

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACOLOGICHE, BIOLOGICHE E  
CHIMICHE APPLICATE**

**Dottorato di Ricerca in  
FARMACOLOGIA E TOSSICOLOGIA SPERIMENTALI  
XX CICLO**

**STUDIO MOLECOLARE E FUNZIONALE DI NUOVE  
MOLECOLE BIOATTIVE AL FINE DI VEICOLARE  
BIOSUBSTRATI A SCOPO DIAGNOSTICO E TERAPEUTICO**

**Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa MARIANNINA IMPICCIATORE**

**Tutor: Chiar.ma Prof.ssa EMILIA FISICARO**

**Dottoranda:**

**Dott.ssa ELENIA DUCE**

## SCHEMA DELLA RICERCA

Con la rapida conclusione del progetto relativo alla definizione della sequenza del genoma umano, il principio di curare le malattie di origine genetica dispensando i geni corretti alle cellule interessate si è fatto strada come strategia alternativa all'uso di farmaci di sintesi. La terapia genica, uno dei più rilevanti obiettivi che la ricerca post-genomica si prefigge, si basa sul principio di curare la malattia, determinata da un gene difettoso noto, introducendo il gene corretto nelle cellule del paziente mediante vettori di trasferimento genico. Al presente, i vettori sono essenzialmente di due tipi: virali e non-virali. Sebbene i vettori virali garantiscano un'alta efficienza di trasfezione nelle cellule bersaglio, per i rischi connessi al loro utilizzo, non possono ancora essere considerati agenti farmaceutici di semplice applicazione. Gran parte dei sistemi non-virali di "gene delivery", commerciali e non, si basano sull'utilizzo di tensioattivi cationici (citofectine). Sono solo all'inizio gli studi volti a correlare la struttura chimica con l'idoneità della molecola al suo impiego come citofectina.

Per costruire un complesso in grado di fornire un'efficace attività trasfettiva è necessaria un'elevata capacità di ingegneria molecolare, che tenga conto di molteplici aspetti: dalla chimica fisica dei colloidi a tutte le possibili interazioni con le componenti biologiche.

Le ricerche effettuate nel presente lavoro di Dottorato hanno riguardato la caratterizzazione chimico-fisica, strutturale e biologica, delle soluzioni di nuove molecole bioattive, in particolare nuovi tensioattivi cationici, idonee ad essere impiegate come vettori non virali in "*gene delivery*", al fine di poter ottenere un modello fisico per il processo di trasfezione e poter stabilire relazioni struttura/attività utili alla progettazione di vettori non virali sempre più efficienti e specifici.

I tensioattivi che sono stati studiati appartengono principalmente alle seguenti classi:

- 1) tensioattivi gemini con teste polari di tipo ammonio quaternario,
- 2) tensioattivi gemini con teste polari di tipo piridinio e catene lipofile parzialmente fluorurate (la fluorurazione dovrebbe ridurre la tossicità),
- 3) tensioattivi monomerici glucocationici, contenenti gruppi ammonici quaternari e carboidrati ad essi legati covalentemente, anch'essi di nuova sintesi, recanti uno zucchero legato alla testa polare, nella prospettiva di ottenere tensioattivi marcati in grado di essere riconosciuti da quelle cellule che presentano recettori per lo zucchero.

Le azioni di ricerca che sono state intraprese intraprendere sono le seguenti:

- a) studio della termodinamica dei sistemi binari tensioattivo-acqua e del processo di micellizzazione delle classi di tensioattivi sopra elencati. Sono state determinate le entalpie, i volumi, le energie libere, le capacità termiche molari apparenti e parziali, i coefficienti di espansione e le compressibilità adiabatiche in funzione della concentrazione e, applicando opportuni modelli chimico fisici (modello di transizione di pseudo-fase, modello di azione di massa, etc.), la variazione di queste grandezze nel corso del processo di formazione delle micelle. Sono state inoltre determinate le curve di tensione superficiale e di conducibilità,

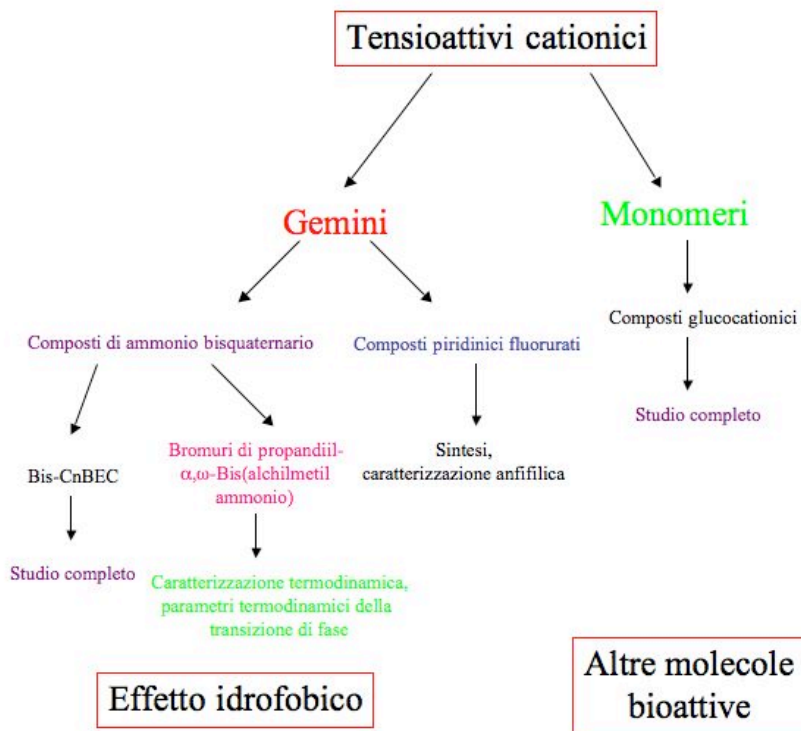
per ottenere informazioni specifiche sull'area superficiale occupata per molecola e sul grado di associazione dei controioni.

- b) Studio dell'interazione DNA-molecole bioattive attraverso metodi biologici (Electrophoresis Mobility Shift Assay -EMSA).
- c) Studio strutturale dei lipoplessi mediante l'impiego di microscopia a forza atomica.
- d) Valutazione dell'efficacia trasfettiva attraverso saggi di trasfezione transiente misurando l'espressione dell'EGFP tramite microscopio a fluorescenza, e della tossicità (MTT proliferation assay).
- e) Studio dell'interazione dei composti in esame con membrane modello mimetiche delle membrane cellulari principalmente tramite calorimetria differenziale a scansione (DSC).

Sono stati inoltre studiati gli equilibri in soluzione di altre molecole bioattive quali i  $\beta$ -dicheto acidi e i corrispettivi  $\beta$ -dicheto esteri che sono una classe promettente di inibitori HIV.

E' stato approfondito lo studio del legame idrofobico mediante il modello termodinamico-statistico, messo a punto dal gruppo di ricerca dove ho svolto il Dottorato. E' ben noto, infatti, come il legame idrofobico sia fondamentale nei processi e nei sistemi biologici: basti pensare alle membrane cellulari, alle interazioni recettore-legante, al meccanismo di azione dei farmaci.

Il lavoro di ricerca svolto nel corso del Dottorato è sintetizzato nello schema seguente:



## **INTRODUZIONE**

## STATO DELL'ARTE

### Overview sulla terapia genica e cenni storici

La terapia genica può essere definita come il trattamento di una malattia attraverso l'introduzione di materiale genetico terapeutico nelle cellule di un organismo. Attualmente, l'approccio principale non è quello di correggere i geni difettosi, ma piuttosto di introdurre una copia funzionale di geni difettosi per migliorare, se non curare, il fenotipo della malattia. Un gene difettoso può portare alla mancata espressione di una proteina importante che causa la malattia. Dal rilascio di una copia funzionale della copia difettosa del gene, la cellula è in grado di esprimere la proteina mancante, quindi di curare la malattia.

Le "fondamenta" della terapia genica possono essere fatte risalire al 1944 quando O.T. Avery, C.M. MacLeod e M. McCarty modificarono geneticamente un batterio attraverso la trasfezione del DNA isolato da un altro batterio geneticamente distinto [1]. Il principale contributo apportato da questo lavoro è stato quello di mettere in luce per la prima volta il ruolo del DNA come *carrier* dell'informazione genetica, ma ha anche dimostrato la possibilità di alterare il patrimonio genetico di un organismo attraverso il trasferimento genico. Nel 1953 Watson e Crick hanno svelato la struttura del DNA e, in seguito, hanno postulato il suo meccanismo di replicazione [2]. Nel 1967 F. Jacob e J. Monod hanno formulato il concetto di un polinucleotide *short-lived intermediate* che agisce come messaggero per la sintesi proteica (mRNA) [3]. Nel 1966, grazie al lavoro di M. Nirenberg [4] e H. G. Khorana [5], è stato reso noto il codice genetico e lo stretto legame tra DNA e proteine. Il successivo grande *step* verso la terapia genica si è avuto nei primi anni '70, attraverso il lavoro di P. Berg, H. Boyer e S. Cohen [6,7]. Il loro lavoro ha portato allo sviluppo della tecnica del DNA ricombinante, ovvero un processo di *splicing* e di ricombinazione di sezioni del DNA per mezzo dell'uso di enzimi di restrizione e della DNA ligasi per generare nuovi costrutti genici. Da quel momento, le scoperte fatte nel campo della biologia molecolare hanno portato a pensare di poter utilizzare la trasfezione genica come potenziale mezzo per curare le malattie [8,9]. L'attenzione si è quindi spostata verso il riuscire ad utilizzare in pratica clinica la terapia genica.

Alcuni lavori hanno dimostrato che è possibile il trasferimento di acidi nucleici in cellule in coltura attraverso l'uso di vettori virali [1], della precipitazione di calcio fosfato [10], del DEAE-destrano [11] e di microiniezioni [12]. Sebbene queste tecniche abbiano dato risultati *in vitro*, la loro applicazione *in vivo* non ha avuto successo a causa della scarsa efficienza. Lo sviluppo di vettori retrovirali nei primi anni '80 è stato uno dei maggiori *input* verso una terapia genica di successo [13-18]. Nel 1982 Spradling e Rubin hanno utilizzato la terapia genica per correggere il colore degli occhi di embrioni di *Drosophila* [19].

Due anni più tardi la terapia genica è stata applicata per la prima volta con successo su mammiferi [20]. Lavorando con topi mutati con livelli dell'ormone della crescita ridotti, Hammer et al. hanno utilizzato la terapia genica per aumentare i livelli sierici dell'ormone. Gli aumentati livelli ormonali hanno permesso ai topi nani di crescere; tuttavia, un'*over*-espressione dell'ormone porta l'animale a crescere una volta e mezzo in più di uno normale. Questo dimostra come la terapia genica sia in grado di agire su malattie fenotipiche di mammiferi ma mette anche in luce che è necessaria un'adeguata regolazione dei geni trasferiti.

Gli sviluppi della terapia genica *in vivo* realizzati negli anni '80 hanno reso possibile l'impiego del primo protocollo di terapia genica umana nel 1990 [21]. Il *trial*, condotto da M. Blese e W.F. Anderson, ha utilizzato la terapia genica per trattare due pazienti con una grave immunodeficienza combinata (SCID) che causa una deficienza dell'adenosina deaminasi (ADA). I risultati di questo studio hanno messo in luce che la trasfezione del gene ADA è possibile e che i pazienti trattati mostrano una risposta immunitaria migliorata. Anche se i risultati del *trial* sono sembrati promettenti, hanno tuttavia evidenziato diversi problemi, come una trasfezione inefficiente ed inconsistente, ed i livelli di ADA, il numero di linfociti T e la risposta immunitaria sono risultati transitori e molto variabili.

### **Ruolo della terapia genica in medicina**

La terapia genica ha avuto un evidente impatto nel campo della medicina, dovuto sia all'alto numero di malattie in cui essa può essere utilizzata sia per la relativa inefficacia delle terapie convenzionali per la cura di determinate patologie.

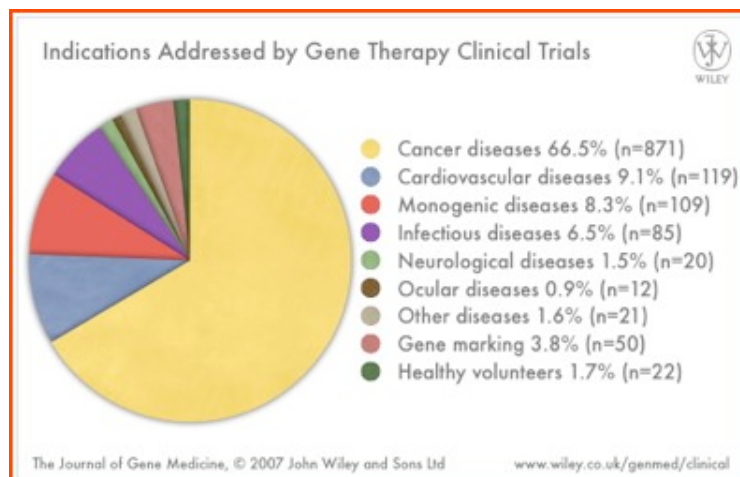
Innanzitutto, ogni malattia che presenta una componente genetica può diventare un candidato per la terapia genica. Le malattie genetiche possono essere suddivise in tre principali classi: i disordini legati ai cromosomi, i disordini monogenici ed i disordini multifattoriali.

I disordini legati ai cromosomi derivano da un cambiamento nel numero totale dei cromosomi o da un riarrangiamento errato dei cromosomi stessi. Un esempio comune è la sindrome di Down, che è causata dalla presenza di un cromosoma 21 in più. La terapia genica può essere in grado di trattare i sintomi di tale malattia, tuttavia è improbabile che la terapia genica possa curare la malattia stessa.

I disordini monogenici sono invece causati da un difetto di un singolo gene e quindi sono candidati ideali per il trattamento con la terapia genica. In particolare, potrebbero essere buoni candidati malattie che coinvolgono geni con una regolazione "sempre accesa", in quanto dovrebbero richiedere solamente una ripresa dei normali livelli di regolazione genica per ottenere un effetto terapeutico. I disordini monogenici comprendono circa 4000 malattie note che includono la deficienza dell'adenosina deaminasi (ADA), la fibrosi cistica, la distrofia muscolare di Duchenne, l'emofilia, la fenilchetonuria e l'ipercolesterolemia [22].

Infine, i disordini multifattoriali sono il gruppo di malattie più vasto e più complesso ed implicano il coinvolgimento di geni multipli o di una combinazione di fattori genetici ed ambientali. Data la complessità di tali disordini, l'utilizzo di protocolli di terapia genica per la loro cura è una sfida, ma nei casi in cui le terapie convenzionali sono inefficienti, la terapia genica potrebbe essere una soluzione.

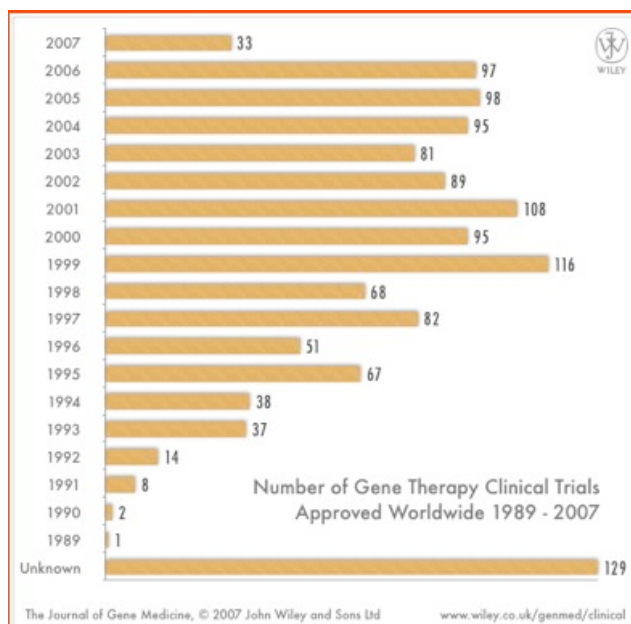
Oltre il 60% dei protocolli di terapia genica impiegati nei *clinical trials* sono rivolti al trattamento del cancro (Figura 1), malattia multifattoriale acquisita, e comprendono la stimolazione del sistema immunitario attraverso l'espressione di citochine, la trasfezione di cellule tumorali con geni sensibili ai farmaci e la sostituzione dei geni soppressori tumorali non funzionanti con copie funzionanti [23-28].



**Figura 1.**

La terapia genica può essere impiegata anche nel campo dell'immunologia [29-31]. In particolare nel campo dei vaccini. I DNA vaccini si basano sul trasferimento di geni che codificano proteine antigeniche, infatti portano alla produzione di antigeni nelle cellule ospiti attivando la risposta delle cellule B e T. Essi sono vaccini "non vivi" e risultano, quindi, più sicuri dei vaccini "vivi" attenuati, in più sono più facili e meno costosi da produrre, da conservare e da distribuire.

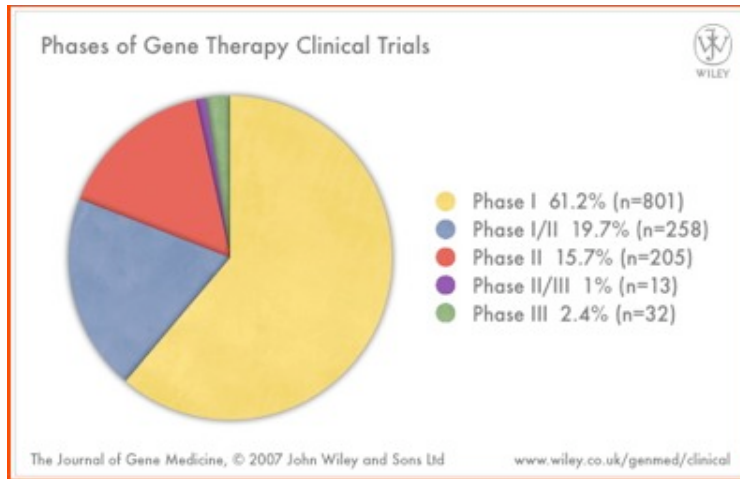
Ogni anno vengono approvati numerosi *clinical trials*, che a partire dal '99 sono diventati numericamente importanti (Figura 2).



**Figura 2.**

Nel mondo ci sono più di 600 *clinical trials* in atto. La maggior parte dei farmaci utilizzati sono in fase I di sperimentazione, e soltanto il 2% arriva alla fase III (Figura 3).

Solo due farmaci a base di DNA sono stati approvati fino ad ora dalla FDA. Essi sono il Vitravene (1999), usato per curare retiniti da citomegalovirus in pazienti affetti da AIDS e il Gendicine (2003), usato per il carcinoma a cellule squamose della testa e del collo.



**Figura 3.**

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Avery, O.T.; MacLeod, C.M. and McCarty, M.; J. Exp. Med 1944, 79, 137-158.
- [2] Watson, J.D.; Crick, F.H. Nature 1953, 171, 737-738.
- [3] Jacob, F.; Monod, J.; J. Mol. Biol 1961, 3, 318-356.
- [4] Nirenberg, M.: Nobel Lectures: Physiology or Medicine (1963-1970). 1968, American Elsevier 372-395
- [5] Khorana, H.G. Nobel Lectures: Physiology or Medicine (1963-1970). 1968, American Elsevier 341-369.
- [6] Cohen, S.N. Proc Natl Acad Sci 1973, 70(11), 3240-4.
- [7] Jackson, D.A., Symons R.H and Berg P.; Proc Natl Acad Sci USA 1972, 69(10), 2904-9.
- [8] Tatum, E.L.; Perspect Biol Med, 1966, 10(1) 19-32.
- [9] Friedmann, and Roblin R. Science 1972 175(25): 456-67.
- [10] Graham, F.L.; van der Eb A.J, Virology 1973, 52(2), 456-467.
- [11] Pagano, J. S.; McCutchan, J. H. and Vaheri, A.; J. Virol 1967, 1(5), 891-7.
- [12] Capecchi, M.R.; Cell 1980, 22(2 Pt 2), 479-88.
- [13] Eglitis, M.A.; Science 1985, 230(4732), 1395-8.
- [14] Joyner A.; Nature 1983, 305(5934), 556-8.
- [15] Mann, R.; Mulligan, R.C and Baltimore Cell 1983, 33(1), 153-9.
- [16] Miller, A.D.; Proc Natl Acad Sci USA 1983, 80(15), 4709-13.
- [17] Miller, A.D.; Science 1984, 225(4666), 993-8.
- [18] Miller, A.D.; Science 1984, 225(4662), 630-2.
- [19] Spradling, A.C. and Rubin G.M.; Science 1982, 218(4570), 341-7.
- [20] Hammer, R.E.; Palmiter, R.D; Brinster, R.L; Nature 1984, 311(5981), 65-7.
- [21] Bleise, R.M.; Science 1995, 270(5235), 475-80.
- [22] Kresina, T.F.; Branch, A.D.; Kresina, Editor 2001, Wiley-Liss: New York, 1-22.
- [23] Nichols, E.K.; Human Gene Therapy 1988, Washington, D.C.: National Academy of Science.
- [24] <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical/> 2007
- [25] Brenner, M.K; Faseb J, 1997, 11 (8), 640-8.
- [26] Roth, J.A.; Cristiano, R.J.; J. Natl Cancer Inst. 1997, 89(1), 21-39.
- [27] Culver, K.W.; Bleise, R.M. Trends Genet 1994, 10(5), 174-8.
- [28] Bleise, R.M. Sci. Am. 1997, 276(6), 111-5.
- [29] Kim, J.J; Weiner, D.B.; DNA Vaccines, in Gene Therapy, N.S. Templeton and D.D Lasic, Eds. 2000, Marcel Dekker: New York 549-68.
- [30] Donnelly, J.J., Annu Rev Immunol, 1997, 15, 617-48.
- [31] Restifo, N.P.; Gene Ther. 2000, 7(2), 89-92.

## RELAZIONI STRUTTURA ATTIVITÀ NELLA TRASFEZIONE GENICA MEDIATA DA LIPIDI CATIONICI

Ricordiamo che la terapia genica è uno dei principali obiettivi perseguiti dalla ricerca post-genomica e che si fonda sul principio di curare una malattia ereditata o acquisita, causata da un difetto genico conosciuto, attraverso il rilascio alle cellule malate, di una copia corretta del gene difettoso, per mezzo di uno specifico vettore. Purtroppo, questo approccio terapeutico molto promettente ha finora fallito in termini di significatività terapeutica, nonostante l'interesse clinico dimostrato da circa un migliaio di *clinical trial* di terapia genica eseguiti o tuttora in atto nel mondo.

Un problema per l'utilizzo della terapia genica nella cura delle malattie è quello di ottenere un'efficiente transfezione, ovvero l'introduzione di DNA nel nucleo cellulare.

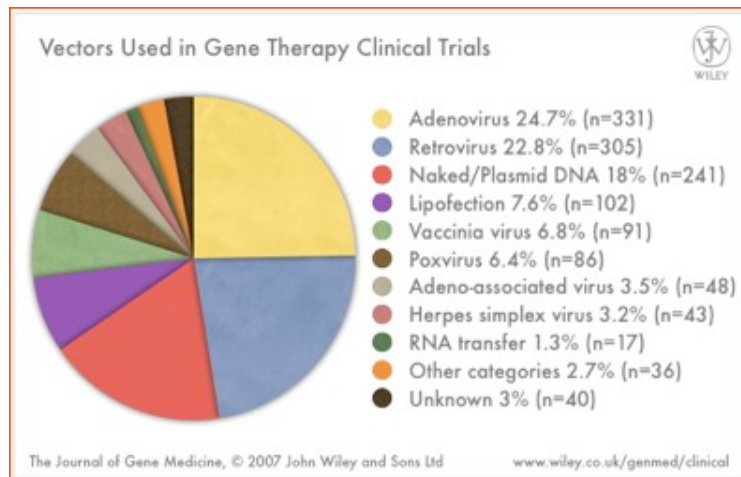
Il trasferimento nel nucleo di una cellula bersaglio sia di un gene funzionale sia di una struttura in grado di interferire con un gene cellulare, è un compito arduo, considerando il numero delle barriere che devono essere superate [1].

E' largamente accettato che le barriere più significative per la transfezione siano le membrane cellulare e nucleare. Vi è, di conseguenza, un vivo interesse rivolto allo sviluppo di tecniche pratiche che permettano al DNA di attraversare queste membrane. Potenzialmente, l'approccio più promettente implica le modificazioni chimiche o biologiche del materiale genetico oppure il suo impaccamento, che può essere ottenuto attraverso l'uso di vettori specifici. La maggior parte dei vettori usati in terapia genica si può dividere in due classi: virali e non virali.

