Figura 3.9 è riportato il confronto tra le isoterme di DPPC puro (a),

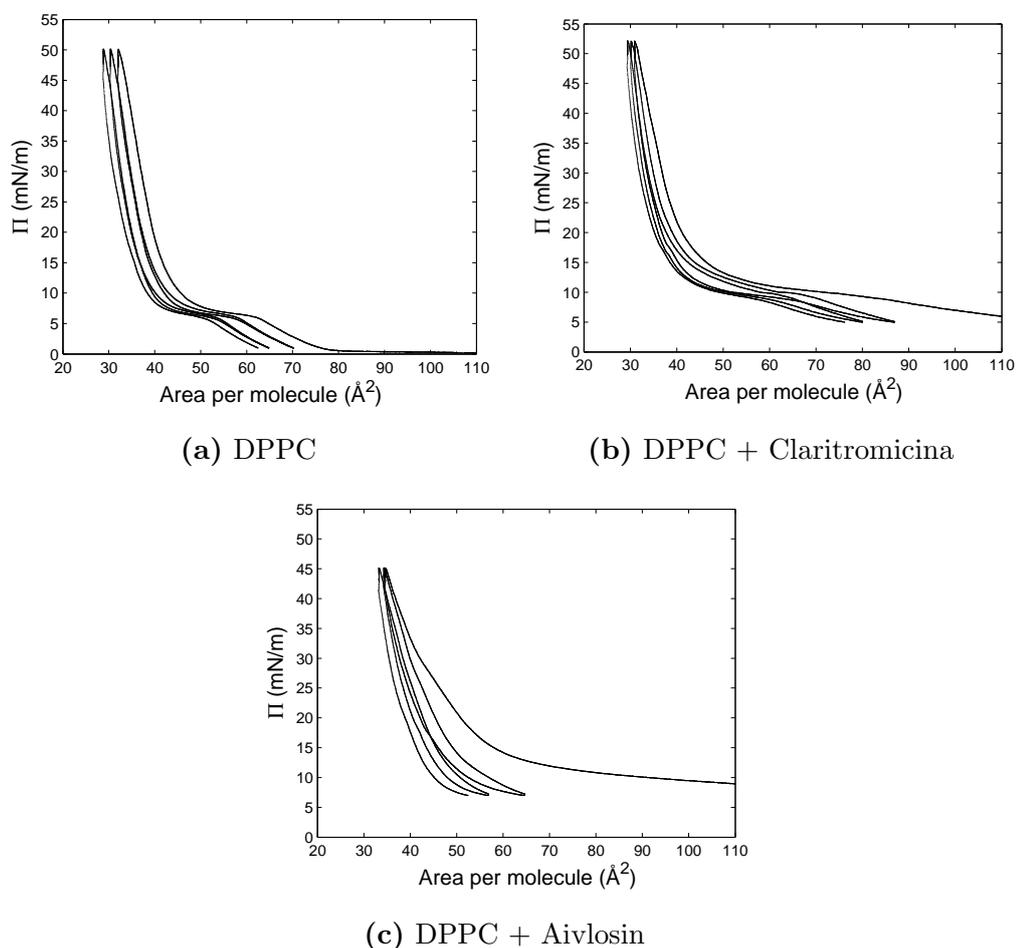


Figura 3.9: Confronto tra isoterme di DPPC su buffer pH = 6.2 (a), DPPC su buffer con disperso Claritromicina a concentrazione $50 \mu\text{M}$ (b) e DPPC su buffer con disperso Aivlosin a concentrazione $0.1 \mu\text{M}$ (c) a $T = 22^\circ\text{C}$. La probabile espulsione di una piccola frazione di fosfolipidi quando l'isoterma raggiunge valori di Π elevati causa un maggior compattamento del monostrato ad ogni ciclo successivo.

DPPC con Claritromicina $50 \mu\text{M}$ in subfase (b) e DPPC con Aivlosin $0.1 \mu\text{M}$ in subfase (c). Ciascuna misura è stata eseguita facendo tre cicli completi di compressione (chiusura delle barriere mobili) ed espansione (apertura delle barriere mobili). Le pressioni limite sono $\Pi = 1 \div 50 \text{ mN/m}$ per il DPPC, $\Pi = 5 \div 52 \text{ mN/m}$ per il DPPC con Claritromicina in subfase, $\Pi = 7 \div 45 \text{ mN/m}$ per il DPPC con Aivlosin in subfase. La velocità delle barriere è

impostata a $10 \text{ cm}^2/\text{min}$ per ciascuna misura. Questo tipo di misura è già riportato in letteratura [72] per il caso di DPPC su acqua e il comportamento ottenuto è analogo. Nel primo ciclo in compressione, l'isoterma è in accordo con le misure di singola compressione effettuate in precedenza per quanto riguarda l'andamento. L'area limite ottenuta per il primo monostrato di DPPC puro che si è formato è 45 \AA^2 per molecola, valore compatibile a quello ottenuto in precedenza. Il *plateau* che si ottiene in corrispondenza della transizione LE-LC si presenta al valore di $\Pi=7\text{mN/m}$, consistente con quanto già ottenuto.

E' possibile fare le medesime osservazioni per quanto riguarda l'isoterma del primo ciclo in compressione del campione di DPPC con Claritromicina $50 \mu\text{M}$ in subfase. Si nota infatti che la pressione iniziale è $\Pi \simeq 9 \text{ mN/m}$, dove per una corrispondente area per molecola nel caso del DPPC senza farmaci in subfase è nulla e il *plateau* si osserva a circa $\Pi=11 \text{ mN/m}$. La pendenza della fase LC è anche in questo caso meno pronunciata, a ulteriore conferma dell'ipotesi precedentemente fatta riguardo l'espulsione del farmaco. Tutte queste osservazioni effettuate per l'isoterma con Claritromicina in subfase sono applicabili anche all'isoterma con Aivlosin in subfase. In questo terzo caso, l'aumento di pressione in funzione dell'area per molecola è ancora più sensibile, così come è sensibile il cambio di pendenza nella fase LC che corrisponde ad una netta espulsione del farmaco dalla membrana modello. Come già osservato in Figura 3.7 è presente un netto cambio di pendenza della fase LC a $\Pi \simeq 30 \text{ mN/m}$. Si nota che il valore di pressione superficiale massima che il monostrato di DPPC con Aivlosin $0.1 \mu\text{M}$ in subfase può sopportare prima di collassare è sensibilmente minore se confrontato con i casi precedenti delle Figure 3.9 (a) e (b).

In ciascuna delle tre misure eseguite si nota lo spostamento dei picchi ad aree per molecola ogni volta minori. Questo risultato è stato spiegato in diversi modi [72]. Una prima ipotesi afferma che ad alti valori di Π , una piccola frazione di fosfolipide viene persa, pertanto, siccome la normalizzazione viene effettuata sul quantitativo di fosfolipide disperso inizialmente, risulta

osservabile uno *shift* ad aree per molecola minori. Una seconda ipotesi afferma invece che l'isteresi visibile è dovuta essenzialmente al fatto che la prima isoterma di compressione avviene in condizioni statiche, ovvero partendo dal fosfolipide appena disperso, mentre le due successive sono ottenute senza lasciare che il monostrato rilassi completamente (condizione dinamica). Questo può essere vero in particolare per l'isoterma in cui c'è solo DPPC senza alcun farmaco in subfase, in quanto è l'unico caso in cui si parte da $\Pi=1$ mN/m, ovvero nella situazione di gas bidimensionale.

	DPPC	DPPC + Aivlosin	DPPC + Claritromicina
Area limite (Å^2)	43	55	47.5

Tabella 3.1: Aree limite ottenute dalle isoterme di Figura 3.7. I valori di DPPC e DPPC con Claritromicina sono confrontabili mentre DPPC con Aivlosin mostra un valore maggiore dato dalla probabile espulsione del farmaco che abbassa sensibilmente la pendenza della fase liquido-compresso.

3.2 Misure ISR

Per determinare le proprietà viscoelastiche delle membrane modello di DPPC formate mediante la tecnica sviluppata da Langmuir si è fatto uso principalmente dell' *Interfacial Stress Rheometer* costruito presso i laboratori del Dipartimento di Fisica di Parma. Una serie completa di misure ISR sono state effettuate precedentemente a questo lavoro e mostrano un comportamento della membrana modello completamente inatteso dal confronto con quanto ottenuto da misure analoghe riportate in letteratura. Ciò che si osserva è l'aumento anomalo della componente elastica (G') del modulo dinamico complesso che, ad alte frequenze ($f > 2$ Hz), presenta un valore superiore alla componente viscosa (G''), in maniera differente da quanto avviene per le basse frequenze in cui la componente elastica è quasi inesistente. Si osserva

quindi per ogni misura eseguita, tenendo la pressione costante e variando la frequenza, un incrocio delle due componenti del modulo dinamico che si sposta a frequenze inferiori in funzione dell'aumento della pressione superficiale del monostrato. Questi dati sono stati interpretati col modello di Maxwell per i sistemi viscoelastici [38].

Con l'obiettivo di verificare questo comportamento è stata condotta una lunga e attenta analisi sul funzionamento dell'ISR e sul software di acquisizione dei dati.

Una misura preliminare necessaria per portarsi nelle condizioni operative

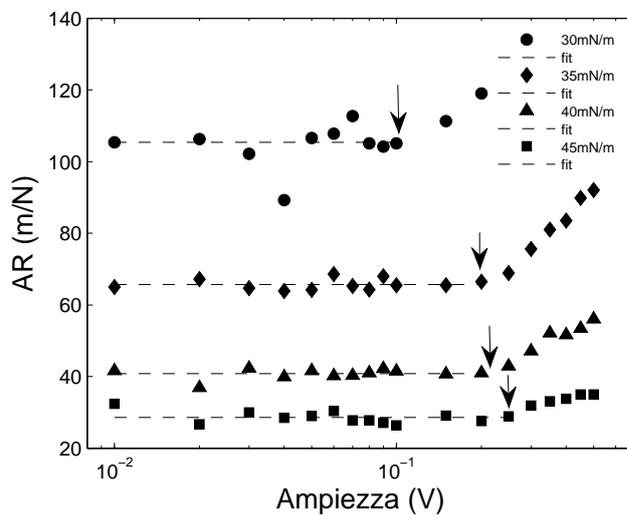


Figura 3.10: Confronto della risposta AR (*Amplitude Ratio*) del film di DP-PC alla sollecitazione a diverse ampiezze alla frequenza fissa $f = 2\text{Hz}$. Le frecce indicano i valori di soglia oltre i quali si esce dal regime lineare

migliori consiste nel determinare il valore massimo di ampiezza del segnale di *stress* fornito dall'alimentatore. In Figura 3.10 viene mostrato come il valore di soglia cresca in funzione della pressione superficiale a cui viene condotta la misura. E' fondamentale che questi valori vengano rispettati in quanto, se viene fornito uno *stress* troppo grande, la membrana collassa inficiando la misura. Una serie di misure di calibrazione viene effettuata su acqua milli-Q per avere un riferimento con cui confrontare le misure su monostrato e capire

quanto la subfase acquosa influisce sulla misura di viscosità della membrana. I dati ottenuti sono riportati in Figura 3.11.

