



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di laurea magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

**STABILITA' STRUTTURALE DI CUBOSOMI PER
DRUG DELIVERY**

**STRUCTURAL STABILITY OF CUBOSOMES FOR
DRUG DELIVERY**

Tesi di Laurea Magistrale
Di: **Marianna Ranaudo**

Relatore
Chiar.mo Prof.
Paolo Mariani

Sessione Febbraio 2020
Anno Accademico 2018/2019

A mio nonno

Scopo della tesi

I nanosistemi a base lipidica sono stati ampiamente proposti come sistemi di erogazione di farmaci (*drug delivery*). Tra le matrici lipidiche utilizzate per il rilascio prolungato di farmaci, sono da ricordare quelle basate sulla monooleina (MO), e in particolare le MAD, dispersioni in soluzione acquosa di monooleina. Le MAD sono sistemi eterogenei composti da nanoparticelle costituite da monooleina organizzata in strutture liotropiche liquido-cristalline, che vanno da fasi lamellari ad esagonali o cubiche.

La struttura interna delle nanoparticelle dipende da numerosi fattori (come ad esempio composizione, temperatura, caratteristiche del farmaco incapsulato), ed è ben noto che la morfologia della struttura può avere una grande influenza sul carico che la nanoparticella può sopportare, sulla stabilità del prodotto ottenuto e sulle modalità di erogazione delle molecole trasportate. E' chiaro perciò che un'approfondita caratterizzazione della fase lipidica è di fondamentale importanza al fine di sviluppare sistemi appropriati. Le proprietà strutturali e il polimorfismo del sistema monooleina/acqua sono state studiate da lungo tempo: il diagramma di fase è dominato da due fasi cubiche bicontinue appartenenti a due diversi gruppi spaziali differenti, $Pn3m$ e $Ia3d$, mentre una fase esagonale inversa è presente a temperature molto elevate (superiori a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$) e una fase lamellare liquido-cristallina si osserva a

bassa idratazione. Fin dai primi studi che hanno chiarito il comportamento di fase e hanno sottolineato la somiglianza strutturale delle fasi cubiche con l'organizzazione fisiologica della membrana lipidica, la monooleina ha ricevuto grande attenzione per applicazioni nell'area farmaceutica: in effetti, la capacità di incapsulamento di additivi con differenti proprietà (idrofilici, idrofobici e anfifilici), insieme alla capacità di proteggere e rilasciare lentamente le molecole intrappolate, rendono le fasi cubiche della monooleina candidati eccellenti per ottenere sistemi di somministrazione di farmaci.

Essendo tutte le applicazioni indicate fortemente correlate all'integrità del mezzo, la particolare necessità di controllare la struttura e l'intervallo di stabilità delle fasi cubiche è evidente.

Per quanto riguarda l'incorporazione di proteine, diverse proteine idrofobiche o idrofiliche sono state solubilizzate in fasi cubiche di MO, con conseguente determinazione della diversa capacità di caricamento e l'osservazione delle eventuali modifiche dei diagrammi di fase. Ad esempio, il caricamento al 18% p/p è stato ottenuto con una varietà di proteine solubili (compresi lisozima e mioglobina): alcuni risultati hanno suggerito una localizzazione delle molecole proteiche nel mezzo acquoso e hanno dimostrato il raggiungimento di condizioni di equilibrio in 24 h (7 giorni per la mioglobina). Inoltre, la formazione di una struttura cubica Ia3d è stata suggerita nel caso del lisozima,

anche se la cella unitaria riportata era sorprendentemente grande. Questo punto è rilevante, perché una fase cubica $Ia3d$ non è mai stata osservata in condizioni di eccesso di acqua. È stato anche considerato il sistema composto da monooleina in soluzione acquosa di citocromo-c: il diagramma di fase dipendente da T e concentrazione mostrava la presenza di una fase cubica $Im3m$, non presente nel sistema MO/acqua, e una fase cubica $P4_332$, mai osservato fino ad allora nei sistemi contenenti lipidi. Questi dati sono stati confermati recentemente.

Nel complesso, si ottiene l'incorporazione di proteine in fasi cubiche di MO, ma i dati suggeriscono che l'interazione tra la MO e le molecole intrappolate determinino la stabilità delle diverse strutture e l'efficienza del caricamento. Il presente lavoro di tesi si focalizza sulla necessità di una maggiore comprensione delle proprietà strutturali e di stabilità delle differenti fasi osservate nel sistema MO/acqua, valutando l'effetto di due proteine simili (HSA e BSA) sul polimorfismo della monooleina in eccesso d'acqua. Sono stati considerati due parametri, la concentrazione della proteina nella soluzione di carico e il tempo di incubazione. Gli esperimenti di diffrazione dei raggi X e di spettrofotometria UV-visibile sono stati eseguiti per derivare le proprietà strutturali delle fasi che eventualmente si formano nelle diverse condizioni e per valutare l'effetto delle proteine HSA e BSA sulle fasi

cubiche della monooleina in funzione del tempo di incubazione e della concentrazione proteica nelle soluzioni. I risultati supportano la necessità di valutare le caratteristiche strutturali delle matrici lipidiche per applicazioni tecnologiche e farmacologiche.

INDICE

1. INTRODUZIONE

1.1	Presentazione della tesi	pag. 8
1.2	Lipidi	10
1.2.1	<i>Monooleina</i>	13
1.2.2	<i>Polimorfismo lipidico e caratterizzazione</i>	15
1.2.3	<i>Diagramma di fase lipidico</i>	24
1.3	Cubosomi	26

2. MATERIALI E METODI

MATERIALI

2.1	Sistema lipidico monooleina/acqua	pag. 28
2.1.1	<i>Human Serum Albumin (HSA) e Bovine Serum Albumin (BSA)</i>	29
2.1.2	<i>Polietilen-glicole (PEG)</i>	32

METODI

2.2	Diffrazione raggi-X	pag. 37
2.2.1	<i>Il diffrattometro raggi-X</i>	41
2.2.2	<i>Calibrazione dello strumento con il tricosano</i>	46
2.2.3	<i>Preparazione per l'analisi di diffrazione e analisi dati</i>	48
2.3	Spettrofotometria UV-visibile	51

3. RISULTATI

3.1	Analisi spettrofotometriche	pag. 57
3.1.1	<i>Curve di taratura</i>	57
3.1.2	<i>Analisi sulla concentrazione in soluzione di HSA e BSA</i>	59
3.2	Analisi diffrazione raggi-X	64
3.2.1	<i>Analisi dei campioni con HSA e BSA in soluzione</i>	66
3.2.2	<i>Analisi dei campioni con PEG in soluzione</i>	78

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI pag. 90

BIBLIOGRAFIA pag. 99

1. INTRODUZIONE

1.1 Presentazione della tesi

Il lavoro presentato in questa tesi riguarda lo studio del polimorfismo liquido-cristallino del sistema lipidico monooleina/acqua e lo studio dell'effetto della proteina sierica umana (*Human Serum Albumin*) e della proteina sierica da bovino (*Bovine Serum Albumin*), sulle fasi cubiche di monooleina.

La monooleina (MO) è definita uno dei lipidi più importanti nel campo del *drug delivery* (1), il quale è un fenomeno che vede l'utilizzo di dispositivi (*drug delivery systems*) che permettono l'inglobamento di un farmaco al loro interno, con lo scopo di aumentare il tempo di vita e di veicolarlo in uno specifico distretto (2). La monooleina mostra proprietà anfifiliche essendo caratterizzata da un gruppo polare (testa) e da una catena di idrocarburi non polare (coda); proprio grazie alle sue proprietà anfifiliche che la monooleina è in grado di auto-assemblarsi in diverse strutture liquido-cristalline a diverse condizioni di temperatura e composizione del solvente; note rispettivamente come fasi termotropiche e liotropiche (1). Le proprietà strutturali e il polimorfismo della monooleina nelle soluzioni acquose sono stati studiati per molto tempo. La presenza di fasi bicontinue, la capacità di incapsulare composti idrofili, idrofobici e anfifilici, insieme alla capacità di proteggere e

rilasciare lentamente le molecole intrappolate, hanno designato le fasi della monooleina come buone matrici per il rilascio prolungato di farmaci (3). La tecnica che è stata utilizzata e che ci ha permesso di caratterizzare le diverse strutture è la *diffrazione raggi-X*. Con questa tecnica è stato possibile monitorare il cambiamento di fase della monooleina in soluzione acquosa e soprattutto è stato possibile valutare l'effetto delle due proteine sulle fasi cubiche della monooleina in funzione del tempo di incubazione e della concentrazione proteica nelle soluzioni. Mentre, mediante tecniche *spettrofotometriche* è stato possibile capire quale effetto l'HSA e la BSA esercitavano sui cubosomi di monooleina e se le due proteine venivano inglobate o meno all'interno dei cubosomi.

1.3 Lipidi

I lipidi sono una delle tre principali classi di molecole biologiche essenziali ad elevato peso molecolare (tra 100 e 5000) . I lipidi vengono identificati sulla base delle loro proprietà comuni di solubilità: non sono solubili in acqua, mentre sono solubili in solventi organici come etere dietilico o acetone, alcoli e idrocarburi. Si trovano in tutti gli organismi viventi, animali o vegetali; sono tra i maggior costituenti della cellula. Sono specificatamente localizzati nelle membrane (rappresentano circa il 20-80% della massa totale della membrana stessa) e sono presenti in alta concentrazione anche in molti organelli cellulari dove vengono utilizzati nella produzione o riparazione delle membrane cellulari; sono trasportati nelle cellule animali sotto forma di piccoli aggregati detti lipoproteine. Infine possono essere utilizzati come fonte di energia (4). Dal punto di vista strutturale, i lipidi sono costituiti da una porzione idrocarbonica, alifatica o aromatica (coda) ed una parte polare (testa) [Fig. 1] (5).

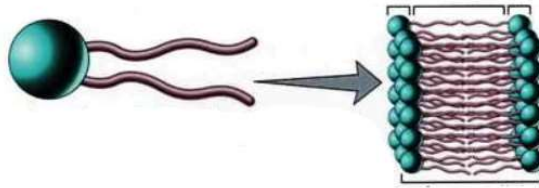


Fig. 1: Rappresentazione schematica di un lipide anfifilico (6)

In base alla struttura del loro scheletro vengono classificati come *lipidi complessi*, che contengono acidi grassi; o come *lipidi semplici*, che non contengono acidi grassi (7). I lipidi principalmente trattati sono i *fosfolipidi*.

Un fosfolipide è formato da una molecola di glicerolo unita a due molecole di acidi grassi e legata a un gruppo fosfato (PO_4^-) a sua volta legato ad un gruppo organico indicato con R (gruppo radicale) che specifica il tipo di fosfolipide. La molecola risulta essere formata da una ‘testa’ polare idrofila e da due ‘code’ non polari idrofobe. I lipidi con questa caratteristica vengono detti *anfipatici* o *lipidi polari* (6).

A causa delle proprietà anfifiliche, le molecole lipidiche, in acqua, sono in grado di auto-aggregarsi in una grande varietà di strutture, formando un doppio strato con le teste polari rivolte verso l’acqua e le code idrofobe rivolte all’interno del bilayer. Se invece i fosfolipidi si dispongono in lamine ad un unico strato, queste tendono a rinchiudersi su se stesse delimitando un

ambiente interno lipidico separato dall'esterno che invece rimane a contatto con l'acqua. Una struttura del genere viene denominata micella (8).

In fig. 2 viene mostrata le diverse organizzazioni dei lipidi nella micella e nel doppio strato lipidico.

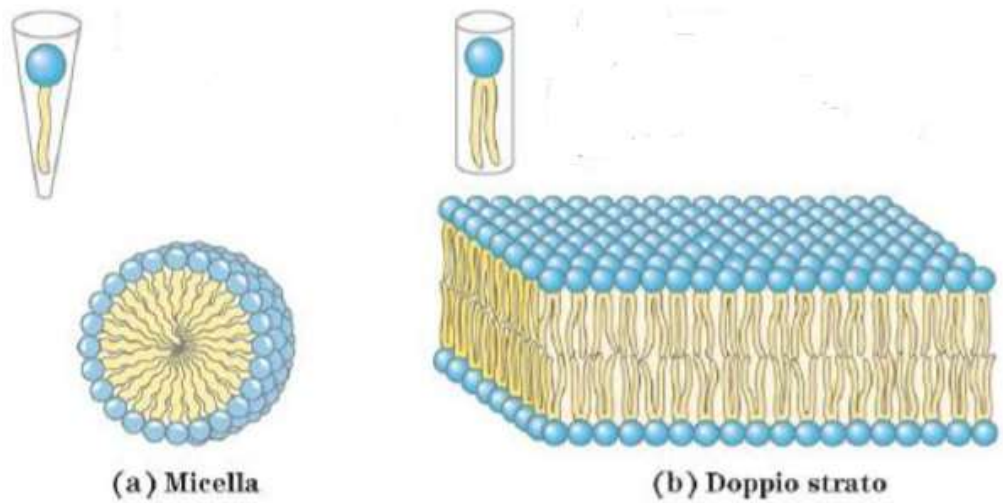


Fig. 2: Organizzazione dei fosfolipidi nella micella (sinistra) e nel bilayer (destra).

1.3.1 La monooleina

La 1-Monooleina (1- (cis-9-ottadecenoil) -rac-glicerolo) è, macroscopicamente parlando, un liquido viscoso, giallo chiaro o giallo pallido. Dal punto di vista molecolare, la monooleina è un lipide composto da una catena di idrocarburi, che è attaccata al backbone di glicerolo da un legame estere. I restanti due gruppi idrossilici della frazione glicerolica conferiscono caratteristiche polari a questa parte della molecola (testa). Pertanto, possono formare legami idrogeno con acqua in soluzioni acquose. Al contrario, la catena idrocarburica formata da 18 atomi di carbonio (coda) è caratterizzata da un doppio legame cis tra i carboni C9 e C10, ed è fortemente idrofobica [Fig. 3]; quindi la monooleina mostra chiaramente delle proprietà anfifiliche, con un valore HLB (bilancio lipofilo idrofilo) complessivo di 3.8 (1).

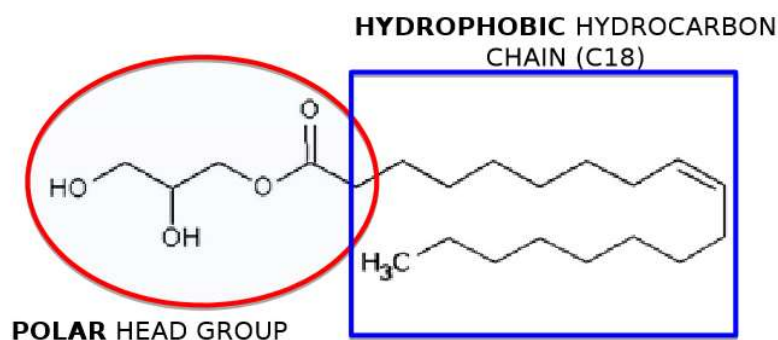


Fig. 3: Struttura chimica della monooleina (1).

La monooleina (MO) è insolubile in acqua ed alcool freddo, ma molto solubile in olio, etere di petrolio, cloroformio ed alcool caldo. La monooleina è un materiale atossico, biodegradabile e biocompatibile; la sua biodegradabilità è dovuta al fatto che essa è soggetta a lipolisi a causa dell'attività dell'esterasi nei diversi tessuti. Ulteriori proprietà fisico-chimiche della monooleina sono raccolte nella *Tabella 1* (1).

Chemical Name	9-Octadecenoic acid (Z)-monoester with 1,2,3-propanetriol
Common names	Monoolein, Glycerol-1-oleate, glycerol oleate, glyceryl monooleate, GMO, 1-(cis-9-Octadecenoyl)- <i>rac</i> -glycerol, DL- α -Monoolein, α -monoolein glycerol, Glyceryl cis-9-octadecenoate, 1-Oleoyl-sn-glycerol.
Empirical formula	C ₂₁ H ₄₀ O ₄
Molar mass	356.55 g mol ⁻¹
Acid value	< 20
Boiling point	238-240 °C
Density	0.94 g cm ⁻³
Hydrophilic-lipophilic balance	3.8
Melting point	36 °C
Refractive index	1.4626
Saponification value	160-170

Tabella 1: Proprietà chimiche della monooleina (1).

Grazie alle proprietà anfifiliche della monooleina, essa è capace di auto-assemblarsi in diverse strutture liquido-cristalline. Lo stato liquido-cristallino è uno stato della materia intermedio tra un liquido isotropo ed un cristallo solido; ed è proprio la combinazione delle proprietà di un liquido e di un cristallo che ne determina tale nome (1).

1.3.2 Polimorfismo lipidico e caratterizzazione

In questo paragrafo saranno descritte le diverse fasi liquido-cristalline che i lipidi adottano in acqua e i fattori che ne controllano la stabilità; però prima è necessario comprendere quali sono i concetti alla base del polimorfismo lipidico.

Una delle principali forze motrici per l'auto-assemblaggio delle molecole anfifiliche è l'effetto idrofobico, il quale agisce per ridurre al minimo l'interfaccia tra le code idrofobiche del lipide e l'acqua del solvente. Tuttavia, vi sono molti fattori che determinano o influenzano la formazione di particolari strutture come ad esempio la concentrazione e la forma di un anfifilo i quali svolgono un ruolo decisivo. I lipidi formano micelle quando la concentrazione è uguale o maggiore alla concentrazione micellare critica (CMC) e quando la temperatura è maggiore della temperatura micellare critica (CMT).

Il principio fondamentale alla base della differenza nell'auto-assemblaggio dei lipidi è la loro forma, che a sua volta riflette il loro carattere anfifilico. Le molecole di forma cilindrica formano fasi di *tipo 0*, ovvero formano micelle affini al doppio strato lipidico con curvatura quasi nulla [Fig. 4]. Un tipico esempio di fase di *tipo 0* è una fase lamellare formata da DOPC (dioleil

fosfatidilcolina) a temperatura ambiente in eccesso di acqua. Invece la forma a cono è tipica delle molecole detergenti, che presentano una testa polare più ingombrante; essi pertanto formano micelle di *tipo 1*, dove il doppio strato lipidico è curvato verso la regione della catena. Infine le molecole a forma di cuneo formano micelle inverse o di *tipo 2*. Un esempio è il DOPE (dioleil fosfatidiletanolamina) che forma una fase esagonale inversa. La convenzione dei segni della curvatura adottata dai diversi autori può variare, ma la maggior parte di essi ha adottato la seguente convenzione: la curvatura verso la regione della catena (fase di *tipo 1*) è indicata come curvatura positiva, mentre la curvatura verso la regione dell'acqua è indicata come curvatura negativa (fase di *tipo 2*) (1).

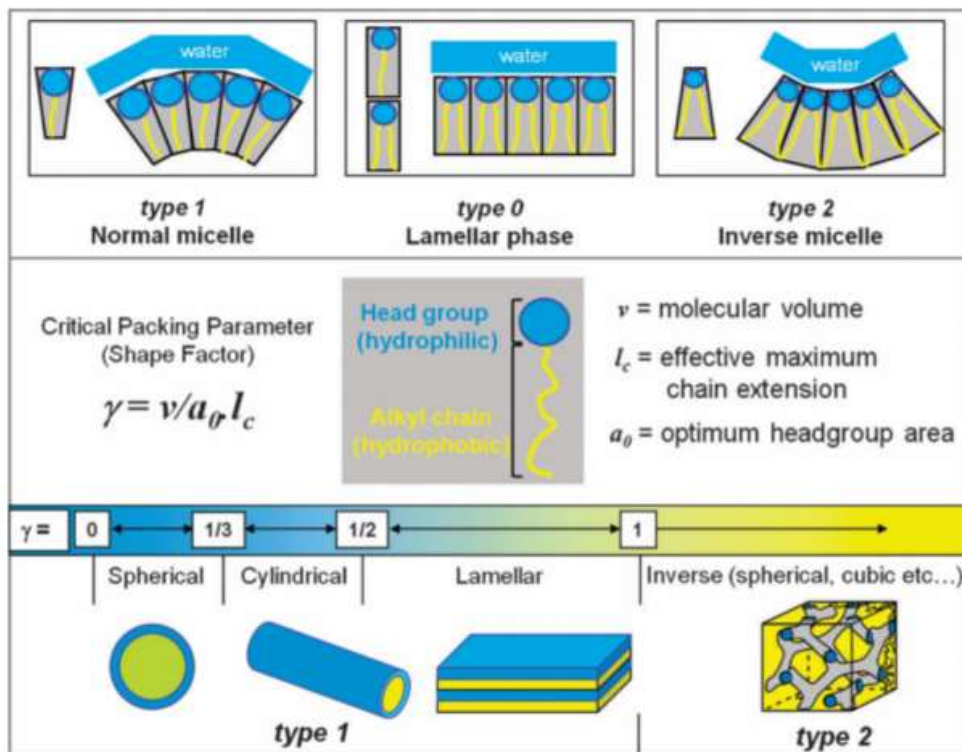


Fig. 4: Forma molecolare e tipi di auto-aggregati anfifilici: a seconda della forma molecolare di un anfifilo, si formano micelle di tipo 0, 1 o 2. Esempi tipici includono rispettivamente membrana cellulare, micelle detergenti e micelle lipidiche. Più precisamente, la geometria di un aggregato è data dai parametri di impacchettamento critico adimensionale (γ) basati sulla teoria di Israelachvili. Questa teoria, tuttavia, non distingue tra diverse geometrie di tipo 2. Le frecce a due punte indicano l'intervallo delle geometrie più preferite: sferica ($\gamma = 0-1/3$), cilindrica ($\gamma = 1/3-1/2$), lamellare ($\gamma = 1/2-1$) e inversa (tipo 2) micelle ($\gamma > 1$). L'aumento del colore giallo verso destra indica un aumento del carattere idrofobico di un anfifilo; solitamente quantificato dal valore HLB. (1)

La forma della molecola può essere descritta secondo la teoria di Israelachvili. Questa teoria si basa sul parametro di impacchettamento adimensionale (γ), chiamato anche parametro di impaccamento critico o fattore di forma, come mostrato in fig. 4. Le molecole che presentano un parametro di impaccamento minore tendono a formare aggregati sferici, che consentono alle teste polari di occupare più area rispetto a un doppio strato, e così via. Questa teoria si presta bene nel caratterizzare forme aggregate semplici come sfere e cilindri (1).

Nella fig. 4 sono mostrate le geometrie adottate in base al valore di γ . Nel caso della monooleina, il doppio legame cis tra i carboni C9 e C10 [Fig. 2] rende sterile la coda dell'idrocarburo, innescando così la formazione di micelle inverse o di *tipo 2* dove il valore γ è superiore a 1 (1).

Comportamento di fase della monooleina

La monooleina, in acqua, forma auto-aggregati mono-, bi- e tridimensionali che corrispondono rispettivamente alla fase lamellare, esagonale e cubica bicontinua [Fig. 5]; fasi aggiuntive si formano, di solito, mediante l'aggiunta di altri componenti e/o energia (1).