Il vettore deve possedere varie proprietà, tra cui proteggere il DNA dall'ambiente extracellulare, facilitarne l'ingresso nelle cellule bersaglio, permetterne l'uscita dai compartimenti intracellulari ed infine consentire il rilascio del plasmide, che deve successivamente passare attraverso la membrana nucleare affinché l'espressione transgenica possa avvenire [2-4].

### Vettori

I vettori virali sono particolarmente efficienti dal momento che si sono evoluti per infettare le cellule con materiale genetico estraneo. Tuttavia, il loro potenziale rischio di immunogenicità, di tossicità, di ricombinazione per formare virioni in grado di replicarsi, di mutagenesi inserzionali, di inattivazione del vettore e limiti sulle dimensioni del materiale genetico che sono in grado di trasportare, hanno rallentato lo sviluppo di questi vettori [7] (Figura 4).



**Figura 4.**

Le complicazioni associate ai vettori virali hanno portato allo sviluppo di vettori non-virali sintetici. Il loro principale svantaggio è che per ora non sono efficienti come i virus (specialmente in vivo) e necessitano di arrivare alla cellula bersaglio in alte concentrazioni [7]. C'è anche il problema che tali vettori vengono rapidamente rimossi dalla circolazione dai globuli bianchi e dal sistema reticolo - endoteliale (RES), e una significativa parte della dose di lipide si deposita nel fitto reticolo dei capillari polmonari [8]. Tuttavia, sono più sicuri e meno immunogenici dei sistemi virali. I vettori non virali, in particolare lipidi e polimeri cationici, sono più facili e meno costosi da produrre e possono essere ottenuti su larga scala. Si può, inoltre, esercitare un maggior grado di controllo a livello molecolare ed i prodotti possono essere altamente purificati [8]. Le tre principali classi di vettori non virali sono i polimeri cationici, i lipidi cationici e i peptidi.

### **Polimeri**

I polimeri cationici formano interazioni elettrostatiche con i gruppi anionici fosfato del DNA per formare un complesso [9]. Il rapporto di mescolamento è tale per cui il complesso mantiene una carica netta positiva, così da potersi legare alle superfici cellulari cariche negativamente dove entrano per endocitosi. La trasfezione mediata da poliplessi è stata riportata per la prima volta da Wu *et al.*, in un lavoro in cui sono state trasfettate *in vitro* cellule di epatoma con polilisine coniugate ad un'asialo-glicoproteina [10]. Tuttavia, una volta all'interno del lisosoma questo sistema non è stato in grado di rilasciare il DNA prima della degradazione lisosomiale enzimatica. L'efficienza di trasfezione può essere aumentata dall'aggiunta di un agente tampone come la cloroquina, che impedisce al pH dell'endosoma di diminuire fino ad attivare gli enzimi lisosomiali [11,12]. Più recentemente, si è visto che la polietilenimina (PEI) è un vettore molto efficiente e questo sembra sia dovuto alla capacità tampone insita nella sua struttura [13]. Altri gruppi tampone come l'imidazolo dell'istidina sono stati incorporati nei polimeri [14,15].

### **Lipidi cationici e liposomi**

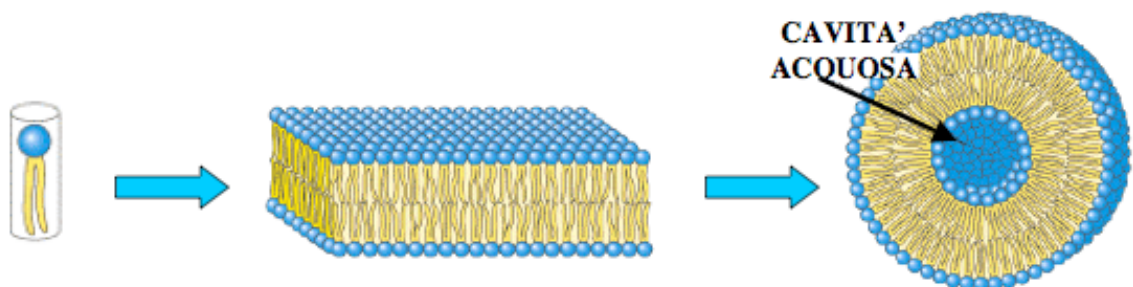
I lipidi cationici sono anfifili, ciò significa che hanno sia una regione idrofilica che una idrofobica. Quando sono esposti ad un ambiente acquoso formano spontaneamente grosse strutture sferiche note come liposomi. Dentro al liposoma, i lipidi cationici si dispongono schiena contro schiena in un doppio strato

(Figura 5). Le teste polari sono rivolte verso l'esterno, proteggendo il dominio idrofobico dalla soluzione acquosa. I liposomi cationici possono essere composti da un singolo doppio strato (liposomi unilamellari) o da alcuni doppio strati concentrici (liposomi multilamellari). All'interno, il liposoma contiene uno spazio acquoso che può essere usato per incapsulare varie molecole che comprendono farmaci chemioterapici, coloranti e materiale genetico.

I liposomi cationici rappresentano il gruppo di vettori non virali più ampiamente studiato e sono delle macrostrutture composte da lipidi cationici. La struttura di un lipide cationico è costituita generalmente da una testa polare cationica legata ad un grosso dominio idrofobico. La testa polare è un'ammina primaria, secondaria o terziaria, ma sono stati studiati anche sali di ammonio quaternario, gruppi imidazolici e guanidinici [16-23]. I più comuni *linker* usati sono eteri ed esteri, sebbene siano stati utilizzati anche carbammati e ammidi [24-26]. Il dominio idrofobico è generalmente un derivato del colesterolo o una doppia catena idrocarburica che solitamente è costituita da 12-18 atomi di carbonio, può essere completamente satura o contenere doppi legami (es. gruppi oleilici) e non essere necessariamente simmetrica. Anche cambiamenti strutturali relativamente piccoli di questi domini possono influenzare drasticamente l'efficienza di trasfezione [18,19,22-24,27-35]. I lipidi cationici talvolta formano liposomi da soli, ma più spesso sono coformulati con un co-lipide neutro come la dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE) [18,19,23-25,27-31,36].

Una volta che i componenti lipidici si sono disposti nei liposomi, il meccanismo di trasfezione può essere suddiviso in quattro distinti passaggi:

- (1) formazione del lipoplezzo
- (2) legame e *uptake* del lipoplezzo
- (3) fuoriuscita endosomiale
- (4) entrata nel nucleo ed espressione.



**Figura 5**

## Parametri chimico-fisici dei lipidi cationici e dei liposomi

### Struttura chimica dei lipidi cationici

In generale, un lipide cationico è costituito da un dominio idrofobico, un testa polare idrofila cationica ed un *linker* tra i due, che può mancare in alcuni composti, anche se i nuovi lipidi cationici progettati per superare le diverse barriere biologiche hanno strutture più complesse. Un'analisi più dettagliata rivela i diversi elementi di un lipide cationico necessari per la trasfezione genica *in vivo* (vedi Figura 6):

- dominio idrofobico (solitamente composto da due lunghe catene alifatiche o da gruppi tipo colesterolo)
- testa polare cationica (solitamente ammine, poliammine, guanidine)
- *backbone*: agisce come uno *scaffold* in cui il dominio idrofobico e la testa polare sono inseriti; la più comune *backbone* è basata sul glicerolo
- *linker*: tra il dominio idrofobico e la *backbone*, tra la testa polare cationica e la *backbone* o direttamente tra il dominio idrofobico e la testa polare cationica
- un dominio idrofilo a lunga catena, solitamente legato alla testa polare; il più noto è il polietilenglicole
- una porzione *targeting*

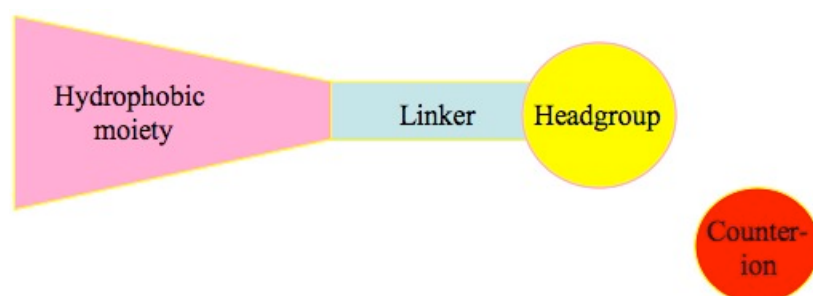


Figura 6.

A parte il dominio idrofobico e la testa polare cationica, gli altri elementi menzionati non sono necessari.

La disposizione di tutti questi elementi genera l'architettura dei lipidi. La struttura più comune è "dominio idrofobico-*backbone/linker*-testa polare cationica". Strutture alternative utilizzate nella progettazione di lipidi cationici per *gene delivery* sono i tensioattivi gemini [37] e gli anfifili *bolaform* [38-40]. I tensioattivi gemini sono una classe di anfifili sintetici costituiti da una catena idrofobica, un gruppo ionico, uno *spacer*, un secondo gruppo ionico ed un'altra catena idrofobica (Schema 1) [41]. Gli anfifili *bolaform* sono costituiti da due teste polari ioniche legate da un lungo dominio idrofobico, che può adottare una conformazione ad U con entrambe le teste polari che stanno dalla stessa parte della membrana o attraversano il doppio strato cosicché le teste polari stiano rispettivamente nella parte interna e in quella esterna della membrana (Schema 2) [42].

Un'altra importante caratteristica dei lipidi cationici è la loro geometria. Usando gli stessi elementi strutturali e la stessa architettura, si possono ottenere lipidi con differenti strutture [24,34,43]. Per esempio, usando il colesterolo come dominio idrofobico e la poliammina come testa polare, si possono ottenere lipidi a forma di T o lineari, a seconda del punto di attacco del colesterolo sulla poliammina (Schema 3) [44].

Le strutture chimiche del lipide cationico e del colipide determinano i parametri fisici del liposoma e sono fattori essenziali per affrontare gli ostacoli sulla via di una trasfezione efficiente.

L'effetto del riempimento dello spazio, ovvero la struttura e il relativo orientamento del dominio idrofobico e di quello idrofilo [43], sono stati studiati più a fondo. I maggiori risultati sono stati ottenuti per lipidi con teste polari poliamminiche, che sono quelle più voluminose e rendono la struttura del lipide più visibile e più facilmente definibile. La maggior parte degli studi hanno dimostrato che la struttura a T è migliore delle strutture lineari [24,44,45]. Tuttavia, uno studio che ha preso in considerazione teste polari lineari, a T, globulari e ramificate ha evidenziato che sono le strutture lineari a dare i migliori risultati [34]. Il *molecular modelling* ha suggerito che la forma reale di una poliammina lineare è in realtà tanto più avvolta, quanto più è lunga la catena [43].

### ***Formazione dei Lipoplessi e Macrostrutture***

Il primo uso dei lipidi cationici come vettori per trasfezione genica è stato riportato da Felgner *et al.* [16] e lo stesso Felgner e Ringold hanno proposto un meccanismo per questo processo [46]. Agendo sulla base del rapporto di carica, hanno ipotizzato che i complessi formati tra i liposomi ed il DNA (lipoplessi) siano costituiti da quattro liposomi ed un plasmide. Essi hanno assunto che i liposomi interagissero con il DNA senza modificarne dimensioni o struttura, una proposta che è ora si sa non essere valida. Infatti, evidenze sperimentali mostrano che i lipoplessi non sono assolutamente omogenei, ma strutture variabili e dinamiche.

Nel 1981 Struck *et al.* hanno esaminato il grado di fusione dei lipidi che si verifica tra i liposomi quando formano un complesso con il DNA [47]. Sono stati formulati due gruppi di liposomi, il primo costituito da lipidi con proprietà FRET (*fluorescent resonance energy transfer*), il secondo da lipidi non marcati, e una miscela dei due a rapporti di carica crescenti (+/-) è stata usata per complessare il DNA. La miscela di lipidi tra liposomi marcati e non potrebbe risultare in un *dequenching* di fluorescenza (ovvero un aumento) prodotto dai donatori/accettori FRET, dal momento che saranno diluiti da lipidi non marcati, e questo è stato puntualmente osservato. Ciò avviene a rapporti di carica di circa 1:1, indicando che la fusione dei liposomi si verifica durante la condensazione del plasmide.

Gershon *et al.* hanno condotto esperimenti usando l'etidio bromuro come sonda di fluorescenza e le paia basi del DNA esposte sono state complessate con liposomi di DOTMA e DOTMA/DOPE [48]. Si è osservato che aumentando lentamente il rapporto (+/-) da 0 a 1:1 si ha un piccolo effetto sulla fluorescenza. Comunque ad un rapporto di circa 1:1, si osserva un repentino decadimento della fluorescenza, che corrisponde alla condensazione del plasmide. A partire da questi risultati, Gershon *et al.* hanno concluso che la complessazione liposomiale è direttamente responsabile del collasso della struttura del DNA. Quando

questo e la fusione della membrana lipidica, avvengono, il DNA potrebbe essere effettivamente circondato da un doppio strato lipidico continuo [48].

La prima visualizzazione di lipoplessi è stata pubblicata da Sternberg *et al.* [49]. La microscopia elettronica *freeze-fracture* di liposomi di DC-Chol/DOPE complessati con DNA plasmidico ha mostrato vari tipi di strutture, che dipendono dal rapporto lipide-DNA e dal tempo di incubazione del complesso. A bassi rapporti lipide-DNA e con tempi di incubazione brevi, si osservano liposomi semi-fusi, mentre a rapporti più alti e tempi di incubazione più lunghi diventano visibili strutture simili a fibre, il cui diametro (7 nm) ha suggerito un raggomitolamento del DNA coperto da un unico doppio strato lipidico continuo. Questo fatto è collegato alla formazione di grosse strutture di liposomi semi- o totalmente fuse, il cui aspetto ha portato alla definizione di modello ‘spaghetti and meatballs’.

Gustafsson ha pubblicato immagini ottenute con microscopia elettronica che mostrano la complessazione di quantità crescenti di liposomi di DOTAP e di diottadecildimetilammonio bromuro (DODAB)/DOPE con il DNA e si può osservare la presenza di piccole particelle dense debolmente legate al DNA quando il rapporto di carica (+/-) è minore di 1:1 [50]. Sopra questo valore, si vedono grosse strutture aggregate (>100 nm) ed il gruppo ha proposto che si tratti di strutture multilamellari in cui il DNA è intrappolato.

Zabner *et al.* hanno studiato l’interazione di pDNA con liposomi DMRIE/DOPE ad un rapporto liposoma-DNA di 5:1 [51]. Hanno osservato una miscela molto eterogenea di strutture, che vanno da grossi aggregati densi con prolungamenti di DNA avvolto, ad aggregati più piccoli e DNA libero. Hanno anche osservato strutture fibrose simili alle strutture ‘spaghetti-like’ riportate precedentemente. Le strutture sono probabilmente in un equilibrio dinamico. Tuttavia, l’esatto meccanismo di formazione di lipoplessi è al momento ancora sconosciuto, ma in termini generali, come sottolineato da Lasic, si potrebbe pensare che il DNA induca l’aggregazione dei liposomi che di conseguenza si fondono con il DNA che rimane intrappolato nell’aggregato durante il processo [52].

### ***Disposizione dei Lipidi dentro al Lipoplesso***

Il co-lipide neutro DOPE è spesso usato nelle formulazioni di liposomi, dal momento che spesso migliora la trasfezione. Fasbender *et al.* hanno dimostrato che l’inclusione del DOPE in liposomi di DC-Chol e DMRIE aumenta l’espressione, mentre la riduce lentamente quando co-formulato con il lipide *N*-(2-aminoetil)-*N,N*-dimetil-2,3-*bis*(miristilossi)-1-propanamminio bromuro ( $\beta$ AE-DMRIE) [53]. Huang *et al.* hanno riportato che, mentre i lipopoliplessi da soli potrebbero non trasfettare le cellule, l’aggiunta del DOPE alla formulazione potrebbe aiutare a farlo [54]. Inoltre, la microscopia elettronica (EM) ha mostrato che i primi endosomi vicini alle membrane plasmatiche sono in uno stato di distruzione. Un’ipotesi comune è che il DOPE aiuti la fuoriuscita endosomiale [29,54,55] e si pensa che questo sia un risultato della sua tendenza a causare la fusione di membrana attraverso la conversione strutturale da una fase stabile a doppio strato ad una fase instabile fusogena.

Recentemente, alcune ricerche molto interessanti sono state riportate da Safinya e collaboratori [56]. Usando la diffrazione a raggi X ad alta risoluzione per esaminare la dioleoilfosfatidilcolina (DOPC)/DOTAP complessata con un DNA  $\lambda$ -fago, hanno mostrato che gli aggregati formati sono costituiti da una struttura a lattice multilamellare altamente ordinata. La struttura a *sandwich* contiene strati di DNA che si alternano a doppi strati lipidici, con il DNA anionico che scherma le forze repulsive generate da doppi strati cationici a contatto tra loro. Questa fase a doppio strato lamellare è anche chiamata la fase *L<sub>α</sub>*. Lasic *et al.* Sono giunti alle stesse conclusioni nel loro studio sui lipoplessi di DODAB/colesterolo/DNA [52]. Inoltre, Safinya e collaboratori hanno studiato gli effetti della sostituzione del DOPC con il DOPE [57]. Quando il contenuto di DOPE è più alto di 0.7 - 0.85 del peso totale lipidico, si osserva un cambiamento drammatico nella struttura. La fase lattice lamellare descritta si riarrangia in una fase fusogena non a doppio strato chiamata fase esagonale inversa (*H<sub>II</sub>*). Tutte le molecole lipidiche si dispongono lungo il DNA come micelle, con le teste polari rivolte verso l'interno e il loro dominio idrofobico lontano dal DNA.

### ***Incapsulamento***

Così come per formare complessi elettrostatici con il DNA, i liposomi possono essere usati per incapsularlo al loro interno. Negli ultimi 15 anni una varietà di metodi sono stati usati a questo scopo, inclusi la disidratazione-reidratazione [58,59], l'evaporazione della fase inversa [59,60], la sonicazione e il congelamento-scongelo [59,61]. Un metodo particolarmente efficace è stato descritto da Wheeler *et al.*, a proposito della formulazione di "particelle plasmide lipide stabilizzate" (SPLP) [62]. Attraverso una procedura di dialisi, vengono preparate vescicole unilamellari che contengono un DNA plasmidico per particella, con efficienza di trapping che supera il 70%. Questo processo di incapsulamento protegge completamente il DNA dalla degradazione da parte delle nucleasi. Queste vescicole hanno uno strato di poli(etilenglicole) (PEG) che permette l'inclusione di un'alta percentuale di DOPE nella formulazione, dal momento che stabilizza il doppio strato. Lo strato di PEG potrebbe anche prevenire l'aggregazione delle SPLP e proteggerle dai componenti del siero nel sangue, e ciò consente di aumentarne il tempo di circolazione. Uno svantaggio è che il PEG inibirà anche l'interazione ed il successivo *uptake* da parte delle cellule bersaglio. Questo problema può essere affrontato usando opportune ancore per le catene del PEG [63].

### ***Potenziale Zeta e Dimensioni dei Liposomi Cationici***

Le proprietà elettriche di una superficie liposomiale sono descritte dal "Potenziale Zeta". Il termine si applica alle cariche elettriche che sono presenti nelle formulazioni liposomiali (e certamente ad ogni dispersione di natura colloidale). L'esame dell'ambiente intorno al liposoma sospeso nel buffer rivela che è circondato da uno strato denso di ioni che hanno una specifica carica elettrica. Oltre a questo è presente anche uno strato più diffuso di ioni con una carica propria. Anche il liquido in cui i colloidi sono sospesi possiederà una carica elettrica e la differenza di carica tra lo strato denso di ioni che circonda la particella e il liquido è il "Potenziale Zeta", solitamente riportato in millivolts.

Il “Potenziale Zeta” può essere un buon indicatore della stabilità dei sistemi colloidali. La differenza di potenziale tra lo strato denso di ioni e il fluido di sospensione cambia dal momento che altri ioni o polimeri si adsorbono allo strato denso. Particelle di sistemi colloidali con un alto “Potenziale Zeta” ( $> \pm 30$  mV) generano repulsioni elettrostatiche che li rendono stabili. I valori al di sotto di tale potenziale potrebbero indicare sistemi in grado di fondersi e aggregarsi. Un’eccezione a questa regola sono i sistemi con uno strato di PEG, dal momento che questo protegge la carica interna, parecchi ioni si adsorbono alla particella, rendendo il “Potenziale Zeta” (vicino a) zero. Tuttavia i sistemi PEG sono normalmente molto stabili [64-66].

Un altro importante parametro per liposomi e lipopleksi è la loro dimensione, in particolare quando si usano in applicazioni sistemiche. L’interazione elettrostatica istantanea che avviene quando il DNA plasmidico viene introdotto nei liposomi cationici spesso porta a miscele eterogenee di particelle, con dimensioni comprese tra i 100 ed i 1000 nm. Dopo somministrazione intravenosa, i lipopleksi incontrano i sottili capillari polmonari, il cui diametro interno può essere inferiore a 10  $\mu$ m, permettendo alle particelle cationiche di aderire facilmente alla superficie anionica dell’epitelio polmonare. Quindi, un alto grado di accumulazione/espressione nel polmone è spesso associato ad un rilascio sistemico.

Quando applicato nella terapia genica del cancro, le dimensioni diventano importanti per altri motivi. La vascolarizzazione tumorale è spesso caratterizzata da una struttura disordinata e da piccoli *gap* nell’endotelio (30 to 50 nm) [67]. Ogni particella con una lunga emivita può permeare nel volume tumorale, sempre che sia abbastanza piccola. In questo modo, la particella può conseguire un certo grado di *targeting* del tumore e questa caratteristica è stata sfruttata per il rilascio di farmaci e di DNA plasmidico [18,68-70].

## OTTIMIZZAZIONE DI LIPIDI CATIONICI

E' chiaro che nonostante sia stata sintetizzata e testata una grande quantità di formulazioni di lipidi e di liposomi, i risultati in termini di efficienza nel *gene delivery* sono ancora inferiori rispetto a quelli ottenuti con vettori virali e non è disponibile alcun liposoma di rilevanza clinica generale per la terapia genica, quindi è necessaria un'ulteriore ottimizzazione. Comunque, da studi sistematici sulla struttura dei lipidi cationici e da miglioramenti nella loro formulazione si è riusciti ad ottenere la prima generazione di vettori non-virali [44,71].

La struttura chimica dei lipidi cationici ha l'impatto maggiore sull'efficienza del gene delivery, sia *in vitro* che *in vivo*. Perfino modificazioni strutturali minori possono influenzare significativamente il risultato della trasfezione [19,30].

Sono stati seguiti due diversi approcci per ottimizzare la struttura chimica dei lipidi cationici, uno dei quali consta nell'effettuare modificazioni sistematiche della struttura dei lipidi cationici per trovare relazioni struttura-attività. Per esempio, sono stati sintetizzati lipidi con catene di lunghezza variabile nel dominio idrofobico e su di essi sono stati effettuati saggi di trasfezione per trovare l'*optimum* [72]. Questo approccio produce un feedback semiempirico che può essere usato per scegliere il miglior composto "candidato". L'informazione così ottenuta può favorire la comprensione di importanti parametri per la trasfezione e portare ad un'ulteriore ottimizzazione. E' stata sottolineata l'importanza di variazioni strutturali sistematiche ("one-by-one") per uno studio QSAR [37]. Un sistema modello che permette una variazione successiva di un singolo parametro, tenendo costante la linea cellulare, il plasmide, il protocollo di preparazione dei liposomi, il protocollo di lipofezione e le misure biofisiche, è importante per determinare l'effetto delle modificazioni strutturali [73].

L'altro approccio per ottimizzare i lipidi cationici è basato sulla progettazione razionale della struttura, per affrontare e poter superare una o diverse barriere biologiche o pratiche che interessano la trasfezione. Esempi sono l'uso di un legame estereo, che è un substrato per le esterasi endogene, per diminuire la citotossicità del vettore [74], o la modificazione dei lipidi con catene di PEG per aggirare il sistema immunitario e anche per evitare l'aggregazione [75].