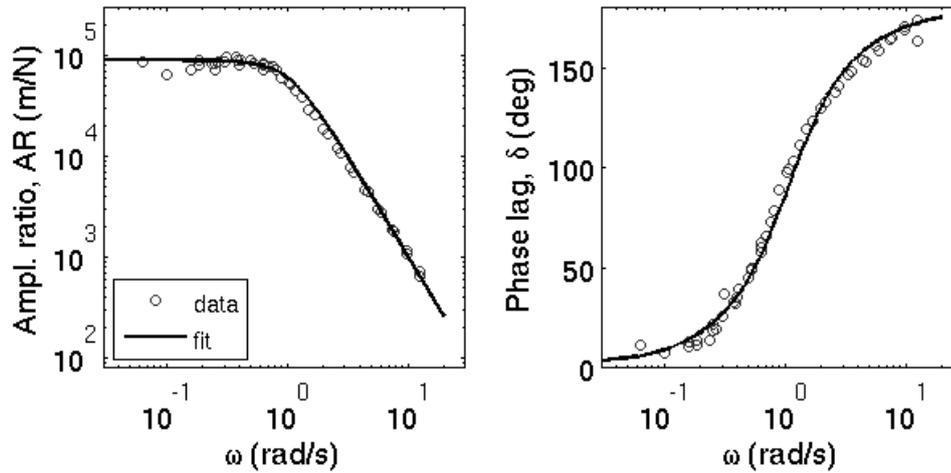


Figura 3.11: Andamento di AR in funzione della frequenza di stimolo dell'ago magnetico (sinistra) e andamento del ritardo di fase a $T=22$ °C. L'ago è appoggiato all'interfaccia aria-acqua senza alcun fosfolipide disperso [42].

In aggiunta all'analisi accurata è stato introdotto un dispositivo elettronico che non era presente nella configurazione strumentale delle misure anomale: un generatore di funzioni che fornisce un segnale di trigger alla telecamera e alla scheda DAQ. In questo modo si è in grado di tenere sincronizzate le oscillazioni acquisite dalla telecamera e consente, di conseguenza, di ridurre al minimo il ritardo di fase strumentale tra lo *stress* e lo *strain*. Ciò consente una maggiore affidabilità nel calcolo dello sfasamento tra le due onde sinusoidali e la miglior stima delle componenti elastica e viscosa del modulo dinamico. Come viene mostrato in Figura 3.12 il comportamento del monostrato in funzione della frequenza è sensibilmente diverso da quanto riportato nel lavoro precedente [38].

Dalle misure ottenute non si riscontra alcun incrocio tra la componente viscosa e la componente elastica di G^* . Da un'osservazione qualitativa

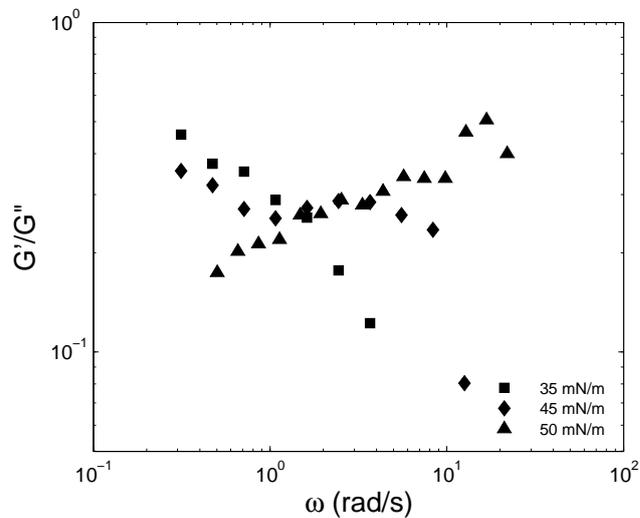


Figura 3.12: Rapporto tra G' e G'' del monostrato di DPPC a diverse pressioni su buffer a $\text{pH} = 6.2$ e a $T = 22^\circ\text{C}$. In nessun caso, alle diverse Π riportate, G' supera G'' . Si nota che all'aumentare di ω G' diventa confrontabile con G'' per $\Pi = 50$ mN/m.

di Figura 3.12 è però possibile concludere che all'aumentare della pressione superficiale la componente elastica diventa confrontabile in modulo alla componente viscosa ad alte frequenze anche se la seconda domina sempre in tutto il range di frequenze indagato.

ISR su DPPC

Avendo capito che una misura a frequenze $f \simeq 2$ Hz è foriera di problemi legati alla difficoltà di acquisire i dati dell'oscillazione tramite videocamera CCD e trattarli, è stato scelto di concentrare le misure sul range di frequenze $f = 0.08 \div 0.5$ Hz, acquisendo 10 punti logaritmicamente spaziati. È stata effettuata una misura al variare della frequenza per le pressioni superficiali $\Pi = 25, 30, 35, 40, 45, 50$ mN/m.

In Figura 3.13 e Figura 3.14 sono riportati rispettivamente AR e lo sfasamento tra *stress* e *strain* di una misura eseguita in tale range di frequenze. In aggiunta si messo il confronto con la misura effettuata su acqua pura. I

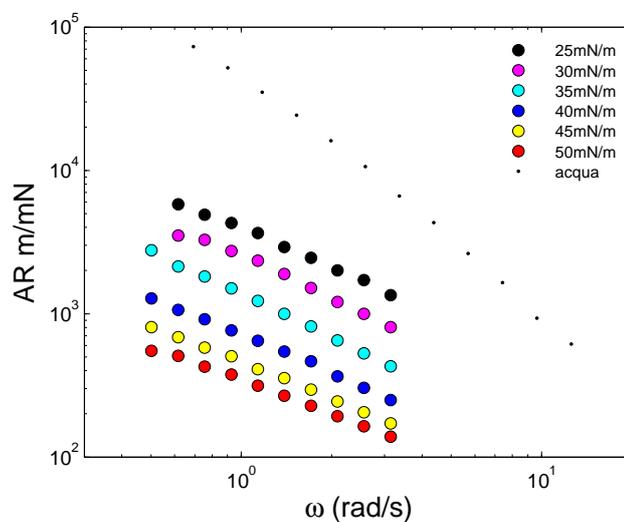


Figura 3.13: L'aumento di Π induce una diminuzione di AR. Misura a $T = 22^\circ\text{C}$, su buffer a $\text{pH} = 6.2$. Per le varie Π , AR è sempre molto minore dell'AR dell'acqua, si può pertanto trascurare il trascinamento dell'acqua.

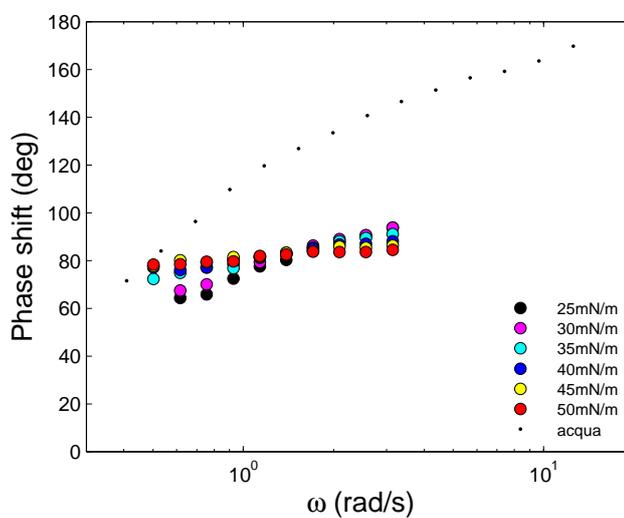


Figura 3.14: L'aumento di Π porta lo sfasamento a diventare costante. $T = 22^\circ\text{C}$, su buffer a $\text{pH} = 6.2$.

valori di AR di ciascuna misura effettuata sul film di DPPC sono sufficientemente inferiori ai valori di AR dell'acqua e questo ci consente di trascurare

il contributo di trascinamento della subfase. All'aumentare della pressione superficiale il contributo minimo della subfase diminuisce sempre più. Anche dall'analisi dello sfasamento si può intuire un andamento simile a quello su acqua per le pressioni minori e all'aumentare della pressione superficiale lo sfasamento tende a porsi costante sul valore di circa 80° . Questo porta ad avere una componente immaginaria di G^* dominante su quella reale, ovvero, in altre parole, il modulo viscoso domina su quello elastico.

In Figura 3.15 è riportata una misura con un fit lineare nella regione delle basse frequenze dove il comportamento della membrana è puramente newtoniano senza effetti dovuti al trascinamento della subfase acquosa e la viscosità è pertanto costante e individuata dal fit della funzione:

$$G''(\omega) = \eta_s \cdot \omega \quad (3.3)$$

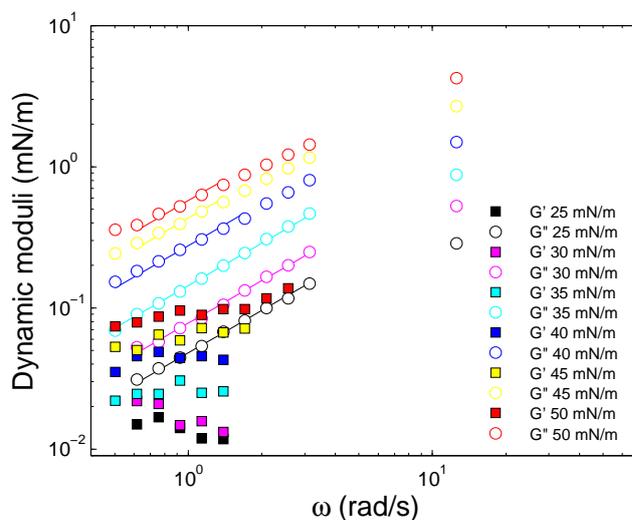


Figura 3.15: G' (■) e G'' (○) a $T = 22^\circ\text{C}$, buffer a $\text{pH} = 6.2$, $\omega = 0.08 \simeq 0.5 \text{ Hz}$. Per ogni Π , $G'' \gg G'$. La linea solida è il fit eseguito sul modello dell'equazione 3.3. Le η_s ottenute sono riportate in Tabella 3.2.