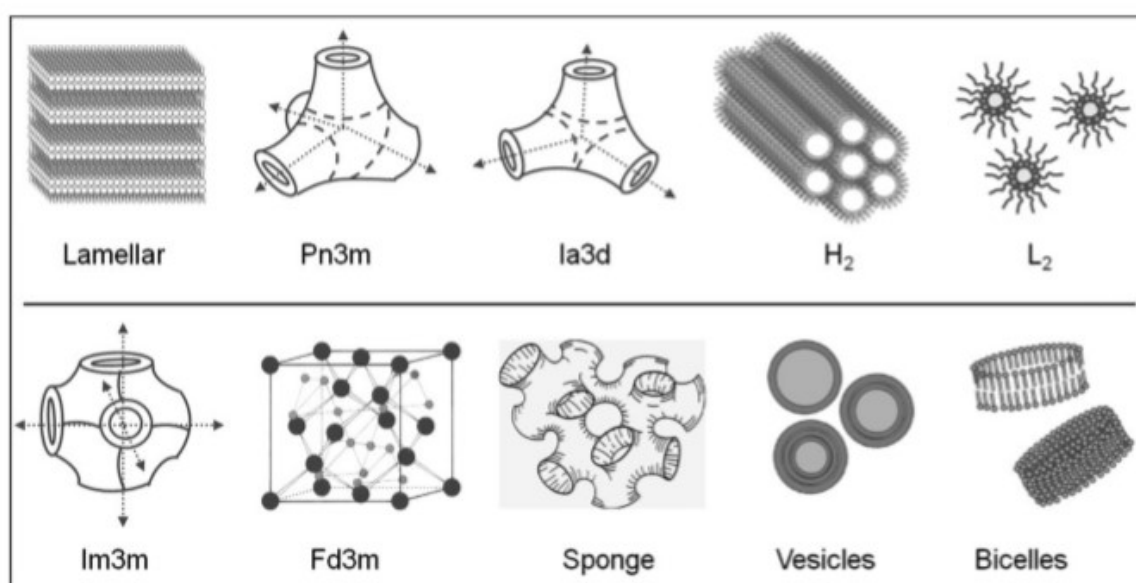


Fig. 5: La monooleina, in presenza di acqua, mostra fasi lamellari ($L\alpha$ e L_c), fasi cubiche bicontinue $Pn3m$ e $Ia3d$, fasi esagonali (H_2) e fluide isotropiche (L_2), (fila superiore). Strutture aggiuntive (fila inferiore) come fase cubica bicontinua- $Im3m$, fase cubico-micellare $Fd3m$, fase spugnosa; anche vescicole e bicelle sono formate dalla monooleina ma in presenza di additivi, ad esempio altri lipidi, detergente o sale ecc. in acqua (1).

Ora si passa alla descrizione delle tre fasi della monooleina:

- FASE LAMELLARE

La fase lamellare è costituita da un gruppo di doppi strati identici con un ordine mono-dimensionale; ciascun doppio-strato è separato da uno spessore costante di acqua, che dipende dal contenuto di acqua, dalla temperatura, dalle dimensioni, dalla polarità e dalla carica dei gruppi polari di testa della molecola lipidica (9). Ciascuna lamella del doppio-strato è riempita dalle catene idrocarboniche in conformazione liquida, ed è ricoperta all'esterno dai gruppi polari idrofilici. I doppi strati sono piatti, cioè non sono né curvati verso l'acqua né verso la regione della catena di idrocarburi. Esistono tre tipi principali di fasi lamellare: lamellare fluido ($L\alpha$), gel lamellare ($L\beta$) e lamellare cristallino (Lc). La fase Lc è cristallina, dove le molecole sono ordinate in una posizione fissa (1).

- FASE ESAGONALE

La fase esagonale è costituita da un gruppo di cilindri micellari impaccati su un reticolo esagonale 2-D. Le fasi esagonali possono essere "normali" (H_1), con una curvatura verso la regione della catena idrocarbonica del

lipide, quindi curvatura positiva; oppure fasi esagonali "inverse" (H_2) che mostrano una curvatura verso l'interno acquoso, curvatura negativa (1).

- FASE CUBICA

La fase cubica mostra una curvatura intermedia tra una fase lamellare piatta e una fase cilindrica esagonale (1). Strutturalmente questa fase consiste in un singolo bilayer lipidico che segue una superficie minima periodica infinita (IMPS), dividendo lo spazio in reti di canali acquosi, che non intersecano (10). A differenza delle fase lamellare e esagonale, le fasi cubiche mostrano un'elevata viscosità. Attualmente sono state identificate sei tipi di fasi cubiche con differenti simmetrie spaziali; fasi cubiche con simmetria: $Im3m$, $Pn3m$, $Ia3d$, $P4_332$, $Fd3m$ e $Pm3n$ (1). Una fase cubica viene indicata anche come Q^n dove Q sta per cubica e 'n' è il numero del gruppo spaziale definito dalle Tavole Internazionali di Cristallografia (11).

Di seguito sono descritte le tre principali fasi cubiche della monooleina.

-La fase $Ia3d$ (Q^{230}) è stata la prima ad essere identificata in sistemi lipide-acqua (12). La struttura può essere descritta come uno scheletro di cilindri, che consistono in due reticoli 3D, interconnessi e non collegati, e con i cilindri coplanarmente collegati tre a tre (11) [Fig. 6].

La struttura di questa fase è “bicontinua” nel senso che consiste di due mezzi della stessa polarità, separati da un terzo mezzo con polarità diversa e che i tre mezzi costituiscono un continuum all’interno dello spazio tridimensionale (13).

-La fase $Pn3n$ (Q^{224}) presenta una struttura che può essere descritta in termini di due reticoli 3D di cilindri, interconnessi e non collegati; i cilindri in questo caso sono collegati tetraedicamente 4 a 4 (14). [Vedi Fig. 6]

-La fase $Im3m$ (Q^{229}) presenta una struttura che può essere descritta in termini di due reticoli 3D di cilindri, interconnessi e non collegati; i cilindri sono ortogonalmente collegati 6 a 6. Anche questa come la Q^{230} presenta una fase bicontinua (15). [Vedi Fig. 6]

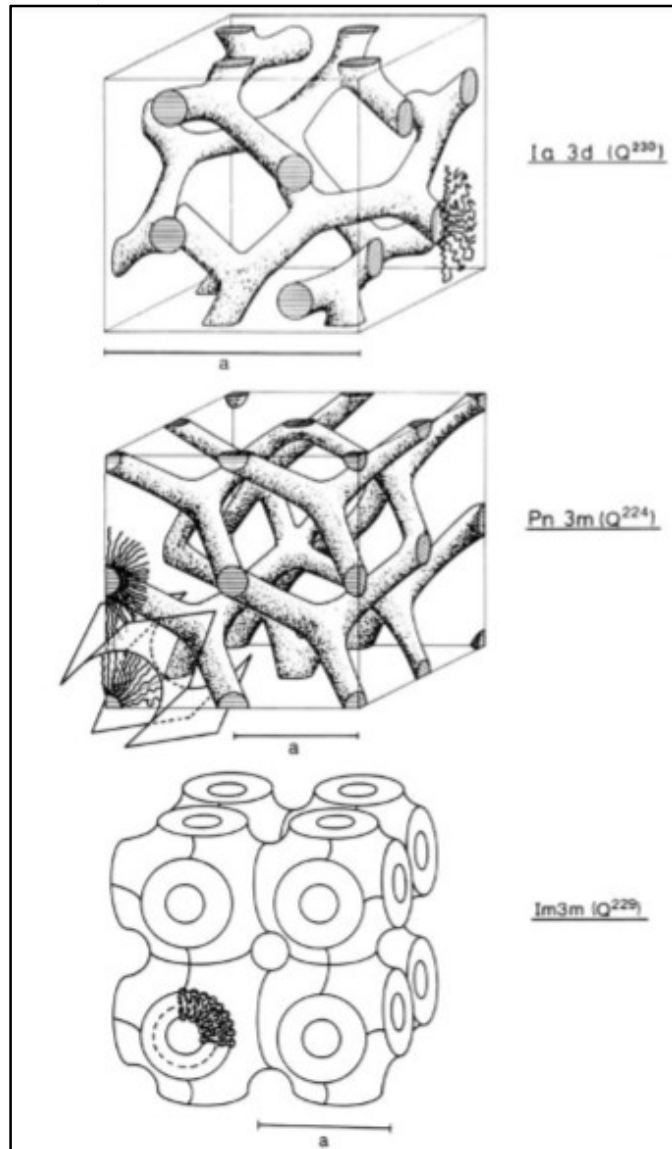


Fig. 6: Strutture delle fasi cubiche bicontinue inverse. Dall'alto: $Ia\bar{3}d$ (Q^{230}), $Pn\bar{3}m$ (Q^{224}) e $Im\bar{3}m$ (Q^{229}) (8).

1.3.3 Diagramma di fase lipidico

La caratterizzazione delle fasi liotropiche appena descritte è stata eseguita mediante diffrazione raggi-X (XRD); essa è considerata la tecnica più adatta per rilevare una particolare fase lipidica, consentendo anche di ottenere la sua idea strutturale (1). Da esperimenti di diffrazione dei raggi X, su sistemi lipide-acqua si possono ricavare i cosiddetti ***diagrammi di fase***. I diagrammi di fase racchiudono informazioni sulla struttura delle fasi del sistema lipide-acqua, descrivendo il loro dominio di esistenza in funzione della temperatura e della concentrazione (16). Un diagramma di fase si basa sulla regola di fase di Gibb, ovvero:

$$F = C - P + 2$$

F è uguale al numero di gradi di libertà o variabili indipendenti, C è il numero di componenti chimici e P è il numero di fasi che possono coesistere. I gradi di libertà possono essere temperatura, pressione, frazione molare del componente etc. I diagrammi di fase descrivono il comportamento dei sistemi in equilibrio termodinamico, in cui il sistema è al suo stato più basso di energia libera (1).

Il polimorfismo del sistema monooleina/acqua è stato studiato a lungo ed infatti i principali risultati possono essere riassunti considerando il suo

diagramma di fase, dipendente dalla temperatura e dalla concentrazione di acqua in cui la MO è disciolta (3) [Fig. 7].

Dal diagramma di fase si notano, che le fasi predominanti sono le fasi cubiche bicontinue Pn3m e Ia3d; è presente una fase esagonale inversa a temperature molto elevate (superiori a 80 ° C) ed infine si osserva una fase lamellare liquido-cristallina a basse concentrazioni di acqua (3).

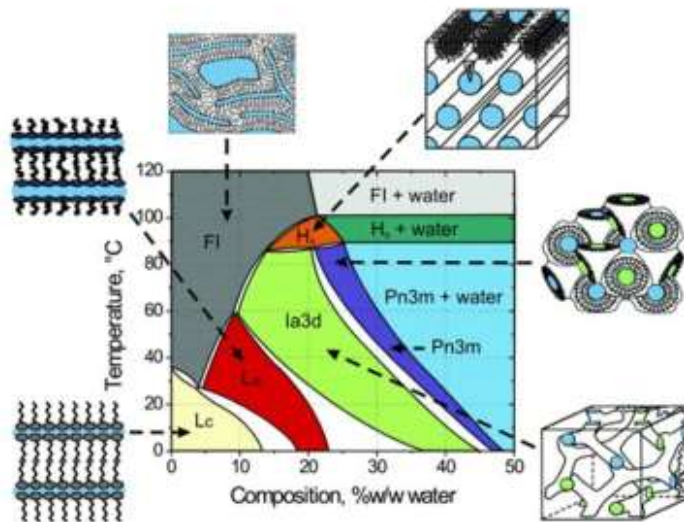


Fig. 7: Diagramma di fase T-c dipendente di MO in acqua pura. Le diverse fasi sono indicate da H, fase esagonale, tipo II; FI, fluido isotropico; Pn3m, fase cubica del gruppo spaziale Pn3m; Ia3d, fase cubica del gruppo spaziale Ia3d; La, fase lamellare, con conformazione liquida della catena di idrocarburi; Lc, fase cristallina lamellare. (3).

1.4 Cubosomi

Dalla geometria della fase cubica del sistema lipide-acqua, originano i *cubosomi*. I cubosomi sono nanoparticelle lipidiche, le quali furono scoperte nel 1980 e suscitano l'interesse dei ricercatori in quanto la loro struttura veniva considerata come un ottimo strumento per veicolare i farmaci nel processo di *drug delivery* (cit. Novel Cub Sys. Res.) [Fig. 8].

I cubosomi per essere utilizzati nel drug delivery devono avere le caratteristiche di: biodegradabilità, suscettibilità agli stimoli esterni, avere un target predefinito e permanere per un lungo intervallo di tempo all'interno del circolo sanguigno. La loro elevata capacità di essere modificabili e biologicamente attivi li rendono ottimali anche per l'inglobamento di proteine.

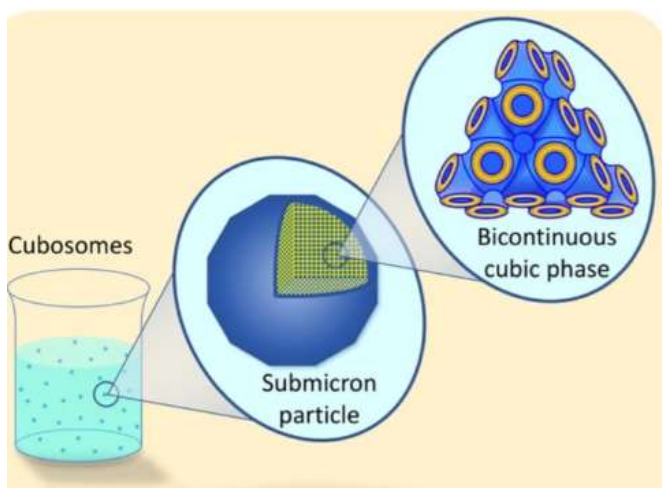


Fig. 8: Diagramma schematico di un cubosoma.

In questo lavoro di tesi, i cubosomi di monooleina sono stati messi in soluzione con la proteina sierica *Human Serum albumin* e con la proteina sierica *Bovine Serum Albumin*. Il processo di preparazione vede l'incubazione della monooleina in soluzione madre contenente la proteina.

Al fine di verificare quale fosse l'effetto esercitato delle proteine sieriche HSA e BSA sui cubosomi di monooleina e se le suddette proteine entrassero o meno all'interno dei canali della fase cubica della MO, sono stati fatti esperimenti di diffrazione raggi-X e esperimenti di spettrofotometria UV-visibile.

2. MATERIALI E METODI

MATERIALI

2.1 Sistema lipidico monooleina/acqua

Per la formazione del sistema monooleina/acqua, sono stati preparati i campioni di monooleina (MO) a diverse concentrazioni di acqua Milli_Q. La MO è conservata in frigorifero a -20°C e si presenta come una polvere bianca inodore [Fig. 9].

Sono state effettuate, su bilancia analitica, quattro pesate di MO in eppendorf da 1,5 ml, ed in seguito sono state aggiunte diverse quantità di acqua; ottenendo i seguenti campioni:

- A : 23 mg di MO al 20 % di H_2O
- B : 24 mg di MO al 30% di H_2O
- C : 22 mg di MO al 40 % di H_2O
- D : 20 mg di MO al 60 % di H_2O (MO in eccesso di acqua)

I campioni A, B, C e D sono stati lasciati ad incubare per 24 h in modo tale da permettere alla fase lipidica di essere modificata. Successivamente, dalle quattro eppendorf, mediante l'aiuto di una spatola, è stato recuperato il sistema monooleina/acqua, il quale si presentava sotto forma di un liquido

viscoso. I sistemi recuperati sono stati caricati nei porta-campioni (slot) per l'analisi mediante diffrazione raggi-X.



Fig. 9: Monooleina usata per gli esperimenti

2.1.1 Human Serum Albumin (HSA) e Bovine Serum Albumin (BSA)

In questo lavoro di tesi sono state utilizzate le proteine HSA e BSA; mediante misure raggi-X è stato valutato l'effetto delle due proteine sulle fasi cubiche della monooleina in funzione del *tempo* di incubazione e della *concentrazione* proteica nella soluzione. Infine mediante misure allo spettrofotometro è stata valutata la concentrazione proteica in soluzione, dopo incubazione con monooleina.

Le albumine sono proteine globulari. Quella sierica è la più comune e abbondante proteina plasmatica nei mammiferi. L'HSA e la BSA strutturalmente sono pressoché identiche, sono composte rispettivamente da

584 aa e 583 aa, il loro peso molecolare è di rispettivamente 66470 g/mol e 66430 g/mol e il loro punto isoelettrico è di rispettivamente di 5.67 e 5.60 [Fig. 10]. Entrambi le proteine si presentano con una composizione polverecristallina.

Preparazione campioni per misure raggi-X:

- 1. HSA:** Per prima cosa sono stati preparati 10 mL di soluzione madre di HSA ad un concentrazione 10 mg/mL, quindi sono stati pesati 100 mg di proteina su bilancia analitica e dissolti in 10 mL di acqua Milli_Q. In seguito sono state preparate 6 eppendorf, in ciascuna sono stati pesati 20 mg di MO ed è stata aggiunta una aliquota di 200 µl di soluzione madre HSA. Di questi 6 campioni sono state effettuate misure di diffrazione raggi-X rispettivamente dopo 1, 2, 3, 6 e 27 giorni dalla preparazione; in questo modo si andato a monitorare il cambiamento di fase della monooleina per effetto della proteina.
- 2. BSA:** Come per l'HSA anche per la BSA è stata preparata una soluzione madre [10 mg/mL]; sono stati preparati 4 campioni ciascuno con 30 mg di MO dissolti in aliquote di 500 µl di soluzione madre BSA. Di questi campioni sono state effettuate misure raggi-X dopo 1, 3, 8 e 13 giorni dalla preparazione.



Fig. 10: Struttura cristallografica della HSA a 3.9 Å. PDB ID: 6JE7

Preparazione campioni per misure allo spettrofotometro:

E' stato preparato un campione A pesando 30 mg di MO e aggiungendo un'aliquota di 500 μ l di soluzione madre HSA [10 mg/mL]; il campione è stato lasciato incubare per 24h. Il giorno successivo dal campione A è stata prelevata un'aliquota di 50 μ l, la quale è stata diluita aggiungendo 450 μ l di acqua Milli_Q al fine di ottenere una concentrazione 1 mg/ml; di questa è stata effettuata la misura allo spettrofotometro.

Infine è stata effettuata la misura allo spettrofotometro del campione di 50 μ l soluzione madre di HSA 'pura', anch'essa diluita ad un concentrazione 1 mg/ml.

Lo stesso procedimento è stato replicato per la BSA [Fig. 11].



Fig. 11: Campione di soluzione madre BSA [10mg/mL] e monooleina dopo 24h di incubazione; da notare il pellet di monooleina in stato viscoso.

2.1.2 PEG (polietilen-glicole)

Il glicole polietilenico (**PEG**) è un polimero preparato per polimerizzazione dell'ossido di etilene ed ha un peso molecolare di 20000 g/mol. Il PEG si presenta sottoforma di grandi cristalli di colore bianco opaco.

Basandosi sul principio della *pressione osmotica*, il PEG è stato utilizzato come barriera semipermeabile per controllare il volume di acqua presente all'interno del sistema monooleina/acqua, così da studiare, mediante diffrazione raggi-X, le variazioni delle fasi liquido-cristalline del sistema lipidico.

Il principio alla base dell'impiego del polietilen-glicole, all'interno dei sistemi monooleina/acqua, si basa sull'osmosi. Questa riguarda la capacità di un solvente, in questo caso l'acqua, di diffondere attraverso una membrana semipermeabile, senza lasciare passare il soluto che presenta dimensioni

maggiori. La membrana semipermeabile si comporta come un setaccio fatto di maglie strette molto piccole ma grandi abbastanza da lasciar passare le molecole di solvente. Si tratta di un processo spontaneo in cui il movimento dell'acqua avviene contro gradiente di concentrazione, cioè da una regione a minor concentrazione, ipotonica, a una regione a maggior concentrazione, ipertonica. Il passaggio avviene fintanto che le due soluzioni non raggiungono la stessa concentrazione. Si tratta di un processo fisico spontaneo che porta alla diluizione di una soluzione più concentrata per ridurre proprio la concentrazione.

Ogni soluzione possiede una sua pressione osmotica e questa è proporzionale sua molarità, secondo l'equazione di Van't Hoff:

$$\pi V = n R T$$

La tecnica dello stress osmotico fornisce uno strumento utile al controllo della fase liquido-cristallina assunta dal sistema monooleina/acqua.

In questo lavoro, il PEG è stato utilizzato per andare a studiare il suo effetto sulla fase liquido-cristallina in campioni con il sistema monooleina/acqua da sola e in campioni con il sistema monooleina/acqua in presenza di proteina (HSA o BSA). Nella preparazione dei campioni sono state utilizzate le seguenti percentuali di PEG in soluzione: 5%, 10%, 15%, 20% e 30%.

Preparazione campioni con PEG per diffrazione raggi-X

Come prima cosa sono state preparate le cinque soluzioni di PEG al 5%, 10%, 15%, 20% e 30%, in seguito utilizzate per la preparazione dei campioni.

A seconda della concentrazione, le quantità di PEG disciolto in acqua sono:

$$\text{- 5\%} \rightarrow 5 \text{ g} : 100 \text{ ml} = X \text{ g} : 20 \text{ ml} \quad X = 1 \text{ g}$$

$$\text{- 10\%} \rightarrow 10 \text{ g} : 100 \text{ ml} = X \text{ g} : 20 \text{ ml} \quad X = 2 \text{ g}$$

$$\text{- 15\%} \rightarrow 15 \text{ g} : 100 \text{ ml} = X \text{ g} : 20 \text{ ml} \quad X = 3 \text{ g}$$

$$\text{- 20\%} \rightarrow 20 \text{ g} : 100 \text{ ml} = X \text{ g} : 20 \text{ ml} \quad X = 4 \text{ g}$$

$$\text{- 30\%} \rightarrow 30 \text{ g} : 100 \text{ ml} = X \text{ g} : 20 \text{ ml} \quad X = 6 \text{ g}$$

In questo lavoro è stato utilizzato il PEG di taglia 15000-20000 [Fig. 12].

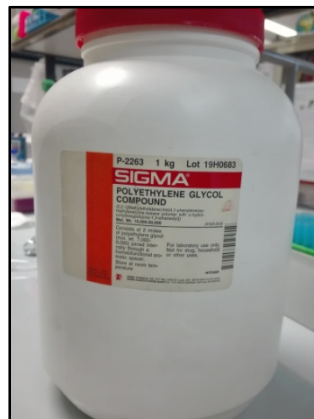


Fig. 12: PEG Sigma_Aldrich usato negli esperimenti

Sono stati preparati i campioni con la monooleina, il PEG e la proteina (HSA, BSA). In *Tabella 2* sono riportati i 10 campioni preparati ed in seguito analizzati.

<u>Campioni con HSA</u>	<u>Campioni con BSA</u>
MO+HSA+PEG al 5%	MO+BSA+PEG al 5%
MO+HSA+PEG al 10%	MO+BSA+PEG al 10%
MO+HSA+PEG al 15%	MO+BSA+PEG al 15%
MO+HSA+PEG al 20%	MO+BSA+PEG al 20%
MO+HSA+PEG al 30%	MO+BSA+PEG al 30%

Tabella 2: Descrizione campioni

La preparazione dei campioni, descritti in tabella 2, è identica per le due proteine.

Sono state allestite 10 eppendorf ed in ciascuna sono stati pesati 30 mg di MO. In seguito sono state allestite altre 10 eppendorf nelle quali sono stati dissolti 5 mg di proteina (HSA, BSA) in un'aliquota di 500 μ l di PEG alle percentuali descritte in tabella 2. Una volta che la proteina si è ben dissolta

nella soluzione di PEG, il passaggio finale è stato quello di prelevare 500 μ l di soluzione PEG/proteina da ogni eppendorf ed di inserirli in ogni eppendorf contenente la MO.