## VARIABILI CHE INFLUENZANO L'EFFICIENZA DELLA LIPOFEZIONE

La lipofezione è un processo complesso, che *in vitro* dipende da molte variabili biofisiche ed intra- ed extracellulari, *in vivo* la variabilità dei sistemi biologici aggiunge un nuovo livello di complessità su un sistema già difficile da controllare. E' quindi prevedibile che, fino ad ora, il *gene delivery* con vettori liposomiali non raggiunga l'efficienza dei vettori virali. Tuttavia, molte di queste variabili sono state identificate e sono state proposte soluzioni ingegnose per superarle. Questi nuovi sviluppi portano più vicino allo sviluppo di una nuova generazione di vettori liposomiali utilizzabili in casi clinici.

### Fattori Biofisici, Biochimici e Cellulari

Seguendo il primo lavoro di Zabner *et al.* [51], molte review hanno riassunto le barriere biofisiche e cellulari (Figura 7) che un lipoplezzo deve superare per perpetrare la trasfezione [8,45,76].

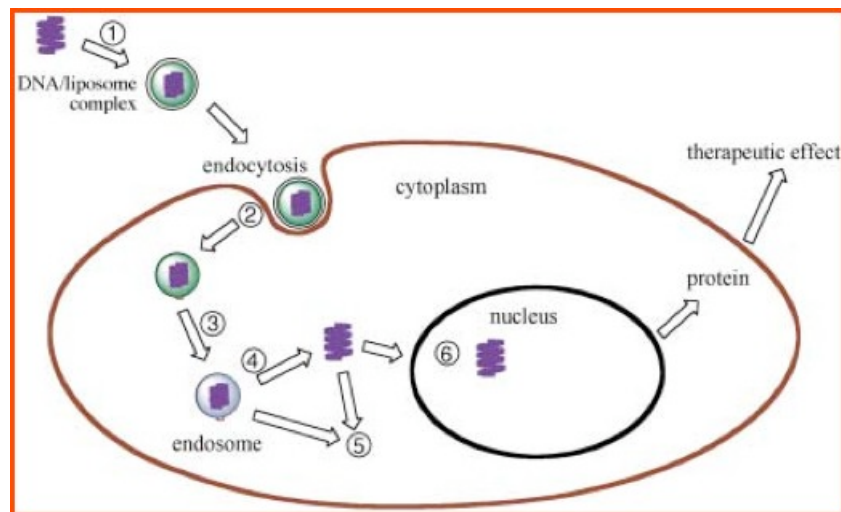


Figura 7.

### Generazione dei Complessi Liposoma/DNA

Il primo *step* verso la trasfezione è la formazione di complessi liposoma/DNA (lipoplezzi). Nella formazione del lipoplezzo, i liposomi carichi positivamente sono mescolati con il DNA, che è carico negativamente per via dei gruppi fosfato. Il risultato è la formazione istantanea di un complesso elettrostatico [46-48]. Il rapporto di mescolamento è di solito tale per cui il complesso mantiene ancora una carica complessiva positiva, che gli permette di legarsi alla superfici cellulari (che sono cariche negativamente). Idealmente, lipoplezzi dovrebbero avere piccole dimensioni ed una struttura colloidale uniforme e stabile, tale da renderli facilmente iniettabili. In pratica, Zabner *et al.* hanno notato che a rapporti ottimali lipide-DNA per la trasfezione, la popolazione di complessi è molto eterogenea [51]. Inoltre, soprattutto a concentrazioni saline fisiologiche (150 mM), l'aggregazione dei lipoplezzi o poliplessi cationici è pressochè inevitabile [77,78]. L'introduzione di catene di polietilenglicole in una certa proporzione di lipidi in un liposoma (liposomi stabilizzati stericamente [79], liposomi *stealth* [80]) produce particelle stabili, omogenee con diametri di 100 nm e porta ad un aumento dell'efficienza di trasfezione [81].

### ***Protezione del DNA***

Affinchè il DNA intatto venga rilasciato nel tessuto bersaglio [8], esso deve essere protetto sia durante il processo di preparazione come anche nello spazio extracellulare e intracellulare. Il processo di preparazione include la sonicazione per la formazione del liposoma e la nebulizzazione per formulazioni aerosol. Queste procedure sottopongono il DNA a forze di *shearing* che possono portare alla sua rottura. L'incapsulamento del plasmide nel liposoma sembra proteggere il DNA dalla frammentazione [76]. Le nucleasi presenti nel siero o nel citoplasma possono degradare il DNA a meno che l'ingombro sterico non blocchi l'accesso di questi enzimi. Anche l'incapsulamento, il *crosslinking* o la stabilizzazione sterica del PEG portano ad una protezione completa contro le nucleasi.

### ***Trasporto dei Lipoplessi nei Tessuti Bersaglio***

I lipoplessi devono spostarsi dal sito di somministrazione per raggiungere il tessuto bersaglio, quindi interagire con la membrana cellulare per entrare all'interno delle cellule. Lipoplessi carichi positivamente interagiscono con le superfici cariche negativamente attraverso i proteoglicani, come anche attraverso il siero od i componenti della matrice cellulare, come i glucosaminoglicani solubili. Mentre il primo caso è auspicabile per ottenere l'*uptake* cellulare, il secondo può distruggere i complessi o bloccare la trasfezione [82].

### ***Uptake Cellulare***

L'*uptake* cellulare di complessi liposoma-DNA è necessario al plasmide per raggiungere il nucleo che rappresenta il suo bersaglio. Inizialmente si è pensato che questo avvenisse tramite la fusione liposoma-membrana [83,84], ma è stato successivamente dimostrato che questo processo è principalmente mediato da endocitosi [51]. La via della fusione di membrana non può comunque essere del tutto scartata [54]. Recentemente, la fagocitosi è stata proposta come una possibile via di *uptake* del lipoplesso [85]. Sebbene sia un processo lento per i lipoplessi carichi positivamente, l'*uptake* cellulare non sembra essere la barriera principale [51]; è più probabile che siano i liposomi anionici ad avere difficoltà in questo passaggio. Per liposomi marcati, cioè modificati con una porzione *targeting* come l'acido folico [86], anticorpi [87] o carboidrati [88], l'*uptake* può essere mediato da un recettore ed incrementato.

### ***Escape Endosomiale***

Dopo l'endocitosi, l'*escape* dall'endosoma nel citoplasma è un passaggio critico nella trasfezione. Un'elevata percentuale di lipoplessi viene distrutta dalla degradazione endosomiale. L'*escape* endosomiale nella prima fase si pensa che sia essenziale al lipoplesso per evitarne la degradazione [51,89]. E' stato proposto un meccanismo per descriverlo, meccanismo per mezzo del quale i lipidi cationici interagiscono con i componenti anionici della membrana endosomiale, che induce un flip-flop del lipide endosomiale. Questi lipidi si dispongono a coppie e neutralizzano la carica del complesso permettendo al DNA di diffondere nel citoplasma [90]. Sono state ideate diverse strategie per aumentare l'*escape* endosomiale. Una

si basa sul *buffering* endosomiale, ipotizzato per la prima volta per la polietilenimina [13] e che sembra spiegare l'aumento dell'efficienza di trasfezione da parte della clorochina [91]. Il buffering endosomiale avviene in presenza di gruppi amminici debolmente basici, che si protonano al pH endosomiale agendo come una "spugna" protonica. Tutto ciò fa sì che sia gli enzimi lisosomiali che richiedono un pH acido ottimale per essere attivi risultino inibiti, e che avvenga anche un rigonfiamento osmotico che porta alla rottura dell'endosoma dovuta all'entrata dell'acqua [92]. Inoltre si pensa che i lipidi cationici che agiscono (almeno parzialmente) attraverso questo meccanismo includano le lipopoliammine (Transfectam [92], CTAP [24]), il composto colesterico BGTC [23], le amidinoammine [93] ed i lipidi con una 1,4-diidropiridina [82]. Un'altra strategia è quella di utilizzare componenti che diminuiscano la curvatura della membrana endosomiale [94]. Il DOPE facilita l'*escape* endosomiale attraverso la formazione, a pH endosomiale, di una fase esagonale inversa che destabilizza sia il complesso che la membrana endosomiale [55]. Il DOPE forma la fase  $H_{II}$  molto facilmente dal momento che possiede una bassa temperatura di transizione di fase ( $T_c$ ) [95] che inoltre aiuta la formazione della fase  $H_{II}$  a pH più bassi [54]. Questo è dovuto alla struttura della molecola del DOPE, infatti la piccola testa polare ed il grosso dominio idrofobico a forma di cuneo porta il lipide ad assumere una forma a cono che è adatta a formare la fase  $H_{II}$  descritta sopra. Safinya e collaboratori hanno utilizzato vescicole anioniche *giant* (*G-vesicles*) come modelli della membrana anionica endosomiale per dimostrare l'importanza dello scambio di fase per la fusione della membrana [57]. I lipoplessi con lipidi nella fase  $L\alpha$  si uniscono in modo stabile alle vescicole G attraverso un'interazione elettrostatica, ma non vi è fusione tra i due. Al contrario, i lipoplessi  $H_{II}$  si legano alle vescicole G e si fondono tra loro rapidamente, diffondendosi e perdendo la loro struttura compatta. Queste osservazioni suggeriscono che una volta all'interno dell'endosoma, la diminuzione dei livelli di pH costringe il DOPE a trasformare la struttura lipidica da una conformazione  $L\alpha$  ad una  $H_{II}$ . Questa fusione del doppio strato cationico con il doppio strato anionico della membrana endosomiale innesca il rilascio del lipoplesso residuo nel citoplasma. La destabilizzazione della membrana può anche essere facilitata dall'uso di peptidi fusogenici [96] o dall'uso di anfifili a singola coda debolmente basici che passano, a pH endosomiale, da una forma a doppio strato ad una micellare [94].

### ***Trasporto del DNA al Nucleo***

Una volta rilasciato dall'endosoma, il DNA deve oltrepassare la membrana nucleare. Questo processo di diffusione può essere lento [97,98] e dipende dalle dimensioni. La matrice intracellulare può ostacolare il passaggio del voluminoso lipoplesso, a meno che a questo punto il DNA non si libera da esso. Inoltre, complessi di grosse dimensioni non possono attraversare i pori relativamente piccoli della membrana nucleare. Per quanto, il DNA completamente nudo a questo punto potrebbe essere esposto all'azione delle nucleasi intracellulari [45,98].

### ***Entrata nel Nucleo***

Il trasferimento nucleare è stato identificato come uno tra i maggiori ostacoli per la trasfezione [51]. E' stato dimostrato che iniettando del plasmide nel nucleo si ottiene l'espressione del 50-100% di cellule, confrontata con una trasfezione pari allo 0.01% di cellule che si ottiene iniettandolo a livello citoplasmatico [99]. La trasfezione, che dipende dal ciclo cellulare, avviene principalmente durante la mitosi, quando la membrana nucleare viene distrutta [100]. Metodi per aggirare questo problema prevedono l'uso di peptidi *nuclear localization signal*, legati a vettori [101] o direttamente al plasmide [102,103], per un'entrata diretta nel nucleo, o l'uso di sistemi di espressione citoplasmatica tipo l'autogene T7 [104,105].

### ***Rilascio del DNA dai Complessi***

Nel momento in cui il plasmide raggiunge il nucleo, dovrebbe essere completamente rilasciato dal lipoplesso. E' stato dimostrato che i plasmidi che restano complessati con un liposoma non sono in grado di esprimersi [51], mentre i plasmidi nudi lo sono [51,99]. Pertanto, il rilascio del DNA dal vettore è un fattore che influenza la trasfezione [51,97] e vettori che si destabilizzano all'interno della cellula possono essere vantaggiosi in termini di efficienza di trasfezione [27,28].

### ***Espressione***

Una volta nel nucleo, il plasmide deve essere espresso efficientemente ed, a seconda dello scopo dell'applicazione, potrebbe essere desiderabile l'incorporazione nei cromosomi. Questa generalmente si ottiene attraverso l'uso di plasmidi ingegnerizzati più che attraverso i vettori, inserendo opportuni promotori, fattori di trascrizione *binding sites*, inserzioni di sequenze cromosomiche, etc [84,106].

### **Fattori legati alla somministrazione in vivo**

Sebbene ampiamente usati *in vitro*, i vettori liposomiali hanno avuto meno successo *in vivo*, con poche eccezioni rilevanti. Ci sono parecchi problemi associati alla somministrazione *in vivo*, come l'inattivazione da parte del siero, l'immunogenicità e l'eliminazione da parte del sistema reticolo-endoteliale (RES), lo scarso trasporto sistemico, la scarsa biodistribuzione e l'accumulazione in organi non-bersaglio come polmoni e fegato. Si è cercato di aggirare queste barriere e si è cercato di migliorare l'efficienza del gene *delivery in vivo*.

### ***Inattivazione da parte del siero***

L'inattivazione da parte del siero dei lipoplessi è un fenomeno comune e può avvenire attraverso meccanismi diversi. L'aggregazione in condizioni fisiologiche e la degradazione da parte delle nucleasi sono state menzionate prima. L'interazione dei lipoplessi carichi positivamente con i componenti del plasma carichi negativamente può impedire l'interazione con la membrana cellulare. L'albumina tra le proteine del siero è il candidato più probabile a legarsi, e può indurre un'inversione di carica dei lipoplessi [78,107].

### ***Immunogenicità***

Il meccanismo più comune di inattivazione dei lipoplessi *in vivo* sembra essere mediato dall'attivazione del complemento. L'opsonizzazione da parte dei componenti del complemento porta all'eliminazione dei complessi dal sangue attraverso l'*uptake* operato dalle cellule del RES [84,108]. Questo dipende dal tipo e dalla carica dei lipidi cationici [108].

Inoltre, l'effetto immunitario dei liposomi può essere aggravato da processi infiammatori persistenti [109]. Un altro fattore clinico legato all'immunogenicità dei liposomi è l'effetto della "dose ripetuta". Per ottenere e mantenere l'efficacia, la dose ripetuta è probabilmente necessaria nella maggior parte dei protocolli di terapia genica, soprattutto non-virale. Inoltre, la durata di espressione è solitamente molto breve con vettori liposomiali [45,104] e l'immunogenicità dei lipoplessi potrebbe precludere una somministrazione ripetuta. Tuttavia, nel caso dei complessi liposoma-DNA, questa è solitamente più bassa di quella dei vettori virali, e la somministrazione ripetuta di interferone- $\beta$ /DNA è possibile a condizione che intercorra abbastanza tempo (14 giorni) tra i due dosaggi consecutivi [110].

### ***Emivita***

L'emivita, come l'eliminazione, è direttamente correlata all'inibizione da parte del siero e all'opsonizzazione, e può essere molto breve (<5 min) per alcuni vettori non-virali [108]. Per esempio per raggiungere tumori distali dopo somministrazione sistemica, sarebbe vantaggiosa una lunga emivita. Inoltre, si può ottenere il targeting passivo di tumori con liposomi a lunga emivita grazie alla scarsa loro vascolarizzazione [8]. Vari studi si sono rivolti a ridurre l'immunogenicità dei lipoplessi attraverso l'ottimizzazione della formulazione e includendo lipidi endogeni come il colesterolo. Una delle più efficaci modificazioni per evitare la risposta immunitaria è stata la coniugazione con il polietilenglicole per creare un liposoma *stealth* [8,75,86]. L'emivita risulta aumentata anche da minuti a 10 h [111]. Mentre questa modificazione migliora molto la farmacocinetica, ha un effetto opposto sull'*uptake* cellulare e sull'espressione genica [8,81,86]. Per superare questo problema, il PEG è stato legato ai domini idrofobici di diversa lunghezza attraverso un linker di ceramide. Una catena di carboni più corta potrebbe scambiarsi più velocemente con il doppio strato, esponendo il doppio strato lipidico, e permettendo all'*uptake* e ad eventi fusogenici di aver luogo. Le SPLP (*PEG-stabilized liposomal vesicles encapsulating plasmid DNA*) hanno dimensioni molto uniformi (62 nm +/- 8 nm) e possono essere conservate per più di 12 mesi senza nessuna diminuzione dell'attività. Come previsto, in esperimenti *in vitro* una ceramide con una catena idrofobica a 20 di carbonio (CerC20) produce SPLP meno attive di quelle prodotte utilizzando CerC14, e infatti la CerC8 è la più efficiente [112]. Usando un modello intraperitoneale (i.p.) B16-F10 di topo, Zhang *et al.* hanno dimostrato che le SPLP di diottadecildimetil-ammonio cloruro (DODAC)/DOPE associate con PEG-CerC8 sono 10 volte più efficienti dei lipoplessi DODAC/DOPE quando iniettati i.p. [63]. In un ulteriore studio *in vivo*, le SPLP associate a PEG-CerC20, rilasciate per via intravenosa, hanno dimostrato di possedere una  $t_{1/2}$  di più di 6 ore [113] rispetto ai lipoplessi che sono rapidamente eliminati dalla circolazione, avendo una  $t_{1/2}$

di meno di 15 minuti. Dopo 24 ore, il 3% delle SPLP totali iniettate si è accumulato nel sito tumorale, compreso l'1.5% del plasmide totale iniettato.

### ***Farmacocinetica***

Una scarsa farmacocinetica potrebbe essere dovuta non solo dall'eliminazione da parte del sistema immunitario, ma anche dall'interazione con altre barriere biologiche, come il muco e i tensioattivi polmonari [104]. La dimensione delle particelle gioca un ruolo importante sulla farmacocinetica. L'estesa vascolarizzazione dei polmoni porta ad una rapida eliminazione polmonare delle particelle più grosse attraverso la deposizione nel letto dei capillari [8]. Il travaso attraverso i vasi sanguigni e la diffusione nella massa tumorale richiedono ancora particelle di piccole dimensioni [114].

### ***Biodistribuzione***

La biodistribuzione dei complessi liposoma-DNA è anch'essa un fattore molto importante [115]. Anche nel caso di un'iniezione intratumorale, alcuni complessi possono uscire dal tumore e penetrare nella circolazione sistemica, sebbene non vi sia stata associata alcuna tossicità [104]. Dopo somministrazione sistemica, il maggior organo di accumulo è il polmone, seguito da milza, fegato, cuore e reni [8,116]. Nel polmone, il principale tessuto trasfettato è l'endotelio [117]. Se un differente tessuto o un tumore devono essere "bersagliati", l'*uptake* polmonare, che può essere di tre ordini di grandezza superiore all'*uptake* tumorale [117], diventa un serio ostacolo. Il *targeting* di altri tessuti è stato ottenuto attraverso vie diverse e il protocollo di somministrazione può determinare la biodistribuzione. Un tumore epatico è stato bersagliato da un rilascio transarteriale, che in questo caso si è dimostrato più selettivo rispetto ad un'iniezione intratumorale [118]. I liposomi stabilizzati stericamente presentano un profilo di biodistribuzione differente: l'*uptake* polmonare è insignificante e la principale via di eliminazione è il fegato, con il 23% della dose iniettata assorbita dopo 24 h. Anche dopo 24 h i livelli plasmatici sono ancora del 18% ed a livello tumorale può raggiungere il 10% [111]. I liposomi stabilizzati bersagliano passivamente i tumori a causa della loro scarsa vascolarizzazione [8]. Un grado ancora più elevato di selettività si spera di ottenerlo con un *targeting* attivo dei tumori o di alcuni tipi cellulari, per mezzo di lipoplessi coniugati con una porzione *targeting*. Le cellule del fegato sono state bersagliate con liposomi cationici galattosilati per il riconoscimento da parte recettori dell'asialo-glicoproteina *in vivo* [88]. Invece, liposomi stabilizzati stericamente e coniugati con folati mirati per il recettore per il folato espresso dai tumori non hanno raggiunto un accumulo a livello tumorale migliore di quelli senza il folato; presumibilmente poiché il passaggio limitante è il travaso di questi grossi coniugati e la loro diffusione nel tumore. La coniugazione del folato, comunque, ha ripristinato l'efficienza di trasfezione diminuita dalla coniugazione con il PEG [86].

### ***Tossicità e Citotossicità***

Problemi generali dei liposomi cationici, sia *in vitro* che *in vivo*, sono la loro tossicità e citotossicità. La citotossicità di alcuni lipidi commerciali è un dei maggiori ostacoli per la loro applicazione *in vivo* [119].

La tossicità è stata attribuita alla loro origine non-naturale e alla loro natura non-biodegradabile. Infatti l'incorporazione di anfifili nelle membrane cellulari produce pori ed impedisce anche il *signalling* attraverso l'inibizione della proteina chinasi C [74]. La minimizzazione della tossicità dei lipidi ha costituito una priorità per questo campo di ricerca e l'uso di un legame estereo biodegradabile [74], di teste polari piridiniche [120] o fosfoniche più che amminiche [30], di derivati anfifilici della betaina con una glicina [121] o di una sfingosina nel dominio idrofobico [122] sono alcune delle strategie adottate per ottenere lipidi con tossicità ridotta.

## **Fattori Pratici**

Altri fattori pratici legati alla produzione, alla formulazione ed all'uso dei lipidi e liposomi cationici sono qui elencati in breve. La prevenzione dell'aggregazione della formulazione in soluzioni altamente saline/fisiologiche e la resistenza alla sonicazione o alla nebulizzazione sono già state menzionate prima.

### ***Stabilità durante la Conservazione***

La stabilità durante la conservazione è importante a scopo commerciale e clinico. I lipidi sono spesso stabili se mantenuti in adeguate condizioni (es. lipidi contenenti legami triesterei mantenuti in cloroformio a  $-20^{\circ}\text{C}$  sono stabile per più di 5 anni). La stabilità dei liposomi, in termini di proprietà, dimensioni delle particelle e stabilità alla sterilizzazione termica, è molto difficile da raggiungere. Durante la conservazione, avvengono reazioni di transacilazione tra il legame estereo del DOPE e del gruppo amminico primario deprotonato del lipide [44]. Si hanno risultati simili per i lipidi diesterei con una testa polare con un gruppo amminico primario. Le dispersioni preparate da idrocarburi basati su lipidi come unici agenti (es. dimiristoil, dipalmitoil- o distearoil-fosfatidilcolina) formano un deposito irreversibile dopo 6-7 giorni. I loro analoghi fluorurati sono molto più stabili, per più di 10 mesi e anche la sterilizzazione termica li lascia inalterati [123].

### ***Variabilità Interbatch***

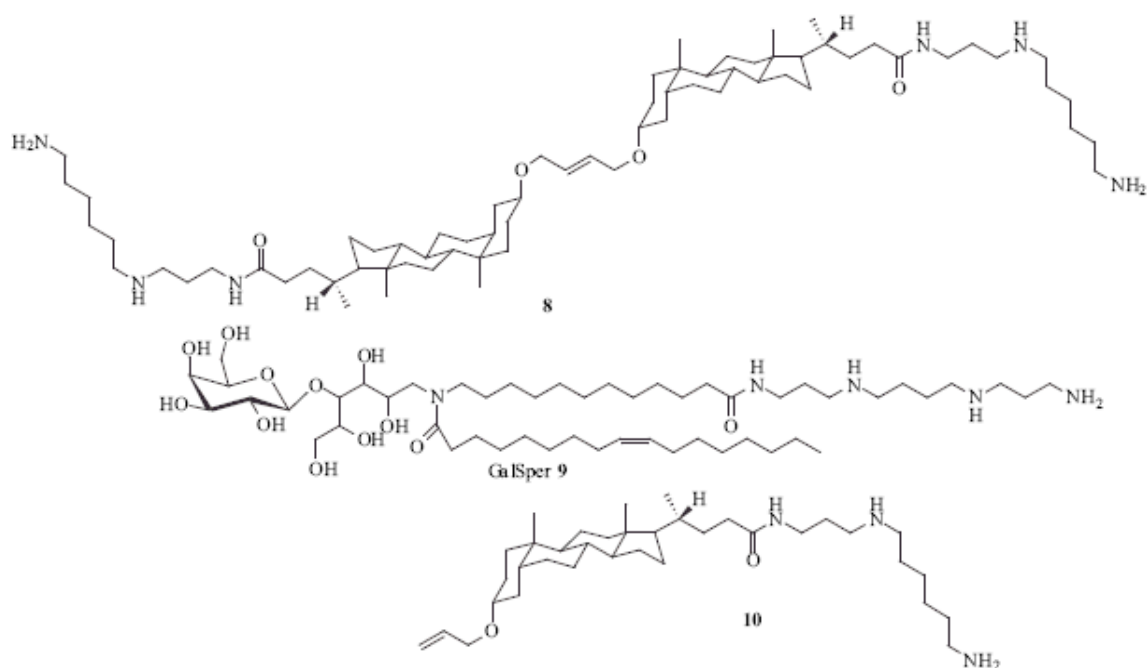
Sebbene sia meno pronunciata di quella dei vettori virali la variabilità *interbatch* è un problema che si incontra frequentemente per i lipidi e i liposomi cationici. I vettori liposomiali dovrebbero essere stabili durante la produzione in modo tale che grandi quantità possono essere preparate con specifiche uniformi [8].