In questo lavoro viene proposta l'applicazione del principio di sovrapposizione tempo-pressione su film di Langmuir. L'applicazione di questo

metodo ai sistemi fosfolipidici di Langmuir può essere giustificata assumendo la validità della teoria del volume libero che descrive alcuni aspetti, ma non tutti, della teoria del volume libero. La pressione superficiale è l'unica variabile termodinamica cambiata in questi esperimenti. Pertanto la pressione superficiale può giocare il ruolo della temperatura, dal momento che un monostrato molto compatto mostra una limitata libertà conformazionale, in analogia con un materiale più freddo. Selezionando solamente il modulo superficiale viscoso, in quanto quello elastico ha valori molto bassi se non inesistenti, si sovrappongono i dati raccolti a diverse pressioni scegliendo di tenere fissi quelli ottenuti a $\Pi=30$ mN/m. Ciò che si ottiene è la *mastercurve* in Figura 3.16. L'interpolazione dei dati è effettuata seguendo un modello di andamento generico che correla G'' a ω :

$$G'' = \alpha \cdot a\omega^\beta \quad (3.4)$$

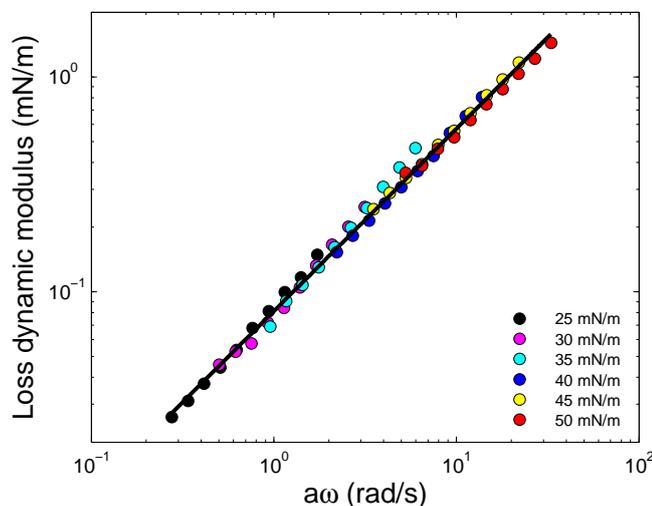


Figura 3.16: Mastercurve di G'' a diverse Π in funzione di ω . La linea solida è il fit sul modello di equazione 3.4 con i parametri riportati in Tabella 3.3. Il monostrato ha carattere approssimativamente *newtoniano*.

I fattori di *shift* usati per generare la *mastercurve* sono mostrati nella Fi-

gura 3.17 in funzione della pressione superficiale. La dipendenza esponenziale dei fattori di shift a , è espressa dalla legge di attivazione

$$a \propto \exp\left(\frac{\Pi A_0}{k_B T}\right) \quad (3.5)$$

che trova giustificazione assumendo che il riarrangiamento molecolare laterale avviene solo se è accessibile alle molecole un'area libera minima A_0 che consente di scambiare le posizioni. Il costo in termini di energia per quest'area libera è ovviamente $\Pi \cdot A_0$.

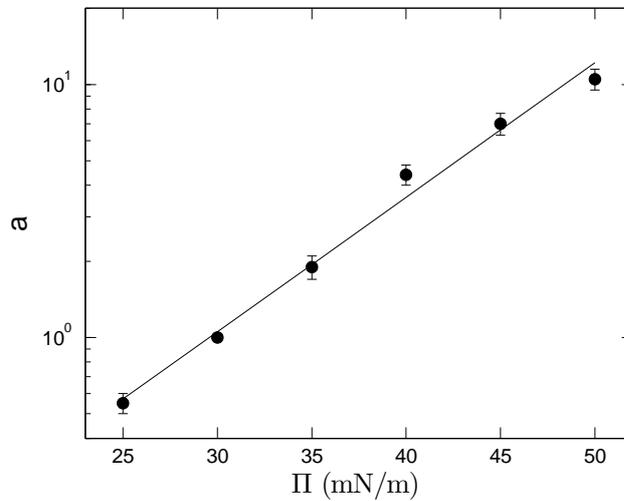


Figura 3.17: Parametri di *shift* a della *mastercurve* in funzione di Π . La linea solida è il fit dei dati eseguito sul modello della legge di attivazione 3.5.

Dall'interpolazione si ottiene il valore di area limite $A_0 = 49.82 \text{ \AA}^2$, in accordo con quello ottenuto dall'isoterma della Sezione 3.1.

I dati di viscosità ottenuti eseguendo una misura di ISR alla frequenza fissa di 2 Hz mostrano una dipendenza esponenziale in funzione della pressione superficiale. In analogia con 3.5 è stata ricavata una nuova legge di attivazione per correlare queste due quantità

$$\eta_s \propto \exp\left(\frac{\Pi A_0}{k_B T}\right) \quad (3.6)$$

In Figura 3.18 è riportato il fit eseguito con questa legge di attivazione dal quale si ricava un'area limite $A_0 = 45.19 \text{ \AA}^2$.

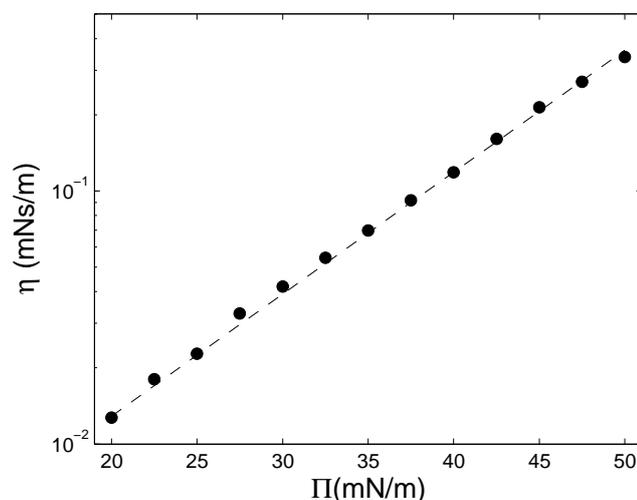


Figura 3.18: η_s aumenta esponenzialmente in funzione di Π a $f = 2$ Hz. La linea tratteggiata è il fit eseguito sul modello della legge di attivazione 3.6.

ISR su DPPC e Aivlosin

E' stata seguita la medesima procedura sperimentale (3.2) per effettuare una serie di misure sul monostrato di DPPC con Aivlosin $0.1 \mu\text{M}$ in subfase di buffer. I dati sono riassunti in Figura 3.19. L'applicazione del principio di sovrapposizione tempo-pressione porta ad ottenere la *mastercurve* anche per la misura sulla membrana modello di DPPC interagente con Aivlosin riportata in Figura 3.20.

Per meglio capire come il farmaco interagisce con la membrana modello, si esegue un grafico comparativo, Figura 3.21 (a), tra l'andamento di G'' in funzione della frequenza per le diverse pressioni superficiali indagate, nel caso di DPPC disperso su buffer e nel caso di DPPC disperso su buffer e Aivlosin. Si osserva chiaramente che alle basse pressioni superficiali l'effetto del farmaco si mostra abbassando la viscosità della membrana. All'aumentare della pressione superficiale si ha la probabile progressiva espulsione del farmaco che avviene a $\Pi \simeq 38 \text{ mN/m}$. Questo fenomeno è visibile osservando che la viscosità della membrana nelle due diverse condizioni sperimentali tende ad assumere lo stesso valore. In Figura 3.21 (b) è mostrato più chiaramente que-

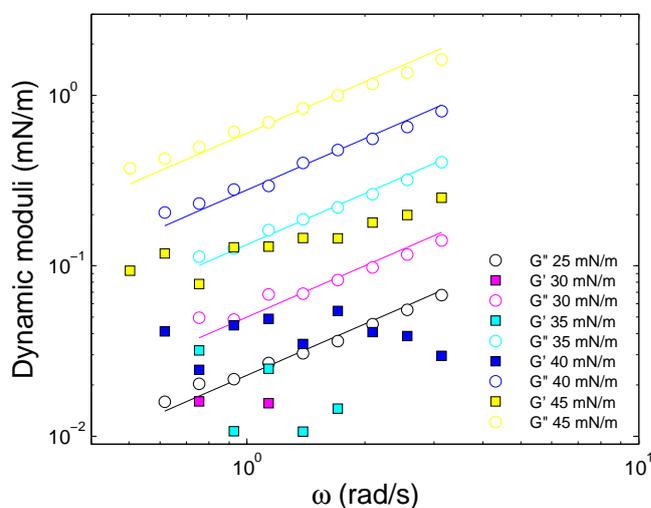


Figura 3.19: G'' (■) e G' (○) per il monostrato su buffer con Aivlosin $0.1 \mu\text{M}$ a $\text{pH} = 6.2$ e a $T = 22^\circ\text{C}$ e $\omega = 0.08 \div 0.5 \text{ Hz}$. Le linee solide sono il fit eseguito sul modello di equazione 3.3. Le viscosità sono riassunte in Tabella 3.2. $G'' \gg G'$ per ogni Π .

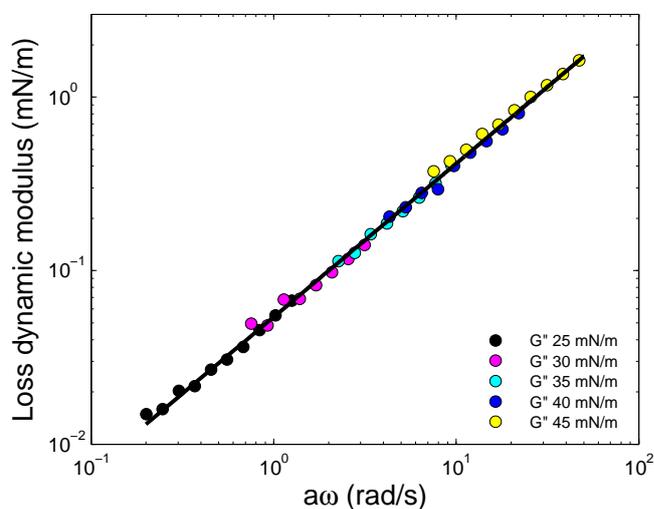


Figura 3.20: *Mastercurve* di $G''(\omega)$ per diverse Π per il monostrato con Aivlosin in subfase. La linea solida è il fit sul modello di equazione 3.4 con i parametri riportati in Tabella 3.3. Il monostrato è approssimativamente *newtoniano*.