Dopo 24 h di incubazione dei 10 campioni, si è passati al recupero della monooleina tramite spatola per l'allestimento degli slot, per le misure di diffrazione.

METODI

2.2 Diffrazione raggi-X

I metodi di diffrazione, in particolare la diffrazione raggi- X , sono infatti il modo più affidabile per eseguire l'identificazione della fase liotropica (15); essa è una tecnica versatile e non distruttiva.

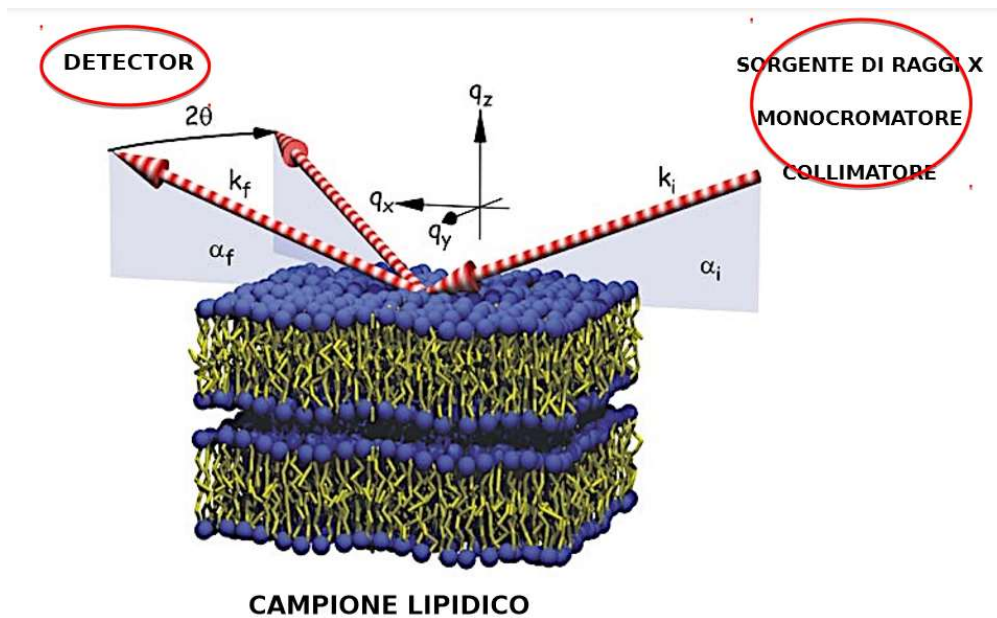


Fig. 13: Rappresentazione grafica della diffrazione raggi-X.

I raggi X sono delle radiazioni elettromagnetiche con lunghezza d'onda compresa tra 0.1 \AA e 100 \AA , confrontabile con le distanze interatomiche tipiche dei cristalli (17). Infatti le strutture molecolari cristalline sono in grado

di assorbire le radiazioni elettromagnetiche della lunghezza d'onda pari a quelli dei raggi X e di diffonderli secondo angoli particolari che dipendono dalla natura e dalla disposizione degli atomi della molecola nel sistema analizzato [Fig. 13]. Questo fenomeno provoca una remissione, perciò l'interazione dei raggi X con gli elettroni del campione analizzato produce onde sferiche secondarie emesse dall'elettrone stesso. Questo fenomeno è noto come *deviazione elastica* e l'elettrone è noto come "diffrattore". Se si suppone che un fascio di raggi X incida su un cristallo con un angolo θ rispetto alla superficie e che i due raggi indicati vengano riflessi su due piani sovrapposti [Fig. 14], si ha che i due raggi interferiscono costruttivamente se il maggior cammino ottico percorso dal raggio 1, rispetto al raggio 2, è un multiplo intero della lunghezza d'onda.

Questa differenza di cammino ottico può essere espressa dalla *Legge di Bragg*, dal nome di W.L. Bragg che la enunciò:

La Legge di Bragg:

$$n \lambda = 2 d \sin\theta \quad [n= 1,2,3,4,5..]$$

Conoscendo quindi la lunghezza d'onda dei raggi X e l'angolo di incidenza per il quale si ha interferenza costruttiva, si può calcolare il valore di **d**, che sta per distanza fra i due piani reticolari di atomi.

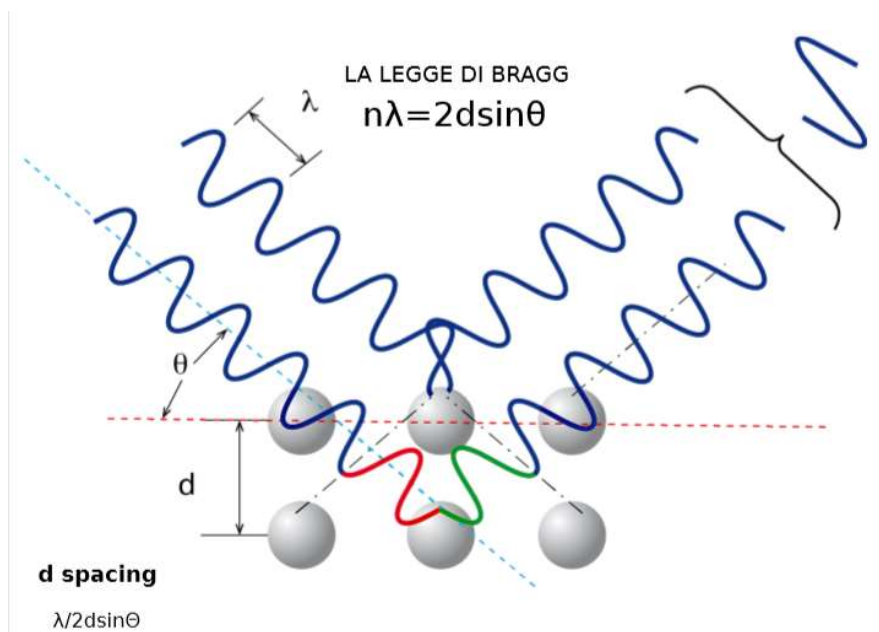


Fig. 14: Rappresentazione schematica delle legge di Bragg.

Dalle analisi mediante raggi X si ottengono differenti profili di diffrazione, diagrammi in cui vengono mostrati i picchi, ottenuti in relazione diretta del campione analizzato. L'analisi della posizione dei picchi permette l'identificazione del reticolo e del valore di **a** (parametro di cella unitaria). Mediante tale tecnica si è analizzata la struttura della fase cubica della monooleina. Dal profilo di diffrazione possono essere ricavate due

informazioni. La prima è ottenuta dall'*analisi della posizione dei picchi osservati*. Tali posizioni sono in relazione diretta con la simmetria del reticolo del campione. Nella fig. 15 vediamo un esempio di picchi di diffrazione relativi alle diverse simmetrie delle tre fasi cubiche: P4₃32, Im3m e Pn3m.

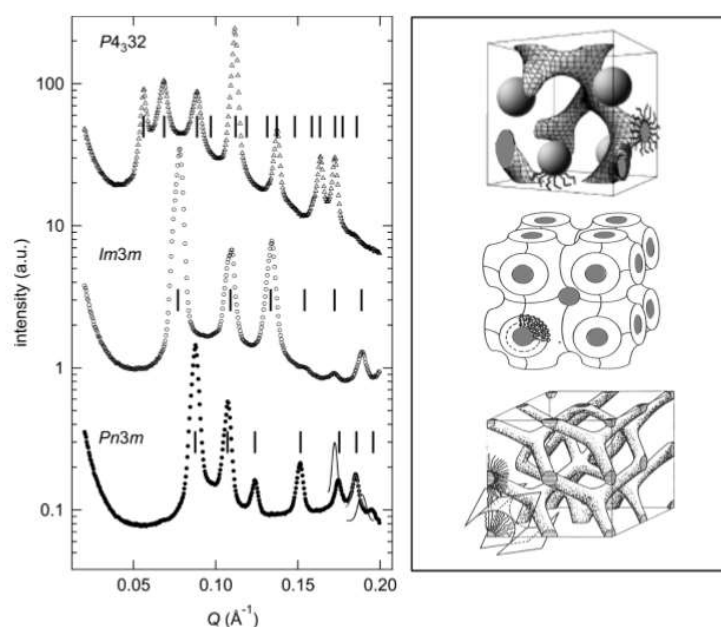


Fig. 15: Fasi cubiche osservate nella monooleina in eccesso rispetto alla soluzione acquosa di citocromo-c (3). A partire dall'alto fase P4₃32, Im3m e Pn3m.

La simmetria del reticolo si riflette in una serie di riflessioni di Bragg che nello spazio reciproco ($S_{hkl}=1/d_{hkl}$) hanno un caratteristico rapporto di posizioni.

Ad esempio:

1. Lamellare 1D: $S_h = h/d$
2. Esagonale 2D: $S_{hk} = 2(h^2 + k^2 - hk)^{1/2} / \sqrt{3}a$
3. Cubico 3D: $S_{hkl} = (h^2 + k^2 + l^2)^{1/2}$

Rispettivamente i rapporti per le posizioni dei picchi risultano nella fase esagonale: $\sqrt{3}:\sqrt{4}:\sqrt{7}:\sqrt{9}:\sqrt{12}$ etc. mentre per la fase lamellare il rapporto è pari a 1:2:3:4 etc. Per una fase cubica il rapporto varia a seconda del reticolo cubico, ad esempio $\sqrt{2}:\sqrt{3}:\sqrt{4}:\sqrt{6}$ etc. (per la cubica Q^{224}), oppure $\sqrt{6}:\sqrt{8}:\sqrt{14}:\sqrt{16}$ etc. (per la cubica Q^{230}) (3). Le linee nere verticali che si notano in fig. 15 indicano proprio le posizioni di picco previste (3). Una volta individuato il tipo di simmetria è possibile calcolare le *dimensioni della cella unitaria*.

2.2.1 Il diffrattometro a raggi-X

Lo strumento è il diffrattometro a raggi X, costituito da un *generatore* di raggi X, cioè da un tubo all'interno del quale sono presenti un anodo e un catodo. L'anodo, ovvero l'elettrodo positivo, è costituito da un filamento di tungsteno, che mostra un'elevata temperatura di fusione; il catodo invece è l'elettrodo negativo ed è costituito da rame. Collegando il catodo ad un alimentatore, viene portato ad incandescenza e la produzione di elettroni

avviene per effetto termoionico. Gli elettroni essendo carichi negativamente si dirigono verso l'anodo subendo deviazioni delle loro traiettorie con perdita di una parte della loro energia, che viene emessa sotto forma dei raggi X. Può capitare che un elettrone che si è generato urti un elettrone delle orbite più interne provocandone l'espulsione dell'atomo, di conseguenza un elettrone di un'orbita a maggiore energia andrà ad occupare il posto nell'orbita interna. Questo spostamento provoca pertanto l'emissione di un fotone X di energia pari a quella persa dall'elettrone nel passaggio di posizione; un processo definito radiazione caratteristica.

Gli esperimenti presentati in questa tesi sono stati condotti utilizzando un generatore di raggi X Philips PW 1830 (Amsterdam, Paesi Bassi). Oltre al generatore, lo strumento si compone di un *sistema di monocromatizzazione* costituito da cristalli monocromatori di quarzo che selezionano l'onda magnetica prescelta di $\lambda = 1.54$ nm, un *sistema di collimazione* del fascio incidente per definire la forma e la grandezza del fascio, da un *porta-campione* e da un *sistema di rilevazione* del fascio diffratto, cioè il detector costituito da una lastra fotografica in cui sarà possibile rilevare il profilo di diffrazione. Per gli esperimenti di questa tesi i modelli di diffrazione sono stati registrati sul sistema GNR Analytical Instruments Imaging Plate (Novara, Italia). [Fig. 16, Fig. 17 e Fig. 18]

I porta-campioni sono costituiti da una serie di due dischi di alluminio e uno di teflon dello spessore di 1mm con un foro al centro del diametro di 3 mm ciascuno, intervallati da due sottili fogli di mylar. Questi ultimi costituiscono le finestre attraverso le quali passa la radiazione X. La funzione dei dischetti di alluminio è di ridurre al minimo l'espansione delle finestre di mylar quando il porta-campioni è posto all'interno della camera in cui viene praticato il vuoto. Il campione viene quindi depositato all'interno della cella delimitata dal teflon e dai foglietti di mylar. [Fig. 19 e Fig. 20].



Fig. 16: Foto del diffrattometro raggi-X del laboratorio di Biofisica molecolare.



Porta-campione

Fig. 17: Visualizzazione del porta-campione caricato nel diffrattometro a raggi-X.



Fig. 18: Scanner per la lettura delle immagini.



Fig. 19: Foto del porta campione usato per gli esperimenti.

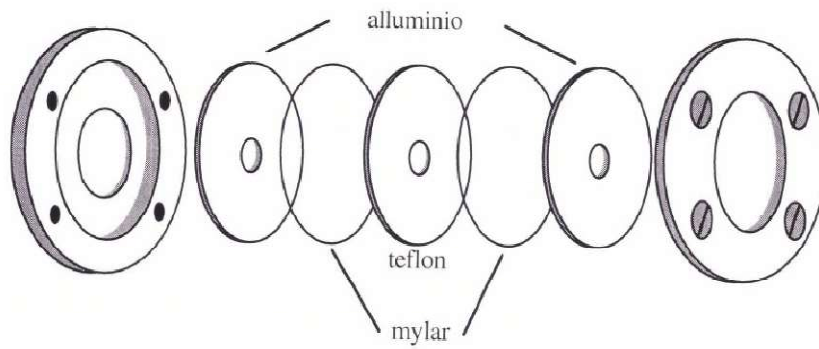


Fig. 20: Rappresentazione schematica del porta campione

2.2.2 Calibrazione dello strumento con il tricosano

Prima di effettuare le misure dei campioni con il diffrattometro a raggi-X, viene effettuata la calibrazione dello strumento tramite il *tricosano*, un composto organico con una struttura molto ordinata e ripetuta che genera uno spettro costituito da linee concentriche ad intervalli regolari. [Fig. 21]

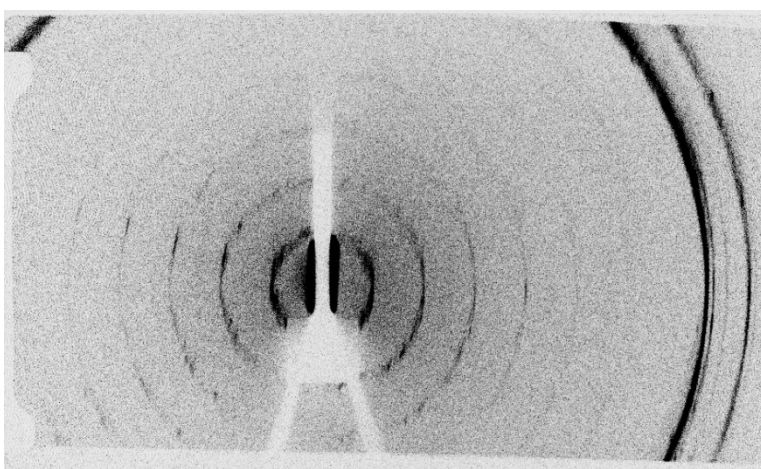


Fig. 21: Immagine del tricosano visualizzata con ImageJ

L'area centrale bianca che si rileva in fig. 21 è dovuta al beamstop, ovvero una porzione metallica che blocca il fascio di raggi X diretto, invece i cerchi concentrici neri sono il risultato della diffrazione simmetrica del composto. Con il programma "ImageJ" è possibile rilevare questa immagine; esso ci permette di calcolare la media relativa a tutti i punti e ci permette di ottenere il corrispettivo grafico monodimensionale mostrato in figura 22.

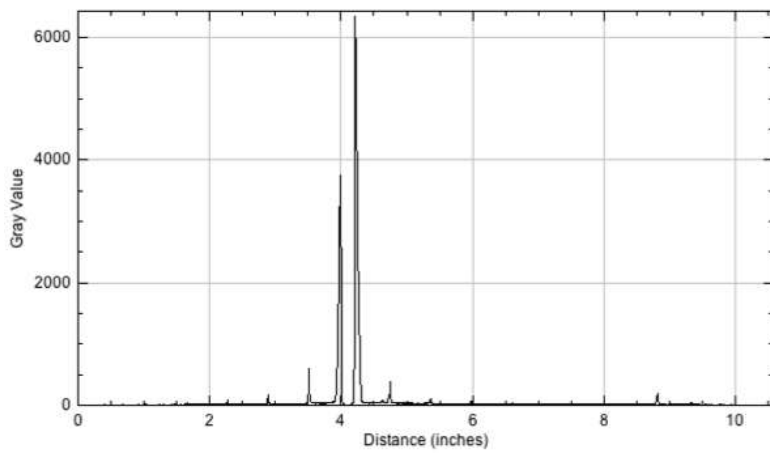


Fig. 22: Grafico 1D del tricosano ricavato con ImageJ

Affinché il grafico possa essere caricato sul programma “IgorPro”, bisogna salvarlo in formato testo (.txt). Tramite questo programma si va ad identificare “il punto 0” del grafico, ovvero il punto attraverso il quale passa la linea di simmetria [Fig. 23]

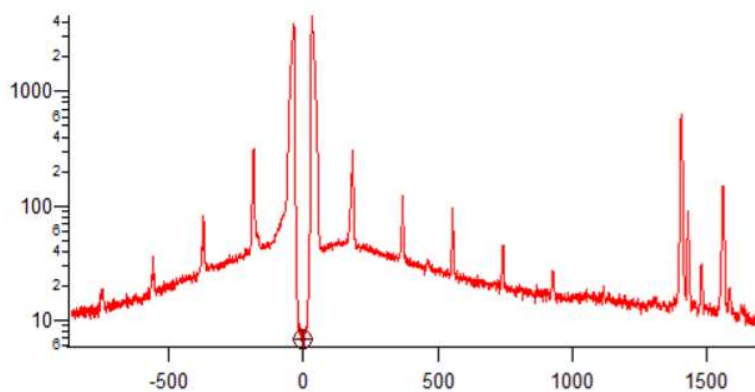


Fig. 23: Grafico del tricosano importato su Igor

Per l'identificazione del "punto 0" si posizionano i due cursori all'apice dei due picchi, identificando così la loro posizione sull'asse x. Sottraendo ai pixel (x) la media dei valori ottenuti, si ottiene il grafico centrato. Riportando in un grafico con in ordinata i valori relativi all'angolo di diffrazione noti per il tricosano in funzione dei valori dei picchi determinati nel grafico, in pixel, (i valori delle x per i picchi principali) si ottengono dei punti da cui si ricava una retta.

Si avrà una retta $y = a + bx$ dove b è il coefficiente angolare, parametro che sarà utilizzato per la normalizzazione dei dati sperimentali di diffrazione dei campioni analizzati in seguito.

Tutti i passaggi effettuati per la calibrazione con il tricosano, escluso il passaggio in cui si ricava la retta, vengono ripetuti anche per l'analisi del campione.

2.2.3 Preparazione per l'analisi di diffrazione e analisi dati

La preparazione per l'analisi in diffrazione consiste come prima cosa nell'allestimento del porta-campione. I sistemi in studio sono caratterizzati dal sistema lipidico monooleina/acqua, quindi dopo incubazione si procede con il recupero della monooleina dall'eppendorf tramite spatola.

Il campione viene inserito all'interno del foro del disco bianco in teflon [Fig. 19], ed in seguito si procede con il montaggio del porta-campione. Completato il montaggio, il porta-campione viene posizionato all'interno dello strumento e dopo circa trenta minuti sarò possibile ottenere il risultato.

Si parte sempre dalla visualizzazione dell'immagine ottenuta dalla diffrazione con ImageJ. Si effettua una sezione nella porzione centrale dell'immagine [Fig. 24].

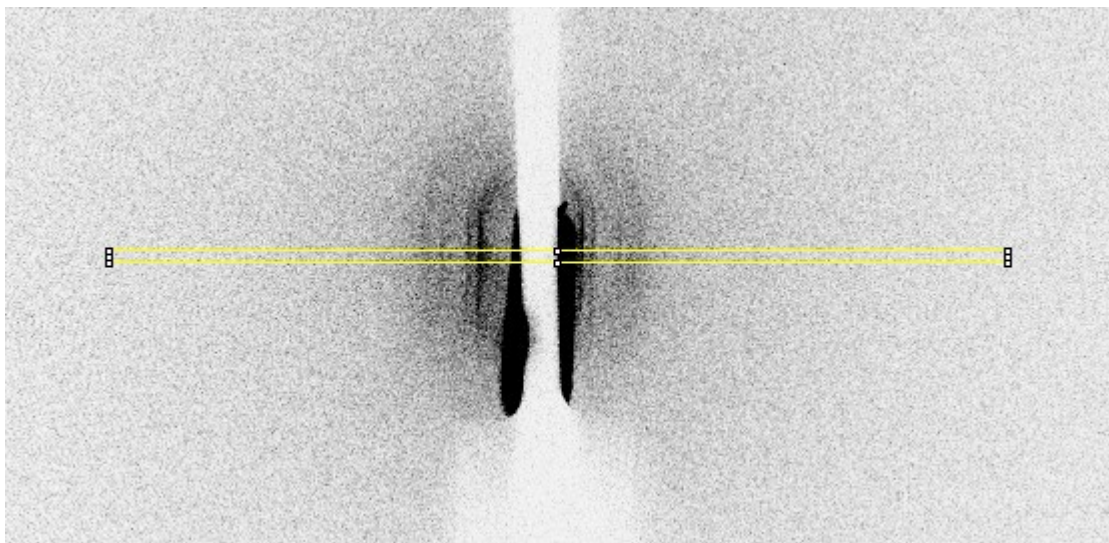


Fig. 24: Sezione radiale di un campione ottenuta con ImageJ

Il passo successivo è quello di ricavare il grafico dei pixel, ovvero la distanza in funzione dell'intensità e si arriva al “punto 0” di simmetria.

Il valore del “punto 0”, viene poi utilizzato per ottenere il valore di 2θ e moltiplicato per il coefficiente angolare della retta di taratura. A sua volta il valore 2θ permette il calcolo del parametro Q, ovvero il vettore di scattering.

In questo modo si può ottenere il profilo di diffrazione del campione in funzione del parametro Q. Come ultimo passaggio si analizza la “*simmetry*”, opzione che ci permette di visualizzare il rapporto della posizione dei picchi corrispondente ad una determinata tipologia di fase; con questa opzione vengono automaticamente inserite le linee verticali (blu) che ricadono su ogni picco, in modo da avere il valore della a (parametro della cella unitaria) della molecola in esame. In fig. 25 viene mostrato un esempio.