### ***Sintesi***

La sintesi dei lipidi cationici è il primo *step* nella produzione di un vettore liposomiale. Una via sintetica affidabile, semplice e flessibile per ottenere lipidi cationici ha la sua importanza. A supporto del processo di ricerca, si sono rivelati molto utili l'ottimizzazione e gli studi delle relazioni struttura-attività, un metodo flessibile che permette modificazioni multiple sistematiche e differenti della classe di lipidi in studio.



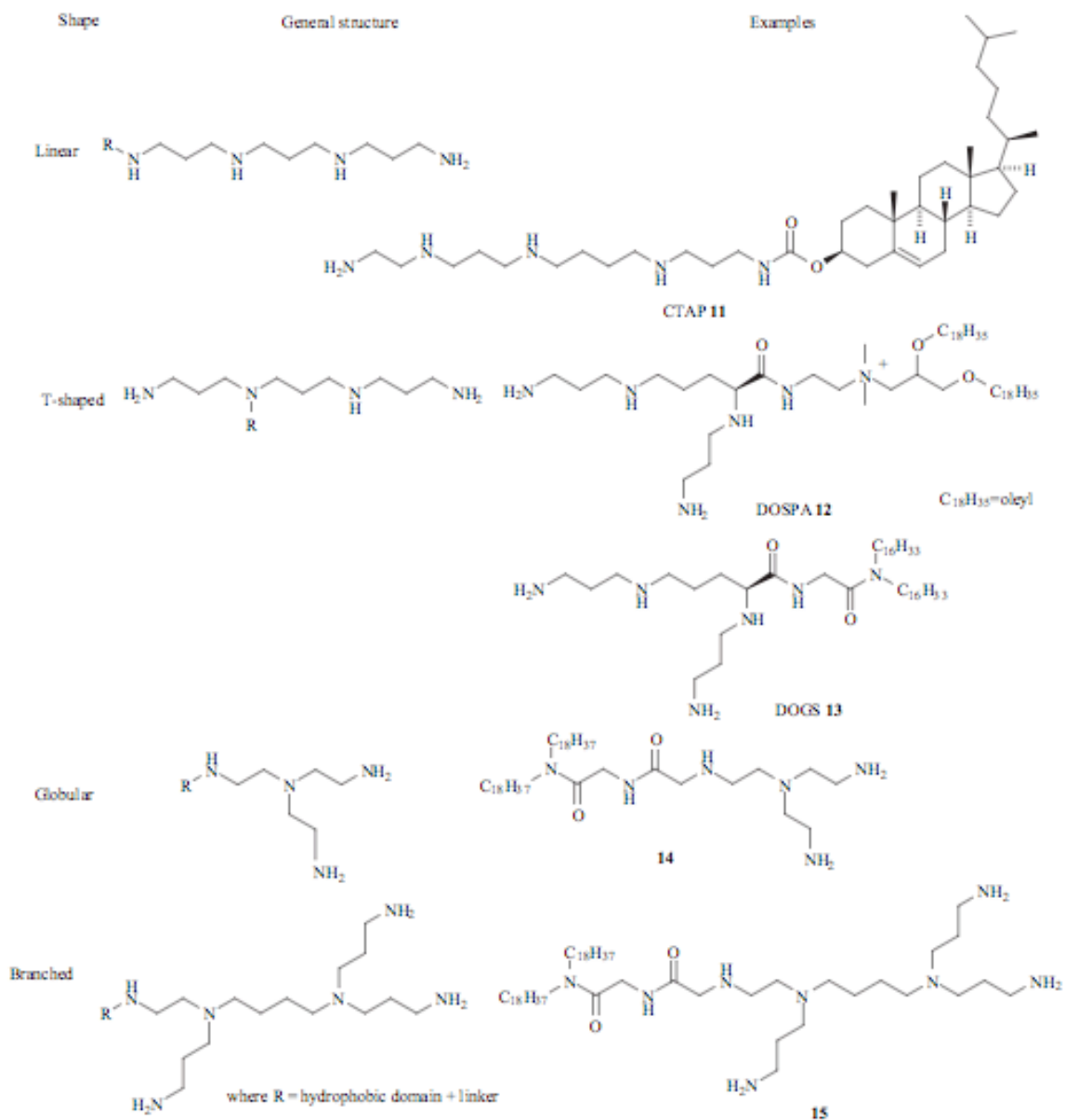
Gli anfifili *bolaform* con un esteso dominio idrofobico, che è costituito da un acido omodimerico litocolico, **(8)** hanno un'efficienza di trasfezione superiore ai corrispondenti monomeri **(10)** [42]. (Schema 2) Mentre sono stati condotti pochi studi comparativi tra differenti architetture, alcune correlazioni struttura-attività sono state fatte con una classe di tensioattivi gemini. L'elemento distintivo dei tensioattivi gemini è lo *spacer* tra i due gruppi carichi. Un'interessante proprietà di questo *spacer* è l'effetto che ha la lunghezza della catena sulla propensione all'idratazione, che a sua volta determina la fase poliformica preferita. La TmedEce (N,N'-dioleil-N,N,N',N'-tetrametil-1,2-etandiamina) è lamellare sia in acqua che in soluzione salina, poichè lo *spacer* corto induce le due catene lipidiche a stare parallele. La PropEce (N,N'-dioleil-N,N,N',N'-tetrametil-1,3-propandiamina), con tre carboni nello *spacer*, è lamellare in soluzione salina, quando la forza ionica scherma la repulsione tra le due cariche positive e permette alle catene idrocarburiche di avvicinarsi abbastanza da diventare parallele. In acqua, le cariche tendono a stare molto lontane tra loro e la molecola è a forma di cuneo, quindi micellare. Nel caso della HexEce (N,N'-dioleil-N,N,N',N'-tetrametil-1,6-esandiamina), che ha uno *spacer* ancora più lungo, le due catene sono troppo lontane l'un l'altra e il lipide è micellare sia in acqua che in soluzione salina [125]. Questo comportamento è stato considerato per preparare gli anfifili gemini con uno zucchero come *spacer* **(4)**, che si converte da lamellare a micellare a basso pH endosomiale, con la conseguente distruzione dell'endosoma e la fuoriuscita dal DNA nel citoplasma [94]. Un'altro modo di utilizzare questo spacer per innescare il rilascio del DNA all'interno delle cellule è quello di creare un lipide gemini che forma temporaneamente un doppio strato **(3)**, che si romperà in due frammenti monocationici simili a detergenti a causa della riduzione attivata dal *linker* [35]. Un più dettagliato studio SAR su una classe di tensioattivi gemini basata su una struttura simile ad un peptide **(5)** ha evidenziato che la struttura ottimale per la trasfezione è quella con catena idrofobica C<sub>16</sub> ed ha come testa polare la tri-lisina legate attraverso la catena amminica laterale piuttosto che attraverso il normale legame peptidico [37]. Negli anfifili *bolaform*, l'esteso dominio idrofobico può connettere non solo due gruppi cationici, come nell'**(8)**, ma anche una testa polare cationica ad una porzione *targeting* galattosidica GalSper **(9)** [40]. Questo crea la possibilità di avere un liposoma con il DNA incapsulato all'interno e la porzione *targeting* all'esterno. La lunghezza dei domini idrofobici degli anfifili *bolaform* è simile alla larghezza di un doppio strato [42].



**Schema 2** Esempi di anfili *bolaform* **8** e **9** GalSper e corrispettivi monomeri **10**

### **Struttura Molecolare**

L'orientamento relativo delle teste polari e della catena idrofobica (la struttura del lipide cationico) ha un effetto considerevole sull'efficienza di trasfezione. In uno studio sistematico sui ruoli del dominio idrofobico, sulla struttura delle teste polari, e sulla struttura delle lipopoliammine, è emerso che il parametro con il più alto impatto sull'efficienza di trasfezione è la struttura [44]. Un lipide a forma di T, dove il dominio lipidico è attaccato nel mezzo della catena poliamminica, è il più efficiente. Questa scoperta è stata confermata da altri gruppi [23,76]. Alcuni dei più efficienti agenti trasfettanti contengono anche lipidi a forma di T come DOSPA **12** e DOGS **13**. Un risultato diverso, però, è stato ottenuto da Byk *et al.* [34] che hanno studiato una serie di lipidi con diverse strutture: lineari, a forma di T, ramificate e globulari. Il miglior lipide per la trasfezione *in vitro* è un lipide con struttura lineare. Un altro lipide lineare con una buona efficienza di trasfezione è il CTAP **11** (Schema 3) [76]. Sebbene la struttura sembri a forma di T o lineare nella rappresentazione grafica, in realtà in soluzione la conformazione più stabile si ottiene quando la catena poliamminica è ripiegata [43].



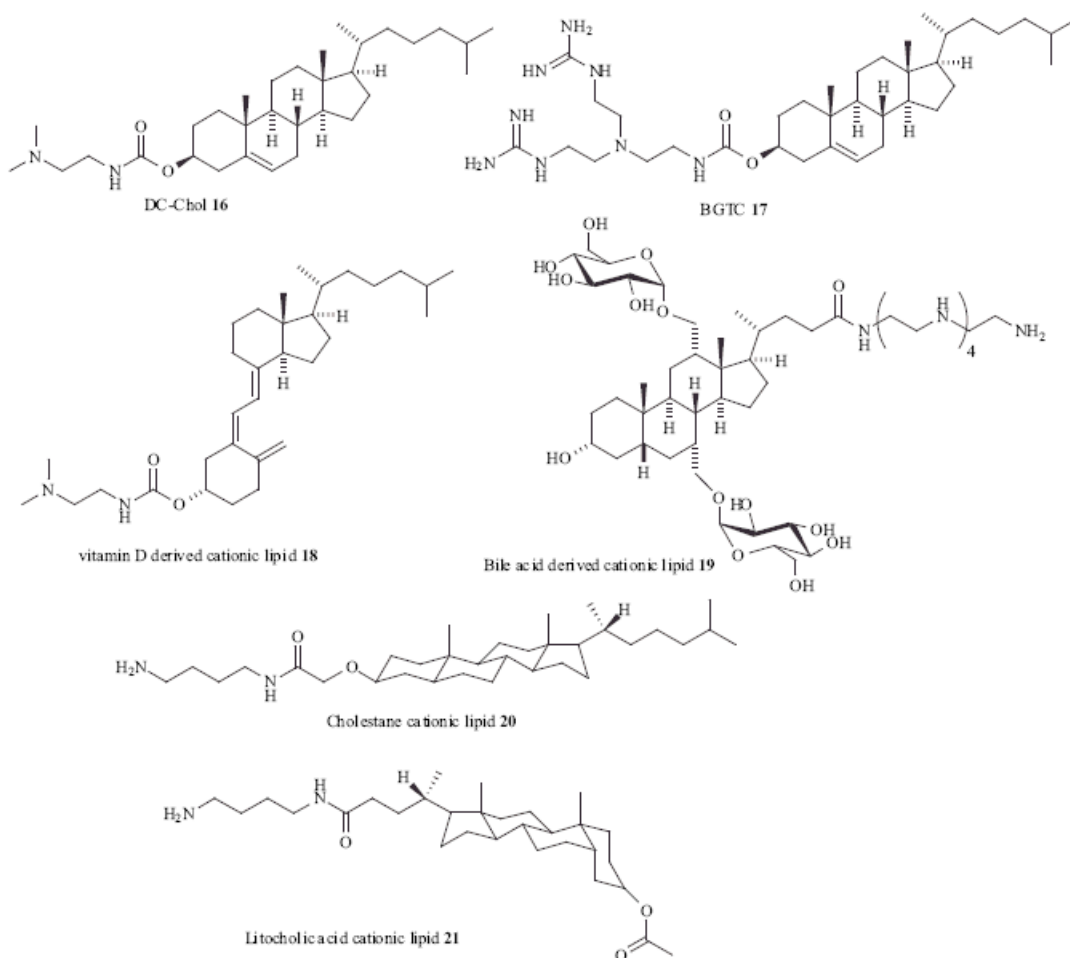
**Schema 3** Esempi di strutture di lipidi cationici: Lineare CTAP 11, a forma di T DOSPA 12 e DOGS 13, globulare 14, ramificata 15.

## Il Dominio Idrofobico

Prima di qualsiasi discussione sulle componenti dei domini dei lipidi cationici, bisognerebbe sottolineare che l'analisi separata di ogni dominio è in qualche modo artificiale. L'efficienza di trasfezione non è determinata solamente da un singolo dominio del lipide cationico ma dalla loro combinazione [36]. Le caratteristiche ottimali del dominio idrofobico dipendono dalla struttura generale del lipide e differenti tipi di lipidi possono avere necessità strutturali opposte, per esempio in termini di lunghezza ottimale della catena idrofobica per una migliore trasfezione [34]. Tuttavia, l'approccio modulare è stato utilizzato per la progettazione di nuovi vettori. Inoltre, gli andamenti delle proprietà fisiche del liposoma possono essere dedotti dallo studio dell'effetto delle variazioni nella struttura chimica di alcuni domini. All'interno di una determinata classe di lipidi, la modificazione sistematica di ogni parte e la comprensione della relazione struttura-attività (SAR) sono necessarie per ottenere una prestazione ottimale.

### *Dominio Idrofobico Steroideo*

I gruppi idrofobici più comunemente usati per i lipidi cationici sono derivati steroidei e catene idrocarburiche lineari (Schema 4).



**Schema 4** Lipidi cationici con domini steroidei: Dc-Chol 16, BGTC 17, derivati della Vitamina D 18, derivati degli acidi biliari 19, colesterani 20, acidi litocolici 21.

Nel gruppo steroideo, il colesterolo è quello che si incontra con maggiore frequenza. L'originario lipide cationico DC-Chol **16** [25], così come i più recenti lipidi come il BGTC **17** [23] sono esempi di lipidi colesterolici. Molti altri lipidi progettati per la trasfezione genica contengono questa struttura [24,34,35,76,126]. Il colesterolo stesso può essere usato come colipide e tende a rendere poco flessibile il doppio strato [73]. In generale, i lipidi cationici usati in *gene delivery* contengono solamente una porzione steroidea. In letteratura sono riportati pochi esempi in cui due molecole steroidee sono presenti nello stesso lipide [42,126]. Altri composti steroidei usati come porzioni idrofobiche per lipidi cationici includono la vitamina D **18** [127], gli acidi biliari **19** [128], il colestano **20** e l'acido litocolico **21** [43]. Gli ultimi due sono stati sintetizzati per studiare l'influenza della struttura del dominio idrofobico sull'efficienza di trasfezione. Il colestano e l'acido litocolico hanno una *trans*-decalina e *cis*-decalina rispettivamente, e la loro capacità di riempire lo spazio è differente. In questo esempio, la struttura più allungata del colestano ha un'efficienza di trasfezione migliore della struttura angolata dell'acido litocolico [43]. Gli analoghi della vitamina D sono composti di tipo steroideo, con un legame carbonio 9,10 che manca nell'anello B della struttura steroidea. Questa modificazione porta ad efficienze di trasfezioni simili a quelle del DC-Chol, che ha struttura steroidea intatta [127]. Lipidi cationici che usano uno *scaffold* di un acido biliare hanno una struttura simile al colesterolo, ma sono più idrofili per la presenza di gruppi poliidrossilici [128].

### ***Catene Alifatiche nel Dominio Idrofobico***

Le catene idrocarburiche usate nei vettori sono in un range che va da C8:0 a C18:1 (Cn:n<sup>1</sup> dove n indica il numero di atomi di carbonio e n<sup>1</sup> indica la posizione dell'insaturazione sulla catena), ma le più studiate sono quella oleilica (C18:1), laurilica (C12:0), miristilica (C14:0), palmitilica (C16:0) e stearilica (C18:0). Le catene sono lineari e sature o mono insature in caso dell'oleilica. Sono state riportate anche catene ramificate [129] e diaceteniliche [130].

### ***Il Numero di Catene Alifatiche***

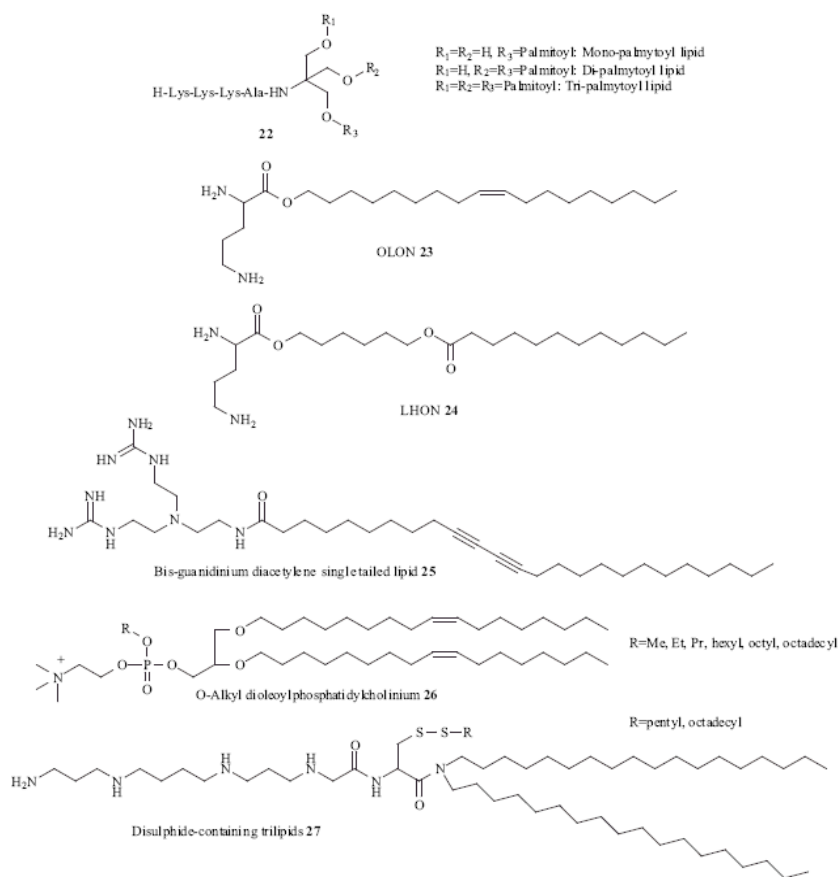
La maggior parte dei lipidi con catene idrocarburiche lineari hanno due catene nel dominio idrofobico. Esempi di lipidi simmetrici ed asimmetrici con catena idrocarburica a lunghezza variabile sono presenti nello Schema 6 ed in Tabella 1. Sono stati studiati pochi esempi di lipidi con una o tre catene (Schema 5). In generale, i lipidi contenenti una catena idrocarburica tendono a formare micelle, trasfettano poco e sono più tossici [131,132]. Confrontando lipidi simili che contengono una, due o tre catene palmitiliche **22**, il lipide con una catena trasfetta molto meno dei corrispettivi di- o tri-sostituiti [132]. In alcuni esempi invece, lipidi con un'unica catena sono agenti di trasfezione efficienti. Usando la logica che né la porzione idrofobica né quella idrofila del lipide determinano tutte le proprietà da sole, Tang *et al.* hanno sostenuto che una combinazione corretta di una catena idrocarburica e di una testa polare può portare alla creazione di lipidi con una sola catena in grado di trasfettare [36]. Un lipide che ha una catena oleilica e una lisina come testa polare (OLON, **23**) formulati con il DOPE si comportano come la formulazione commerciale DOTAP/DOPE. Tuttavia questi lipidi sono più tossici del DOTAP. Introducendo un *linker* biodegradabile

estereo in mezzo della catena (LHON, **24**) si ha una diminuzione della tossicità mantenendo la stessa efficienza di trasfezione [36]. Un altro esempio di un lipide cationico a singola catena è il bis- diacetilene guanidinico **25**. Questa catena è più lunga dell'usuale catena idrocarburica usata nei lipidi cationici (è composta di 25 atomi di carbonio). Le formulazioni con un simile lipide neutro bis acetilenico o con il DOPE sono efficienti nelle trasfezioni *in vitro* [130]. Lipidi aventi tre catene sono di solito meno trasfettanti dei lipidi con due catene [34,132,133]. Tuttavia, quando la terza catena è corta o può essere rimossa da una riduzione intracellulare di un legame disolfurico, la trasfezione aumenta. Composti O-alcil dioleoilfosfatidilcolinici **26**, dove la terza catena è un gruppo alchilico legato come triestere fosfato, mostrano un comportamento di fase che dipende dalla lunghezza di questa terza catena. I derivati etilico e propilico formano fasi lamellari e sono vettori molto efficienti. Il composto etilico forma una fase lamellare in acqua ed una fase cubica in soluzioni con alte concentrazioni saline. I derivati ottilici ed ottadecilici formano una fase esagonale inversa e non trasfettano senza essere pre-sonicati [133]. Lipidi contenenti una terza catena legata come ponte disolfuro **27** sono più efficienti dei corrispettivi lipidi senza la terza catena. Anche se il picco di trasfezione del lipide tri-palmitoilico è più basso dell'analogo di-palmitoilico ed il primo transfetta in un più ampio intervallo di rapporti lipide:DNA [132].

### ***La Lunghezza delle Catene Alifatiche***

L'effetto della lunghezza della catena sui lipidi cationici con due catene idrocarburiche è stato trattato in molti studi [19,30,31,33,34,37,71,73,82,120,129,134-138]. Le conclusioni di questi studi sono frequentemente in contraddizione, mettendo in luce che l'efficienza di trasfezione è influenzata da tutta la struttura, non solo da un singolo dominio. La maggior parte degli studi comunque conclude che la lunghezza minima della catena idrocarburica necessaria per la trasfezione è C<sub>12</sub> [33,73]. Alcuni altri studi considerano invece che la lunghezza minima debba essere C<sub>10</sub> [82] o C<sub>14</sub> [138]. Le catene più corte formano micelle e sono meno tossiche [34,135,138]. Lipidi con catene più lunghe (per catene sature) hanno temperature di transizione di fase T<sub>c</sub> più alte [73,129,134], tuttavia T<sub>c</sub> non predice l'efficienza di trasfezione e non esiste una correlazione lineare tra lunghezza di catena e trasfezione [33]. Nell'analizzare una serie di lipidi cationici che differisce solo per la lunghezza di catena, solitamente si trova un picco nell'efficienza di trasfezione che non corrisponde né al composto a catena più lunga né al composto a catena più corta. Per esempio, nella serie con catene da C<sub>12</sub> a C<sub>18</sub> atomi, C<sub>14</sub> è spesso la miglior lunghezza di catena per la trasfezione [73,135,136,138]. In alcuni casi la più corta C<sub>12</sub> è la migliore [31,82]. Si sono trovati pochi esempi in cui la lunghezza ottimale è costituita da una catena satura più lunga di C<sub>18</sub>, per esempio in un lipide gemini nel rif. [37]. Una catena che appare molto frequentemente nelle strutture di agenti di trasfezione efficienti è la catena oleilica insatura C18:11 e questa catena è spesso la miglior scelta per una buona trasfezione [19,71,120,136,139]. Esiste un esempio isolato in cui la catena satura C18:0 funziona meglio dell'equivalente controparte C18:1, questo è probabilmente dovuto a fattori addizionali come una più facile idrolisi del *linker* estereo tra testa polare–catena idrofobica del composto saturo rispetto all'insaturo [140]. Una ragione per la quale le catene più efficaci, in termini di miglioramento della trasfezione sono

spesso le più corte o le insature, risiede nel loro effetto sulla fluidità di membrana, poichè la fluidità di membrana è stata correlata all'efficienza di trasfezione. Le catene insature, ramificate e più corte tendono a fluidificare il doppio strato, distruggendo l'impaccamento della membrana e facilitando l'*escape* del DNA nelle cellule. Una formulazione che ha un lipide con una catena corta insatura C14:1 e un colipide ramificato C<sub>16</sub>, con una fluidità molto alta, è il miglior vettore *in vitro* di una serie di combinazioni di catene di lipidi e colipidi [129]. La fluidità di membrana è stata anche correlata con l'*escape* endosomiale [82] che tuttavia non è sempre in grado di predirne l'attività. In una serie di anfifili 1,4-diidropiridinici, il composto C<sub>10</sub> è il più attivo a livello di membrana e consente il miglior rilascio del DNA nel citosol, tuttavia ha una localizzazione nucleare molto scarsa. Il composto equivalente C<sub>12</sub>, sebbene sia un distruttore endosomiale più debole, entra più facilmente nel nucleo [82]. Il mantenimento di una certa rigidità di membrana è tuttavia necessaria per stabilizzare il liposoma [33,138] e la citotossicità aumenta al diminuire della lunghezza della catena [34,135,138]. Quindi, la lunghezza di catena ottimale è quella che raggiunge il miglior bilancio, che dipende dalle caratteristiche di tutta la struttura lipidica. I risultati *in vitro* correlano con quelli *in vivo*: l'ordine di efficienza per fosfolipidi cationici è C14:0>C18:1 *in vitro*, mentre *in vivo* è l'inverso[30].