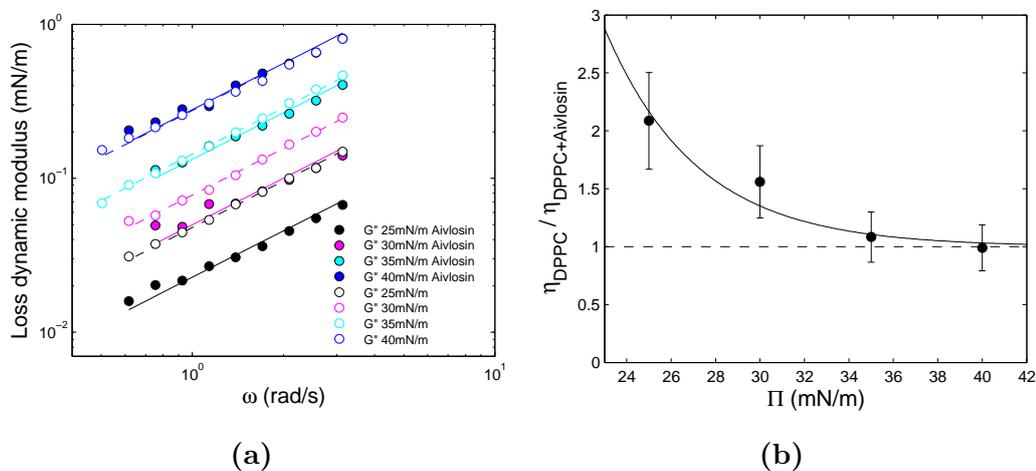


Figura 3.21: (a) $G''(\omega)$ a diverse Π ($\Pi = 25$ mN/m [nero], $\Pi = 30$ mN/m [magenta], $\Pi = 35$ mN/m [ciano], $\Pi = 40$ mN/m [blu]) nelle due diverse condizioni sperimentali: (o) con Aivosin in subfase, (●) senza Aivosin in subfase. (b) Rapporto in funzione di Π tra η_s del monostrato puro e η_s del monostrato interagente con Aivosin. La linea solida è l'andamento fenomenologico seguito dai dati sul modello dell'equazione 3.7 con i parametri riportati in Tabella 3.5.

sto effetto raffigurando il rapporto tra la viscosità della membrana modello di DPPC senza farmaco in subfase e la viscosità della membrana modello con Aivosin in subfase. L'interpolazione dei dati è eseguito sull'equazione puramente fenomenologica:

$$\frac{\eta_{DPPC}}{\eta_{farmaco}} = 1 + B \exp(-A \cdot \Pi) \quad (3.7)$$

I valori dei parametri del fit sono riportati in tabella 3.5, dove sono confrontati con quelli ottenuti da altre misure.

ISR su DPPC e Claritromicina

Una terza serie di misure, effettuata seguendo la procedura sperimentale già delineata nei precedenti paragrafi, viene effettuata sul monostrato di DPPC con Claritromicina $50 \mu\text{M}$ in subfase di buffer. I dati sono riassunti in Figura 3.22.

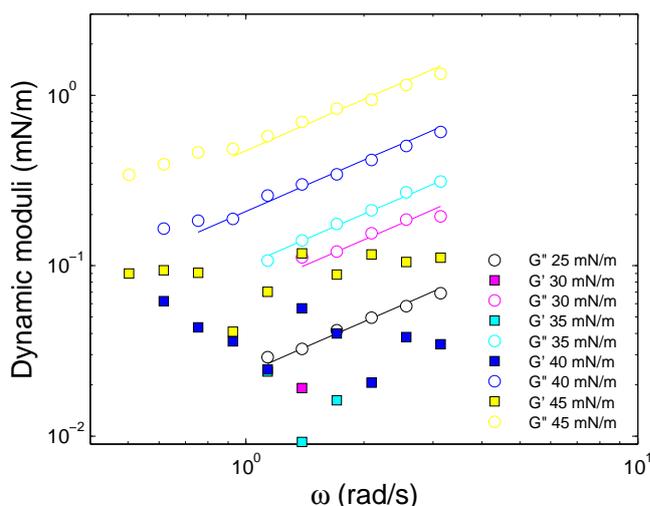


Figura 3.22: G' (■) e G'' (○) del monostrato con Claritromicina $50 \mu\text{M}$ in subfase a $\text{pH} = 6.2$, $T = 22^\circ\text{C}$ e $\omega = 0.08 \div 0.5 \text{ Hz}$. $G'' \gg G'$ per ogni Π e per ogni ω . Il fit è eseguito sul modello dell'equazione 3.3. Le viscosità sono riassunte in Tabella 3.2.

Si osserva che a $\Pi = 30 \text{ mN/m}$ la viscosità della membrana subisce un brusco aumento che non risulta in linea con il graduale aumento di viscosità dovuto agli effetti combinati di aumento di Π e probabile espulsione del farmaco.

L'applicazione del principio di sovrapposizione tempo-pressione porta ad ottenere la *mastercurve* anche per la misura sulla membrana modello di DPPC interagente con Claritromicina riportata in Figura 3.23. Per visualizzare meglio l'interazione del farmaco con la membrana modello, e la sua probabile graduale espulsione, si riporta un grafico comparativo, Figura 3.24 (a), dell'andamento di G'' in funzione della frequenza per le diverse pressioni su-

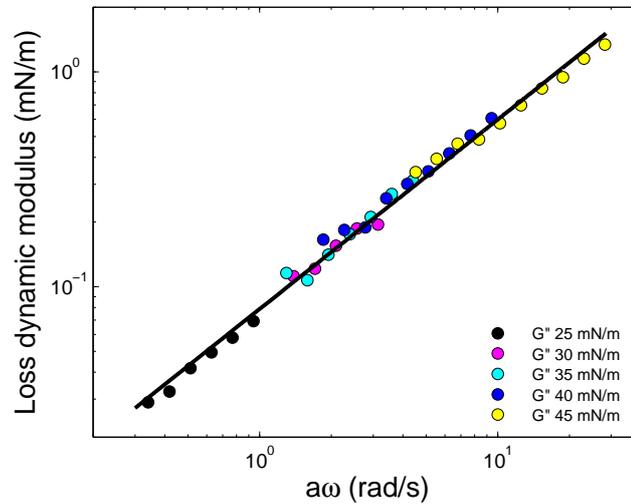


Figura 3.23: *Mastercurve* di $G''(\omega)$ per diverse Π per il monostrato con Claritromicina in subfase a $\text{pH} = 6.2$ e $T = 22^\circ\text{C}$. La linea solida è il fit eseguito sul modello di equazione 3.4 con i parametri riportati in Tabella 3.3. L'andamento è approssimativamente *newtoniano*.

perficiali indagate, nel caso di DPPC disperso su buffer e nel caso di DPPC disperso su buffer e Claritromicina. Anche per la misura eseguita con Claritromicina si osserva chiaramente che a basse Π l'effetto del farmaco si mostra abbassando la viscosità della membrana. All'aumentare di Π si ha la probabile progressiva espulsione del farmaco che avviene a $\Pi \simeq 38$ mN/m. Il fit dei dati di Figura 3.24 (b) è eseguito sul modello della funzione 3.7 e i valori dei parametri sono riportati in tabella 3.5.

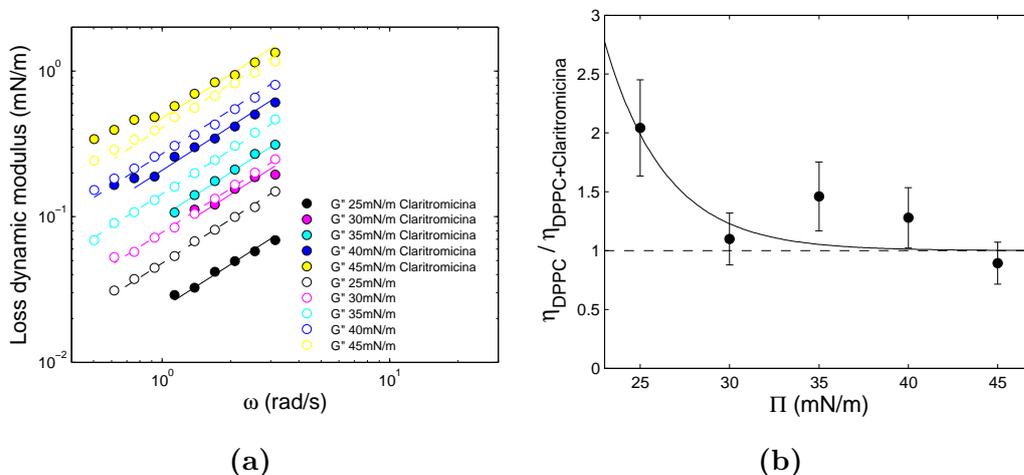


Figura 3.24: (a) $G''(\omega)$ a diverse Π ($\Pi = 25$ mN/m [nero], $\Pi = 30$ mN/m [magenta], $\Pi = 35$ mN/m [ciano], $\Pi = 40$ mN/m [blu], $\Pi = 45$ mN/m [giallo]) nelle due condizioni sperimentali: (\bullet) con Claritromicina in subfase, (\circ) senza Claritromicina in subfase. (b) Rapporto in funzione di Π tra η_s del monostrato puro e η_s del monostrato interagente con Claritromicina. La linea solida è l'andamento fenomenologico seguito dai dati sul modello dellequazione 3.7 con i parametri riportati in Tabella 3.5.

Confronto riassuntivo delle misure ISR

In Tabella 3.2 sono riassunti i valori di viscosità superficiale che sono stati ottenuti mediante interpolazione lineare dei valori di G'' in funzione della frequenza nel range $0.08 \div 0.5$ Hz. In questo range di frequenze è possibile trascurare l'effetto di trascinamento dell'acqua della subfase e l'andamento di G'' è lineare come già spiegato. Alle frequenze maggiori questa approssimazione non è più valida e l'effetto di trascinamento dell'acqua in subfase influisce sulla misura della viscosità. A $\Pi=45$ e 50 mN/m nel caso di monostrato trattato con Aivlosin e $\Pi=50$ mN/m nel caso di monostrato trattato con Claritromicina sono state riscontrate delle difficoltà nella misura ISR a causa di una maggiore instabilità del monostrato stesso che non si riscontra nel caso in cui non c'è farmaco in subfase.