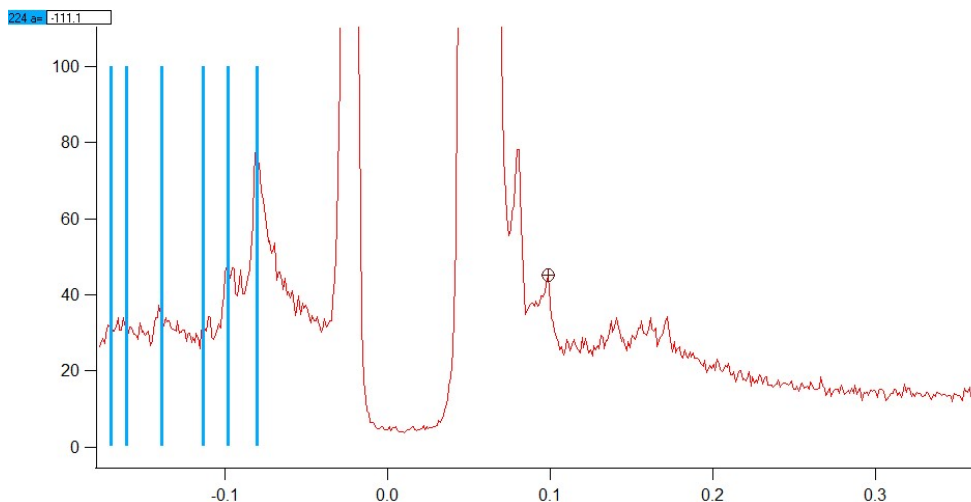


Fig. 25: Identificazione della fase cubica 224.

2.3 Spettrofotometria UV-vis

Il termine spettrofotometria indica una tecnica analitica, qualitativa e quantitativa, che permette il riconoscimento e la quantizzazione di una sostanza in base al suo spettro di assorbimento. La spettrofotometria UV-visibile impiega radiazioni elettromagnetiche monocromatiche nell'intervallo di lunghezze d'onda che vanno dal visibile all'ultravioletto (UV) [Fig. 26].

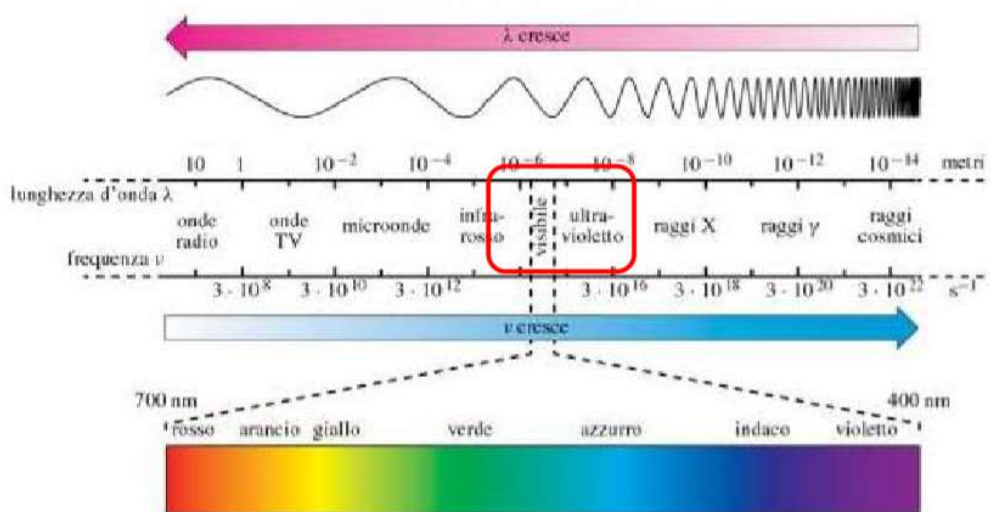


Fig. 26: Spettro delle radiazioni elettromagnetiche.

Con la spettrofotometria è possibile studiare la struttura e la dinamica della materia (come nel nostro caso, anche di biomolecole), analizzando l'interazione che questa ha con la luce. Questa tecnica di basa

sull'assorbimento selettivo, da parte delle molecole, delle radiazioni con lunghezza d'onda (λ) comprese tra 10 nm e 780 nm, divisibili in:

UV lontano 10-200 nm

UV vicino 200-380 nm

Visibile 380-780 nm

Le regioni più utilizzate per lo studio delle biomolecole sono il vicino UV e il visibile.

Tramite spettrofotometria si possono effettuare analisi qualitative e quantitative in quanto gli spettri che si ottengono sono caratteristici per ogni sostanza (analisi qualitativa) e l'intensità della radiazione assorbita è proporzionale alla concentrazione della sostanza in esame. Lo strumento utilizzato per misure di spettrofotometria è lo spettrofotometro, costituito da diverse componenti, quali: una sorgente di radiazioni elettromagnetiche a spettro di emissione continuo, ossia una fascio di radiazioni con tutte lunghezze d'onda (λ) in un certo intervallo; un selettore di λ che lascia passare solo radiazioni elettromagnetiche del fascio monocromatico; un'apposita cuvetta contenente il campione da misurare (in questo lavoro è stata usata la cuvetta in quarzo); un rivelatore che converte l'intensità della luce in uscita

in intensità di corrente elettrica ed infine il quadrante di letture che mostra il dato misurato dallo strumento, ossia il valore dall'assorbanza [Fig. 27].

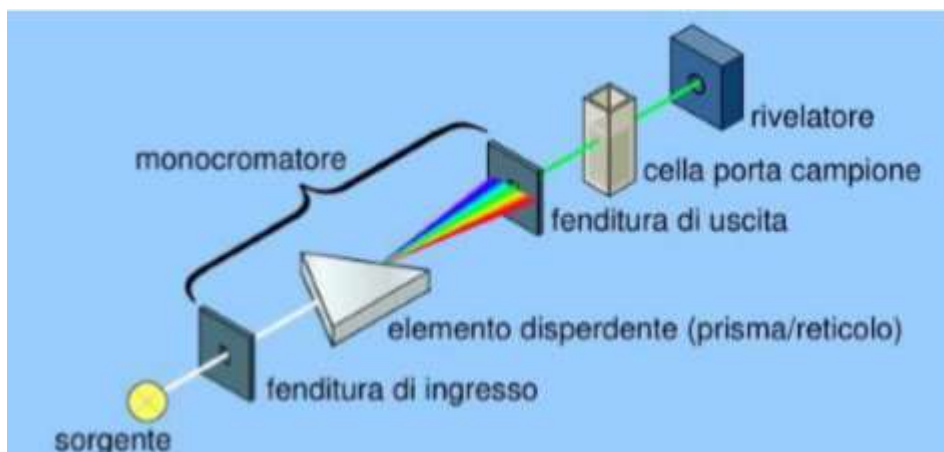


Fig. 27: Rappresentazione schematica di uno spettrofotometro.

Analisi qualitativa:

Per effettuare analisi qualitative si fa uso di raggi policromatici a spettro continuo, poi separati tramite monocromatori nelle varie componenti (radiazioni monocromatiche). In pratica singole radiazioni monocromatiche di tale raggio si fanno passare, una alla volta, attraverso la sostanza in esame, la quale assorbirà in modo diverso, cioè con diversa intensità, le diverse radiazioni. Quindi riportando i diversi valori in un grafico lunghezza d'onda-assorbimento, si ottiene lo spettro di assorbimento della sostanza esaminata. Dato che ogni sostanza ha il suo determinato spettro di assorbimento, l'esame

di tali spettri permette di identificarla oppure di controllare il grado di purezza della stessa.

Analisi quantitativa:

Per eseguire analisi quantitative si fa uso di raggi monocromatici, cioè costituiti da radiazioni di una sola lunghezza d'onda. L'analisi quantitativa si basa sul principio che quando una radiazione attraversa una soluzione, viene assorbita più o meno intensamente a seconda della concentrazione; quindi l'assorbimento dipende dalla concentrazione. E' possibile quindi risalire alla concentrazione della soluzione mediante misure UV-visibile. Nella spettroscopia abbiamo due parametri fondamentali da considerare, *TRASMITTANZA ed ASSORBANZA*.

I rilevatori degli strumenti sono grado di misurare l'intensità di flusso luminoso, in particolare vengono analizzate: I_0 , *intensità di flusso luminoso all'ingresso nella cuvetta* e I , *intensità del flusso luminoso in uscita dalla cuvetta*. Quindi il rapporto tra l'intensità del raggio uscente e quella del raggio entrante si chiama *TRASMITTANZA (T)*. Questa grandezza esprime quale frazione della luce incidente ha attraversato il campione senza essere assorbita. T può assumere valori compresi tra 0 e 1.

Altro importante parametro è l'*ASSORBANZA* (A); parametro molto importante perché è direttamente proporzionale alla concentrazione della specie presente nel campione, responsabile dell'assorbimento della luce. La radiazione incidente ha lunghezza d'onda (λ), colpisce il campione e lo attraversa per un cammino ottico definito in base alla cuvetta utilizzata (solitamente 1 cm). L'equazione che correla l'assorbanza con la concentrazione è data dalla legge di *Lambert-Beer* secondo cui:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Dove ε è il coefficiente di estinzione molare (L/cm mol), c è la concentrazione della specie presa in esame (mol/L), l è il cammino ottico (cm) ovvero lo spessore attraversato dalla radiazione incidente [Fig. 28]. La legge di Lambert Beer descrive i fenomeni di assorbimento di radiazioni elettromagnetiche ed è valida per radiazioni monocromatiche e soluzioni diluite.

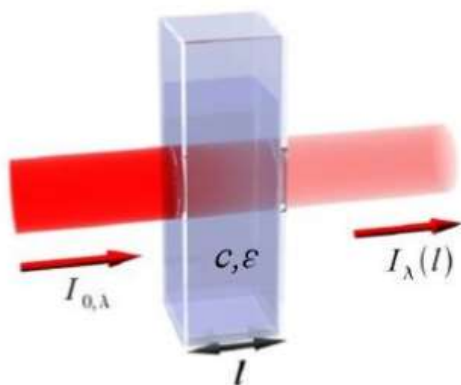


Fig. 28: Rappresentazione della legge di Lambert-Beer.

Le proteine hanno un caratteristico picco di assorbimento, intorno a 280 nm, quasi interamente a causa delle proprietà di assorbimento degli aminoacidi aromatici: triptofano, tirosina e fenilalanina. L'assorbanza misurata a 280 nm viene utilizzata per calcolare la concentrazione di una proteina in soluzione confrontandola con una curva standard o con i valori di assorbimento pubblicati per quella proteina (18).

3. RISULTATI

3.1 Analisi spettrofotometriche

3.1.1 Curve di taratura

Come prima parte della fase sperimentale sono state preparate le curve di taratura. Sono state effettuate le diluizione (1:5, 1:10, 1:50, 1:100) dalle due soluzioni madre contenenti rispettivamente HSA e BSA [10 mg/ml] in acqua, seguite da analisi spettrofotometriche, in un intervallo di lunghezza d'onda (λ) da 190 nm e 400 nm. Dai valori di assorbanza ottenuti alla lunghezza d'onda di 280 nm relativi a ciascuna diluizione [Fig. 29 e Fig. 30], sono state create le **curve di taratura**, grafici contenenti i valori delle altezze dei picchi, in funzione della concentrazione in mg/ml calcolata dalle diluizioni effettuate.

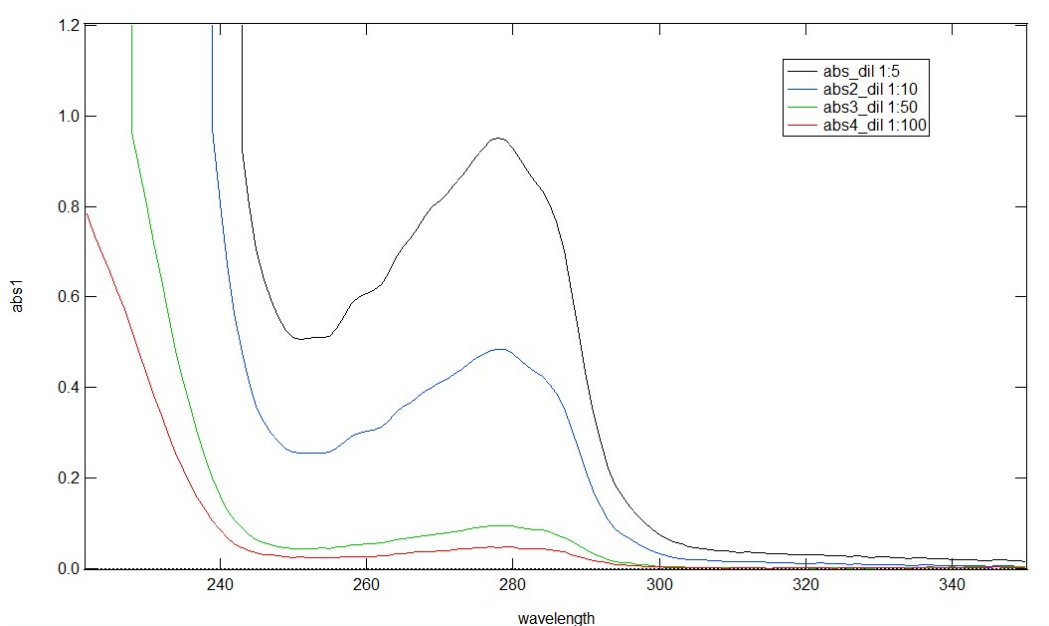


Fig. 29: Assorbanze misurate delle diluizioni dalla soluzione madre di **HSA**.

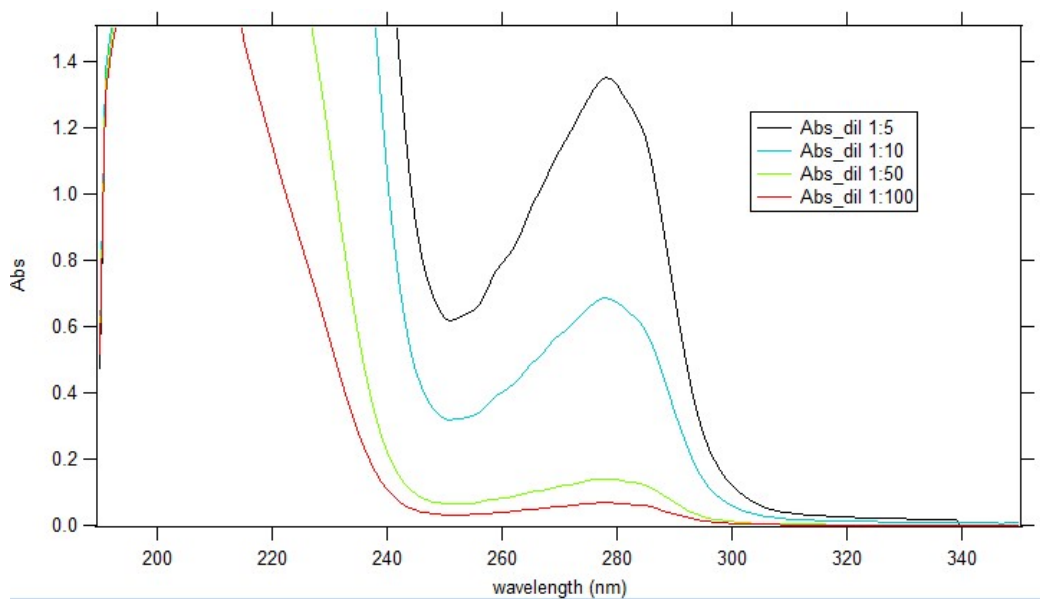


Fig. 30: Assorbanze misurate delle diluzioni dalla soluzione madre di **BSA**.

In Fig. 31 e Fig. 32 vengono mostrate le due curve di taratura relative alle due proteine; le curve sono state realizzate con il programma Igor Pro:

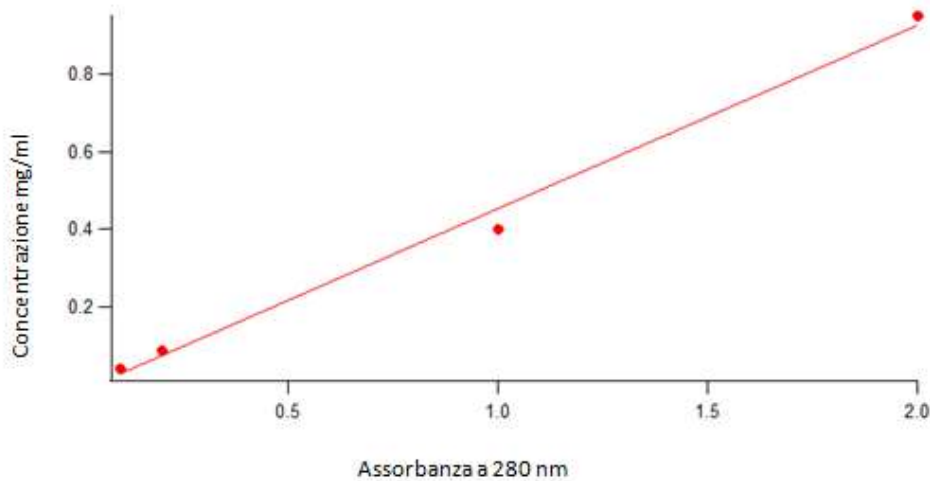


Fig. 31: Curva di taratura relativa alla soluzione di **HSA**.

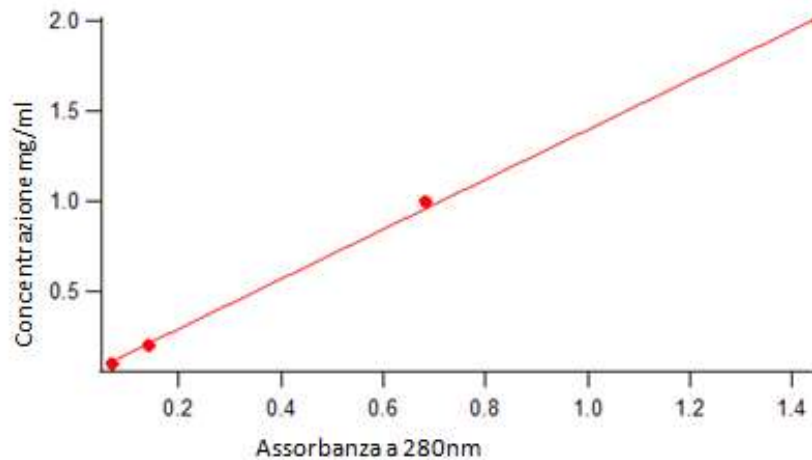


Fig. 32: Curva di taratura relativa alla soluzione di BSA.

Le curve di taratura sono state utilizzate per determinare la concentrazione di ogni campione analizzato un volta misurato il valore dell'assorbance a 280 nm.

3.1.2 Analisi sulla concentrazione in soluzione di HSA e BSA

Sono state condotte analisi spettrofotometriche sulla **soluzione A**, in cui è stata lasciata incubare la MO con la soluzione madre di **HSA** [10 mg/ml] e analisi spettrofotometriche sulla **soluzione B**, in cui è stata lasciata incubare la MO con la soluzione madre di **BSA** [10 mg/ml]. Queste analisi sono state confrontate con le misure spettrofotometriche delle rispettive soluzioni madre

“pure” ovvero senza incubazione con la monooleina, al fine di andare a confrontare le concentrazioni proteiche in soluzione.

Le misure spettrofotometriche sono state effettuate a distanza di 1, 2 e 3 giorni dall'incubazione della MO con la soluzione madre. In questo modo è stato possibile capire due cose fondamentali; la prima, quale effetto l'HSA e la BSA esercitavano sui cubosomi di monooleina e la seconda se le due proteine venivano incapsulate o meno all'interno dei cubosomi.

In fig. 33 a) e b) sono riportati gli spettri ottenuti della **soluzione A** ai diversi giorni di incubazione; lo spettro tratteggiato in nero rappresenta soluzione madre “pura” di HSA.

Per la **soluzione B**, è stata effettuata una quarta misura, ovvero dopo 7 giorni dall'incubazione della MO. In fig. 34 a) e b) sono riportati gli spettri ottenuti della soluzione ai diversi giorni di incubazione; anche in questo caso lo spettro tratteggiato in nero rappresenta la soluzione madre “pura” di BSA.

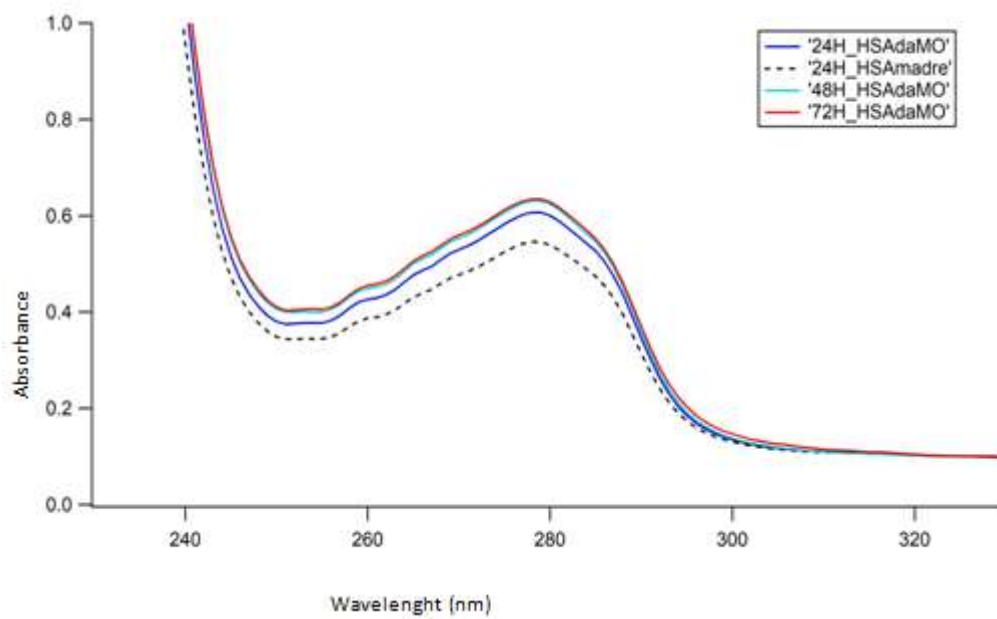


Fig. 33 a): Spettri di assorbimento della soluzione HSA dopo incubazione con la MO.