**Schema 5** Lipidi cationici con una o tre catene idrocarburiche: OLON **23**, LHON **24**, lipide bis-guanidinio acetilenico a singola coda **25**, O-alcildioleilfosfatidilcolinio **26**, lipide contenete un disolfuro **27**.

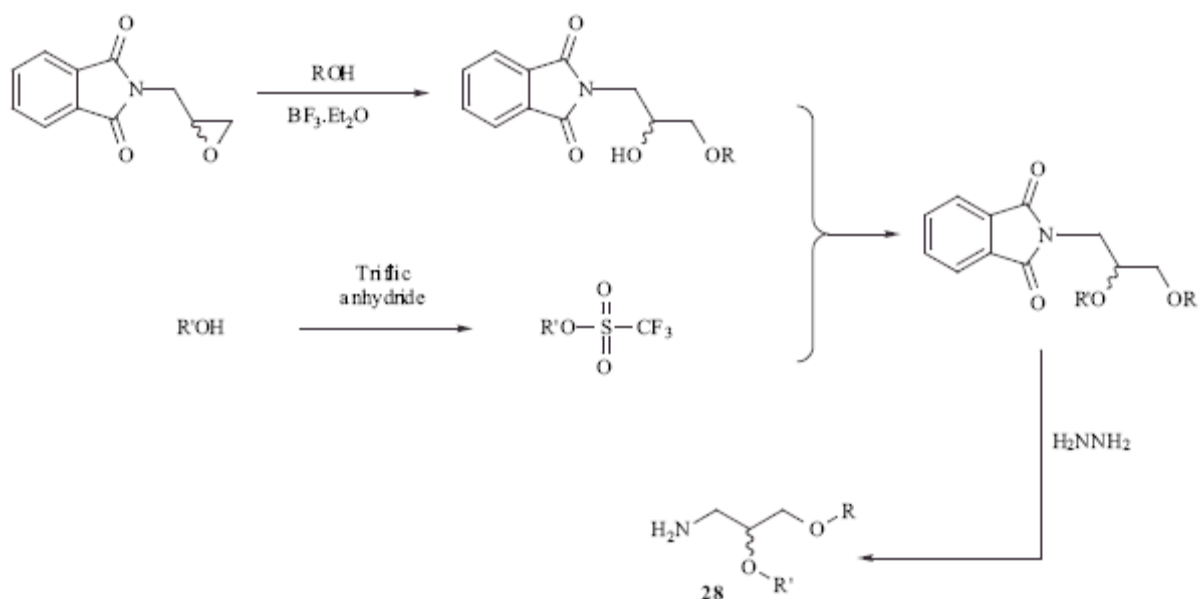
### ***L'Insaturazione delle Catene Idrocarburiche***

L'effetto dell'insaturazione sulla fluidità di membrana è stato menzionato sopra e la geometria del doppio legame ha qualche influenza sull'efficienza di trasfezione.

La catena oleilica commerciale è composta dell'85% di isomero *cis* e del 15% di isomero *trans*, ma grazie alla sintesi di isomeri puri si è visto che la geometria *trans* è migliore per la trasfezione [120], anche se un risultato opposto è stato ottenuto da Obika *et al.*, che hanno trovato che la catena oleilica *cis* è più attiva nella trasfezione rispetto alla *trans* in lipidi con ammonio quaternario [141]. Inoltre, uno svantaggio dell'insaturazione è la ridotta stabilità durante la conservazione, causata dalla propensione ad ossidarsi [43].

### ***L'Asimmetria del Dominio Idrofobico***

L'asimmetria del dominio idrofobico è un'altra variabile importante per l'efficacia dei lipidi cationici. C'è un'asimmetria insita in molti lipidi cationici comunemente usati, dovuta alla struttura del *backbone* glicerolico. L'asimmetria si ha quando due catene di strutture differenti sono presenti nello stesso lipide. Questa asimmetria può essere estesa alle formulazioni in cui il lipide ed il colipide hanno catene di diversa lunghezza, dal momento che le catene sono intercambiabili e danno in qualche modo risultati simili [129]. Diversi gruppi hanno dimostrato che l'asimmetria della struttura del lipide favorisce la trasfezione [31,33,120,142], anche se altri gruppi hanno riportato l'opposto, asserendo che domini idrofobici altamente asimmetrici portano a livelli più bassi di trasfezione [19,35]. In formulazioni liposomiali, la coppia lipide – colipide con un alto livello di asimmetria (C18:1 nel lipide – C12:0 nel colipide) così come quelli con un alta simmetria in cui le catene idrocarburiche sono perfettamente corrispondenti (C16:0 nel lipide – C16:0 nel colipide) hanno le migliori proprietà trasfettive [129]. Ci sono pochi esempi di lipidi asimmetrici in letteratura e un motivo per la loro relativa scarsità (rispetto a quelli simmetrici) è la difficoltà di sintesi. La preparazione di domini idrofobici asimmetrici parte dalla scelta di un *backbone* opportuno o di una via sintetica conveniente. (Un esempio è riportato nello Schema 6). Sono stati preparati 15 lipidi dieterei simmetrici e asimmetrici con una testa polare costituita da un'ammina primaria (Tabella 1). Nella formulazione con DC-Chol e DOPE come lipide *helper*, si ha un picco di trasfezione nel *range* del 40-60% di lipide rispetto al totale di lipidi cationici presenti (DC-Chol + lipidi **28**). I lipidi con le catene più corte (**28**,  $R^1=R^2=C_{12}$ ) e con il più alto grado di asimmetria (**28**,  $R^1=C_{12}$ ,  $R^2=C_{18}$ ) danno i migliori risultati in saggi *in vitro*.

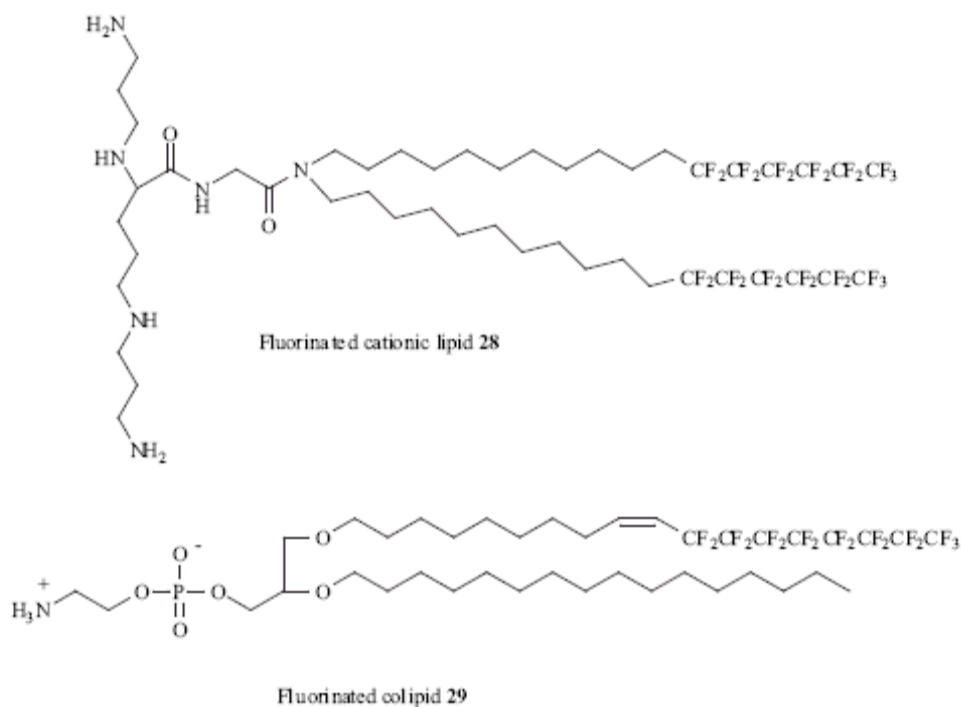


**Schema 6** Sintesi di lipidi dieterici con domini idrofobici simmetrici e asimmetrici.

### ***Domini Idrofobici Fluorurati***

Le catene fluorurate costituiscono un caso speciale di dominio idrofobico. La parte fluorurata della catena è sia idrofobica che liofobica e tende ad aggregarsi quando formulata in liposomi, creando un film fluorurato interno. Questi liposomi sono molto stabili da conservare, più resistenti ai detergenti ed hanno una lunga emivita *in vivo*. Sono stati sintetizzati sia i lipidi (**29**) che i colipidi (**30**) con catene fluorurate (Schema 7) [40,123].

Per riassumere, si può dire che la struttura del domino idrofobico determina la temperatura di transizione di fase, la fluidità del doppio strato, influenza la stabilità dei liposomi, la protezione del DNA dalle nucleasi, l'*escape* endosomiale, il rilascio del DNA dal complesso e la penetrazione nel nucleo. Inoltre, influenza anche la tossicità dei lipidi.



**Schema 7** Lipidi cationici fluorurati **28** e colipidi fluorurati **29**.

## Dominio della Testa Polare

E' stata recentemente pubblicata una *review* generale sulle correlazioni struttura-attività di lipidi cationici usati in *gene delivery*. I lipidi cationici usati in *gene delivery* sono classificati secondo la struttura della testa polare in: lipidi con ammoni quaternari, lipopoliamine, lipidi cationici sia con ammoni quaternari che con poliamine, con sali amidinici e guanidinici lipidi e lipidi cationici eterociclici [143].

### ***Ammonio Quaternario come Testa Polare***

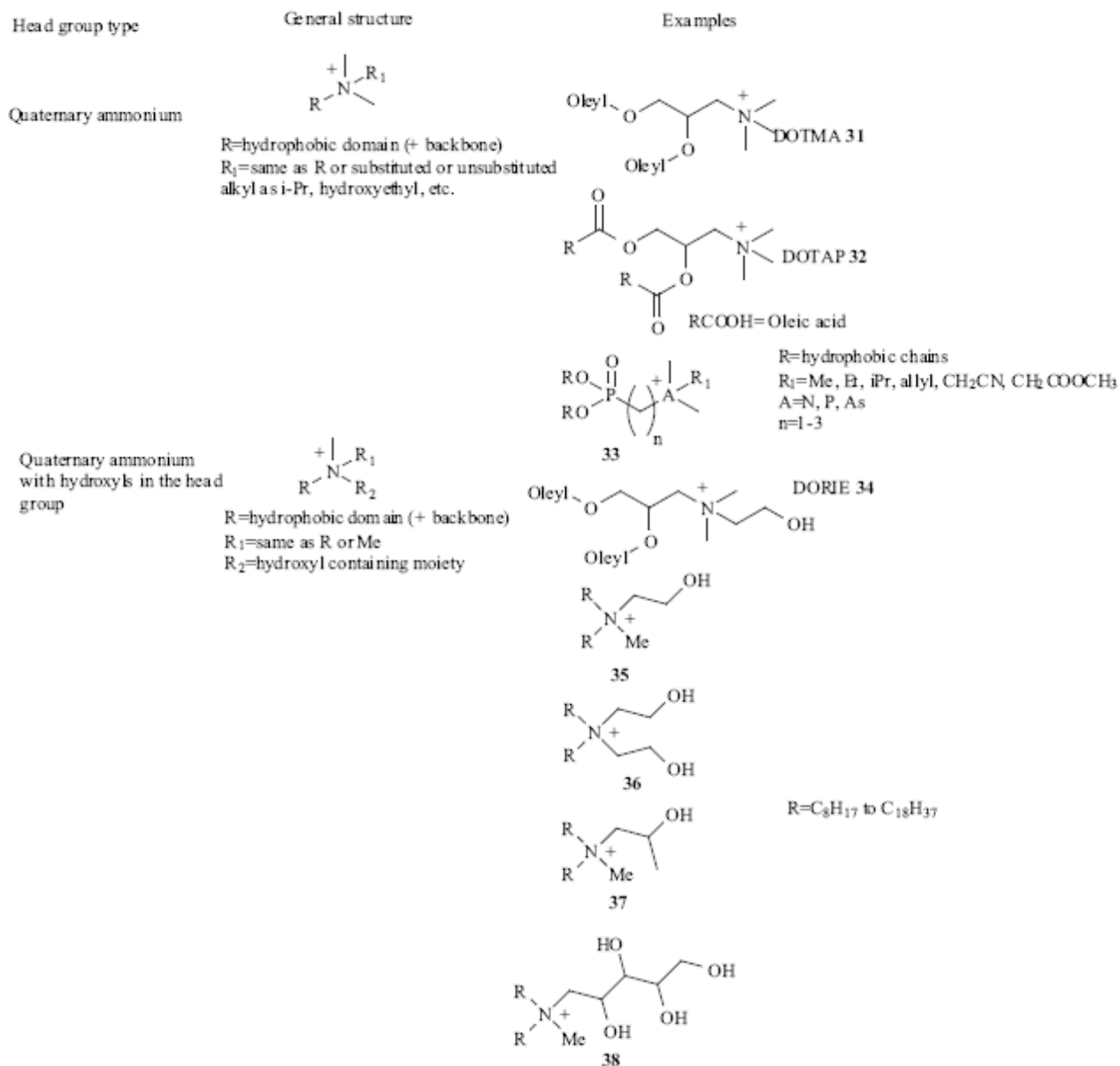
Un ammonio quaternario come testa polare è ampiamente utilizzato in molti dei lipidi cationici noti come il DOTAP **31**, il DOTMA **32**, il DORIE **34** (Schema 8). Importanti parametri che determinano l'efficienza di trasfezione di lipidi con ammoni quaternari sono l'ingombro sterico sull'atomo di azoto, gli effetti elettronici dei sostituenti, e la presenza di gruppi idrofili, più in particolare idrossilici. Nei fosfolipidi **33** con una testa polare con un ammonio trimetilico, la sostituzione di un metile con un allile, con un acetil metile, con un cianometile o con un 2-trimetilammonio-etile porta ad una diminuzione dell'efficienza di trasfezione, dovuta presumibilmente all'ingombro sterico del gruppo carico positivamente, che potrebbe impedire l'interazione con i fosfati carichi negativamente del DNA [136]. Nella stessa classe di lipidi è stato dimostrato che i sostituenti con carattere maggiormente elettron-donatore (come l'isopropile o il butile) hanno un effetto negativo sulla trasfezione rispetto ai corrispondenti composti con un metile o un etile, e questo effetto può essere attribuito all'ingombro sterico [30]. E' stato studiato anche il ruolo degli effetti elettronici dei sostituenti sull'azoto quaternario [144]. La sostituzione di un gruppo etilico con un effetto elettronico induttivo attrattore produce una diminuzione nell'efficienza di trasfezione. L'ordine di

efficienza di trasfezione è 2,2,2-trifluoroetil<2,2,2-tricloroetil<etil. Tuttavia, l'effetto complessivo del sostituente più elettronattrattore (2,2,2-trifluoroetile) è piuttosto modesto (con un'efficienza di trasfezione 3-4 volte inferiore) ed è probabile che gli effetti induttivi non abbiano un ruolo altrettanto rilevante rispetto a quello giocato dall'ingombro sterico. Invece, la presenza di gruppi idrossilici sulla testa polare tende ad avere un effetto positivo, come dimostrato dai lipidi come il DORI e il DORIE [29]. Diversi gruppi hanno sintetizzato lipidi cationici con ammoni quaternari sulla testa polare con una catena idrossialchilica, con risultati variabili [137,145].

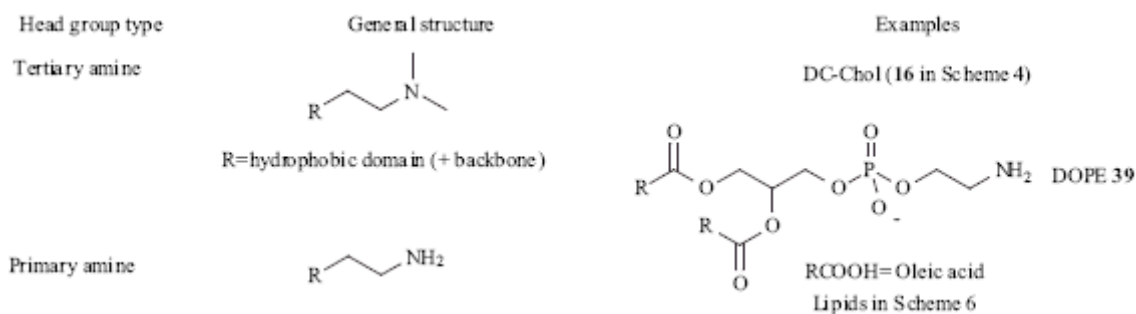
Banerjee *et al.* [146] hanno riportato una serie di lipidi non-glicerolici con una o due catene 2-idrossietiliche sull'ammonio quaternario della testa polare ed hanno visto che i composti con una catena idrossilica **35** sono inattivi mentre quelli con due **36** sono buoni trasfettanti. Spinto da queste scoperte, lo stesso gruppo ha sviluppato glicolipidi cationici con quattro porzioni idrossiliche sulla testa polare **38** [124]. Questi composti condensano il DNA molto scarsamente, come dimostra la loro incapacità a rimuovere l'etidio bromuro. Tuttavia, la loro capacità di trasfezione suggerisce un diverso meccanismo di impaccamento del DNA. Gli autori propongono che il DNA è contenuto nel doppio strato lipidico senza essere condensato. I lipidi con quattro gruppi idrossilici **38** sono meno tossici di quelli con due idrossili **36** [124]. L'effetto delle teste polari con gruppi idrossilici, in grado di ridurre la tossicità, è confermato dalla bassa tossicità del lipide cationico **37** con una catena 2-idrossipropilica ottenuta dalla riduzione di un estere dell'acido lattico [147]. Lo stesso gruppo, rivisitando i lipidi mono o di-idrossietilici non-glicerolici con un ammonio quaternario, ha visto che, a seconda del punto di attacco sul lipide, si possono trovare lipidi attivi anche nelle serie mono-idrossietiliche [138]. Con la sostituzione dell'azoto dell'ammonio quaternario con un fosforo o un arsenico (fosfolipidi **33**) si ottengono teste polari fosfoniche e arseniche, che aumentano l'efficienza di trasfezione e riducono la tossicità [30].

### ***Teste polari amminiche Primarie, Secondarie o Terziarie***

Esistono meno lipidi con una testa polare costituita da un'ammina primaria, secondaria o terziaria (Schema 9). Un esempio sono il DCChol **16**, che ha un'ammina terziaria nella testa polare legata al colesterolo ed il lipide helper DOPE **39** che contiene un'ammina primaria nella testa polare. Altri studi hanno mostrato che per ottimizzare i lipidi cationici con modificazioni sistematiche della testa polare sono state incluse ammine primarie o terziarie insieme a poliamine ed ammoni quaternari [127,137]. Sono stati sintetizzati lipidi dieterei glicerolici **30** con un'ammina primaria nella testa polare, su cui fare saggi di trasfezione e con lo scopo di usarli come partenza per ulteriori derivatizzazioni [31]. Un problema del gruppo amminico primario nella testa polare è la sua incompatibilità, in alcuni casi, con il legame estereo tra le catene idrocarburiche e il *backbone*. Infatti è probabile un trasferimento intramolecolare [148,149] o intermolecolare [44] della catena acilica sull'ammina, soprattutto per ammine deprotonate.



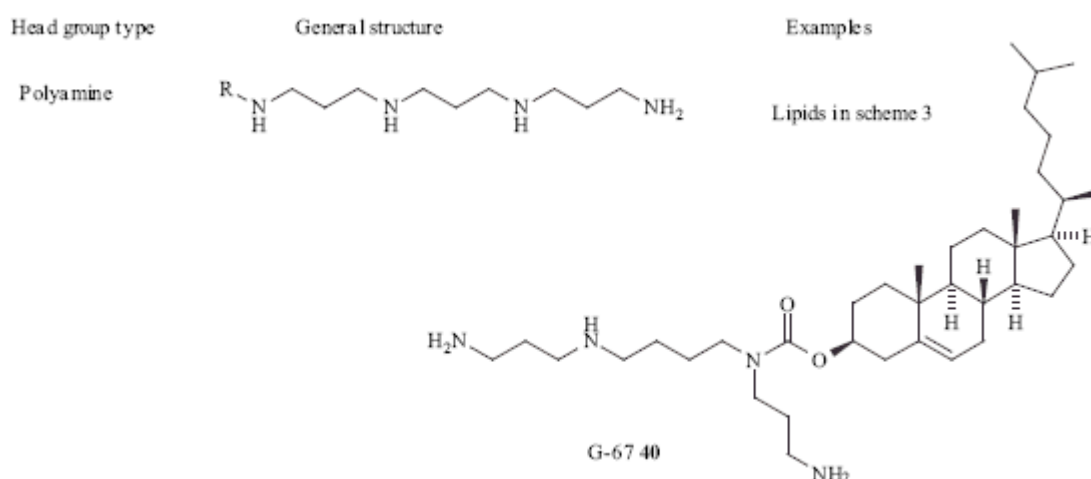
**Schema 8** Lipidi con teste polari con ammoni quaternari: DOTMA 31, DOTAP 32, struttura generale 33, DORIE 34.



**Schema 9** Lipidi con teste polari con ammoni primari e terziari: DOPE 39.

### Testa Polare Poliamminica

Le lipopoliammine sono una delle classi di lipidi cationici più riuscite (per esempio il DOSPA **12** o il DOGS **13**) (Schema 10). Ciò é dovuto alla loro capacità di neutralizzare, condensare e incapsulare efficientemente il DNA ed alla presenza di gruppi amminici deprotonati a pH fisiologico, che provvedono alla capacità di *buffering* nell'endosoma [150]. Alcuni parametri importanti per le teste polari poliamminiche sono ad esempio l'effetto della struttura (lineare, a T, globulare, ramificata) già discusso in precedenza e la lunghezza della catena poliamminica importante per l'efficienza di trasfezione. Le poliammine più lunghe trasfettano meglio [24], ma esiste una lunghezza ottimale (o numero di cariche) sopra la quale la capacità di trasfezione diminuisce [34,43]. Il *molecular modelling* fornisce una spiegazione a questo effetto: poliammine più lunghe di quella ottimale tendono a stare in una conformazione ripiegata che le rendono meno propense ad intergere con il DNA [43]. La polietilenimmina (PEI) è stata anche accoppiata con gruppi esadecilici, per generare lipopoliammine polimeriche. In questo caso, si osserva anche un effetto della lunghezza della catena poliamminica: PEI più corti (600 e 1800 Da) sono più efficienti di quelli più lunghi (25,000 Da) [151]. Un fattore che è risultato essere molto importante in diversi studi è la distanza tra due azoti consecutivi sulla catena poliamminica [24,76,150]. Poliammine con *spacer* non naturali etilici sono meno efficienti nel condensare il DNA, ma hanno una migliore capacità di *buffering*, e sembrano funzionare meglio *in vitro*. Poliammine con *spacer* naturali propilici o butilici condensano il DNA più facilmente e sono più efficienti in *in vivo* [24,150]. Anche lo stato di protonazione del lipide cationico è importante per la trasfezione: è stata trovata una relazione lineare tra il numero di ammine protonate e l'efficienza di trasfezione. Partendo dalla tetrammina del lipide G-67 **40** (Schema 10), sono state ottenute, per titolazione con acido acetico, forme con 0, 1, 2 o 3 ammine protonate. L'efficienza di trasfezione aumenta linearmente dalla forma non protonata a quella completamente protonata [44].