$\Pi(mN/m)$	DPPC	Aivlosin	Claritromicina
25	48 ± 1	23 ± 1	23 ± 5
30	78 ± 1	50 ± 9	71 ± 16
35	141 ± 4	133 ± 5	100 ± 4
40	276 ± 10	279 ± 9	208 ± 7
45	430 ± 20	-	473 ± 18
50	575 ± 130	-	-

Tabella 3.2: Riassunto dei valori delle viscosità superficiali ($\mu\text{Ns/m}$) alle diverse Π indagate. I valori sono stati ottenuti dall'interpolazione dei dati mediante la legge 3.3.

In Figura 3.25 sono riportate le *mastercurve* delle membrane trattate con i due farmaci a confronto con la *mastercurve* di riferimento ottenuta dalla membrana non trattata. Non si evince un significativo effetto fluidificante di Claritromicina che non si scosta dai valori di riferimento del DPPC. Per Aivlosin si osserva invece un effetto fluidificante marcato che porta sistematicamente ad avere valori di G'' inferiori rispetto al riferimento. Si intuisce una convergenza per valori di frequenza superiori a 30Hz, completamente fuori dal range disponibile con l'ISR. I parametri delle interpolazioni delle diverse *mastercurve* costruite sono riportati in Tabella 3.2.

	DPPC	Aivlosin	Claritromicina
α	0.081 ± 0.001	0.054 ± 0.001	0.079 ± 0.002
β	0.85 ± 0.01	0.88 ± 0.01	0.88 ± 0.01

Tabella 3.3: Riassunto dei parametri dell'interpolazione eseguita sulle *mastercurve* in Figura 3.25 seguendo la legge 3.4.

I valori del parametro $\beta \simeq 1$ in tutti e tre i casi, permettono di ipotizzare un comportamento di fluido quasi puramente *newtoniano* per la membrana di DPPC.

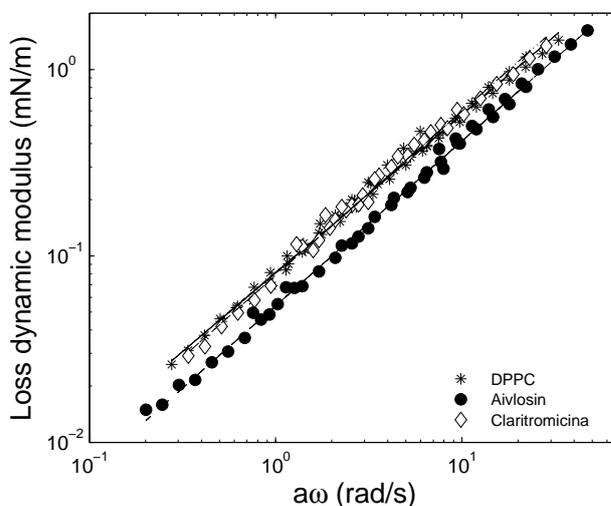


Figura 3.25: Le *mastercurve* ottenute con puro DPPC (*) e con Claritromicina in subfase (◇) mostrano sostanziale accordo, con Aivlosin in subfase (●) si ha un sensibile effetto fluidificante.

In Figura 3.26 sono riportati i parametri di *shift*, utilizzati per creare le *mastercurve* di Figura 3.25, in funzione di Π . Rispetto alla curva di riferimento del solo DPPC (*), sia i parametri relativi alla misura con Aivlosin (●), sia quelli relativi alla misura con Claritromicina (◇) mostrano un incremento maggiore. Questa osservazione indica che è presente un aumento maggiore di viscosità della membrana, relativamente alla viscosità a $\Pi = 30$ mN/m, in funzione di Π . Dall'interpolazione eseguita mediante la legge d'attivazione precedentemente introdotta (3.5) si ricavano i valori di area per molecola riportati in Tabella 3.4

	DPPC	Aivlosin	Claritromicina
Area limite (\AA^2)	49 ± 9	75 ± 12	65 ± 14

Tabella 3.4: Area limite ottenuta dall'interpolazione dei dati di Figura 3.26 seguendo la legge 3.5.

In Figura 3.27 è riportato il confronto dell'andamento in funzione di Π

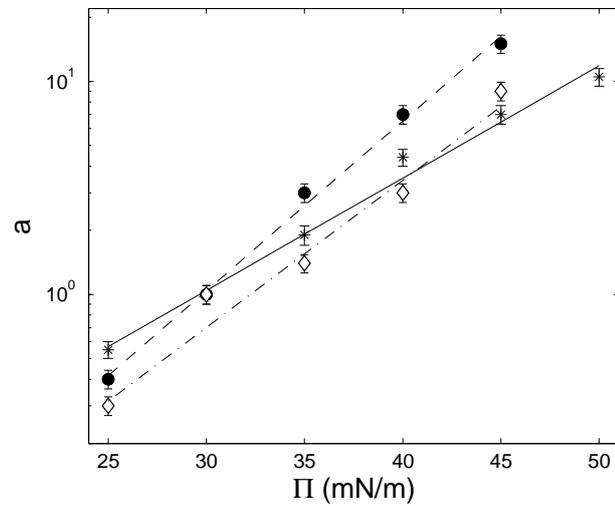


Figura 3.26: Parametri di *shift* usati per ottenere le *mastercurve* in funzione di Π . Il fit è sul modello di legge di attivazione 3.5.

del rapporto tra la viscosità della membrana di riferimento con solo DPPC e la membrana interagente con i farmaci. Con entrambi i farmaci si vede un iniziale effetto fluidificante che all'aumentare di Π si attenua a causa dell'espulsione del farmaco stesso. L'andamento è assolutamente confrontabile in entrambe le misure dove l'espulsione appare essere quasi completa attorno a $\Pi \simeq 40$ mN/m. I parametri dell'interpolazione dei dati sono riportati in Tabella 3.5.

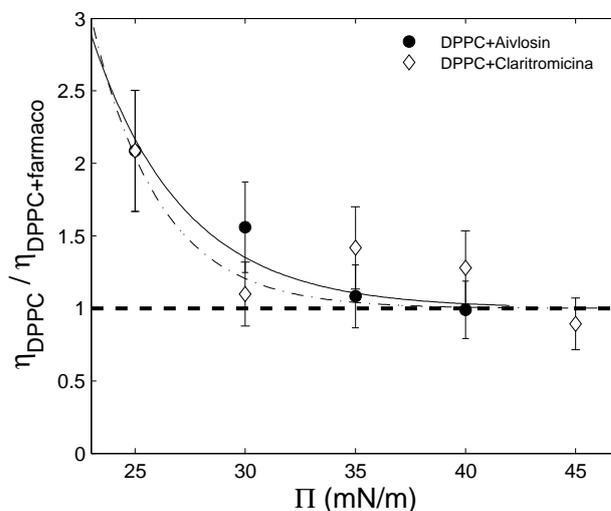


Figura 3.27: Rapporto di η_s dei monostrati interagenti con i farmaci in subfase (Aivlosin (●) e Claritromicina (◇)) e η_s del monostrato puro. Nei due casi l'andamento è confrontabile. La linea solida è l'andamento fenomenologico seguito dai dati sul modello dell'equazione 3.7 per monostrato interagente con Aivlosin e la linea tratteggiata è per monostrato interagente con Claritromicina.

3.3 Misure con Camtel CIR 100

Le misure sul monostrato di DPPC sono state integrate con una serie di prove effettuate con il Camtel CIR 100 presso il *Cavendish Laboratory* di Cambridge (UK), nella struttura di *Physics of Medicine*.

Come spiegato nella descrizione del Camtel CIR 100 nella sezione 2.3, per consentire una corretta misura è necessario creare attorno all'anello di Du Nouy una geometria circolare tramite un anello di contenimento. Due fessure diametralmente opposte consentono la penetrazione del fosfolipide e la formazione del film attorno all'anello rotante. Si rende necessaria una misura preliminare per verificare che il film si formi correttamente dentro l'anello di contenimento.

In Figura 3.28 è mostrato chiaramente che il film si forma senza problemi anche dentro l'anello di contenimento.

Partendo da un ciclo di isoterme come mostrato in Figura 3.9, si effettua

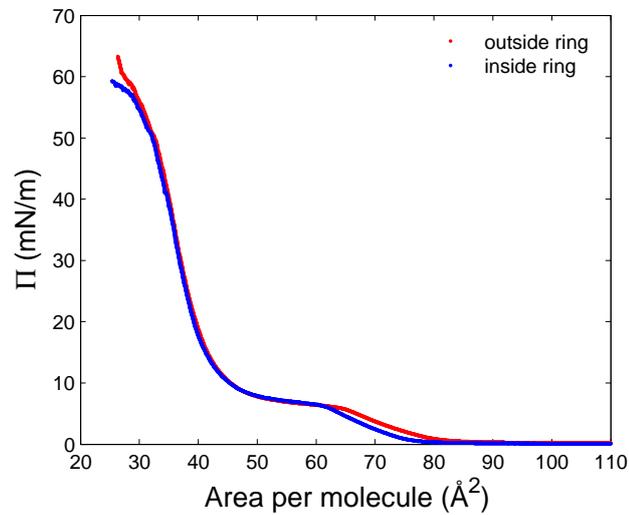


Figura 3.28: Il confronto tra isoterme di DPPC su buffer pH = 6.2 a $T = 22^{\circ}\text{C}$ in cui Π è misurata esternamente all'anello di contenimento (rosso) e internamente (blu) mostra la corretta formazione del monostrato internamente all'anello di contenimento.

una misura con anello rotante ogni volta che il monostrato si trova in un range di pressione superficiale compreso tra $\Pi = 20 \text{ mN/m}$ e $\Pi = 50 \text{ mN/m}$, nel caso di DPPC con subfase di buffer e nel caso di DPPC con subfase di buffer e Claritromicina. Nel caso di subfase di buffer e Aivlosin il range indagato è compreso tra $\Pi = 20 \text{ mN/m}$ e $\Pi = 45 \text{ mN/m}$. La frequenza di oscillazione dell'anello è fissa a 2 Hz per limiti strumentali e l'ampiezza di oscillazione ottimale per l'unica frequenza disponibile è 8 mrad. È stata eseguita una misura di 600 s per ogni ciclo e sono stati misurati i valori del modulo dinamico superficiale viscoso ed elastico ogni 10 s, in modo da avere 60 punti che coprissero interamente la fase di formazione del monostrato. Tramite script di Matlab, appositamente scritto, viene associato ad ogni punto preso col Camtel CIR 100 un valore medio della pressione superficiale in modo da creare una corrispondenza tra quest'ultima e i valori del modulo dinamico superficiale.