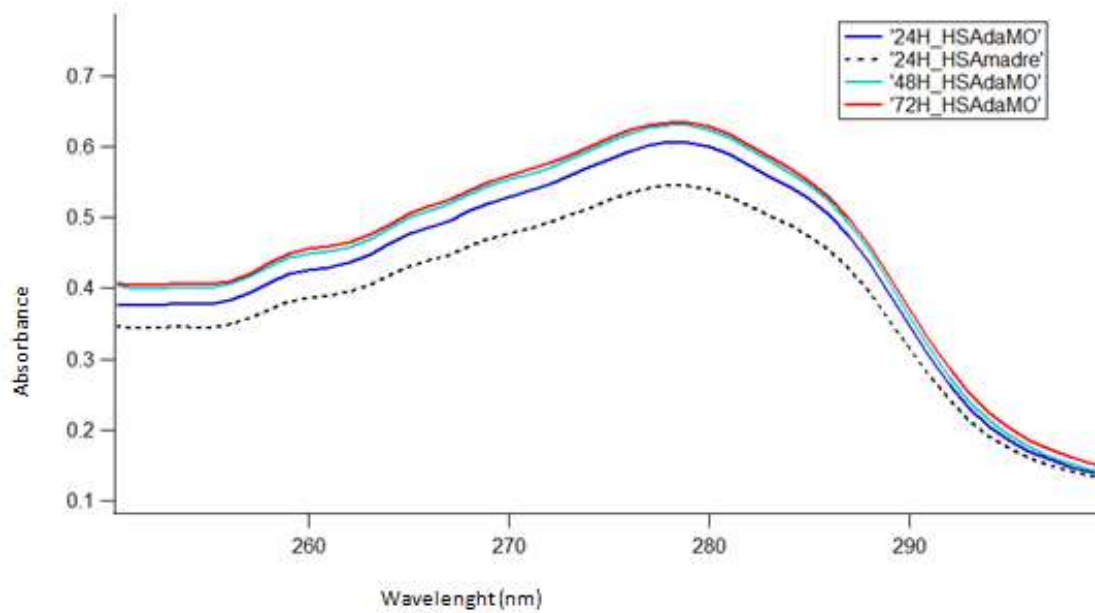


Fig. 33 b): Espansione del grafico rappresentato in Fig. 33 a)

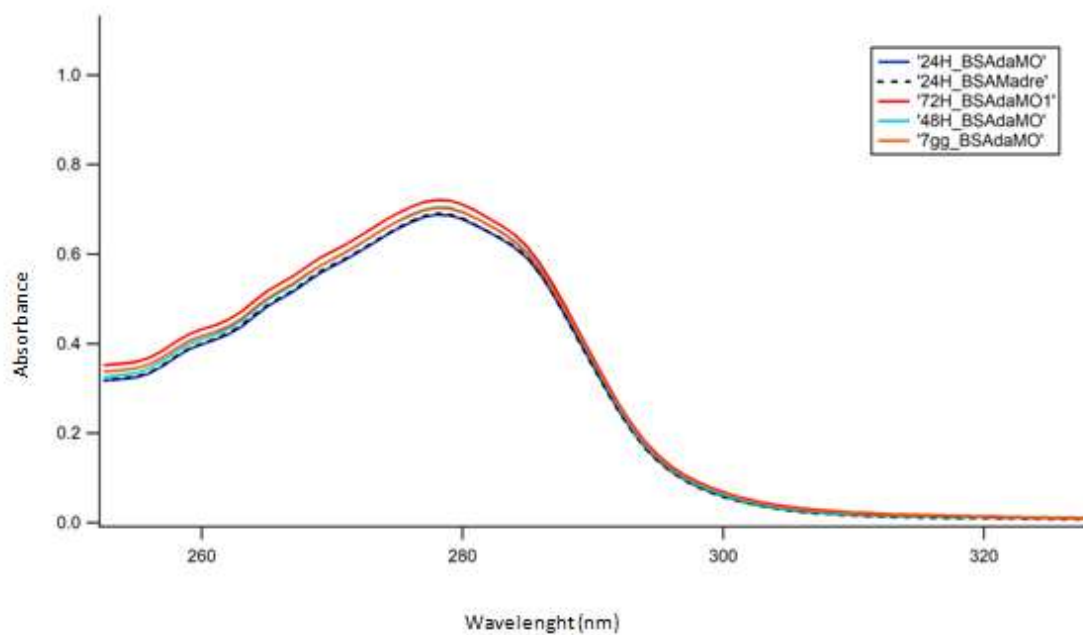


Fig. 34 a): Spettri di assorbimento della soluzione BSA dopo incubazione con la MO.

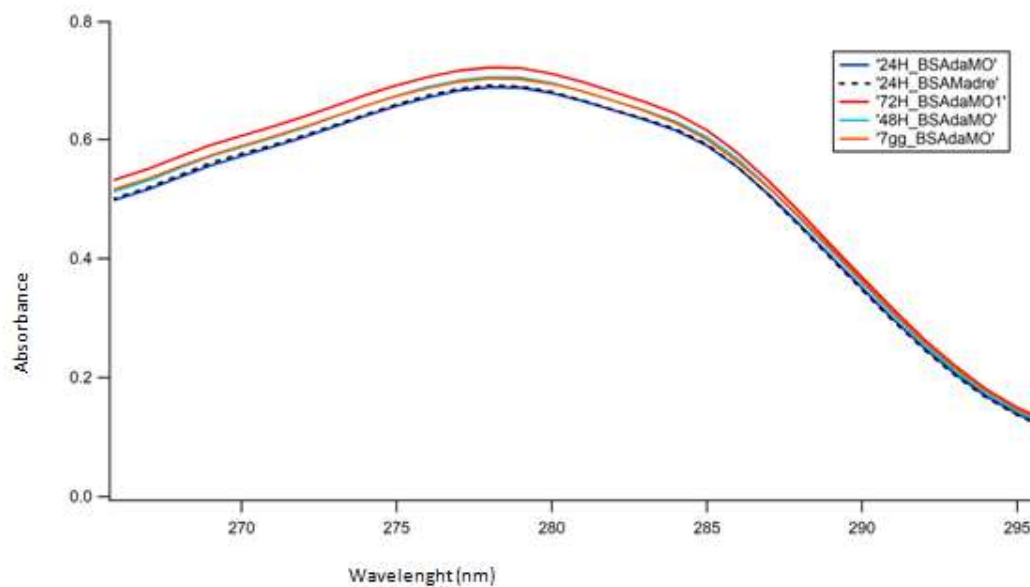


Fig. 34 b): Espansione del grafico rappresentato in Fig. 34 a)

Quanto ottenuto dalla spettrofotometria riporta dati molto interessanti. Come si può notare dagli spettri, sia per la soluzione di HSA [Fig. 33] sia per la soluzione di BSA [Fig. 34], i valori delle assorbanze aumentano all'aumentare dei giorni di incubazione, ma soprattutto i valori delle assorbanze risultano essere sempre più alti dei valori delle rispettive soluzioni madre "pure".

Questo è un risultato significativo; come è noto l'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione, quindi l'aumentare dell'assorbanza che si osserva indica che la concentrazione proteica aumenta sempre di più all'aumentare dei giorni di incubazione con la monooleina. Questo aumento di concentrazione, anche se piccolo, indica che le proteine sieriche non vengono inglobate all'interno dei cubosomi di monooleina. Se ciò fosse stato si sarebbe osservato una diminuzione della concentrazione di HSA e BSA rispetto alla loro concentrazione delle rispettive soluzioni madre "pure".

3.2 Analisi di diffrazione raggi-X

La diffrazione raggi-X ha permesso l'analisi dei campioni di monooleina in soluzione acquosa (MO+H₂O), monooleina in soluzione madre di HSA (MO+HSA) e monooleina in soluzione madre di BSA (MO+BSA), tutti i campioni sono descritti nel capitolo 2. Per i campioni MO+HSA e MO+BSA le misure di diffrazione sono state effettuate dopo diversi giorni dalla preparazione; in questo modo si è andato a monitorare il cambiamento di fase della monooleina e si è andato a determinare il valore di cella unitaria a , per effetto delle proteine sieriche. Inoltre è stata eseguita l'analisi dei campioni preparati con il PEG al 5%, 10%, 15%, 20% e 30%. Dalla fig. 36 alla fig. 56 sono riportate le immagini ottenute dalla diffrazione con il programma Image J e i grafici ottenuti dal programma IgorPro. I grafici ottenuti riportano i valori dell'intensità di scattering di Q in funzione dell'angolo di scattering, espresso dal valore Q . Come già spiegato nel capitolo 2, dalla posizione dei picchi di diffrazione sono stati calcolati i parametri delle fasi osservate (lamellari, esagonali e cubiche224). I valori relativi alle dimensioni di cella ricavati in funzione del tempo di incubazione delle proteine sieriche (campioni MO+HSA e MO+BSA) e i valori relativi alle dimensioni di cella ricavati in funzione della concentrazione PEG in

soluzione (campioni con il PEG), sono riassunti in *Tabella 3*, *Tabella 4*, *Tabella 5* e *Tabella 6*.

Le prime analisi di diffrazione sono state eseguite sui campioni costituiti dalla sola monooleina con il 20%, 30%, 40% e 60% di acqua in soluzione. Queste analisi sono state utili per confermare che la monooleina in acqua assume una fase cubica, caratteristica fondamentale dei cubosomi. In fig. 35 è mostrata l'analisi del campione di monooleina al 30% di acqua; come ci si aspettava è stata osservata una fase cubica. Anche per gli altri campioni, alle altre percentuali di acqua, è stata osservata una fase cubica.

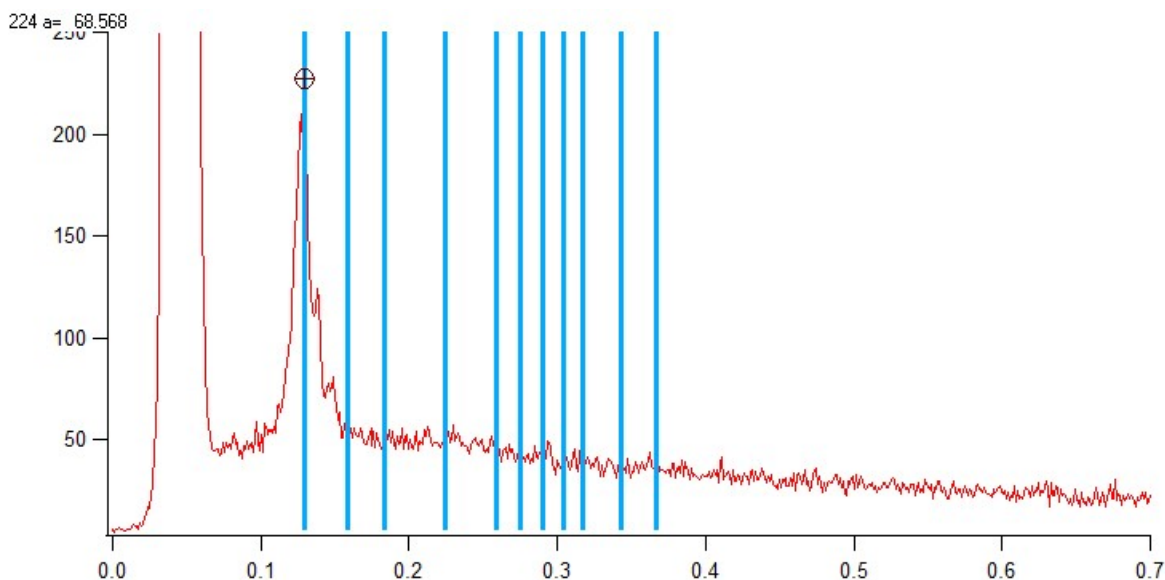


Fig. 35: Individuazione della fase cubica 224 mediante il programma Igor Pro

3.2.1 Analisi dei campioni con HSA e BSA in soluzione

Analisi diffrazione raggi-X dei campioni **MO+HSA**:

1. Dopo un giorno di incubazione:

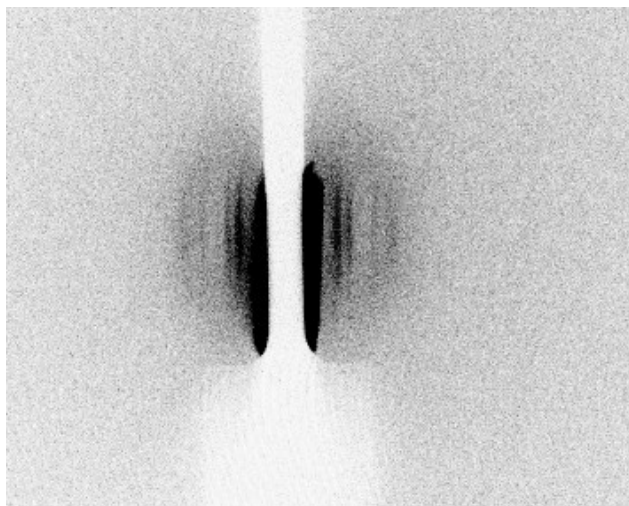


Fig. 36 a): Immagine ottenuta dalla diffrazione visualizzata con ImageJ

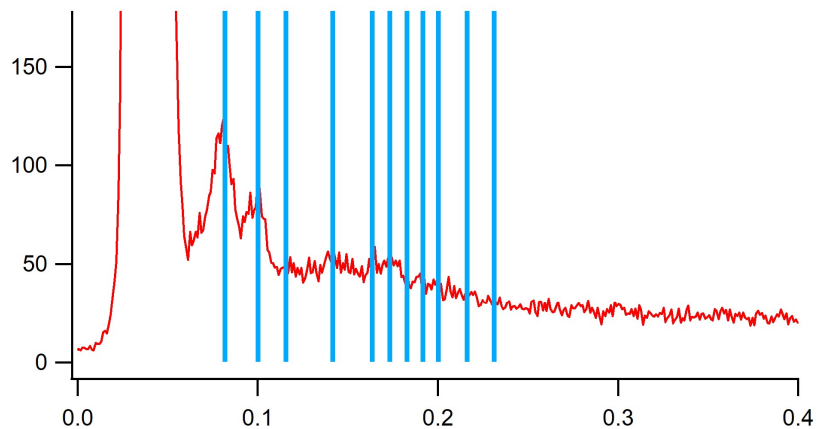


Fig. 36 b): Individuazione della fase

Si osserva una fase *cubica* 224, con $a=109.4$

2. Dopo 2 giorni di incubazione:

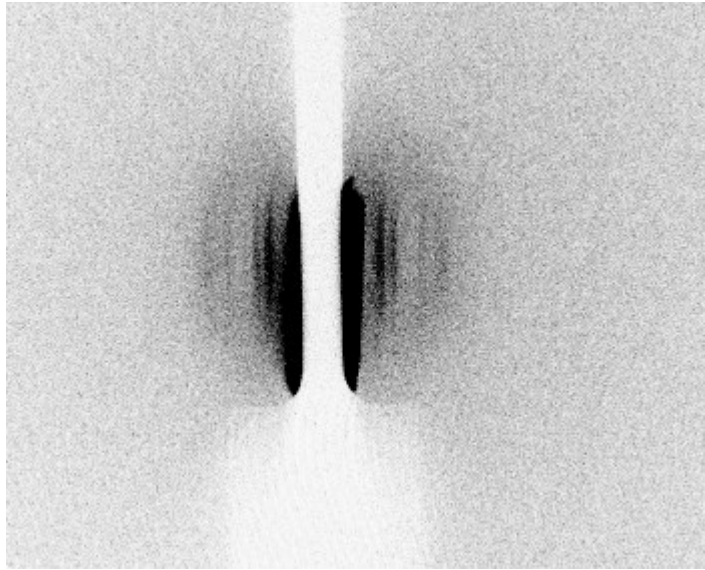


Fig. 37 a): Immagine ottenuta dalla diffrazione visualizzata con ImageJ

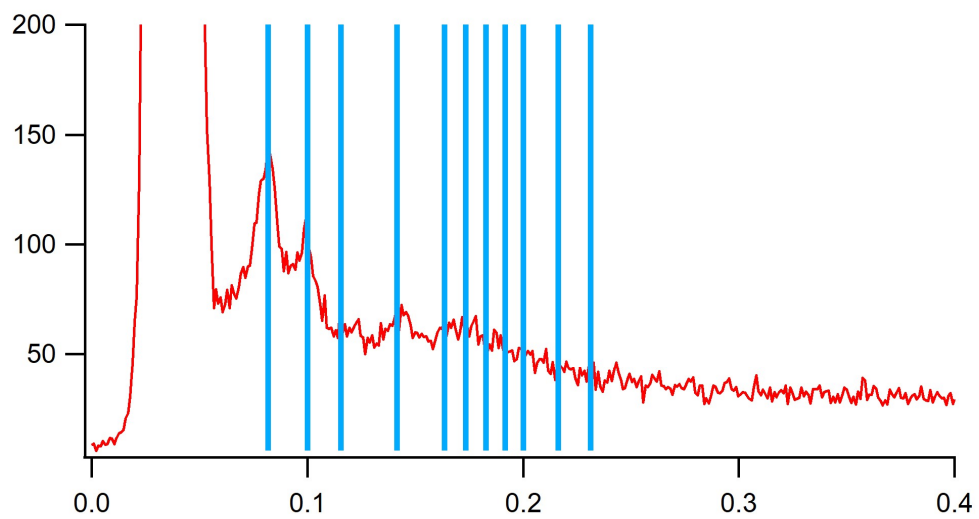


Fig. 37 b): Individuazione della fase

Si osserva una fase *cubica* 224, con $a=108.7$

3. Dopo 3 giorni di incubazione:

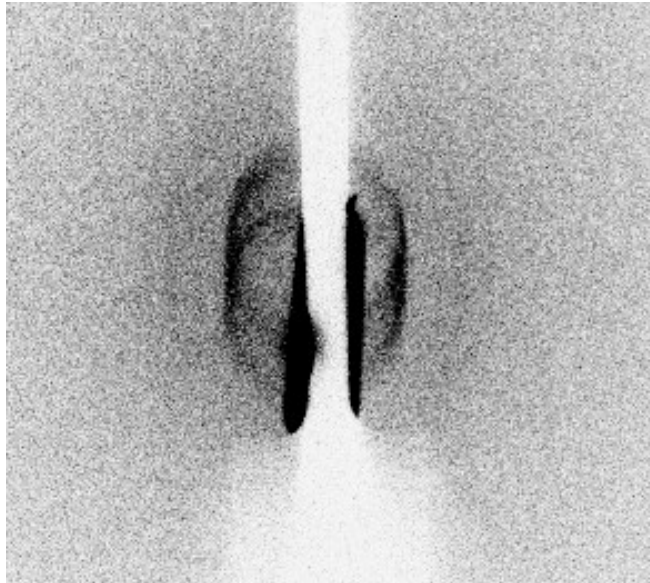


Fig. 38 a): Immagine ottenuta dalla diffrazione visualizzata con ImageJ

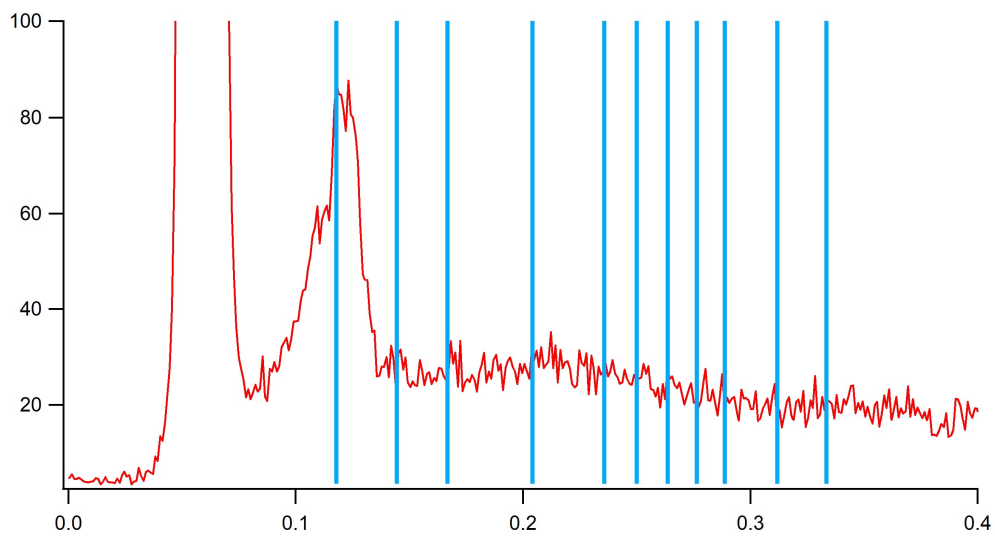


Fig. 38 b): Individuazione della fase

Si osserva una fase *cubica 224*, con $a=75.367$

4. Dopo 6 giorni di incubazione:

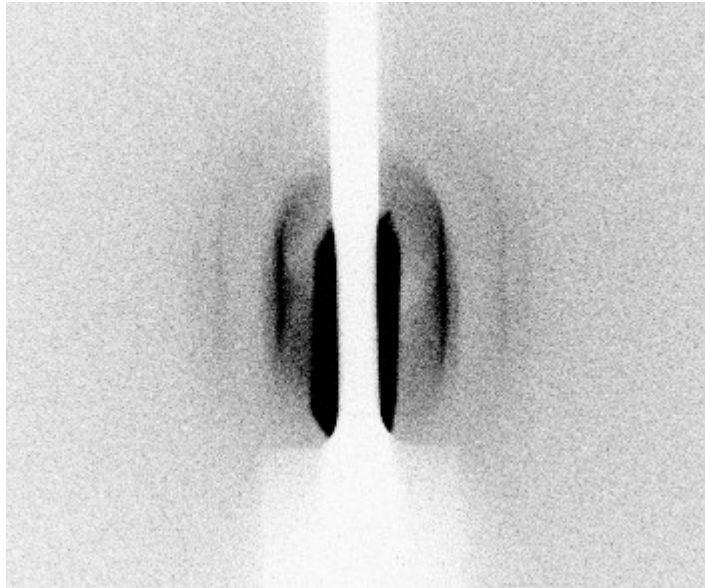


Fig. 39 a): Immagine ottenuta dalla diffrazione visualizzata con ImageJ

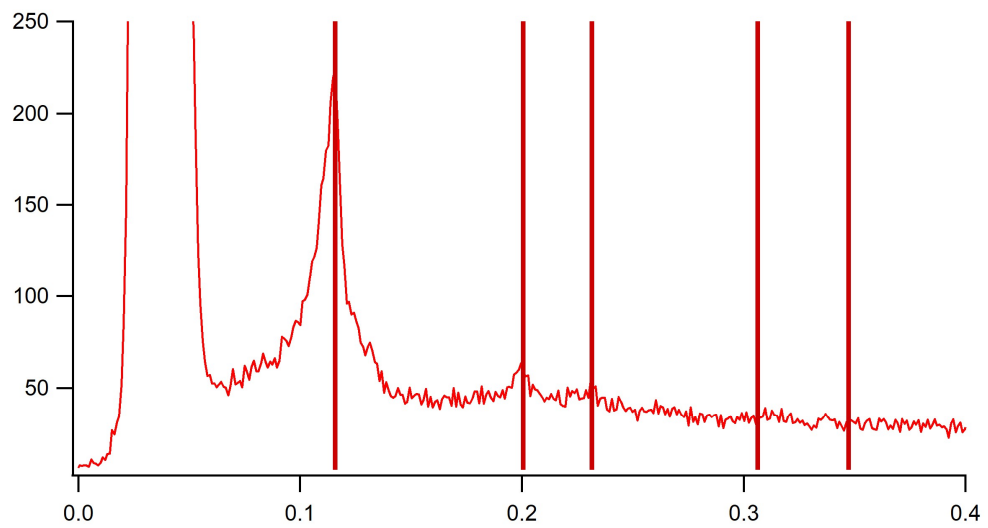


Fig. 39 b): Individuazione della fase

Si osserva una fase *esagonale*, con $a=62.65$

5. Dopo 7 giorni di incubazione:

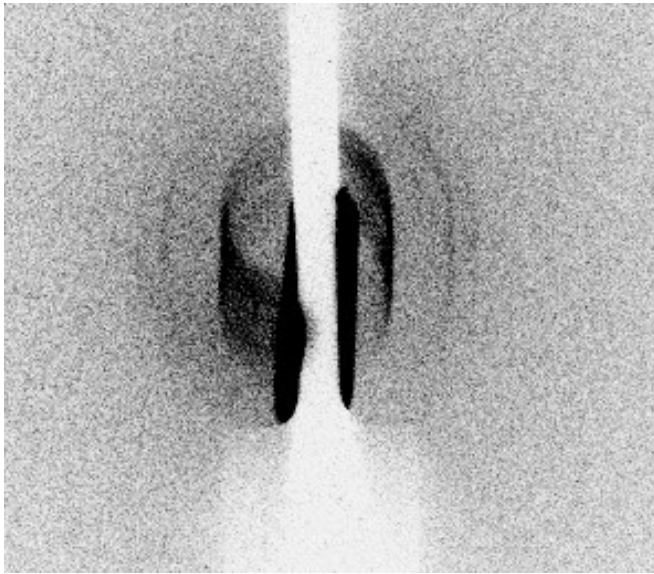


Fig. 40 a): Immagine ottenuta dalla diffrazione visualizzata con ImageJ

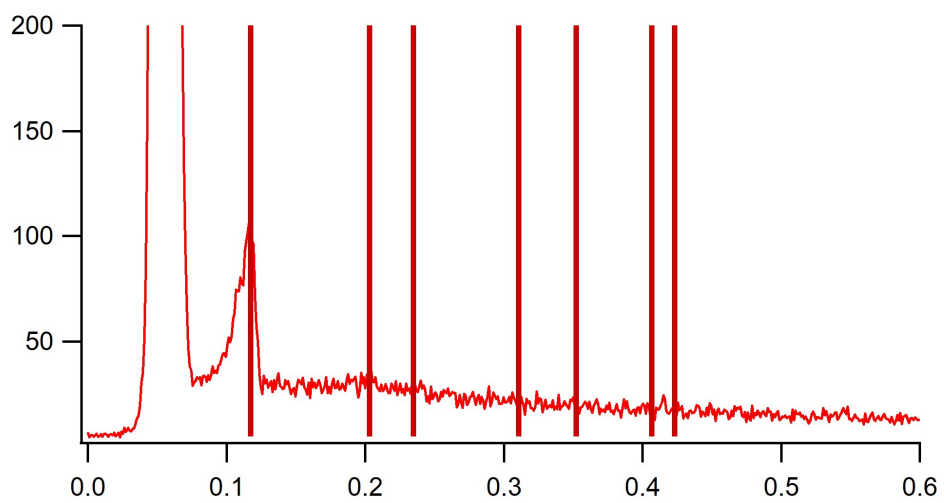


Fig. 40 b): Individuazione della fase

Si osserva una fase *esagonale*, con $a=61.537$

6. Dopo 27 giorni di incubazione:

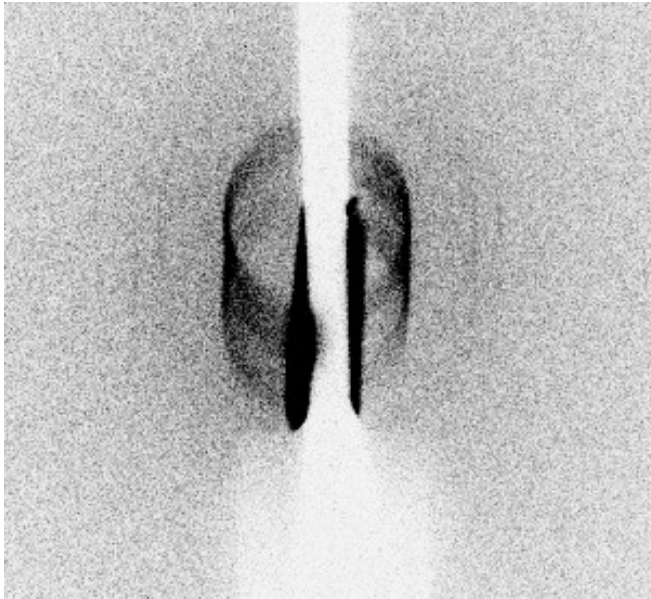


Fig. 41 a): Immagine ottenuta dalla diffrazione visualizzata con ImageJ

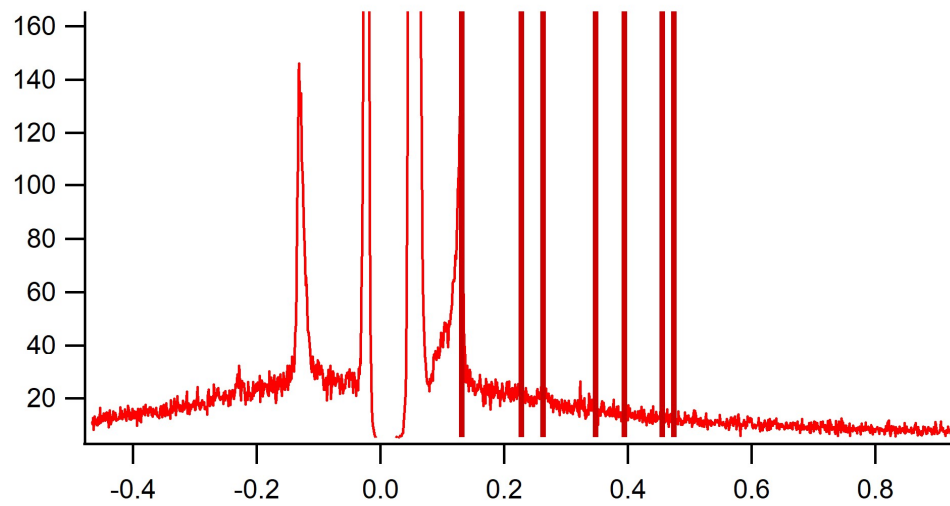


Fig. 41 b): Individuazione della fase

Si osserva una fase *esagonale*, con $a=55.164$

Analisi di diffrazione raggi-X dei campioni **MO+BSA**:

1. Dopo 1 giorno di incubazione:

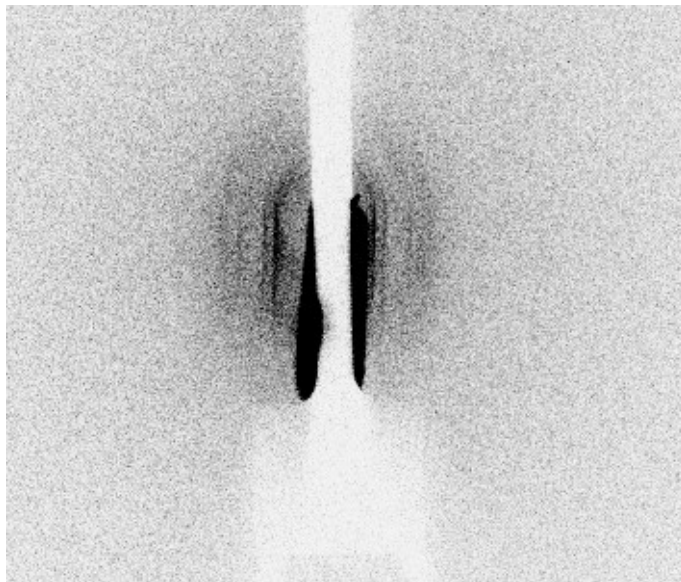


Fig. 42 a): Immagine ottenuta dalla diffrazione visualizzata con ImageJ

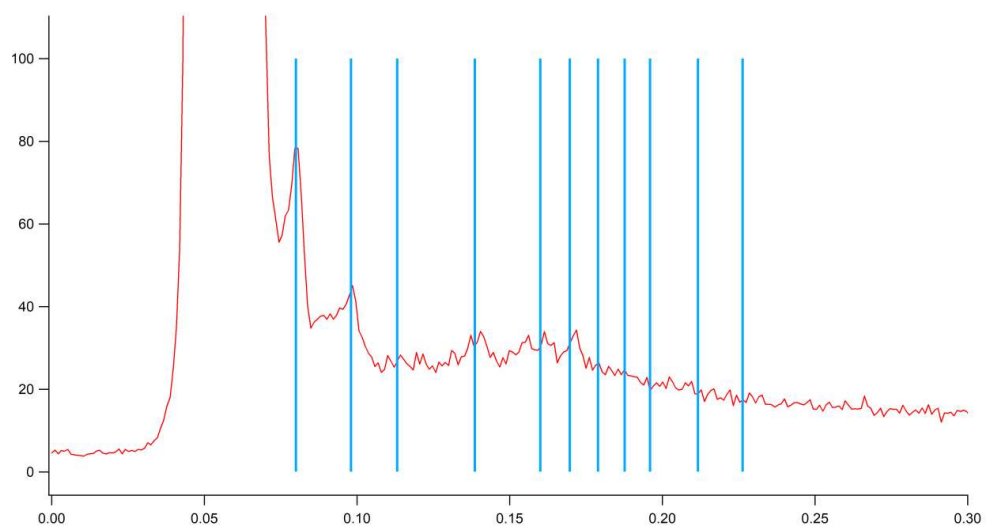


Fig. 42 b): Individuazione della fase

Si osserva una fase *cubica 224*, con $a=111.07$

2. Dopo 3 giorni di incubazione:

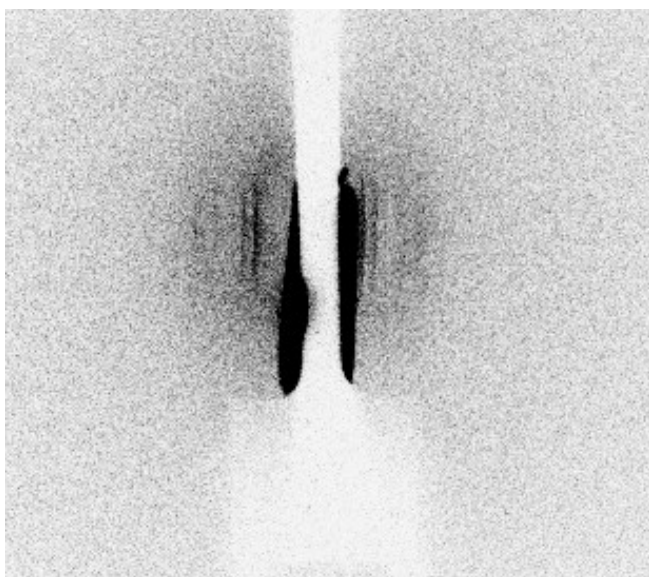


Fig. 43 a): Immagine ottenuta dalla diffrazione visualizzata con ImageJ

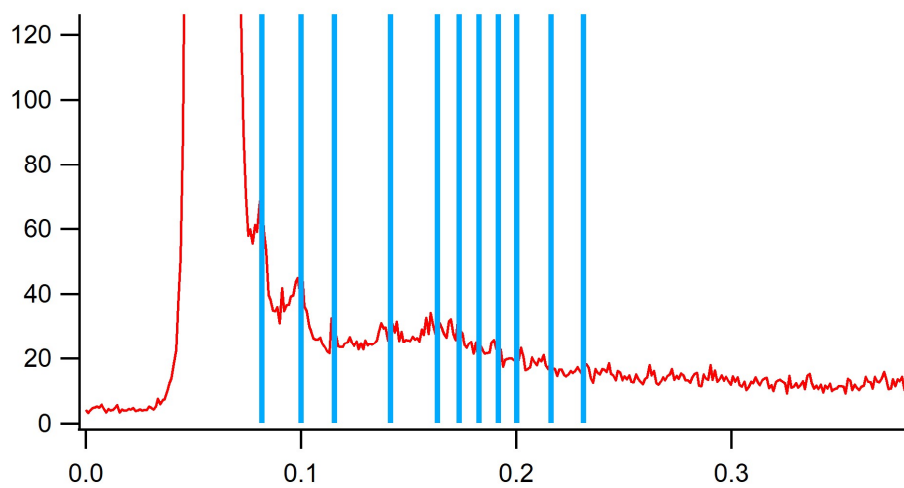


Fig. 43 b): Individuazione della fase

Si osserva una fase *cubica 224*, con $a=108.72$

3. Dopo 8 giorni di incubazione:

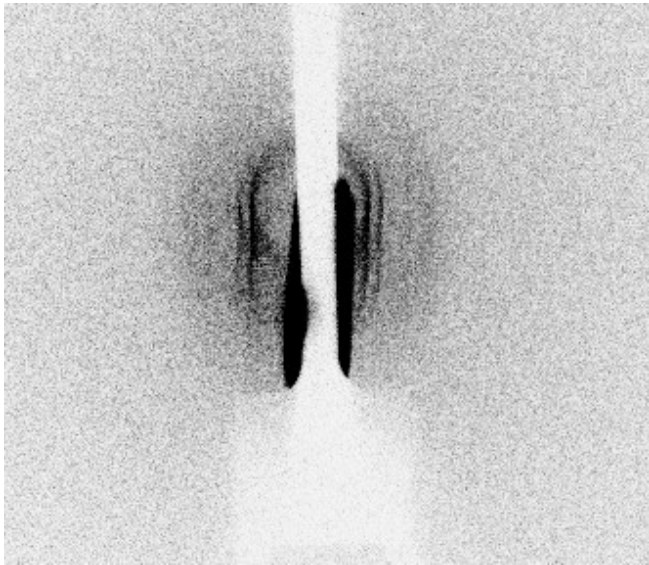


Fig. 44 a): Immagine ottenuta dalla diffrazione visualizzata con ImageJ

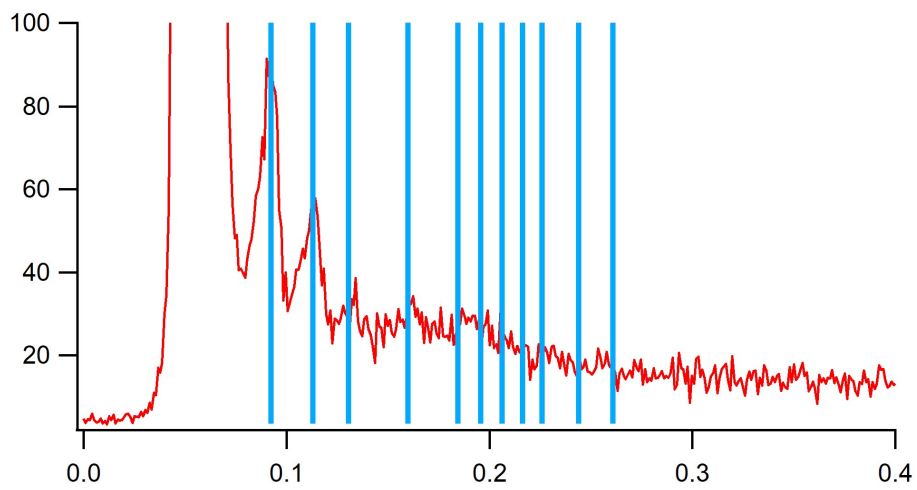


Fig. 44 b): Individuazione della fase

Si osserva una fase *cubica* 224, con $a=96.35$

4. Dopo 13 giorni di incubazione:

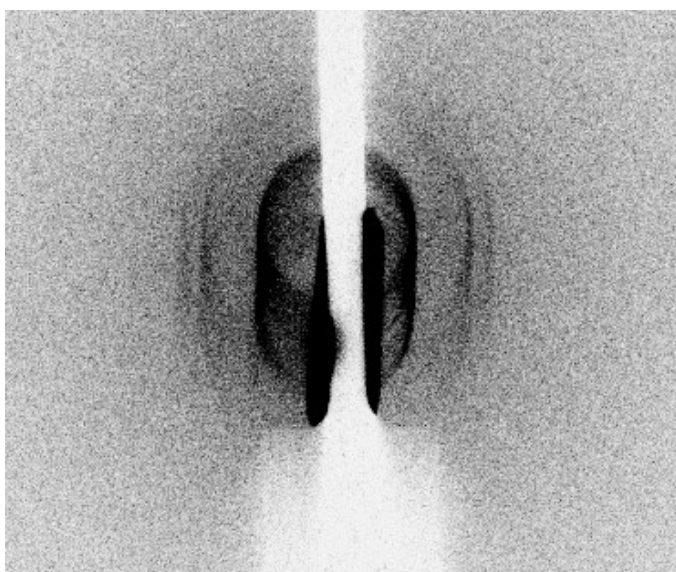


Fig. 45 a): Immagine ottenuta dalla diffrazione visualizzata con ImageJ

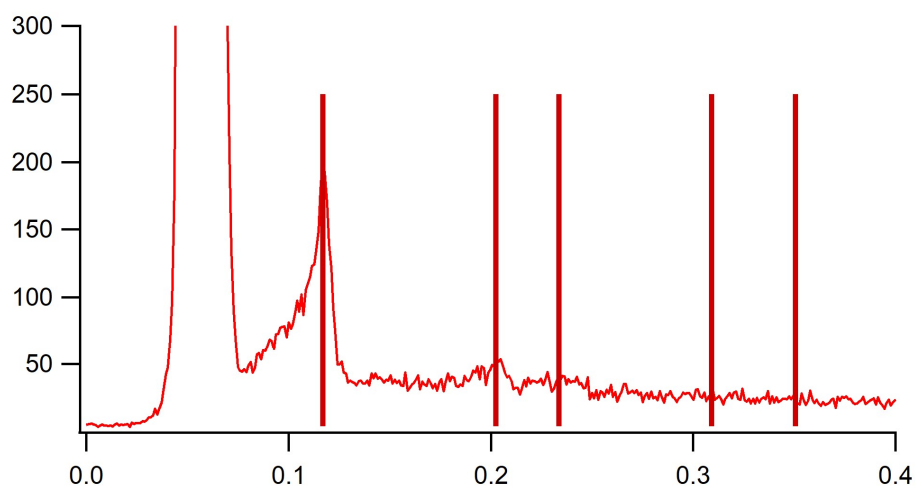


Fig. 45 b): Individuazione della fase

Si osserva una fase *esagonale*, con $a=62.09$

In *Tabella 3* ed in *Tabella 4* sono riportati i valori di cella unitaria (a) e la determinazione della fase lipidica di ogni campione analizzato riportato in funzione dei giorni di analisi.

GIORNI ANALISI	VALORE a	FASI
1	109.4	Cub224
2	108.7	Cub224
3	75.4	Cub224
6	62.7	Hex
7	61.5	Hex
27	55.2	Hex

Tabella 3. Valori relativi ai campioni con ***HSA***

GIORNI ANALISI	VALORE a	FASI
1	111.1	Cub224
3	108.7	Cub224
8	96.4	Cub224
13	62.1	Hex

Tabella 4. Valori relativi ai campioni con ***BSA***

Come si può notare dalla tabella 3 e dalla tabella 4 i valori di cella unitaria e i cambiamenti della organizzazione lipidiche (la variazione di fase) in funzione tempo di analisi sono molto simili per le due proteine. Nei campioni in cui la monooleina è incubata con la soluzione di HSA si può notare un cambiamento di fase lipidico dopo 5 giorni di incubazione; mentre nei campioni incubati con la soluzione di BSA si nota un cambiamento di fase lipidico dopo circa 9 giorni di incubazione. Nella figura 46 si vede il comportamento differente indotto dalle due proteine.

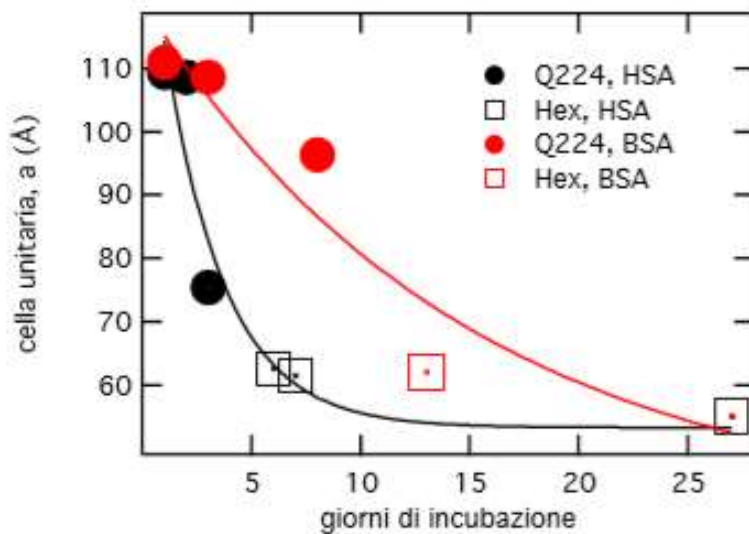


Fig. 46: Visualizzazione del cambiamento di fase di HSA (linea nera) e BSA (linea rossa) in funzione del tempo di incubazione.

3.2.2 Analisi dei campioni con PEG in soluzione

Al fine di valutare il significato del comportamento differente indotto dalle due proteine sono state effettuati degli esperimenti in pressione osmotica: tale esperimento permette di verificare gli effetti prodotti dalle proteine sulla disidratazione controllata della molecola lipidica.