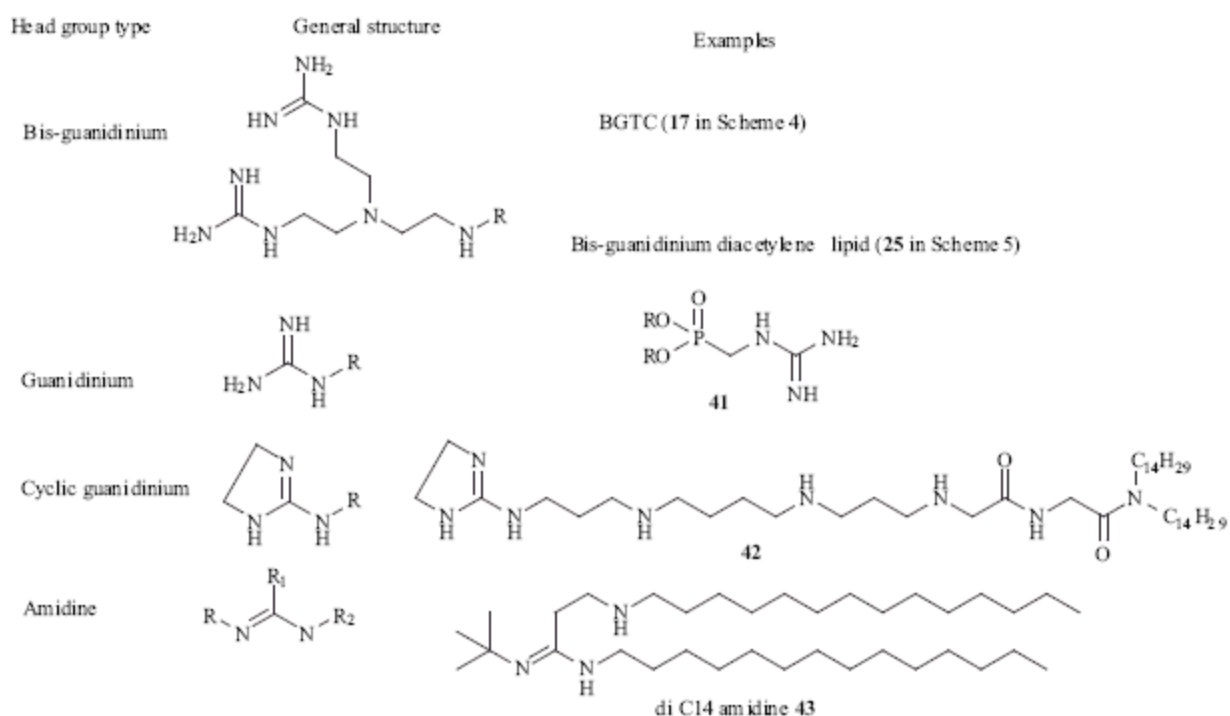
**Schema 10** Lipidi con teste polari poliamminiche: G-67 **40**.

### Testa Polare Guanidinica

Sono state anche proposte teste polari guanidiniche per lipidi cationici in quanto presentano diverse caratteristiche favorevoli, poiché il legame con il DNA è sensibile al pH e sono molto basiche: a) protonate

nel *range* di pH coinvolto nella preparazione del liposoma e nella trasfezione; b) formano coppie di legami idrogeno parallele forti con gli anioni fosfato del DNA; c) possono anche formare legami idrogeno con le basi degli acidi nucleici, in particolare con la guanina.

La testa polare bis-guanidinica ha l'ulteriore vantaggio di possedere un gruppo amminico che si protona a pH endosomiale (pKa circa 7.0), aumentando così il grado di *buffering* [45]. Sono stati studiati diversi lipidi cationici con una bis-guanidina (**17-25**) [23,130], una guanidina (**41**) [30,145] o una guanidina ciclica (**42**) [152] nella testa polare (Schema 11). Anche l'amidina, che ha caratteristiche simili, è stata usata come testa polare per lipidi cationici [93].



**Schema 11** Lipidi con teste polari guanidiniche e amidiniche: bis-guanidinici, guanidici **41**, guanidici ciclici **42**, amidinici **43**.

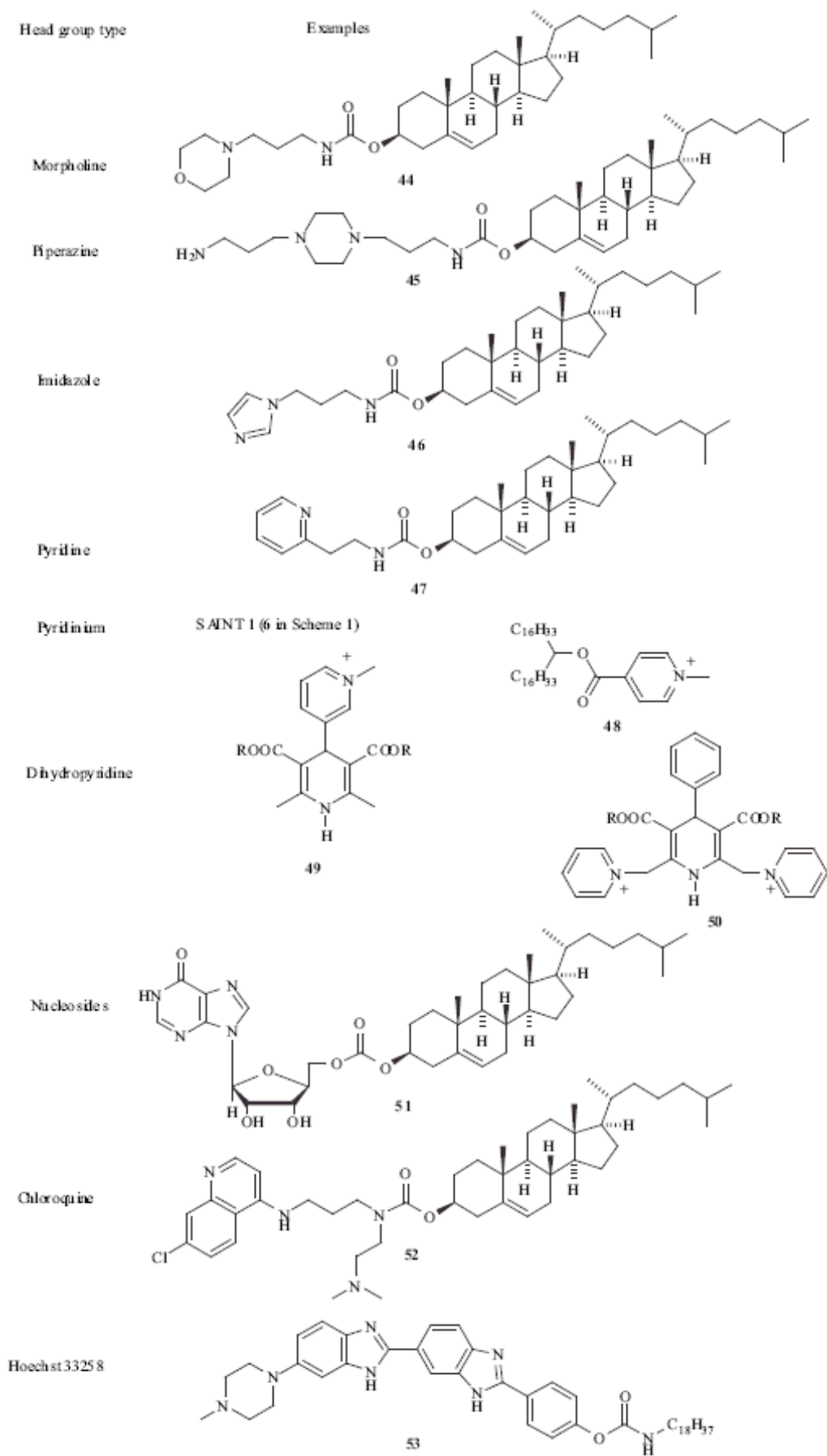
### Testa Polare Eterociclica

Si sono ottenuti e studiati lipidi con gruppi alifatici o aromatici eterociclici nella testa polare (Schema 12). La morfolina e la piperazina sono state coniugate con il colesterolo direttamente o attraverso uno *spacer* (composti **44** e **45**), reggendo bene il confronto con teste polari poliamminiche con un numero simile o più elevato di cariche [126]. Nello stesso lavoro è stato anche riportato l'uso di anelli imidazolic e piridinici, ma con risultati molto scarsi (composti **46** e **47**) [126]. E' stata studiata una serie di anfifili piridinici (**6**, **48**) chiamati SAINT (da *Synthetic Amphiphile IN*teraction). A differenza della testa polare con un ammonio quaternario, la presenza di una lunga catena alifatica sull'azoto carico eterociclico non impedisce la trasfezione, ed inoltre è stata anche sintetizzata una versione gemini di questo lipide, con due teste polari piridiniche separate da uno *spacer* (composto **1**) [120,140].

Hyvonen *et al.* hanno sintetizzato anfifili 1,4-diidropiridinici con una o due cariche, e hanno studiato l'effetto delle modificazioni della testa polare e del dominio idrofobico sulla trasfezione di questa classe di

reagenti [82,153]. Importanti caratteristiche di questa struttura sono il numero di sostituenti carichi e la capacità di buffering dell'azoto sull'anello diidropiridinico.

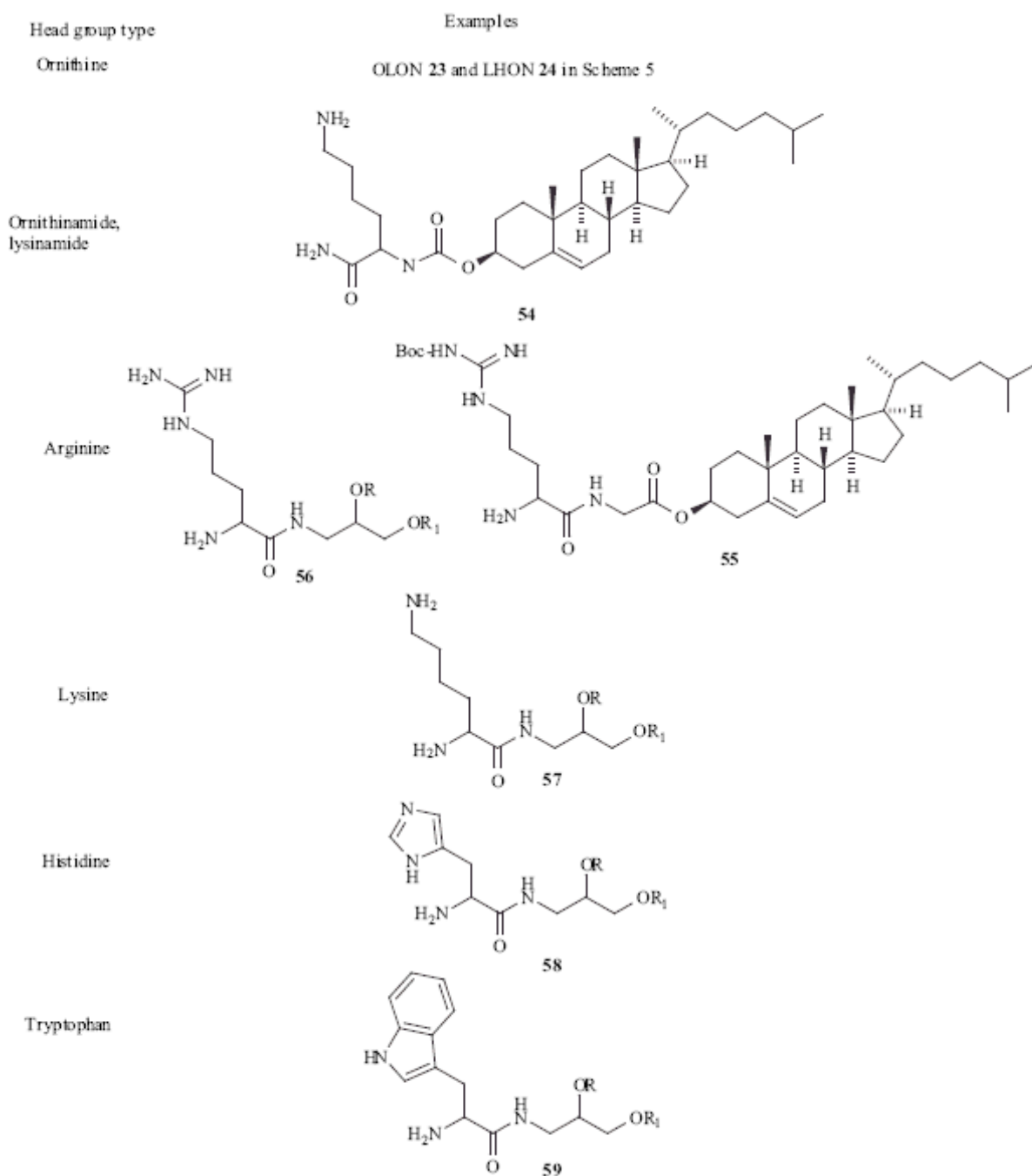
Composti con un sostituito piridinico in posizione 4 della diidropiridina (**49**) non hanno capacità di *buffering* e sono deboli trasfettanti. Il composto **50** con due porzioni metilpiridiniche in posizione 2 e 6 rispetto all'anello diidropiridinico ha la basicità dell'azoto diidropiridinico diminuita con un  $pK_a$  nel range 6-8. Questi composti sono molto più efficienti nel trasfettare ed hanno capacità di *buffering* a livello dell'endosoma. La metilazione di questo azoto cruciale annulla la capacità di *buffering* e l'attività trasfettiva. Sono stati proposti analoghi della cloroquina (per esempio il composto **52**) date le note proprietà di *buffering* della cloroquina nella trasfezione [154]. Anche lipidi con nucleotidi (**51**) sono stati sintetizzati come vettori genici [155] ed è stata provata che danno luogo ad un differente tipo di interazione DNA-lipide: l'Hoechst 33258 intercala il DNA più che interagire con esso elettrostaticamente. Un lipide con una tale testa polare (**53**) è stato usato come modello per liposomi cationici che complessano il DNA in una maniera differente, non elettrostatica [156].



**Schema 12** Lipidi con teste polari eterocicliche: morfolina 44, piperazina 45, imidazolo 46, piridina 47, piridinio 48, diidropiridina 49-50, nucleosidi 51, cloroquina 52, Hoechst33258 53.

### Testa Polare Aminoacidica

Sono stati usati anche degli aminoacidi come teste polari (Schema 13). Aminoacidi dibasici come l'ornitina sono stati considerati adatti ad interagire con il DNA ed usati nei lipidi cationici **23** e **24** [36,157]. E' stato anche riportato l'utilizzo della lisinamide (composto **54**), dell'ornitinamide [119] e dell'arginina stericamente protetta con il Boc (composto **55**) [158]. Inoltre, sono stati sintetizzati derivati lipidici con la lisina (**56**), l'arginina (**57**), l'istidina (**58**) ed il triptofano (**59**). I risultati più promettenti sono stati ottenuti con i composti con lisina e arginina **56** e **57** [31].

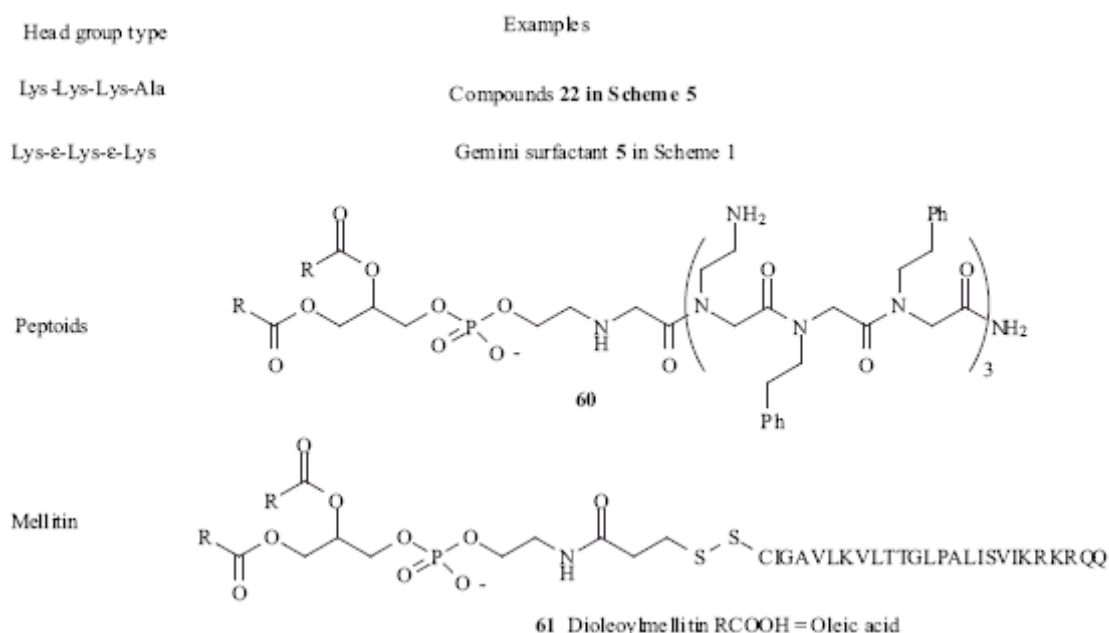


**Schema 13** Lipidi con teste polari aminoacidiche: ornitina **23** e **25** (vedi Schema 5), ornitinamide e lisinamide **54**, arginina **55-56**, lisina **57**, istidina **58**, triptofano **59**.

### Testa Polare Peptidica

Alcuni esempi di questa classe sono riportati nello Schema 14. Corte sequenze di polilisine (K3, K3A) sono state usate nei lipidi cationici per condensare il DNA [37,132]. Nel tensioattivo gemini **5** (Schema 1), il ponte più efficace con lisina è quello attraverso il gruppo  $\epsilon$ -aminico più che  $\alpha$ -aminico come invece accade nei normali legami peptidici [37]. I peptoidi (glicine poli-N-sostituite) **60**, sono stati coniugati su supporto solido con lipidi neutri, per ottenere lipidi policationici e in questo caso la carica positiva è data da una catena etilenamminica. Un peptoido formato da un trimero ripetuto di catene laterali positive neutre sembra essere il più efficiente nei saggi di trasfezione. Una più alta densità di carica è dannosa per la trasfezione [159]. Peptidi endosomolitici come la mellitina, sono stati usati come teste polari nella dioleilmellitina **61**, giocando il doppio ruolo di legante del DNA e distruttore endosomiale [96]. Alcune teste polari cationiche contengono elementi di più di una classe. Sono stati riportati per esempio il GAP-DLRIE, che contiene sia gruppi amminici quaternari che amminici primari [18], o la poliamina che contiene una guanidina ciclica **42** [152]. Confronti diretti tra diversi tipi di teste polari sono riportati nei riferimenti [30,127,137,145].

Per riassumere, le teste polari cationiche giocano un ruolo essenziale nella condensazione del DNA, e nell'*escape* endosomiale. Teste polari con ammine con  $pK_a$  intorno a 7.0 come la 1,4-diidropiridina [153], la cloroquina [154], il bis-guanidinio [23] o le poliammine con *spacer* etilenico [150] possono agire da tamponi endosomiali e portare alla fuoriuscita del complesso. La tossicità del lipide può essere modulata da modificazioni sulla testa polare come la sostituzione di un ammonio con un gruppo fosfonico o un arsenico [30], con l'uso di glicine betainiche [121] o di derivati ridotti dell'acido lattico [147]. La testa polare può anche servire come punto di attacco di ulteriori moduli come catene di PEG e porzioni *targeting*.



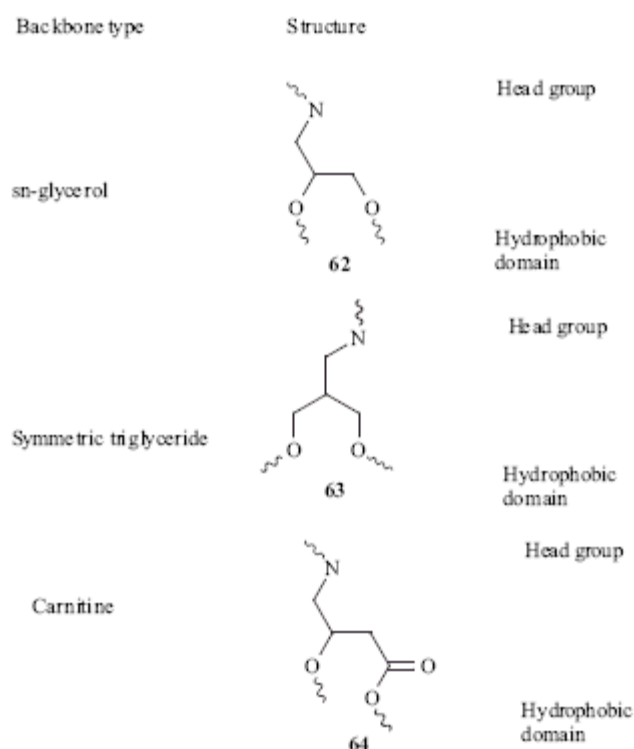
**Schema 14** Lipidi con teste polari peptidiche: Peptoidi **60**, Mellitina **61**.

## Il Dominio backbone

Il *backbone* separa la testa polare dal dominio idrofobico ed agisce come uno *scaffold* sul quale il lipide cationico è costruito. Alcuni lipidi, come il DC-Chol, il BGTC [23], il G-67 [160] o i lipidi descritti da Banerjee *et al.* [146] non possiedono un *backbone* e la testa polare è legata direttamente al dominio idrofobico. Comunque, la maggior parte dei lipidi comunemente usati o in sviluppo hanno un *backbone*, solitamente basato sul glicerolo. Altri tipi di *backbone* comuni sono fosfogliceroli, fosfonati, amino-acidi e gruppi aromatici. Oltre a questi sono stati descritti alcuni altri interessanti esempi che non rientrano in nessuna di queste classi.

### **Backbone Glicerolico** (Schema 15)

Lipidi commerciali come il DOTMA, il DOTAP e il DOSPA hanno in comune un *backbone* glicerolico. Il glicerolo è il *backbone* naturale di molti lipidi naturali e i lipidi basati su questo *scaffold* (**62**) hanno le catene idrofobiche agganciate in posizione 1 e 2 e la porzione amminica in posizione 3; quindi sono insitamente asimmetrici (anche se le catene idrofobiche sono identiche). E' stata sintetizzata una serie di composti con una diversa disposizione simmetrica, con il gruppo centrale in posizione 2 e le catene idrofobiche in posizione 1 e 2 (**63**) [141]. La capacità di trasfezione è molto simile tra questo trigliceride simmetrico e il comune *scaffold* glicerolico, però gli autori indicano che questa struttura è più facile da sintetizzare. E' stato studiato l'effetto della modifica della distanza relativa tra le catene idrofobiche, o tra il dominio idrofobico e la testa polare dovuto all'allungamento del *backbone* [19,134]. Questo studio ha mostrato che i lipidi che danno un'efficienza di trasfezione più alta *in vivo* hanno la testa polare e la vicina catena alifatica in 1, 2 [19]. Una struttura come la carnitina (**64**) in cui il gruppo 1-idrossilico del glicerolo è sostituito da un gruppo carbossilico è stata usata per ottenere lipidi cationici biodegradabili [139]. La struttura ha un atomo di carbonio in più connesso al glicerolo, e quindi aumenta la flessibilità della regione vicina alle code idrofobiche. Inoltre, dal momento che possiede due differenti gruppi funzionali, idrossilici e carbossilici, che collegano le catene idrocarburiche, code di differenti lunghezze, che creano domini idrofobici asimmetrici, sono facili da introdurre nella struttura.