Dalla Figura 3.29 (a) si osserva che i due farmaci abbassano sensibilmente

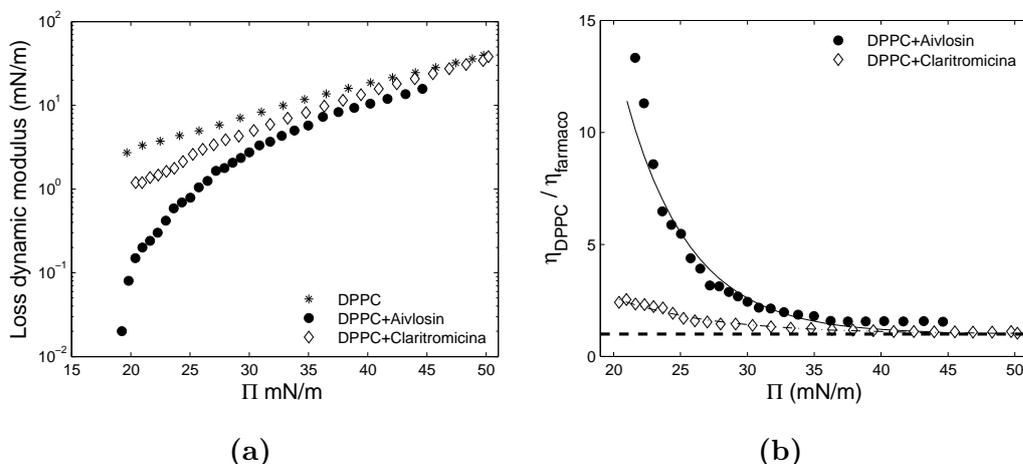


Figura 3.29: (a) I G'' ottenuti con l'anello rotante su buffer con disperso Aivlosin $0.1 \mu\text{M}$ (\bullet) e su buffer con disperso Claritromicina $50 \mu\text{M}$ (\diamond) tendono a G'' del monostrato di DPPC su buffer ($*$) in funzione di Π . $\text{pH} = 6.2$ e $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$. (b) Il rapporto di η_s del monostrato di DPPC e dei farmaci tende asintoticamente a 1 mostrando la probabile espulsione. Il fit è eseguito sul modello di equazione 3.7 con parametri riportati in Tabella 3.5. Primo ciclo.

il modulo viscoso alle basse pressioni superficiali ($\Pi < 30 \text{ mN/m}$), mentre quando la pressione superficiale aumenta, la viscosità tende in entrambi i casi a portarsi sugli stessi valori di quella ottenuta dal film di DPPC con solo buffer.

Siccome appare evidente che l'effetto principale dei farmaci è di fluidificare la membrana modello, questi dati consentono un'interpretazione del seguente tipo: salendo oltre una pressione di soglia, con un valore stimabile a $\Pi \simeq 40 \text{ mN/m}$, il farmaco sembra essere completamente espulso dalla membrana e la viscosità appare uguale in tutti e tre i casi. In particolare l'effetto di Aivlosin $0.1 \mu\text{M}$ è nettamente più marcato di Claritromicina $50 \mu\text{M}$, considerando anche che la concentrazione è due ordini di grandezza inferiore. Questo risultato conferma ulteriormente quanto già osservato con lo strumento ISR nella Sezione 3.2. In Figura 3.29 (b) viene riportato il rapporto tra la viscosità della membrana di puro DPPC e quella ottenuta

con i farmaci in subfase in funzione della Π . In questo modo si evidenzia il raggiungimento del valore di viscosità del riferimento (puro DPPC) per la viscosità delle membrane modello interagenti con i farmaci.

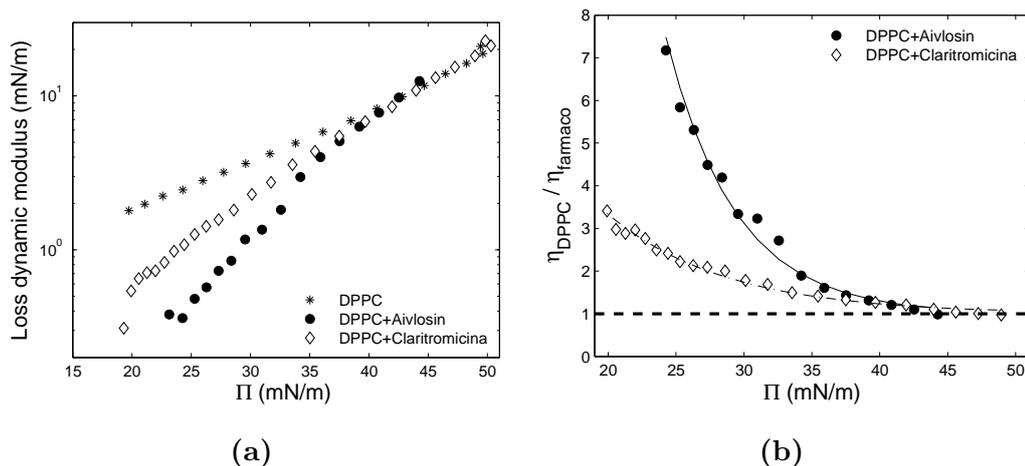


Figura 3.30: (a) I G'' ottenuti con l'anello rotante su buffer con disperso Aivlosin $0.1 \mu\text{M}$ (\bullet) e su buffer con disperso Claritromicina $50 \mu\text{M}$ (\diamond) tendono a G'' del monostrato di DPPC su buffer ($*$) in funzione di Π . $\text{pH} = 6.2$ e $T = 22 \text{ }^\circ\text{C}$. (b) Il rapporto di η_s del monostrato di DPPC e dei farmaci tende asintoticamente a 1 mostrando la probabile espulsione del farmaco. Il fit è eseguito sul modello di equazione 3.7 con parametri riportati in Tabella 3.5. Secondo ciclo.

Dai dati di Figura 3.30 (a), ottenuti lanciando un *time sweep* di 600 s e misurando un valore di G'' ogni 10 s in maniera analoga a quanto descritto sopra, si può trovare conferma di quanto dedotto osservando Figura 3.29. Anche in questo caso si osserva che alle basse pressioni superficiali ($\Pi < 30 \text{ mN/m}$) la diffusione dei farmaci nella membrana modello ha l'effetto di renderla più fluida. Alla pressione superficiale $\Pi \simeq 40 \text{ mN/m}$ avviene la totale espulsione di Claritromicina e Aivlosin dal monostrato e questo fenomeno è particolarmente evidente in Figura 3.30 (a), ovvero in corrispondenza del secondo ciclo. In Figura 3.30 (b) viene riportato il rapporto tra la viscosità della membrana di puro DPPC e quella ottenuta con i farmaci in subfase in funzione della Π anche per il secondo ciclo. Anche in questo caso si conferma

che Aivlosin ha un effetto fluidificante maggiore rispetto a Claritromicina.

E' interessante osservare che il fenomeno di espulsione del farmaco si ripete ad ogni ciclo. Per il primo ciclo questo risultato è atteso in quanto prima si disperde il farmaco in subfase e poi si disperde il fosfolipide. Si da quindi il tempo a Claritromicina e Aivlosin di salire in superficie e raggiungere un equilibrio nel momento in cui si disperde il DPPC all'interfaccia. Per quanto riguarda il secondo ciclo, si può supporre che nella fase di espansione successiva alla compressione il farmaco torni in superficie facendosi spazio tra le molecole di fosfolipide e pertanto abbassa la viscosità alle pressioni fisiologiche venendo successivamente espulso sopra $\Pi \simeq 40$ mN/m.

3.4 Confronto ISR, CIR e letteratura

Siccome sia lo strumento ISR costruito nei laboratori del dipartimento di Parma che il CIR 100 della Camtel danno come informazione il valore del modulo viscoso superficiale G'' , è utile effettuare una serie di misure comparative per verificare che lettura della viscosità del monostrato sia uguale in entrambi i modi. Le condizioni sperimentali sono le medesime: un monostrato di DPPC viene formato all'interfaccia aria-acqua su subfase di buffer a $\text{pH} = 6.2$ e la temperatura fissa a $T = 22^\circ\text{C}$. I risultati ottenuti vengono poi confrontati con quelli già riportati in letteratura. In Figura 3.31 è riportato un riassunto del confronto.

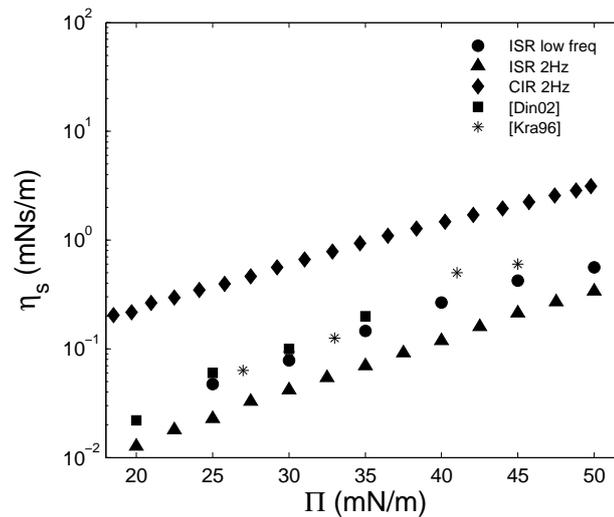


Figura 3.31: Confronto tra diversi valori di viscosità superficiale misurata dall'ISR nel range di basse frequenze (\bullet), dall'ISR a 2 Hz (\blacktriangle), dal CIR 100 a 2 Hz (\blacklozenge) e dalla letteratura (\blacksquare), ($*$)

Siccome il Camtel CIR 100 è limitato ad indagare il modulo superficiale viscoso alla sola frequenza di 2 Hz, si esegue una misura al variare della pressione superficiale nel range $\Pi = 20 \div 50$ mN/m. L'ampiezza dell'oscillazione è fissa a 8 mRad per ogni valore di Π . Per la misura a 2 Hz al variare di Π eseguita con l'ISR, l'ampiezza dello *stress* applicato varia nel range $\text{Amp} =$

0.05 ÷ 0.65 mV, per $\Pi = 20 \div 50$ mN/m.