Analisi diffrazione raggi-X dei campioni **MO+HSA+PEG:**

- PEG 5%

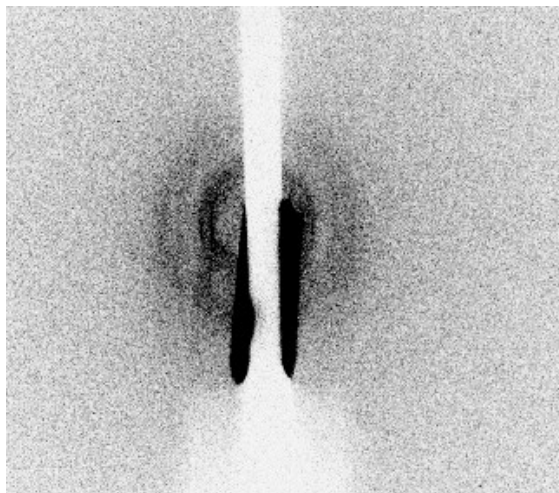


Fig. 47 a): Immagine ottenuta dalla diffrazione visualizzata con ImageJ

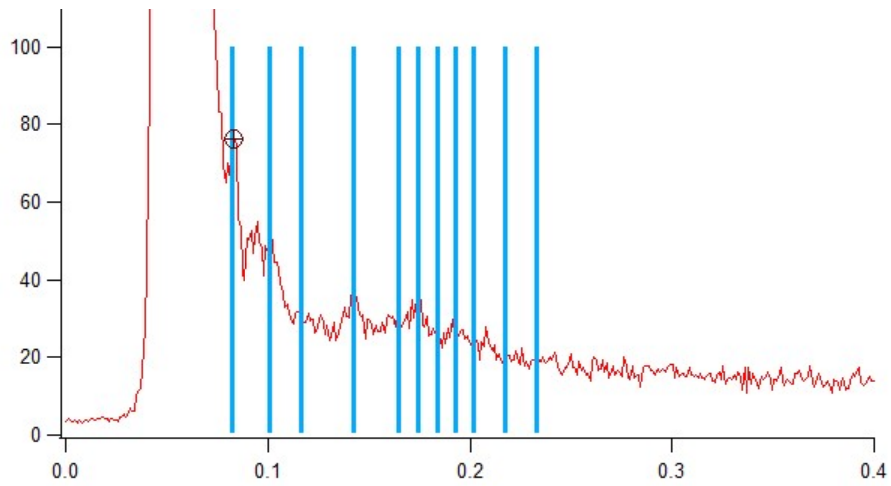


Fig. 47 b): Individuazione della fase

Si osserva una fase cubica 224, con $a=108.01$

- PEG 10%

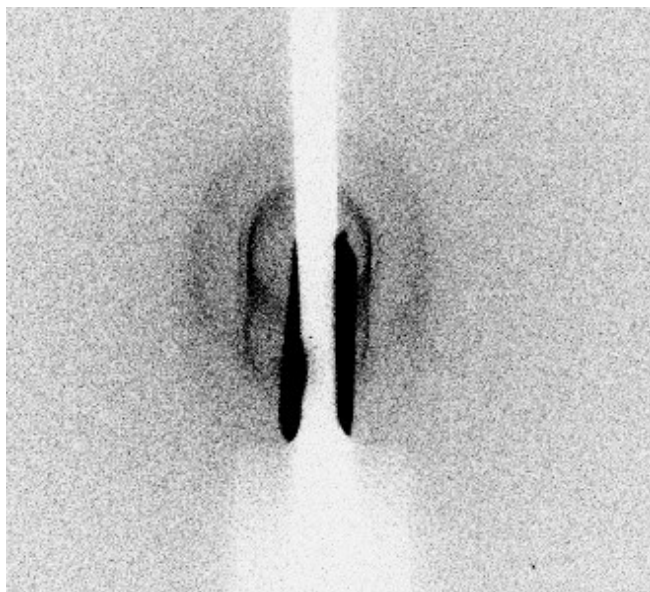


Fig. 48 a): Immagine ottenuta dalla diffrazione visualizzata con ImageJ

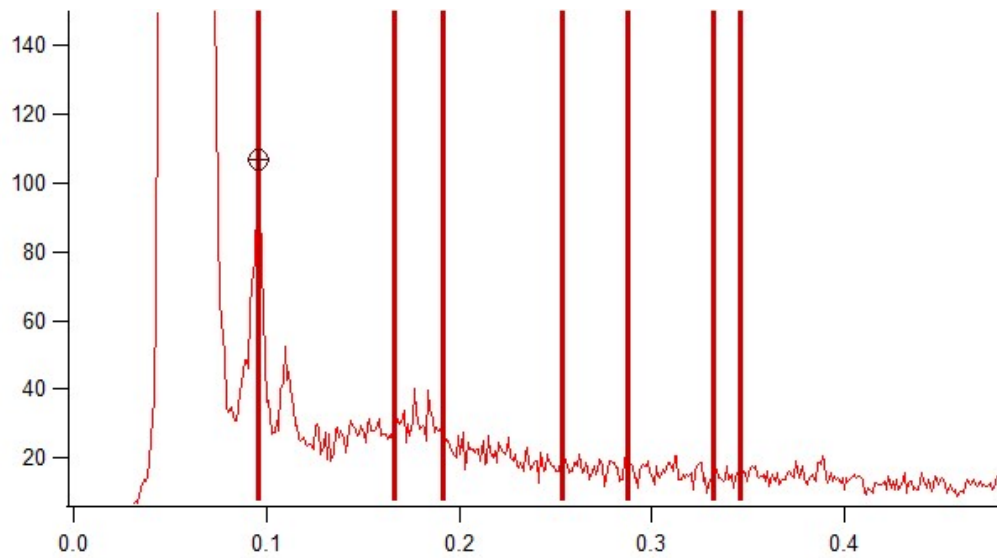


Fig. 48 b): Individuazione della fase

Si osserva una fase esagonale, con $a=76.49$

- PEG 15%

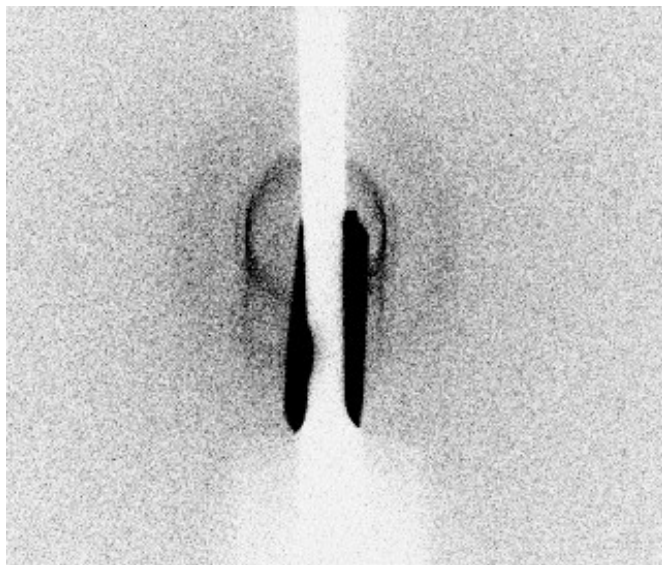


Fig. 49 a): Immagine ottenuta dalla diffrazione visualizzata con ImageJ

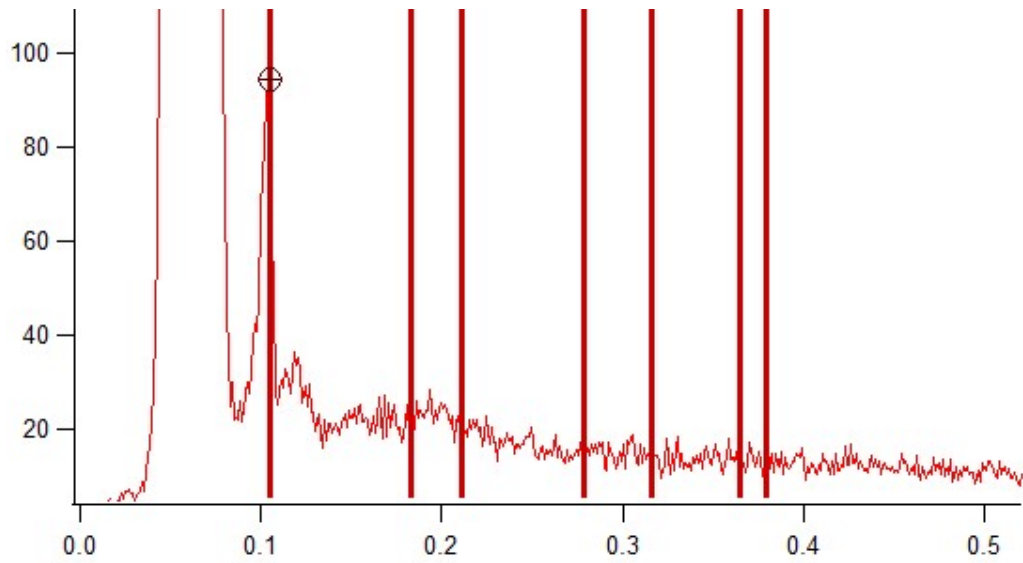


Fig. 49 b): Individuazione della fase

Si osserva una fase esagonale, con $a=68.9$

- PEG 20%

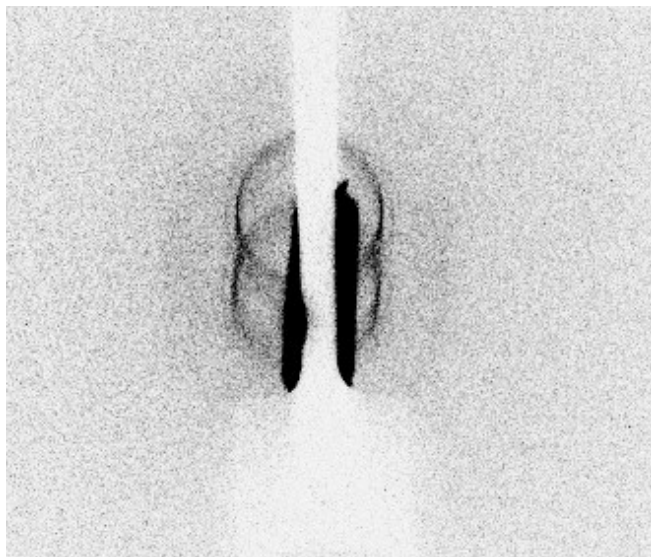


Fig. 50 a): Immagine ottenuta dalla diffrazione visualizzata con ImageJ

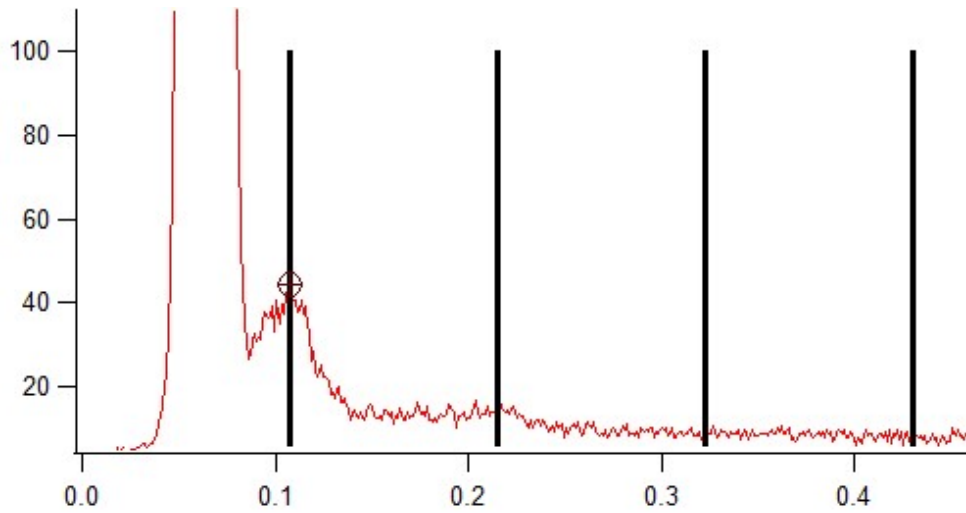


Fig. 50 b): Individuazione della fase

Si osserva una fase lamellare, con $a=58.5$

- PEG 30%

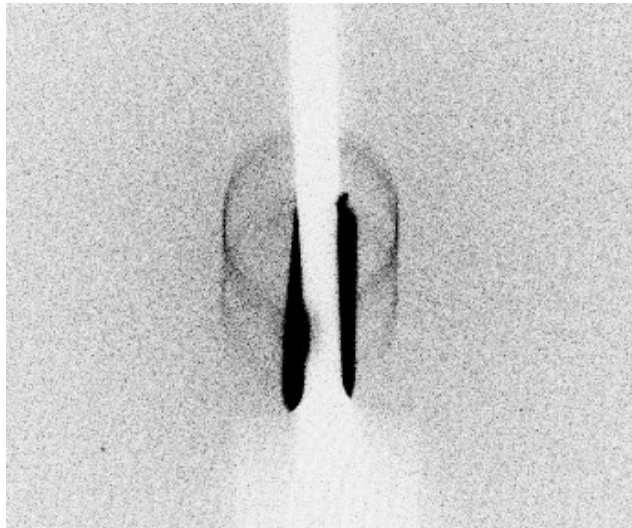


Fig. 51 a): Immagine ottenuta dalla diffrazione visualizzata con ImageJ

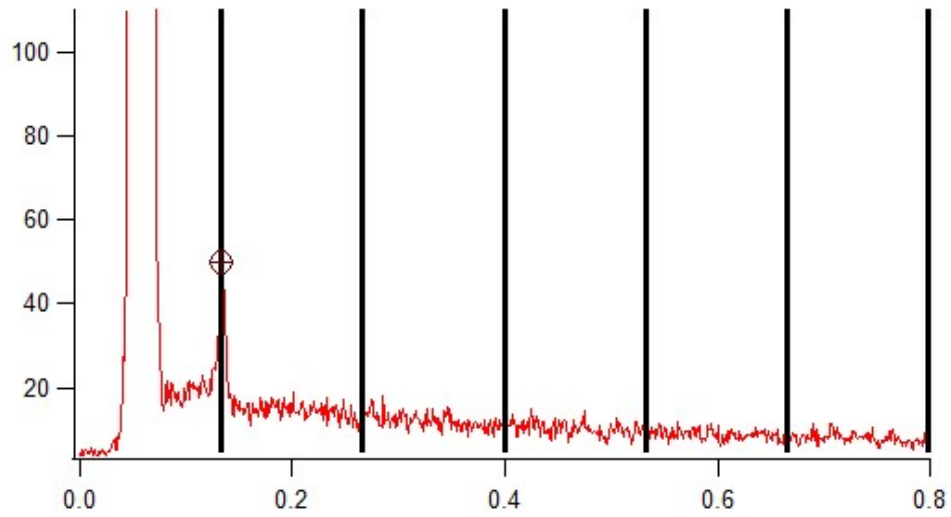


Fig. 51 b): Individuazione della fase

Si osserva una fase lamellare, con $a=47.3$

Analisi diffrazione raggi-X dei campioni **MO+BSA+PEG:**

- PEG 5%

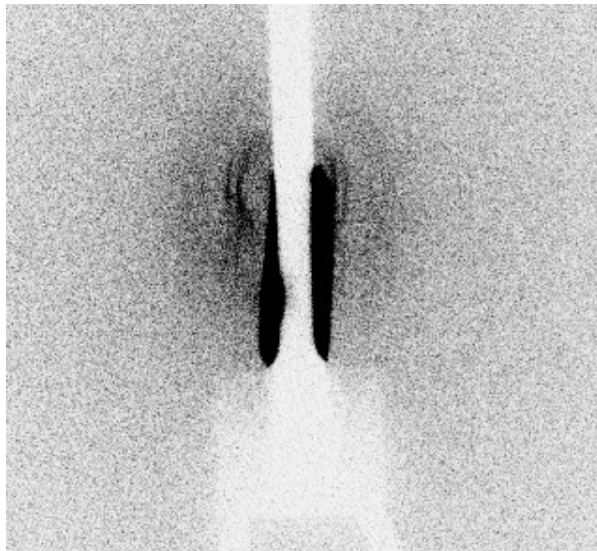


Fig. 52 a): Immagine ottenuta dalla diffrazione visualizzata con ImageJ

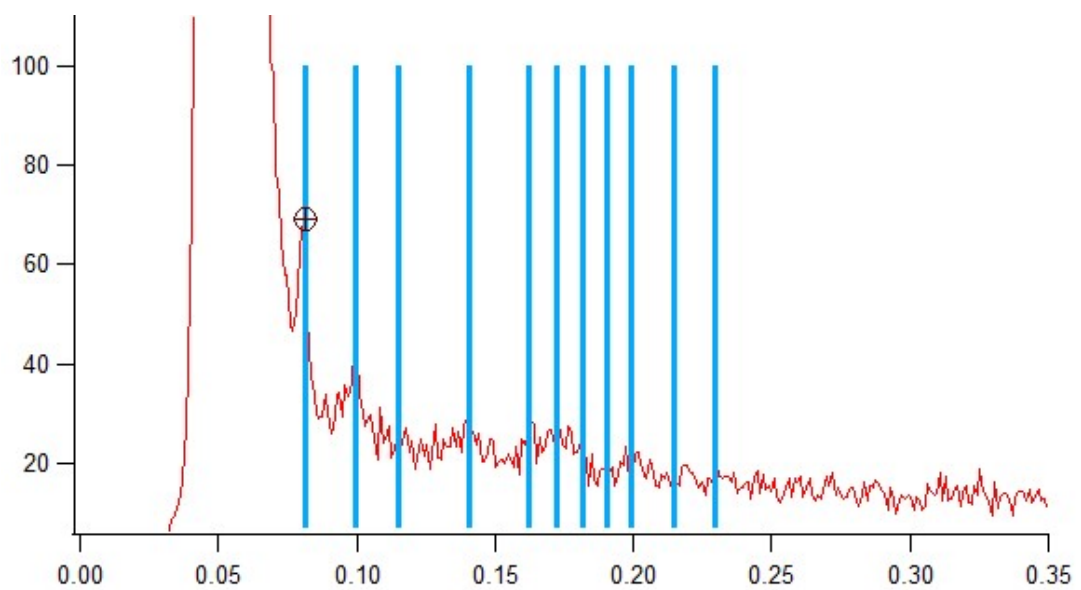


Fig.52 b): Individuazione della fase

Si osserva una fase cubica224, con $a=109.4$

- PEG 10%

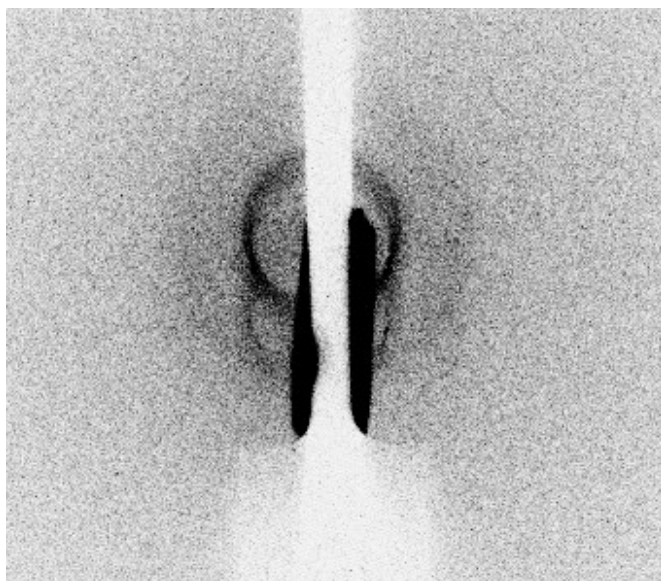


Fig. 53 a): Immagine ottenuta dalla diffrazione visualizzata con ImageJ

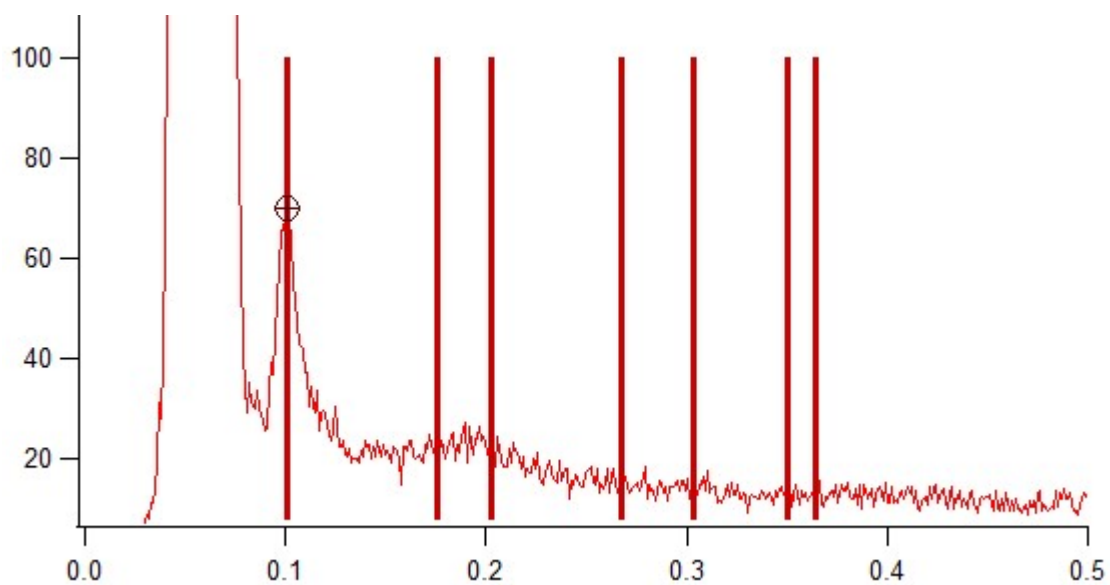


Fig. 53 b): Individuazione della fase

Si osserva una fase esagonale, con $a=71.74$

- PEG 15%

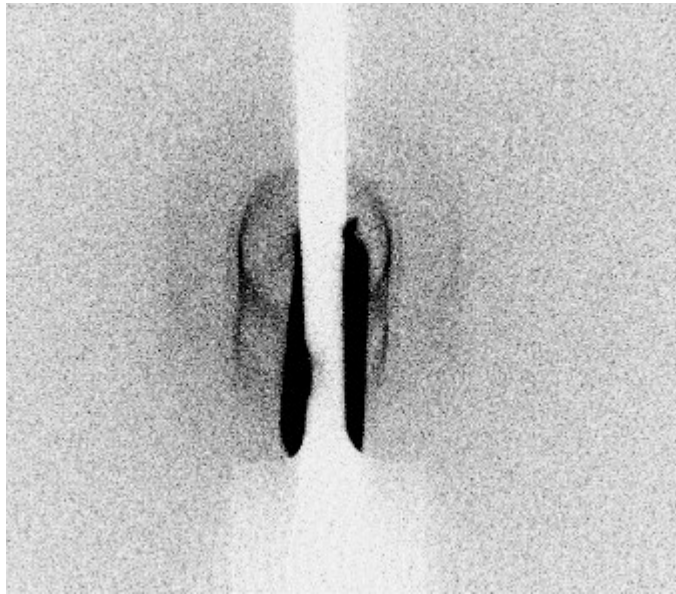


Fig. 54 a): Immagine ottenuta dalla diffrazione visualizzata con ImageJ

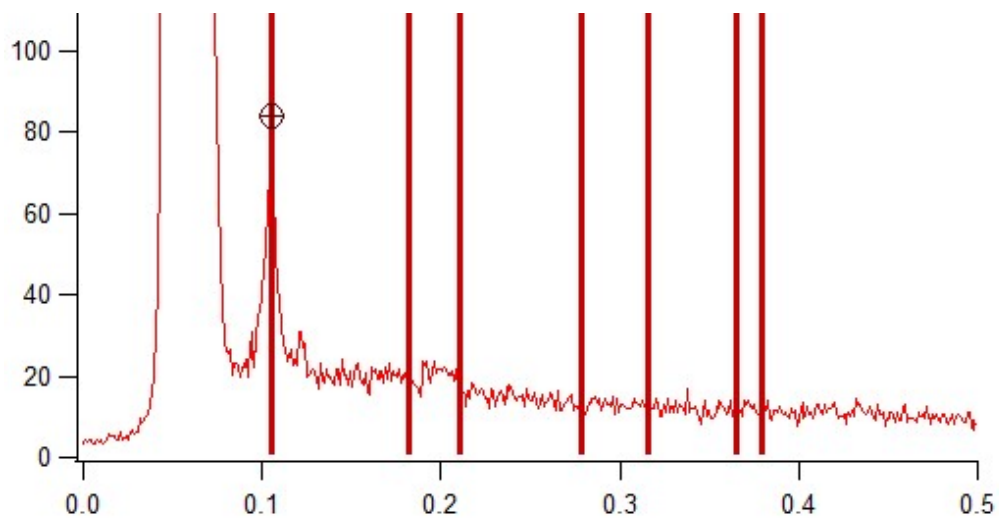


Fig. 54 b): Individuazione della fase

Si osserva una fase esagonale, con $a=68.9$

- PEG 20%

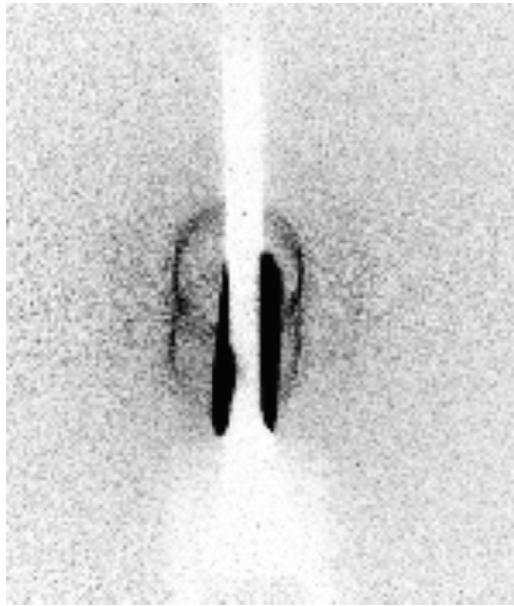


Fig. 55 a): Immagine ottenuta dalla diffrazione visualizzata con ImageJ

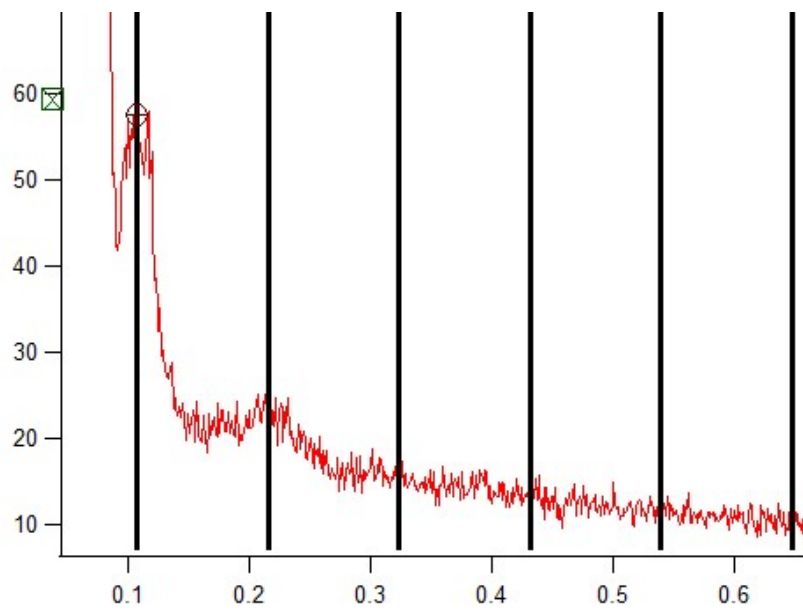


Fig. 55 b): Individuazione della fase

Si osserva una fase lamellare, con $a=58.2$

- PEG 30%

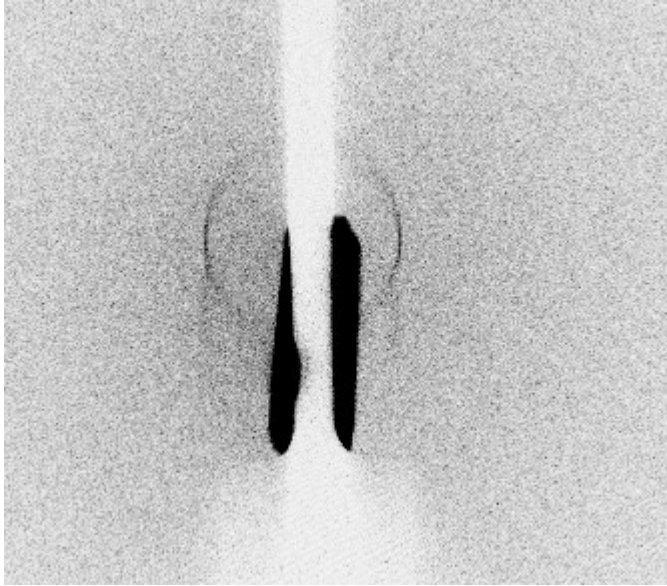


Fig. 56 a): Immagine ottenuta dalla diffrazione visualizzata con ImageJ

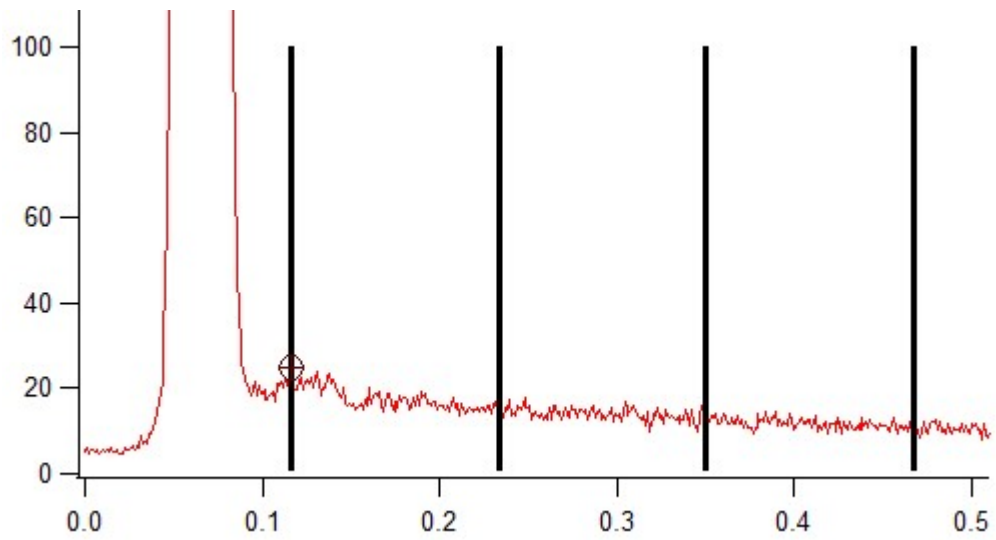


Fig. 56 b): Individuazione della fase

Si osserva una fase lamellare, con $a=53.8$

In tabella 4 ed in tabella 5 sono riportati i valori di cella unitaria (a) e la fase lipidica di ogni campione analizzato riportato in funzione delle percentuali di PEG in soluzione utilizzate.

% PEG	HSA (valore a)	FASE
PEG 5%	108.01	Cub224
PEG 10%	76.49	Hex
PEG 15%	68.9	Hex
PEG 20%	58.5	Lam
PEG 30%	47.3	Lam

Tabella 4. Valori relativi alla HSA

% PEG	BSA (valore a)	FASE
PEG 5%	109.4	Cub224
PEG 10%	71.74	Hex
PEG 15%	68.9	Hex
PEG 20%	58.2	Lam
PEG 30%	53.8	Lam

Tabella 5. Valori relativi alla BSA

Come si può notare dalle tabelle 4 e 5 i valori di cella unitaria e le fasi lipidiche determinate sono simili per le due proteine sieriche.

Dagli spettri ottenuti si può notare che i campioni (sia quelli con HSA che quelli con BSA) trattati con il 5% di PEG mostrano una fase cubica 224, che diviene però esagonale ed infine lamellare all'aumentare della pressione osmotica esercitata dal poli-etilen-glicole. I valori di cella nei campioni con il 5% di PEG sono i più alti rilevati (108.01 per il campione con HSA e 109.4 per il campione con BSA) ed all'aumentare delle percentuali di PEG i valori di cella diminuiscono ulteriormente. Si può notare che i campioni con il 30% di PEG mostrano il più basso valore di cella rilevato. Il grafico in fig. 57 indica che le variazioni indotte dal PEG in presenza delle due proteine è molto simile anche se alcuni effetti sono visibili.

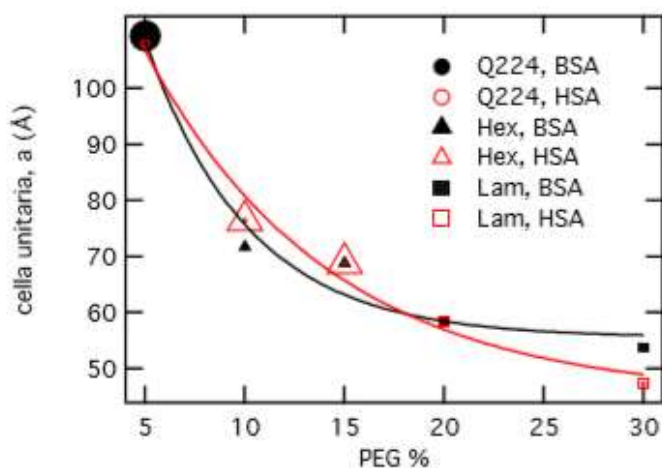


Fig. 57: Visualizzazione della diminuzione del valore della cella a dei campioni con HSA (linea rossa) e dei campioni con BSA (linea nera) in funzione delle % di PEG.

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Grazie all'analisi di diffrazione ai raggi X, è stato possibile confermare che le proteine HSA e BSA provocano un cambiamento di fase lipidico della monooleina; ciò vuol dire che esse interagiscono con il lipide. In ogni caso tutti i risultati (UV-visibile e diffrazione) indicano che HSA e BSA non sono in grado di penetrare all'interno della struttura cubica della monooleina probabilmente a causa delle dimensioni elevate delle proteine rispetto al diametro dei canali acquosi presenti all'interno della struttura (vedi paragrafo 2.1.1). Dunque, l'attività della HSA e della BSA in soluzione determinano una disidratazione della fase cubica e inducendo perciò i cambiamenti di fase osservati. Tuttavia, è importante osservare che il comportamento in presenza di BSA o HSA non è identico.

Per cercare di capire l'origine della differenza tra BSA e HSA, sono stati effettuati esperimenti di stress osmotico. Sui campioni in presenza di BSA e HSA, è stato misurato l'effetto di disidratazione della monooleina indotto dal un polimero ad alto peso molecolare (PEG). I risultati hanno mostrato che la pressione osmotica influisce notevolmente sulle proprietà strutturali, in particolare le concentrazioni più alte di PEG favoriscono una fase lamellare ed una diminuzione del parametro di cella.

I dati di pressione osmotica possono essere analizzati per determinare il lavoro fatto dal PEG per disidratare la monooleina. Il primo passo è capire quante molecole di acqua sono presenti per ogni molecola di monooleina. Nell'ipotesi di separazione completa tra fase lipidica e fase acquosa all'interno del campione, possono essere applicate delle semplici relazioni volumiche e geometriche per determinare a partire del parametro di cella a , trovato nell'analisi di diffrazione di ogni campione, il volume di acqua per molecola di monooleina. In fig. 58, sono mostrati i parametri geometrici e le corrispondenti relazioni volumiche relative alle varie fasi lipidiche. Qui viene riportato a scopo di esempio il calcolo effettuato nel caso della fase lamellare.

Consideriamo il campione in fase lamellare osservato nel sistema MO+HSA in eccesso di PEG al 20%.

Si parte dalla formula $d_l = d \varphi_{lip}$, dove d_l rappresenta la lunghezza della molecola della monooleina (ritenuto costante e dipendente solo dalla temperatura) mentre d rappresenta il valore di cella unitaria trovato nell'analisi di diffrazione (vedi paragrafo 3.2.2), per calcolare il valore di φ_{lip} , ovvero la concentrazione volumica del lipide all'interno del campione.

Si ha che $\varphi_{lip} = d_l / d$. Nel caso del campione preso in esame, avremo $d_l = 2 \cdot 17.2 = 34.4 \text{ \AA}$, $d = 58.5 \text{ \AA}$, quindi $\varphi_{lip} = 0.588$, ovvero il 58.8% del

volume del campione è occupato dal lipide mentre il restante 41.2% è occupato dall'acqua. Prendendo come riferimento un campione standard di volume 1 cm^3 , si può calcolare il numero di molecole lipidiche presenti ed il numero delle molecole di acqua. Il numero delle molecole lipidiche è calcolato come il rapporto tra il volume della parte lipidica (dato dal volume del campione standard moltiplicato per la frazione volumica lipidica) e il volume di una molecola lipidica ($V_{mo}=628 \text{ \AA}$):

$$(1 \text{ cm}^3 \cdot 0.588)/V_{mo} = 0.588 \text{ cm}^3 / (628 \cdot 10^{-24}) \text{ cm}^3 = 0.936 \cdot 10^{-27} \text{ cm}^3.$$