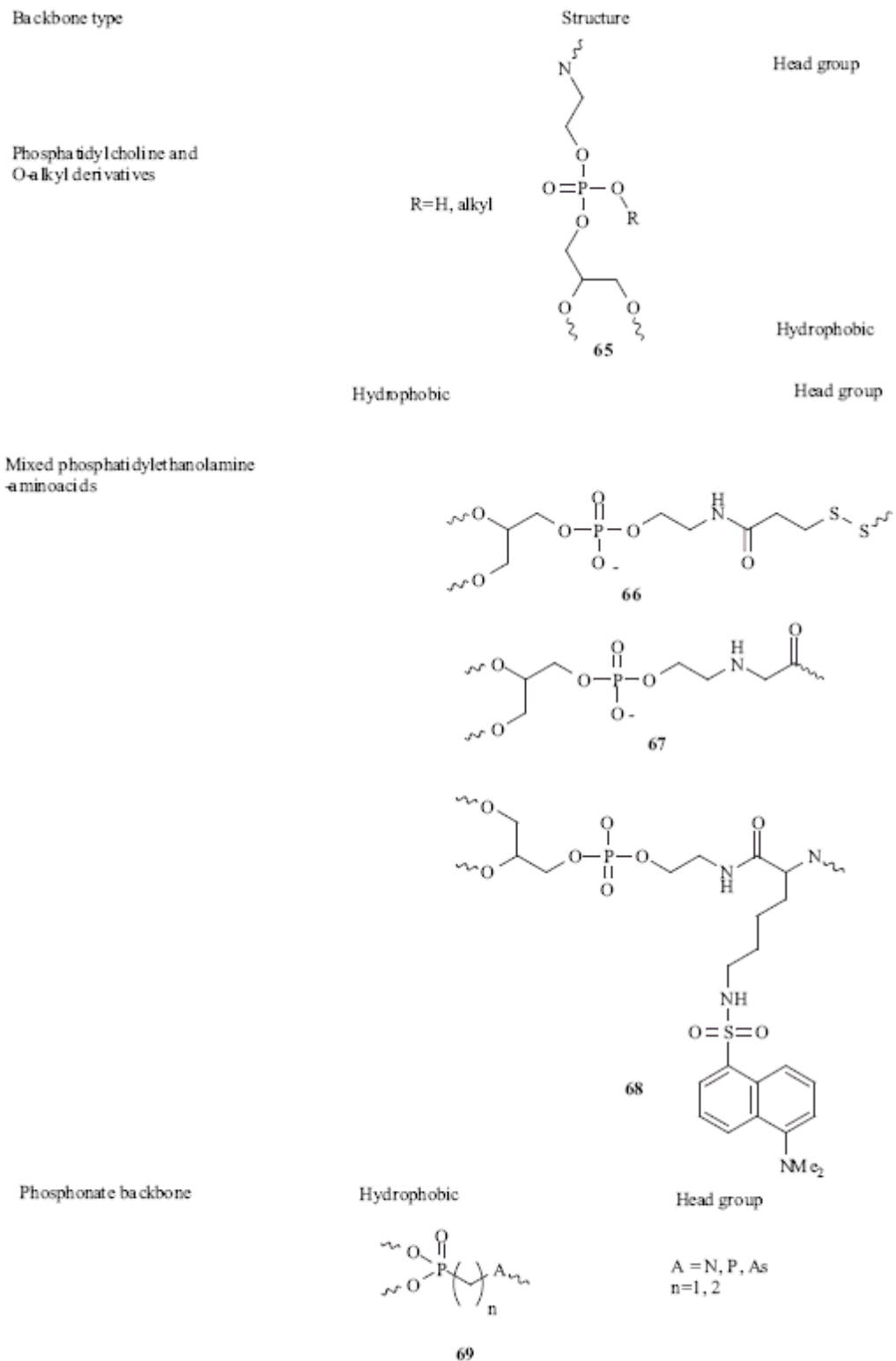


**Schema 15** Lipidi con *backbone* glicerolici: sn-glicerolo **62**, triglicerolo simmetrico **63**, carnitina **64**.

### ***Backbone Fosfato e Fosfonato*** (Schema 16)

La fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina sono tra i più comuni motivi delle membrane biologiche lipidiche. Diversi lipidi comprendono il backbone fosfatidilico, il più noto tra di essi è il lipide *helper* DOPE. Vi è una somiglianza tra questo *backbone* ed i lipidi naturali ed è stato scelto per diminuire la tossicità di lipidi cationici [161]. Questo *backbone* introduce una carica negativa, che neutralizza la carica positiva presente sulla testa polare cationica. Per creare lipidi cationici fosfatidilcolinici, la carica sul fosfato può essere rimossa con un'alchilazione con catene alchiliche di lunghezza variabile (**65**) [161,133]. I lipidi cationici con questi *backbone* sono biodegradabili, a bassa tossicità, chimicamente stabili (ad eccezione dell'estere metilico) e trasferiscono bene. Il *backbone* di fosfatidiletanolamina è stato usato in coniugazione con aminoacidi (**67**, **68**) o con acidi alifatici di-tiolicci (**66**), per creare *backbone* estesi misti [96,159,162]. Questi *backbone* fosfatidiletanolaminici-aminoacidici combinano la bassa tossicità del fosfato con la versatilità degli aminoacidi.

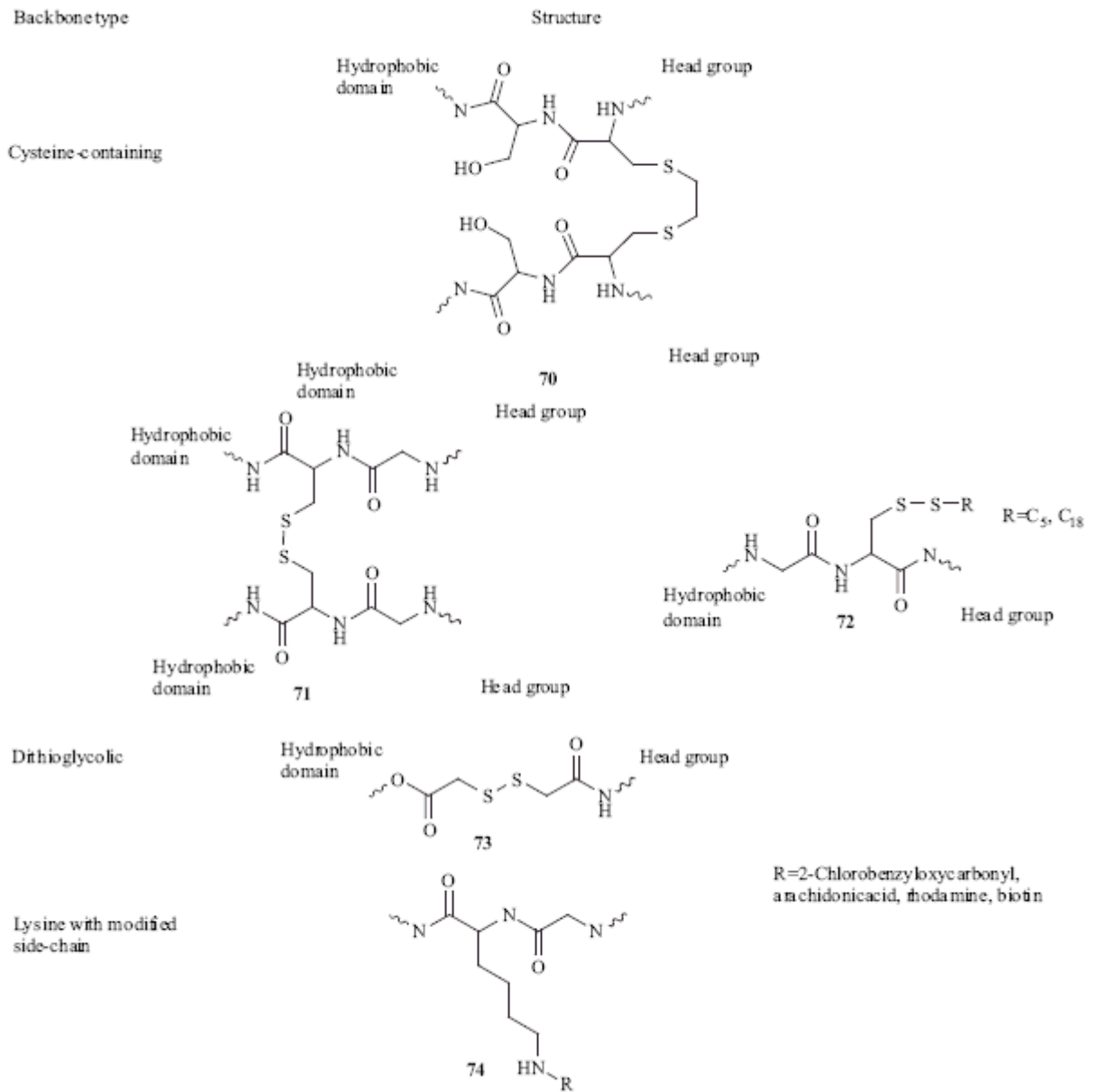
I fosfolipidi (**69**) hanno un *backbone* piuttosto simile a quello del glicerofosfato naturale ma senza la sua instabilità idrolitica e sono più facili da sintetizzare [145]. Diversi studi struttura-attività sono stati condotti su questi composti [30,136,145]. In termini di lunghezza del *backbone* (la distanza tra le code lipidiche che portano i fosfonati e la testa polare carica), è stata trovata una dipendenza con la natura della testa polare. La lunghezza di un metilene è la migliore per l'ammonio quaternario, mentre le più voluminose teste polari con un fosfonio o un arsenico funzionano meglio quando il *backbone* è lungo due metilene [30].



**Schema 16** Lipidi con *backbone* fosfatidilici **65-68** e fosfonati **69**.

### ***Backbone Aminoacidici e Peptidici*** (Schema 17)

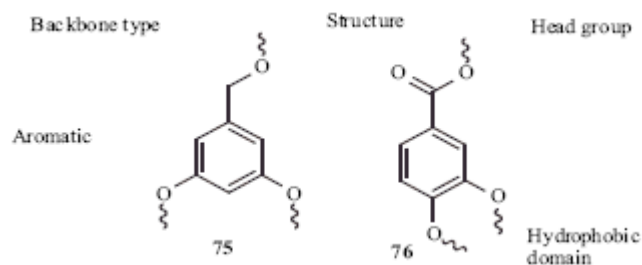
Aminoacidi e corti peptidi sono stati usati come *backbone*, data la loro versatilità e la loro chimica di coniugazione ben nota. Sono stati usati *backbone* composti solo da aminoacidi [34,35,37,163] o *backbone* misti fosfatidiletanolaminici-aminoacidici, come menzionato prima [96,159,162]. Uno dei principali vantaggi di *backbone* aminoacidici è la presenza e la facilità di manipolazione delle loro catene laterali; per esempio, lipidi cationici contenenti due cisteine sono stati uniti per formare tensioattivi gemini (**3**, **4**). Questo accoppiamento è stato fatto attraverso la conversione di *backbone* di cisteina-serina in S,S'-etanediil bis-cisteina-serina (**70**) [37] o dalla creazione di un ponte disolfuro tra due dipeptidi glicina-cisteina (**71**) [35]. La catena laterale cisteinica non è solo stata trasformata in un disolfuro simmetrico Cys-Cys, ma anche usata per aggiungere altri gruppi oltre alla cisteina. Attraverso questo metodo è stata coniugata una catena idrofobica in più alla catena laterale (**72**) [35]. Lo scopo di introdurre legami disolfuro nel *backbone* o tra il *backbone* e i gruppi laterali è quello di indurre la rottura del liposoma in ambiente cellulare, con conseguente rilascio del DNA e/o rilascio endosomiale. *Backbone* contenenti disolfuri sono stati costruiti non solo con aminoacidi, ma anche con tioli contenenti acidi alifatici come acidi ditioglicolici (**73**) [28] o ditio-propionati [96]. È stato studiato l'effetto della carica sulla catena laterale di *backbone* aminoacidici per quanto riguarda l'efficienza di trasfezione. Arginine e lisine con cariche positive ed acidi glutammici con carica negativa sono stati usati tutti come *backbone*. L'introduzione di una carica positiva in più diminuisce l'efficienza, mentre l'acido glutammico carico negativamente la aumenta. Dal momento che la testa polare cationica contiene già quattro gruppi amminici, è probabile che questo effetto sia dovuto alla necessità di un numero ottimale di cariche positive sulla testa polare, come discusso prima. Un'ulteriore modificazione dell'arginina ad Arg(Z2) o sulla lisina da un  $\epsilon$ -azoto ad un 2-clorobenzilossicarbonile (**74**) produce lipidi con buona attività [34]. È stato anche usato il gruppo amminico primario sulla catena laterale del *backbone* aminoacidico per agganciare porzioni *targeting* come acidi arachidonici, biotine o marcatori fluorescenti come la rodamina (**74**) [34] o il dansile (**68**) [162].



**Schema 17** Lipidi con *backbone* amonoacidici 70-72 e tioalifatici 73-74.

### **Backbone Aromatico** (Schema 18)

Anelli aromatici sostituiti sono stati usati come *backbone* data la loro versatilità, facilità e selettività di coniugazione con gruppi idrofobici, idrofili e cationici. Esempi di alcuni *backbone* sono il 3, 5-diidrossibenzil alcol (**75**) [135] e l'acido 3, 4-diidrossi benzoico (**76**) [157].

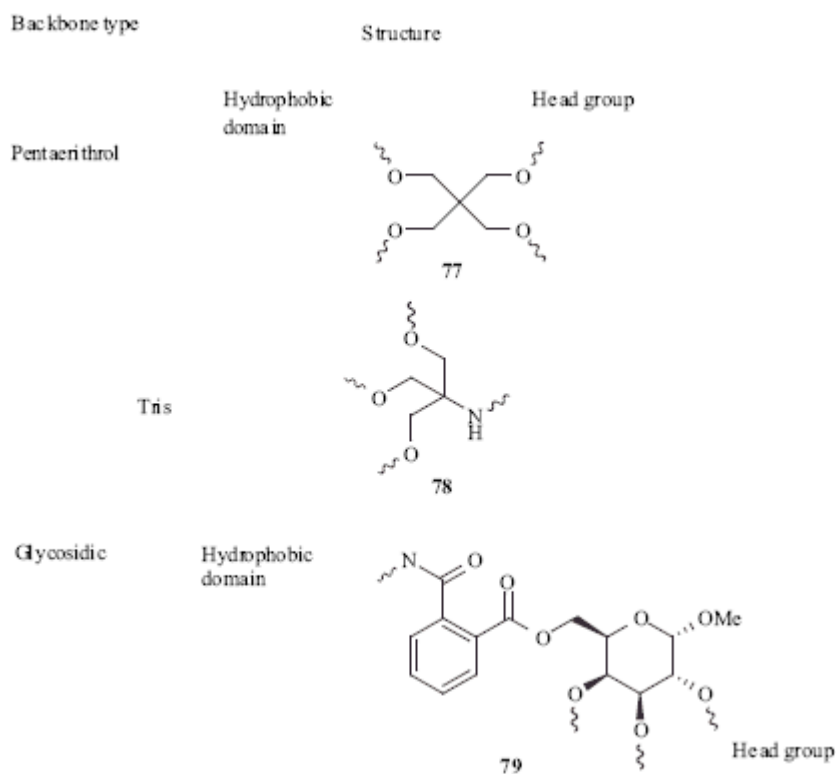


**Schema 18** Lipidi con *backbone* aromatici **75-76**.

### **Altri Backbone** (Scheme 19)

Altri interessanti esempi di *backbone* che non appartengono a nessuna delle categorie descritte prima sono pentaeritroli, *tris linkage* e glucosidi. Il *backbone* pentaeritrolo (**77**) è stato utilizzato per introdurre legami esterei biodegradabili sia tra la testa polare e il *backbone* che tra le code idrofobiche e il *backbone* [74]. Il *tris linkage* (**78**) è versatile e permette la preparazione di domini idrofobici con una, due o tre catene idrofobiche uguali o diverse [132]. La logica che ha portato alla sintesi di un *backbone* glicosidico (**79**) è quella di creare una densità spaziale organizzata delle cariche positive che potrebbe fare un'interazione più stretta con il DNA [164].

In conclusione, il *backbone* determina la posizione relativa dei gruppi idrofobici e cationici e il grado di flessibilità relativa l'una dell'altra. Può essere origine di una maggiore versatilità, che permette la coniugazione di gruppi *targeting*, catene di polietilenglicole. Il *backbone* influenza anche la tossicità del lipide e la sua struttura può giocare un ruolo nel rilascio del DNA e nell'*escape* endosomiale.



**Schema 19** Lipidi con altri *backbone*: pentaeritrolo **77**, Tris **78**, glicosidi **79**.

## Legami Linker

Per lipidi senza un *backbone*, la porzione idrofobica e la testa polare cationica sono connesse direttamente, solitamente attraverso un *linker*. Un esempio è il *linker* carbamato tra la coda colesterolica e la 2-dimetilaminoetil-amina del DCChol. Per lipidi con un *backbone*, si possono identificare due *linker* distinti: catena idrofobica-*backbone* e testa polare cationica-*backbone*. Esempi del primo caso sono il legame estereo tra catene oleiliche e il *backbone* glicerico nel DOTAP o i legami eterei tra le catene oleiliche ed il *backbone* glicerico del DOTMA. Sono stati usati *linker* teste polari cationici-*backbone* per ottenere lipidi più degradabili attraverso la rimozione di una testa polare *in vivo*. Esempi sono *linker* esterei tra testa polare cationica e *backbone* nei lipidi di Aberle e colleghi [74] o il legame bioriducibile S-S tra mellitina e *backbone* nei lipidi dioleilmellitini [96]. I *linker* possono essere classificati secondo la loro stabilità chimica e la loro biodegradabilità: carbamati (come nel DC-Chol) e amidi (nel DOGS [21]) sono chimicamente stabili e biodegradabili, esteri [74] e carbonati [137] sono biodegradabili ma non sono molto stabili chimicamente ed eteri [31] che sono chimicamente stabili e non biodegradabili. Per altre classi chimiche di *linker* la distinzione non è così chiara o non ci sono molti studi sulla loro biodegradabilità o stabilità. Il fosfato diestereo (come nel DOPE) è biodegradabile ed ha stabilità chimica più alta di quella di esteri ma più bassa di quella delle amidi. I fosfonati [145] sono idroliticamente più stabili dei fosfati e presumibilmente biodegradabili, mentre i chetali sono sensibili agli acidi, quindi presumibilmente più stabili a pH 7-8 degli esteri, ma sono biodegradati ad acidi all'intero delle cellule; tuttavia, non sono disponibili dati biologici [165]. I legami disolfuro sono biodegradabili e sono chimicamente stabili purché non siano presenti agenti riducenti [35,96]. Importante è il confronto tra esteri ed eteri. Gli esteri sono stati considerati poiché

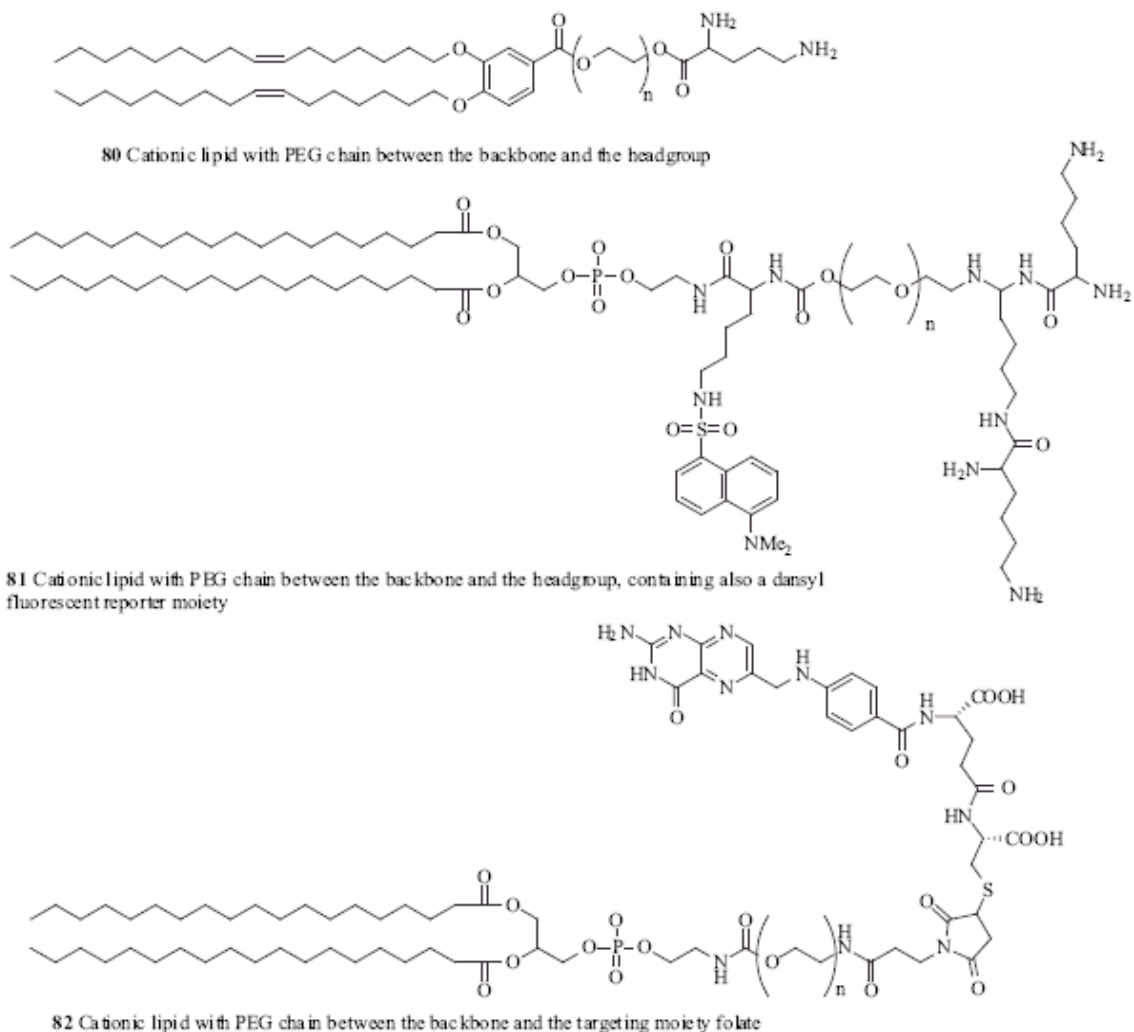
sono più biocompatibili, e tendono a diminuire la tossicità dei lipidi [74,138,140,166]. La maggior parte degli studi tuttavia sono in accordo sul fatto che essi tendano a dare idrolisi più facilmente rispetto ad altri tipi di legame. E' anche stato trovato che sono anche propensi a transacilare, soprattutto quando è presente nella struttura o nella formulazione un gruppo amminico primario [44,148]. Esistono tuttavia lipidi con *linker* esterei in uso commerciale che sono attivi (per esempio il DOPE), quindi questa caratteristica non sempre è un problema. Un lipide cationico con *linkage* esterei sia tra teste polari ed il *backbone* che tra catena idrofobica ed il *backbone*, il YKS-220, sembra essere stabile durante la conservazione per 12 mesi [166]. E' stata studiata in dettaglio l'idrolisi di un legame estereo tra la testa polare piridinica ed il dominio idrofobico [140]: pH più bassi inibiscono fortemente l'idrolisi, pertanto l'ambiente endosomiale acido non porta alla rottura del legame estereo di questi composti. A pH 7.4, l'emivita dei composti con il gruppo carbossilico in *para* rispetto all'azoto eterociclico è più breve di quella dell'analogo con il gruppo in *meta*. Questo effetto può essere attribuito alle differenze degli effetti di risonanza sull'anello piridinico elettroneattrattore. Gli analoghi *meta* hanno anche una attività di trasfezione più elevata. Gli esteri con catene sature sono idrolizzati più rapidamente di quelli con catene insature, comunque gli autori hanno enfatizzato che *in vivo* l'idrolisi enzimatica è probabilmente predominante sull'idrolisi chimica. Un altro effetto del *linkage* estereo riguarda la rigidità del doppio strato. Uno studio ha mostrato che anfifili basati su esteri del colesterolo inducono una maggiore curvatura del doppio strato rispetto agli analoghi eterei, soprattutto quando formulati con la dipalmitoilfosfatidil colina (DPPC). L'effetto è probabilmente dovuto alle interazioni dipolo-dipolo del legame carbonilico dell'estere, che porta la DPPC e anfifilo colesterolico ad avvicinarsi [167].

Il *linkage* estereo più stabile migliora l'attività trasfettiva rispetto a quella di anfifili basati su esteri od uretani [167-169]. Scoperte simili sono state riportate da Ren *et al.* [19] che hanno mostrato che *linker* dieterei tra la catena idrocarburica ed il *backbone* di tipo glicerolico è migliore del diestere o di *linker* misti eterei-esterei. Altri parametri del *linker* che influenzano il comportamento generale dei lipidi cationici sono l'effetto induttivo, la polarità e la lunghezza. In una serie di composti formati da colesterolo-linker e teste polari terziarie o quaternarie, l'effetto induttivo del *linker* estereo diminuisce la basicità della testa polare amminica e l'efficienza di trasfezione. *Linker* più lunghi aumentano la distanza tra l'estere e la testa amminica portando al ripristino della normale basicità [137]. Nei composti con *linker* succinilici, caratterizzati da un *linkage* ammidico più polare, si ha un'efficienza di trasfezione maggiore di quella dei composti con un estere meno polare [137]. La lunghezza del *linker* influenza il comportamento lipidico in diversi modi, la diminuzione dell'effetto induttivo all'allungarsi della catena è appena stato menzionato [137], inoltre il *linker* contribuisce alla flessibilità conformazionale della molecola e potrebbe restringere i possibili orientamenti relativi delle porzioni idrofobiche e cationiche [43]. Il livello di idratazione del lipide può anche essere determinato dalla lunghezza del *linker*. Incorporando unità ossietileniche tra la porzione colesterolica e la testa polare il livello di idratazione aumenta e diminuisce l'efficienza di trasfezione [169]. L'aggregazione dei lipidi può essere diminuita dall'introduzione di unità ossietileniche tra le code idrocarburiche e il glicerolico e l'introduzione di due gruppi ossietilenici tra una delle catene idrofobiche ed

il glicerolo, porta ad una maggiore attività trasfettiva, anche in presenza del siero. Aumentando il numero di ossietileni si ha però un aumento della tossicità [142]. Un *linker* disolfuro tra la catena idrofobica ed il *backbone* cisteinico viene ridotto con maggiori difficoltà di un legame disolfuro sulla catena laterale del *backbone* o tra la testa polare e il *backbone*, a causa della natura idrofila degli agenti riducenti cellulari. Questa cinetica di riduzione sembra essere ottimale per applicazioni in *gene delivery*. Inoltre, il composto rimasto dopo la rimozione riduttiva di una delle catene idrocarburiche contiene una coda idrofobica e agisce da detergente inducendo il rilascio endosomiale del complesso [163].