In entrambi i casi si ottiene il valore della viscosità superficiale dividendo il valore di G'' ottenuto per 4π , ovvero il valore di ω corrispondente alla frequenza di 2 Hz. La parte reale della viscosità dinamica superficiale è infatti:

$$\eta'_s(\omega) = \frac{G_s^*(\omega)}{\omega} \quad (3.8)$$

Ad ogni valore di pressione superficiale indagato si ha uno scostamento di un ordine di grandezza per i valori di η_s tra il CIR 100 e l'ISR e questo indica che probabilmente il primo necessita di una accurata ricalibrazione. Per stabilire quale strumento sia da ricalibrare si aggiungono al confronto una serie di dati ottenuti ancora dall'ISR in un'altra configurazione e due serie di dati ottenuti dalla letteratura. I dati (●) sono ottenuti dall'ISR effettuando il fit di G'' alle basse frequenze come è stato mostrato nella Sezione 3.2. Lo scostamento con i valori di viscosità ottenuti con l'ISR a 2 Hz si può spiegare considerando che a questa frequenza l'effetto di trascinamento della subfase acquosa non è trascurabile.

La serie di misure a bassa frequenza si trova in ottimo accordo con dei dati presenti in letteratura (in particolare a $\Pi \leq 35$ mN/m) che sono stati ottenuti con tecniche diverse rispetto a quelle usate in questo lavoro.

I punti (■) sono stati ottenuti con uno strumento analogo all'ISR ma con una diversa geometria operativa: le bobine in configurazione di anti-Helmholtz e l'ago magnetico sono posti perpendicolarmente alla direzione di movimento delle barriere mobili. Sottoponendo l'ago ad un gradiente di campo magnetico costante si misura la velocità limite che raggiunge. La viscosità superficiale in funzione di un certo parametro (es: la pressione superficiale Π , la temperatura del sistema, etc ...) si ottiene dal confronto tra la velocità limite dell'ago magnetico appoggiato all'interfaccia aria-acqua (v) e la sua velocità limite nelle fissate condizioni sperimentali con il monostrato formato (v_j).

$$\eta_{sj} = D \left(\frac{v}{v_j} - 1 \right) \quad (3.9)$$

D è un fattore di calibrazione. Sono state effettuate misure a diverse temperature e diverse pressioni superficiali con subfase acqua milli-Q [73].

I punti (*) sono stati ottenuti con il metodo delle barriere oscillanti alla frequenza di 0.1 Hz e alla temperatura di $T = 21^\circ\text{C}$ [74].

Espulsione dei farmaci dalla membrana modello

	Aivlosin ISR	Aivlosin CIR 1°	Aivlosin CIR 2°	Claritro- micina ISR	Claritro- micina CIR 1°	Claritro- micina CIR 2°
A $(\frac{m}{mN})$	0.24±0.1	0.21±0.02	0.20±0.02	0.32±0.5	0.14±0.03	0.12±0.02
B	470±100	816±500	739±400	3520±4000	24±18	23±10

Tabella 3.5: Tabella riassuntiva dei parametri ottenuti dal fit dei dati rispettivamente di Figura 3.21 (b), 3.24 (b), 3.29 (b), 3.30 (b), seguendo la funzione modello 3.7.

In Tabella 3.5 sono riassunti, per confronto, i parametri ottenuti dai fit dei dati ricavati dal rapporto tra la viscosità del monostrato di DPPC puro presa come riferimento e la viscosità dello stesso monostrato con Aivlosin e Claritromicina in subfase al variare di Π . Le misure sono state eseguite sia con l'ISR, sia con il Camtel CIR 100. I parametri riportati in tabella sono stati ottenuti dalla funzione modello 3.7.

Per la misura eseguita con Claritromicina in subfase con l'ISR e le due misure eseguite con il Camtel CIR 100 si notano alcune discrepanze. Nel caso della misura ISR, Claritromicina sembra essere espulso più velocemente rispetto a quanto mostrato nelle misure CIR. A parità di Π , Claritromicina mostra un effetto fluidificante sulla membrana modello simile con entrambi gli strumenti. Da ciò si può supporre che la differenza nei valori dei parametri 'A' e 'B' sia dovuta ad una mancanza di dati a $\Pi < 25$ mN/m che provoca una diversa interpretazione dell'andamento dei punti stessi. Con l'ISR non

si riesce a sondare proficuamente la viscosità in quella regione di Π .

La misura eseguita con Aivlosin in subfase con l'ISR è in accordo con entrambe le misure eseguite con il Camtel CIR 100 per quanto riguarda i valori del parametro 'A', che da un'indicazione sulla velocità a cui viene espulso il farmaco. C'è invece disaccordo per quanto riguarda i valori del parametro 'B' che da informazioni sulla viscosità limite del monostrato. Dalle misure CIR risulta un effetto fluidificante sensibilmente maggiore a $\Pi < 30$ mN/m rispetto alla misura ISR. Questo significa che nel caso di Aivlosin si osserva un effetto fluidificante maggiore rispetto a Claritromicina alle alte frequenze, mentre a basse frequenze gli effetti fluidificanti sono uguali per i due farmaci. In tutte le misure viene confermato che a $\Pi \simeq 38$ mN/m avviene la completa espulsione di entrambi i farmaci dalla membrana modello e questo determina il comportamento asintotico del rapporto delle viscosità a $\eta_{DPPC}/\eta_{farmaco} \sim 1$.

Conclusioni

La lunga e accurata serie di misure ISR effettuate sul monostrato di DPPC ha consentito di eliminare diverse possibili fonti di errore che possono affliggerle. L'esperienza sviluppata ha permesso di ottenere la conferma che i monostrati di DPPC hanno un carattere viscoso dominante su quello elastico. E' stato necessario approfondire questo aspetto in quanto sono state riportate misure di microreologia in cui è stato osservato un carattere elastico dominante su quello viscoso nella regione liquido-compresso appena oltre la fase di coesistenza liquido-compresso/liquido-espanso [75]. Il monostrato mostra una η_S crescente in funzione di Π , un risultato atteso dalla comune esperienza di sistemi in cui si ha aumento di densità e in accordo con quanto riportato in letteratura da misure effettuate con tecniche diverse (sezione 3.4). La componente elastica resta invece sempre diversi ordini di grandezza inferiore rispetto alla componente viscosa, ad ogni ω se fissata Π e ad ogni Π se fissata la ω .

La sensibilità dello strumento a valori di $\eta_S \sim \text{mNs/m}$, ha reso possibile utilizzare l'ISR per sondare le proprietà viscoso della membrana modello di DPPC interagente con i farmaci macrolidi Aivlosin e Claritromicina. Questi farmaci, inserendosi tra le molecole di fosfolipide, hanno l'effetto di fluidificare la membrana abbassandone la viscosità e ciò è stato confermato dalle misure eseguite con il reometro interfacciale (sezione 3.2 e 3.3). Per Aivlosin è stato anche osservato un diverso comportamento al variare del pH della subfase acquosa in cui viene disperso. Siccome la sua costante di seconda ionizzazione acida è $\text{pKa}_2 = 7.6$ [67], nell'ambiente buffer a $\text{pH} = 6.2$ prevale

la forma di singolo anione. Questo sale più facilmente alla superficie rispetto al doppio anione presente a $\text{pH} = 7$ dell'acqua pura la cui ascesa all'interfaccia è sfavorita dal costo energetico di accumulare cariche elettrostatiche. La tendenza di Aivlosin a penetrare nelle membrane fosfolipidiche è dovuta alla presenza del gruppo funzionale idrofobico *isovaleryl* che trova affinità con le code apolari [67].

Grazie alla sensibilità dello strumento si è stati in grado di correlare la diminuzione del rapporto tra la viscosità della membrana non interagente con farmaco, presa come riferimento, e la viscosità delle membrane interagenti con i farmaci, con l'aumento di Π della membrana modello. In particolare a $\Pi \simeq 40 \text{ mN/m}$ i valori di viscosità sono circa uguali. E' stato ipotizzato a riguardo un andamento puramente fenomenologico di carattere esponenziale che necessita di ulteriori studi per essere compreso a fondo. L'ipotesi avanzata per spiegare il fenomeno osservato prevede che all'aumentare della Π le molecole del farmaco presenti all'interno della membrana modello vengano espulse o in subfase oppure verso le catene idrofobiche del DPPC. In questo modo il loro effetto fluidificante viene annullato in quanto non costituirebbero più un agente esterno che abbassa la coesione delle molecole di DPPC.

E' stato possibile, in aggiunta, effettuare un confronto fra il reometro presente nei laboratori del Dipartimento di Fisica di Parma (ISR) e un analogo strumento (CIR), ma con una diversa geometria di funzionamento, presente presso il *Cavendish Laboratory* di Cambridge. Dall'analisi comparata dei due reometri risulta una differenza di un fattore 10 nei valori di viscosità superficiale del monostrato di DPPC misurata (sezione 3.4). Questo induce a pensare che sia presente un fattore di calibrazione errato per le misure effettuate con il CIR.

In ultima analisi si osserva un andamento qualitativamente simile del rapporto tra le viscosità superficiali del monostrato di riferimento e del monostrato trattato con farmaci in funzione di Π per i due reometri usati. Ciò conferma che l'effetto non è frutto di artefatti ma le misure eseguite con tecniche diverse concordano e aprono la strada ad ulteriori studi.

Bibliografia

- [1] Blanco O., Perez-Gil J., *European Journal of Pharmacology*, 568, (2007), 1-15.
- [2] Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., *Biochimica*, Zanichelli, 2003.
- [3] http://www.geneticaebiologia.unito.it/membrana/fosfatidilcolina_dettaglio.png.
- [4] Lehninger A.L. and Nelson D.L. Cox M.M., *Principi di Biochimica*, Zanichelli, 1994.
- [5] Singer S.J., Nicolson G.L., The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes, *Science*, 175, (1972), 720-731.
- [6] Zachowski A., Deveaux P.F., Transmembrane Movements of Lipids, *Experimentia*, 46, (1990), 644-656.
- [7] Robertson J.D., Membrane Structure, *The Journal of Cell Biology*, (1981), 91, pp 189-204.
- [8] Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., *Molecular Biology of the Cell*, 4th Ed. 2002, New York: Garland Science.
- [9] http://www-3.unipv.it/webbio/anatcomp/freitas/2008-2009/biocell_BT08-09.htm.
- [10] V.I. Troitsky, Methods of deposition of molecular organized thin films.