Il numero delle molecole di acqua nello stesso volume di campione standard è calcolato come il rapporto tra il volume della frazione acquosa del campione standard (dato dal volume del campione standard moltiplicato per la frazione volumica acquosa) e il volume della molecola di acqua ($V_{wat} = 30 \text{ \AA}$); quindi:

$$(1 \text{ cm}^3 \cdot 0.412) = 0.412 \text{ cm}^3 / (30 \cdot 10^{-24} \text{ cm}^3) = 14 \cdot 10^{-27} \text{ cm}^3.$$

Il rapporto tra questi due numeri ci dà il numero delle molecole di acqua per ogni lipide. Si noti che il risultato è ovviamente indipendente dal volume del campione standard utilizzato. Nel caso presente si ha che il numero delle molecole di acqua per ogni lipide è dato da $14 \cdot 10^{-27} \text{ cm}^3 / 0.936 \cdot 10^{-27} \text{ cm}^3 = 14.9$. Quindi si ha che per ogni lipide si hanno circa 15 molecole di acqua. Il

corrispondente volume di acqua per ogni molecola di monooleina è dato dal prodotto del numero di molecole di acqua per lipide per il volume della molecola d'acqua. Nel caso in esame si ha $15 \cdot 30 \text{ \AA}^3 = 450 \text{ \AA}^3 \text{ H}_2\text{O/ lipide}$.

Utilizzando le corrispondenti equazioni per la fase esagonale e per la fase cubica, riportate qua sotto, è stato calcolato il volume di acqua per ogni molecola monooleina a tutte le concentrazioni di PEG analizzate.

N_A	Avogadro number			
M	Lipid molecular weight			
c	Lipid weight concentration (lipid/lipid + water)			
ν_{lip} and ν_w	Lipid and water partial specific volumes (cm^3/g)			
$\phi_{lip} = (1 + \nu_{lip} (1 - c)/\nu_{lip}c)^{-1}$	Lipid volume concentration			
<i>Lamellar phase:</i>				
$N_{lip} = d \phi_{lip} N_A 10^{-24} / M \nu_{lip}$	Number of lipid molecules per unit surface in one lamella;			
$d_l = d \phi_{lip}$	Thickness of the lipid lamellar layer;			
$S_{lip} = 2/N_{lip}$	Area-per-lipid at the lipid/water interface			
<i>Hexagonal phase (type II):</i>				
$N_{lip} = a^2 \sqrt{3}/2 \phi_{lip} N_A 10^{-24} / M \nu_{lip}$	Number of lipid molecules per unit length per one 2D hexagonal cell			
$R = (a^2 \sqrt{3}/2 (1 - \phi_{lip})/\pi)^{1/2}$	Radius of the water cylinder			
$S_{lip} = 2\pi R/N_{lip}$	Area-per-lipid at the lipid/water interface			
<i>Bicontinuous cubic phases, type II (the structures are supposed to be composed by identical straight rods of circular cross sections):</i>				
$N_{lip} = \phi_{lip} a^3 10^{-24} / \nu_{lip}$	Number of lipid molecules per one 3D unit cell;			
N_{rod} (see table)	Number of rods per unit cell;			
R (see following equations)	Rod cross-sectional radius;			
k_v, k_s and Λ (see table)	Geometric constant			
$l = \Lambda a$	Rod length			
$\phi = (1 - \phi_{lip}) a^3 / N_{rod} = \pi R^2 l (1 - k_v R/l)$	Volume of each rod			
$\sigma = 2\pi R l (1 - k_s R/l)$	Surface area of each rod			
$S_{lip} = \sigma N_{rod} / N_{lip}$	Area-per-lipid molecule at the lipid/water interface			
<i>Phase</i>	N_{rod}	Λ	k_v	k_s
Pn3m	4	$\sqrt{3}/2$	0.780	1.068
Im3m	6	1	1.614	1.801
Ia3d	24	$1/\sqrt{8}$	0.491	0.735

Fig. 58: Parametri geometrici delle fasi lamellari, esagonali e cubiche (19)

Dopo aver calcolato il volume di acqua per molecola di monooleina a tutte le concentrazioni di PEG analizzate, sia per i campioni con HSA che per i campioni con BSA, è stato possibile costruire i grafici pressione osmotica-volume (PV).

Si noti che la pressione osmotica delle soluzioni utilizzate è stata calcolata usando le classiche equazioni di Parsegian a partire dalla percentuale di PEG utilizzato. Nei grafici PV presentati nella fig. 59 si ha nelle ascisse il volume di acqua per lipide e nelle ordinate la pressione osmotica relative ai campioni con HSA (grafico il alto) ed ai campioni con BSA (grafico in basso).

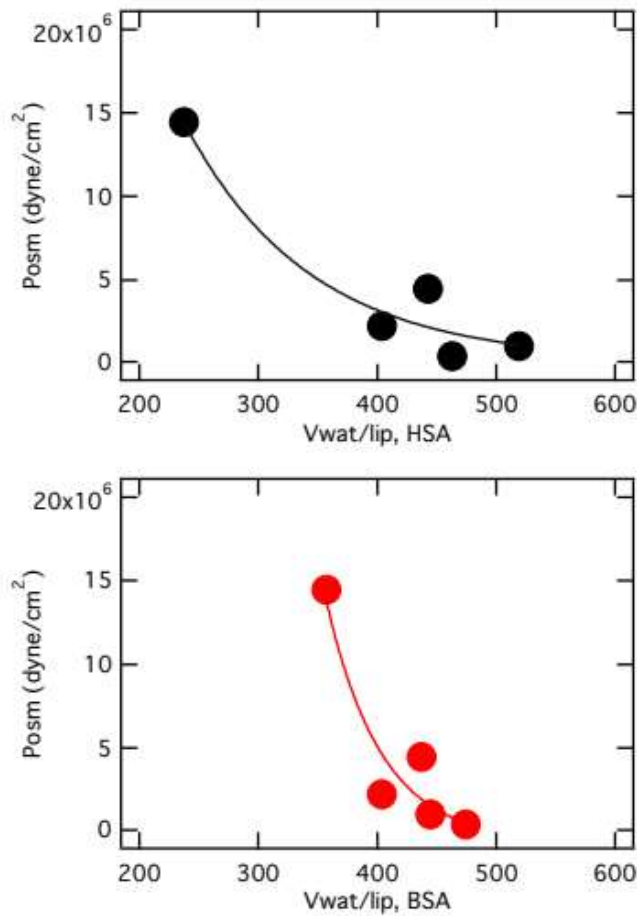


Fig. 59: Il grafico PV in alto è relativo all'**HSA**, il grafico PV in basso è relativo alla **BSA**.

Integrando numericamente i valori della pressione osmotica sul volume di acqua per lipide, è possibile ottenere la variazione dell'energia libera complessiva del sistema durante la disidratazione. Questa energia è il lavoro richiesto per disidratare le superfici idrofile e include, tra l'altro, l'energia di bending dello strato lipidico (vale a dire l'energia di curvatura, che si ritiene sia un termine critico che governa la stabilità delle fasi non lamellari), e

l'energia di impaccamento delle molecole lipidiche, cioè l'energia di stretching.

Nella fig. 60 sono rappresentate le curve di variazione di energia durante la disidratazione in acqua pura ed in presenza di HSA e BSA. Come si può notare le curve di energia in presenza delle proteine sieriche sono più basse rispetto alla curva dell'acqua pura. Questo indica una maggiore instabilità delle fasi lipidiche in presenza delle due proteine e si può correlare ai risultati ottenuti: quando incubata con le proteine sieriche la monooleina più facilmente subisce variazioni strutturali rispondendo alla disidratazione indotta da HSA e BSA. La differenza dell'effetto prodotto dalle due proteine (per altro molto simili) rimane da decifrare.

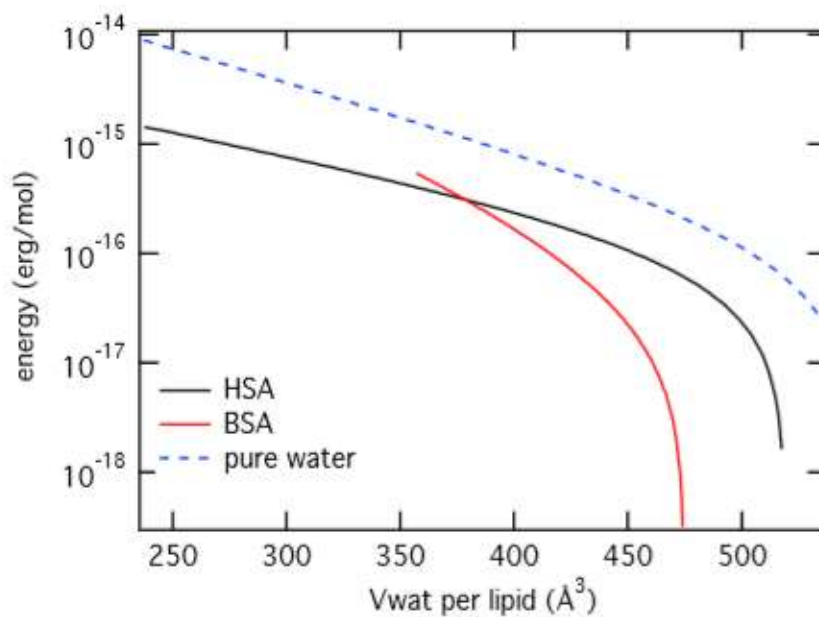


Fig. 60: Curve di energia relative ad HSA, BSA e acqua pura.

Concludendo si può affermare che in questo lavoro di tesi è stata valutata la stabilità strutturale dei cubosomi di monooleina in presenza delle proteine sieriche HSA e BSA. Contrariamente a quanto osservato in altri sistemi, ad esempio nel caso della citocromo-C, i dati ottenuti mostrano che le due proteine non entrano nei canali della fase cubica del lipide, ma anzi ne alterano la stabilità. Quindi, questi risultati ci suggeriscono che lo studio di nanoparticelle come trasportatori di farmaci deve essere ancora perfezionato e soggetto ad ulteriori studi al fine di comprendere eventuali fattori che ne alterano la stabilità.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Monoolein: a magic lipid? Chandrashekhar V. Kulkarni, Wolfgang Wachter, Guillermo Iglesias-Salto, Sandra Engelskirchen and Silvia Ahualli. 2010.
- (2) Drug Delivery by soft matter: matrix and vesicular carriers. Elodie Soussan, Stephanie Cassel, Muriel Blanzat, Isabelle Rico-Lattes.
- (3) Cytochrome-c Affects the Monoolein Polymorphism: Consequences for Stability and Loading Efficiency of Drug Delivery Systems . Serena Mazzoni, † Leandro R. S. Barbosa, Sergio S. Funari, Rosangela Itri, and Paolo Mariani. Ancona, San Paolo and Hamburg : Langumir.
- (4) Small, D.M. Handbook of lipid research. New York and London : Plenum Press, 1986.
- (5) Biological Membranes. Luzzati, V. London - New York : Academic Press, 1968, Vol. 1.
- (6) Lipowsky, R., and Sackmann, E. Structure and Dynamics of membranes. Amsterdam : Elsevier, 1995.
- (7) Lehninger, A.L. Biochimica. s.l. : Zanichelli.

- (8) Structural studies of phospholipid cubic phases . J. M. Seddon, J. L. Hogan, N. A. Warrender and E. Pebay-Peyroula. 1990.
- (9) Biochim. et Biophys. Acta. M.J., Seddon. 1031, 1989.
- (10) Mezzenga, Renata Negrini e Raffaele. "pH-Responsive Lyotropic Liquid Crystals for controlled Drug Delivery".
- (11) The cubic phases. P, Mariani. s.l. : Curr Opin Struct Biol , 1991.
- (12) Luzzati, V. and Speget, P.A. 701, s.l. : Nature, 1967, Vol. 215.
- (13) Luzzati, V., Tardieu, , Rivas and Reiss-Husson. s.l. : Nature, 1968.
- (14) Longley, W., and McIntosh, T.J.,. s.l. : Nature, 1983, Vol. 303.
- (15) J. Mol. Biol. Mariani, P.,Luzzati, V., and Delacroix, H. 1988, Vol. 204.
- (16) Biological membranes. Luzzati, V. s.l. : Academic Press London, 1968.
- (17) Proc. Cambridge Phil. Soc. Bragg, W.L. 1913, Vol. 17.
- (18) Spectrophotometric determination of protein concentration. MH1, Simonian.
- (19) Structural Studies of Lipid-Based Nanosystems for Drug Delivery: X-ray Diffraction (XRD) and Cryogenic Transmission Electron Microscopy

(Cryo-TEM). Elisabetta Esposito, Paolo Mariani, Markus Drechsler, and Rita Cortesi. 2016.