- [11] Kaganer V.M., Moehwald H, Dutta P., Structure and phase transitions in Langmuir monolayers, *Reviews of Modern Physics*, 71, 3, (1999), 779-819.
- [12] Israelachvili J., *Langmuir*, 10, (1994), 3774.
- [13] Roberts G., *Langmuir-Blodgett films*, Plenum Press, 1990.
- [14] *TENSIOMETERS AND LANGMUIR-BLODGETT TROUGHES*, OPERATING MANUAL, NIMA.
- [15] Jorgensen K., Ipsen J. H., Mouritsen O. G., Zuckermann M. J., The effect of anaesthetics on the dynamic heterogeneity of lipid membranes. *Chem. Phys. Lipids*, 65, (1993), 205216.
- [16] Jorgensen K., Ipsen J. H., Mouritsen O. G., Bennett D., Zuckermann M. J., The effects of density fuctuations on the partitioning of foreign molecules into lipid bilayers: application to anaesthetics and insecticides, *Biochim. Biophys. Acta*, 1067, (1991), 241253.
- [17] Wenz J. J., Barrantes F. J., Steroid structural requirements for stabilizing or disrupting lipid domains, *Biochemistry*, 42, (2003), 1426714276.
- [18] Agasosler A.V., Tungodden L.M., Cejka D., Bakstad E., Sydnes L.K., Holmsen H., Chlorpromazine-induced increase in dipalmitoylphosphatidylserine surface area in monolayers at room temperature, *Biochem. Pharmacol.*, 61, (2001), 817-825.
- [19] Saint-Laurent A., Boudreau N., Lariviere D., Legault J., Gaudreault R.C., Auger M., Membrane interactions of a new class of anticancer agents derived from arylchloroethylurea: a FTIR spectroscopic study, *Chem. Phys. Lipids*, 111, (2001), 163-175.
- [20] Mingeot-Leclercq M.P., Tulkens P.M., Aminoglycosides: nephrotoxicity, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43, (1999), 1003-1012.

- [21] A. Schanck, M. P. Mingeot-Leclercq, P. M. Tulkens, D. Carrier, I. C. Smith, H. C. Jarrell, Interactions of aminoglycoside antibiotics with phospholipids, A deuterium nuclear magnetic resonance study, *Chem. Phys. Lipids*, 62, (1992), 153163.
- [22] D. Tyteca, A. Schanck, Y. F. Dufrene, M. Deleu, P. J. Courtoy, P. M. Tulkens, M. P. Mingeot-Leclercq, The macrolide antibiotic azithromycin interacts with lipids and affects membrane organization and fluidity: studies on Langmuir-Blodgett monolayers, liposomes and J774 macrophages, *J. Membr. Biol.*, 192, (2003), 203215.
- [23] Seydel J.K., Wiese M, (Eds.), Drug-Membrane Interactions, WILEY-VCH, Weinheim, 2002.
- [24] Wikipedia. <http://en.wikipedia.org/wiki/macrolide>, 2012. [Online; Retrieved 1-July-2012].
- [25] Omura S., Macrolide antibiotics: chemistry, biology, and practice, Boston:Academic Press, 2002, 2nd edition.
- [26] Kaiser G., Protein synthesis inhibitors: macrolides mechanism of action animation. Classification of agents, The Community College of Baltimore County, [Online; Retrieved 31-July-2009].
- [27] www.aivlosin.com.
- [28] Eco Animal Health website. <http://www.ecoanimalhealth.com>.
- [29] Comunicazione personale, Dr David Brown, Dipartimento di Viriologia, Cambridge University.
- [30] Pagine Sanitarie, Health care network web site (<http://www.paginesanitarie.com/euromedia/veterinari.nsf/0e5ded19dfd64caa41256d2e003cc6cc/06cb52d7ea6c6ae8c125763400381d8a?OpenDocument>).

- [31] <http://it.wikipedia.org/wiki/Claritromicina>.
- [32] <http://www.rxlist.com/biaxin-drug.htm>.
- [33] U.S. Food and Drug Administration prescribing information.
- [34] AA VV, *Interfacial Rheology*, BRILL, 2009, 1-37.
- [35] Cicuta P., Tesi di Dottorato, *Viscoelasticity of Insoluble Macromolecular Monolayers*, University of Cambridge, 2003.
- [36] Meyers M. and Chawla K., *Mechanical behavior of Materials*, Prentice Hall, (1999), pp 570-580.
- [37] Brooks C.F., Fuller G.G., Frank C.W., Robertson C.R., An Interfacial Stress Rheometer To Study Rheological Transitions in monolayers at the Air-Water Interface, *Langmuir*, 15, (1999), 2450-2459.
- [38] Romeo A., *Interaction between macrolide antibiotics and model membranes*, Università degli Studi di Parma, 2010.
- [39] Mencuccini C., Silvestrini V., *Fisica I*, Liguori Editore, 1998, 190-192.
- [40] Mazzoldi P., Nigro M., Voci C., *Fisica Vol. I*, EdiSES Edizioni, 1998, 94-118.
- [41] Levine A.J., Liverpool T.B., MacKintosh F.C., On the mobility of extended bodies in viscous films and membranes, *Physical Review E*, 69, (2004).
- [42] Orsi D., Cristofolini L., Fontana M.P., Equilibrium and out-of-equilibrium dynamics in a molecular layer of azopolymer floating on water studied by Interfacial Shear Rheology, *Journal of non-Crystalline Solids*, 357, (2011), 580-586.
- [43] Tobolsky A.V., *Properties and Structures of Polymers*, Wiley, 1960.
- [44] Ferry J.D., *Viscoelastic Properties of Polymers*, Wiley, 1980.

- [45] Williams M.L., Landel R.F., Ferry J.D., The Temperature Dependence of Relaxation Mechanisms in Amorphous Polymers and Other Glass-forming Liquids, *J. Am. Chem. Soc.*, 77, (1955), 3701-3707.
- [46] Van Gurp M., Palmen J., Time-Temperature Superposition Method for Polymeric Blends, *Society of Rheology*, 2007.
- [47] Reynaert S., Brooks C.F., Moldenaers P., Vermant J., Fuller G.G., Analysis of the magnetic rod interfacial stress rheometer, *Journal of Rheology*, 52, (2008), 261-285.
- [48] Feriani L., Misure meccaniche ad elevata sensibilità su singoli strati molecolari.
- [49] Sherriff M., Warburton B., *Polymer*, 15, (1974), 253.
- [50] Sherriff M., Warburton B., In: Theoretical Rheology, Holten J., Pearson J.R.A. and Walters K. (eds.), *Applied Science*, London, 1975, pp.299.
- [51] Warburton B., In: Rheological Measurements, Collyer A.A. and Clegg D.W. (eds.), Chapman and Hall, London, 1998, pp.723.
- [52] Warburton B., *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 1 (1996), 481.
- [53] Warburton B., In: Techniques in Rheological Measurements, Collyer A.A. (ed.), Chapman and Hall, London, 1993, pp.5.
- [54] Coffman J.P., Naumann C.A., Molecular Weight Dependence of Viscoelastic Properties in Two-Dimensional Physical Polymer Networks: Amphiphilic Lipopolymer Monolayers at the Air-Water Interface, *Macromolecules*, 35, (2002), 1835-1839.
- [55] Moules C., Principles of Interfacial Rheology and Measurement with CIR-100, TechNote1, Camtel Ltd., Royston, UK, 1998.
- [56] Spigone E., Cho G., Fuller G.G., Cicuta P., Surface Rheology of a Polymer Monolayer: Effects of Polymer Chain Length and Compression Rate, *Langmuir*, 25, 7457-7464, (2009).

- [57] Material safety data sheet, Sigma Aldrich.
- [58] <http://en.wikipedia.org/wiki/Dipalmitoylphosphatidylcholine>.
- [59] Material safety data sheet, ECO Animal Health.
- [60] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/SIGMA/M1317?lang=it®ion=IT>.
- [61] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m8250?lang=it®ion=IT>.
- [62] Kim K., Choi S. Q., Zasadzinski J.A., Squires T.M., Interfacial Micro-rheology of DPPC Monolayers at the Air-Water Interface, *Soft Matter*, 7, (2011), 7782-7789.
- [63] http://www.ecoanimalhealthgroupplc.com/~media/Files/E/Eco-Animal-Health-Group/Attachments/pdf/aivlosin_info.pdf.
- [64] Atkins P.W., Chimica Fisica, Zanichelli, 2004, 209-211.
- [65] Gaines G.L. Jr., Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces, New York: Interscience, 1966.
- [66] Butt H.J., Graf K., Kappl M., Physics and Chemistry of Interfaces, WILEY-VCH, 2003, 35-39.
- [67] <http://ip.com/pat/US20100010080#desc>.
- [68] E. Polverini, S. Arisi, P. Cavatorta, T. Berzina, L. Cristofolini, A. Fasano, P. Riccio, M. P. Fontana, Interaction of Myelin Basic Protein with Phospholipid Monolayers: Mechanism of Protein Penetration, *Langmuir*, 19, 872-877, (2003).
- [69] L. Cristofolini, M. P. Fontana, F. Serra, A. Fasano, P. Riccio, O. Konovalov, Micro-structural analysis of the effects of incorporation of Myelin Basic Protein in phospholipid layers, *European Biophys. Jou.*, 34, 1041, (2005).
- [70] Adam N.K., Proc. R. Soc. London, Ser. A 101, 516, 1922.

-
- [71] Wustneck R., Wustneck N., Moser B., Karageorgieva V., Pison U., Surface Dilatational Behavior of Pulmonary Surfactant Components Spread on the Surface of a Pendant Drop. 1. Dipalmitoyl Phosphatidylcholine and Surfactant Protein C, *Langmuir*, vol. 18, Feb. 2002, 1119-1124.
- [72] Rana F.R., Mautone A.J., Dluhy R.A., Surface Chemistry of Binary Mixtures of Phospholipids in Monolayers. Infrared Studies of Surface composition at Varying Surface Pressures in a Pulmonary Surfactant Model System, *Biochemistry*, 32, (1993), 3169-3177.
- [73] Ding J., Warriner E.H., Zasadzinsky A., Schwartz D.K., Magnetic Needle Viscometer for Langmuir Monolayers, *Langmuir*, 18, (2002), 2800-2806.
- [74] Kragel J., Kretzschmar G., Li J.B., Loglio G., Miller R. and Mohwald H., Surface rheology of monolayers, *Thin Solid Films*, 284-285, (1996), 361-364.
- [75] Choi S., Steltenkamp S., Zasadzinski J. et al., Active microrheology and simultaneous visualization of sheared phospholipid monolayers, *Nature communications*, 2, (2011), 312.