### ***Catene di Polietilenglicole***

Catene di polietilenglicole sono state attaccate al lipide per ottenere stabilità, per aggirare il sistema immunitario, per ottenere la solubilità in acqua e migliorare la biodistribuzione dei liposomi. Il ruolo del PEG nelle formulazioni liposomiali è stato discusso prima. Il PEG è connesso al lipide in due modi: attaccato alla testa polare di lipidi neutri come il DOPE [86], il DPPE [114], le ceramidi [111,81] ed il colesterolo [86] o intercalato tra il *backbone* e la testa polare cationica (**80, 81**) [157,162]. Sono stati usati PEG di lunghezza variabile e si è scoperto che il PEG più lungo aumenta la stabilità e diminuisce l'immunogenicità, ma anche l'efficienza di trasfezione [81,86]. Gruppi *targeting* sono stati attaccati sulla parte finale della catena di PEG (**82**), per aumentare la specificità dei liposomi e per ripristinare la capacità di trasfezione (Schema 20) [86].



**Schema 20** Lipidi contenti catene di polietilenglicole **80-82**.

### **Porzioni Targeting**

Sono state usate porzioni *targeting* per aumentare l'*uptake* e la selettività dei liposomi verso certi tipi di tessuti. Sono stati proposti come gruppi *targeting*, folati [86,114], galattosi [40,88], transferrine [118] ed anticorpi. Queste porzioni *targeting* possono essere incluse nel liposoma: per formulazione diretta, senza legami covalenti con il lipide [118]; coniugate con il lipide *helper* [86,114]; o connesse direttamente ai lipidi cationici [40,88]. Il composto **9** è un esempio di lipide cationico coniugato con una porzione *targeting* (galattosio).

Lo sviluppo di lipidi cationici come vettori per *gene delivery* ha fatto progressi significativi negli ultimi anni. Numerose delle principali barriere biologiche per una trasfezione efficiente sono state identificate e grandi sforzi sono stati fatti per mettere a punto strategie per superarle. Attraverso una modificazione sistematica della struttura dei lipidi cationici, sono stati individuati i fattori che governano il comportamento *in vitro* ed *in vivo* di questi lipidi e liposomi. Combinando la più approfondita conoscenza

dei *pathway* biologici coinvolti nel *gene delivery* con le informazioni sulle relazioni struttura-attività, si possono ottenere vie sintetiche migliori, protocolli di formulazione più sicuri e vettori lipidici di rilievo clinico. L'introduzione di elementi aggiuntivi come la distruzione delle membrane, le proprietà *targeting* o l'innescò del rilascio del DNA rappresenta alcuni esempi di nuove possibilità che si aprono nel campo dei vettori non-virali. Vettori modulari che si possono assemblare in modo combinatoriale e che includono molti di questi elementi, sono una via verso la produzione di virus sintetici, che possiedono efficienti meccanismi virali per entrare nella cellula e per l'espressione genica, ma evitano i problemi di sicurezza causati dai virus.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Niculescu-Duvaz, I.; Spooner, R. A.; Marais, R.; Springer, C. J. S. *Bioconjugate Chemistry* 1998, 9, 4-22.
- [2] Springer, C. J.; Niculescu-Duvaz, I. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1996, 22, 351-364.
- [3] Kirn, D.; Niculescu-Duvaz, I.; Hallden, G.; Springer, C. J. *Trends in Molecular Medicine* 2002, 8, S68-S73 Suppl S.
- [4] Koehler, D. R.; Hitt, M. M.; Hu, J. *Molecular Therapy* 2001, 4, 84-91.
- [5] Chene, P. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2001, 11, 923-935.
- [6] Szymkowski, D. E. *Drug Discovery Today* 1996, 1, 415-428.
- [7] Crystal, R. G. *Science* 1995, 270, 404-410.
- [8] MacLachlan, I.; Cullis, P.; Graham, R. W. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 1999, 1, 252-259.
- [9] Hart, S. L. *Expert Opinion On Therapeutic Patents* 2000, 10, 199-208.
- [10] Wu, G. Y.; Wu, C. H. *Journal of Biological Chemistry* 1987, 262, 4429-4432.
- [11] Bennis, J. M.; Choi, J. S.; Mahato, R. I.; Park, J. S.; Kim, S. W. *Bioconjugate Chemistry* 2000, 11, 637-645.
- [12] Monsigny, M.; Roche, A. C.; Midoux, P.; Mayer, R. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1994, 14, 1-24.
- [13] Boussif, O.; Lezoualch, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, 92, 7297-7301.
- [14] Fajac, I.; Allo, J. C.; Souil, E.; Merten, M.; Pichon, C.; Figarella, C.; Monsigny, M.; Briand, P.; Midoux, P. *Journal of Gene Medicine* 2000, 2, 368-378.
- [15] Pack, D. W.; Putnam, D.; Langer, R. *Biotechnology and Bioengineering* 2000, 67, 217-223.
- [16] Felgner, P. L.; Gadek, T. R.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H. W.; Wenz, M.; Northrop, J. P.; Ringold, G. M.; Danielsen, M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987, 84, 7413-7417.
- [17] Stamatatos, L.; Leventis, R.; Zuckermann, M. J.; Silvius, J. R. *Biochemistry* 1988, 27, 3917-3925.
- [18] Wheeler, C. J.; Felgner, P. L.; Tsai, Y. J.; Marshall, J.; Sukhu, L.; Doh, S. G.; Hartikka, J.; Nietupski, J.; Manthorpe, M.; Nichols, M.; Plewe, M.; Liang, X. W.; Norman, J.; Smith, A.; Cheng, S. H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, 93, 11454-11459.
- [19] Ren, T.; Song, Y. K.; Zhang, G.; Liu, D. *Gene Therapy* 2000, 7, 764-768.
- [20] Obika, S.; Yu, W.; Shimoyama, A.; Uneda, T.; Miyashita, K.; Doi, T.; Imanishi, T. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1997, 7, 1817-1820.
- [21] Behr, J. P.; Demeneix, B.; Loeffler, J. P.; Mutul, J. P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989, 86, 6982-6986.
- [22] Solodin, I.; Brown, C. S.; Bruno, M. S.; Chow, C. Y.; Jang, E. H.; Debs, R. J.; Heath, T. D. *Biochemistry* 1995, 34, 13537-13544.

- [23] Vigneron, J. P.; Oudrhiri, N.; Fauquet, M.; Vergely, L.; Bradley, J. C.; Basseville, M.; Lehn, P.; Lehn, J. M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, 93, 9682-9686.
- [24] Cooper, R. G.; Etheridge, C. J.; Stewart, L.; Marshall, J.; Rudginsky, S.; Cheng, S. H.; Miller, A. D. *Chemistry-a European Journal* 1998, 4, 137-151.
- [25] Gao, X.; Huang, L. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1991, 179, 280-285.
- [26] Moradpour, D.; Schauer, J. I.; Zurawski, V. R.; Wands, J. R.; Boutin, R. H. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996, 221, 82-88.
- [27] Tang, F. X.; Hughes, J. A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998, 242, 141-145.
- [28] Tang, F. X.; Hughes, J. A. *Bioconjugate Chemistry* 1999, 10, 791-796.
- [29] Felgner, J. H.; Kumar, R.; Sridhar, C. N.; Wheeler, C. J.; Tsai, Y. J.; Border, R.; Ramsey, P.; Martin, M.; Felgner, P. L. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 2550-2561.
- [30] Floch, V.; Loisel, S.; Guenin, E.; Herve, A. C.; Clement, J. C.; Yaouanc, J. J.; des Abbayes, H.; Ferec, C. *Journal of Medicinal Chemistry* 2000, 43, 4617-4628.
- [31] Heyes, J.; Niculescu-Duvaz, D.; Cooper, R. G.; Springer, C. J. *Journal of Medicinal Chemistry* 2002, 45, 99-114.
- [32] Song, Y. K.; Liu, F.; Chu, S. Y.; Liu, D. X. *Human Gene Therapy* 1997, 8, 1585-1594.
- [33] Balasubramanian, R. P.; Bennet, M. J.; Aberle, A. M.; Malone, J. G.; Nantz, M. H.; Malone, R. W. *Gene Therapy* 1996, 3, 163-172.
- [34] Byk, G.; Dubertret, C.; Escriou, V.; Frederic, M.; Jaslin, G.; Rangara, R.; Pitard, B.; Crouzet, J.; Wils, P.; Schwartz, B.; Scherman, D. *Journal of Medicinal Chemistry* 1998, 41, 224-235.
- [35] Byk, G.; Wetzler, B.; Frederic, M.; Dubertret, C.; Pitard, B.; Jaslin, G.; Scherman, D. *Journal of Medicinal Chemistry* 2000, 43, 4377-4387.
- [36] Tang, F.; Hughes, J. A. *Journal of Controlled Release* 1999, 62, 345-358.
- [37] McGregor, C.; Perrin, C.; Monck, M.; Camilleri, P.; Kirkby, A. J. *Journal of the American Chemical Society* 2001, 123, 6215-6220.
- [38] Fuhrhop, J. H.; Tank, H. *Chemistry and Physics of Lipids* 1987, 43, 193-213.
- [39] Weissig, V.; Torchilin, V. P. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001, 49, 127-149.
- [40] Gaucheron, J.; Santaella, C.; Vierling, P. *Bioconjugate Chemistry* 2001, 12, 569-575.
- [41] Menger, F. M.; Littau, C. A. *Journal of the American Chemical Society* 1993, 115, 10083-10090.
- [42] Yoshimura, T.; Hasegawa, S.; Hirashima, N.; Nakanishi, M.; Ohwada, T. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2001, 11, 2897-2901.
- [43] Fujiwara, T.; Hasegawa, S.; Hirashima, N.; Nakanishi, M.; Ohwada, T. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 2000, 1468, 396-402.
- [44] Marshall, J.; Nietupski, J. B.; Lee E. R.; Siegel, C. S.; Rafter, P. W.; Rudginsky, S. A.; Chang, C. D.; Eastman, S. J.; Harris, D. J.; Scheule, R. K.; Cheng, S. H. *Journal of Drug Targeting* 2000, 7, 453-469.
- [45] Aissaoui, A.; Oudrhiri, N.; Petit, L.; Hauchecorne, M.; Kan, E.; Sainlos, M.; Julia, s.; Navarro, J.; Vigneron, J.-P.; Lehn, J.-M.; Lehn, P. *Current Drug Targets* 2002, 3, 1-16.

- [46] Felgner, P. L.; Ringold, G. M. *Nature* 1989, 337, 387-388.
- [47] Struck, D. K.; Hoekstra, D.; Pagano, R. E. *Biochemistry* 1981, 20, 4093-4099.
- [48] Gershon, H.; Ghirlando, R.; Guttman, S. B.; Minsky, A. *Biochemistry* 1993, 32, 7143-7151.
- [49] Sternberg, B.; Sorgi, F. L.; Huang, L. . *Febs Letters* 1994, 356, 361-366.
- [50] Gustafsson, J.; Arvidson, G.; Karlsson, G.; Almgren, M. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1995, 1235, 305-312.
- [51] Zabner, J.; Fasbender, A. J.; Moninger, T.; Poellinger, K. A.; Welsh, M. J. *Journal of Biological Chemistry* 1995, 270, 18997-19007.
- [52] Lasic, D. D. ; CRC Press:, 1997.
- [53] Fasbender, A.; Marshall, J.; Moninger, T. O.; Grunst, T.; Cheng, S.; Welsh, M. J. *Gene Therapy* 1997, 4, 716-725.
- [54] Zhou, X. H.; Huang, L. *Biochimica Et Biophysica Acta- Biomembranes* 1994, 1189, 195-203.
- [55] Farhood, H.; Serbina, N.; Huang, L. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1995, 1235, 289-295.
- [56] Radler, J. O.; Koltover, I.; Salditt, T.; Safinya, C. R. *Science* 1997, 275, 810-814.
- [57] Koltover, I.; Salditt, T.; Radler, J. O.; Safinya, C. R. *Science* 1998, 281, 78-81.
- [58] Kirkby, C.; Gregoriadis, G. *Biotechnology* 1984, 979-984.
- [59] Monnard, P. A.; Oberholzer, T.; Luisi, P. L. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1997, 1329, 39-50.
- [60] Szoka, F. Jr., Papahadjopoulos, D. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 1978, 75, 4194-4198.
- [61] Pick, U. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1981, 212, 186-194.
- [62] Wheeler, J. J.; Palmer, L.; Osslou, M.; MacLachlan, I.; Graham, R. W.; Zhang, Y. P.; Hope, M. J.; Scherrer, P.; Cullis, P. R. *Gene Therapy* 1999, 6, 271-281.
- [63] Zhang, Y. P.; Sekirov, L.; Saravolac, E. G.; Wheeler, J. J.; Tardi, P.; Clow, K.; Leng, E.; Sun, R.; Cullis, P. R.; Scherrer, P. *Gene Therapy* 1999, 6, 1438-1447.
- [64] Yoshida, A.; Hashizaki, K.; Yamauchi, H.; Sakai, H.; Yokoyama, S.; Abe, M. *Langmuir* 1999, 15, 2333-2337.
- [65] Wolfert, M. A.; Schacht, E. H.; Toncheva, V.; Ulbrich, K.; Nazarova, O.; Seymour, L. W. *Human Gene Therapy* 1996, 7, 2123-2133.
- [66] Schneider, T.; Sachse, A.; Leike, J.; Rossling, G.; Schmidtgen, M.; Drechsler, M.; Brandl, M. *International Journal of Pharmaceutics* 1996, 132, 9-21.
- [67] Dvorak, H. F.; Nagy, J. A.; Dvorak, J. T.; Dvorak, A. M. *American Journal of Pathology* 1988, 133, 95-109.
- [68] Boman, N.; Bally, M.; Cullis, P.; Mayer, L.; Webb, M. J. *Liposome Res.* 1995, 5, 523-541.
- [69] Mayer, L.; Nayar, R.; Thies, R.; Boman, N.; Cullis, P.; Bally, M. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993, 33, 17-24.

- [70] Webb, M.; Harasym, T.; Masin, D.; Bally, M.; Mayer, L. *Br. J. Cancer* 1995, 72, 896-904.
- [71] Loisel, S.; Floch, V.; Le Gall, C.; Ferec, C. *Journal of Liposome Research* 2001, 11, 127-138.
- [72] Hayes, J.; Niculescu-Duvaz, D.; Cooper, R. G.; Springer, C. J. *Journal of Medicinal Chemistry* 2002, 45, 99-114.
- [73] Regelin, A. E.; Fankhaenel, S.; Gurtesch, L.; Prinz, C.; von Kiedrowski, G.; Massing, U. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000, 1464, 151-164.
- [74] Aberle, A. M.; Tablin, F.; Zhu, J.; Walker, N. J.; Gruenert, D. C.; Nantz, M. H. *Biochemistry* 1998, 37, 6533-6540.
- [75] Woodle, M. C. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1995, 16, 249-265.
- [76] Miller, A. D. *Angewandte Chemie-International Edition* 1998, 37, 1769-1785.
- [77] Tang, M. X.; Szoka, F. C. In *Self-Assembling Complexes for Gene Delivery*; Kabanov, A. V., Felgner, P. L., Seymour, L. W., Eds.; John Wiley & Sons: 1998.
- [78] Hagstrom, J. E. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 2000, 2, 143-149.
- [79] Papahadjopoulos, D.; Allen, T. M.; Gabizon, A.; Mayhew, E.; Matthay, K.; Huang, S. K.; Lee, K. D.; Woodle, M. C.; Lasic, D. D.; Redemann, C.; Martin, F. J. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 1991, 88, 11460-11464.
- [80] Woodle, M. C.; Newman, M. S.; Collins, L. R.; Martin, F. J. *Biophysical Journal* 1990, 57, A261-A261 Part 2.
- [81] Song, L. Y.; Ahkong, Q. F.; Rong, Q.; Wang, Z.; Ansell, S.; Hope, M. J.; Mui, B. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002, 1558, 1-13.
- [82] Hyvonen, Z.; Ruponen, M.; Ronkko, S.; Suhonen, P.; Urtti, A. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2002, 15, 449-460.
- [83] Duzgunes, N.; Goldstein, J. A.; Friend, D. S.; Felgner, P. L. *Biochemistry* 1989, 28, 9179-9184.
- [84] Smith, J. G.; Walzem, R. L.; German, J. B. *Biochimica et Biophysica Acta* 1993, 1154, 327-340.
- [85] Matsui, H.; Johnson, L. G.; Randell, S. H.; Boucher, R. C. *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272, 1117-1126.
- [86] Hofland, H. E. J.; Masson, C.; Iginla, S.; Osetinsky, I.; Reddy, J. A.; Leamon, C. P.; Scherman, D.; Bessodes, M.; Wils, P. *Molecular Therapy* 2002, 5, 739-744.
- [87] Kao, G. Y.; Change, L. J.; Allen, T. M. *Cancer Gene Therapy* 1996, 3, 250-256.
- [88] Kawakami, S.; Fumoto, S.; Nishikawa, M.; Yamashita, F.; Hashida, M. *Pharmaceutical Research* 2000, 17, 306-313.
- [89] Wrobel, I.; Collins, D. *Biochimica et Biophysica Acta* 1995, 1235, 296-304.
- [90] Xu, Y. H.; Szoka, F. C. *Biochemistry* 1996, 35, 5616-5623.
- [91] Harris, C. E.; Agarwal, S.; Hu, P. C.; Wagner, E.; Curiel, D. T. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1993, 9, 441-447.

- [92] Remy, J.-S.; Goula, D.; Steffan, A.-M.; Zanta, M. A.; Boussif, O.; Behr, J.-P.; Demeneix, B. In *Self-Assembling Complexes for Gene Delivery*; Kabanov, A. V., Felgner, P. L., Seymour, L. W., Eds.; John Wiley & Sons: 1998.
- [93] Ruyschaert, J.-M.; El Ouahabi, A.; Willeaume, V.; Huez, G.; Fuks, R.; Vandenbranden, M.; Di Stefano, P. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1994, 203, 1622-1628.
- [94] Fielden, M. L.; Perrin, C.; Kremer, A.; Bergsma, M.; Stuart, M. C.; Camilleri, P.; Engberts, J. B. F. N. *European Journal of Biochemistry* 2001, 268, 1269-1279.
- [95] Litzinger, D. C.; Huang, L. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1992, 1113, 201-227.
- [96] Legendre, J. Y.; Trzeciak, A.; Bohrmann, B.; Deuschle, U.; Kitas, E.; Supersaxo, A. *Bioconjugate Chemistry* 1997, 8, 57-63.
- [97] Escriou, V.; Ciolina, C.; Helbling-Leclerc, A.; Wils, P.; Scherman, D. *Cell Biology and Toxicology* 1998, 14, 95-104.
- [98] Neves, C.; Byk, G.; Escriou, V.; Bussone, F.; Scherman, D.; Wils, P. *Bioconjugate Chemistry* 2000, 11, 51-55.
- [99] Capecchi, M. R. *Cell* 1980, 22, 479-488.
- [100] Mortimer, I.; Tam, P.; MacLachlan, I.; Graham, R. W.; Saravolac, E. G.; Joshi, P. B. *Gene Therapy* 1999, 6, 403-411.
- [101] Zhang, F.; Andreassen, P.; Fender, P.; Geissler, E.; Hernandez, J. F.; Chroboczek, J. *Gene Therapy* 1999, 6, 171-181.
- [102] Ciolina, C.; Byk, G.; Blanche, F.; Thuillier, V.; Scherman, D.; Wils, P. *Bioconjugate Chemistry* 1999, 10, 49-55.
- [103] Zanta, M. A.; Belguise-Valladier, P.; Behr, J. P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, 96, 91-96.
- [104] Gao, X.; Jaffurs, D.; Robbins, P. D.; Huang, L. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1994, 200, 1201-1206.
- [105] Brisson, M.; He, Y.; Li, S.; Yang, J. P.; Huang, L. *Gene Therapy* 1999, 6, 263-270.
- [106] Yant, S. R.; Meuse, L.; Chiu, W.; Ivics, Z.; Izsvak, Z.; Kay, M. A. *Nature Genetics* 2000, 25, 35-41.
- [107] Dash, P. R.; Read, M. L.; Barrett, L. B.; Wolfert, M. A.; Seymour, L. W. *Gene Therapy* 1999, 6, 643-650.
- [108] Plank, C.; Mechtler, K.; Szoka Jr., F. C.; Wagner, E. *Human Gene Therapy* 1996, 7, 1437-1446.
- [109] Norman, J.; Denham, W.; Denham, D.; Yang, J.; Carter, G.; Abouhamze, A.; Tannahill, C. L.; MacKay, S. L. D.; Moldawer, L. L. *Gene Therapy* 2000, 7, 1425-1430.
- [110] Meyer, O.; Shughart, K.; Pavirani, A.; Kolbe, H. V. J. *Gene Therapy* 2000, 7, 1606-1611.
- [111] Monck, M. A.; Mori, A.; Lee, D.; Tam, P.; Wheeler, J. J.; Cullis, P. R.; Scherrer, P. *Journal of Drug Targeting* 2000, 7, 439-452.
- [112] Mok, K. W. C.; Lam, A. M. I.; Cullis, P. R. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* 1999, 1419, 137-150.

- [113] Tam, P.; Monck, M.; Lee, D.; Ludkovski, O.; Leng, E. C.; Clow, K.; Stark, H.; Scherrer, P.; Graham, R. W.; Cullis, P. R. *Gene Therapy* 2000, 7, 1867-1874.
- [114] Dauty, E.; Remy, J. S.; Zuber, G.; Behr, J.-P. *Bioconjugate Chemistry* 2002, 13, 831-839.
- [115] Torchilin, V. P. In *Self-assembling complexes for gene delivery*; Kabanov, A. V., Felgner, P. L., Seymour, L. W., Eds.; John Wiley & Sons: 1998.
- [116] Litzinger, D. C.; Brown, J. F.; Wala, I.; Kaufman, F. A.; Van, G. Y.; Farrell, C. L.; Collins, D. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996, 1281.
- [117] Anwer, K.; Meaney, C.; Kao, G.; Hussain, N.; Shelvin, R.; Earls, R. M.; Leonard, P.; Quezada, A.; Rolland, A. P.; Sullivan, S. M. *Cancer Gene Therapy* 2000, 7, 1156-1164.
- [118] Seol, J. G.; Heo, D. S.; Kim, H. K.; Yoon, J.-H.; Choi, B. I.; Lee, H.-S.; Kim, N. K.; Kim, C. Y. *In Vivo* 2000, 14, 513-518.
- [119] Choi, J. S.; Lee, E. J.; Jang, H. S.; Park, J. S. *Bioconjugate Chemistry* 2001, 12, 108-113.
- [120] van der Woude, I.; Wagenaar, A.; Meekel, A. A. P.; Ter Beest, M. B. A.; Ruiters, M. H. J.; Engberts, J. B. F. N.; Hoekstra, D. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 1997, 94, 1160-1165.
- [121] Floch, V.; Legros, N.; Loisel, S.; Guillaume, C.; Guilbot, J.; Benvegnu, T.; Ferrieres, V.; Plusquellec, D.; Ferec, C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998, 251, 360-365.
- [122] Paukku, T.; Lauraeus, S.; Huhtaniemi, I.; Kinnunem, P. K. *J. Chemistry and Physics of Lipids* 1997, 63, 251-258.
- [123] Vierling, P.; Santaella, C.; Greiner, J. *Journal of Fluorine Chemistry* 2000, 107, 337-354.
- [124] Banerjee, R.; Mahidhar, Y. V.; Chaudhuri, A.; Gopal, V.; Rao, N.M. *Journal of Medicinal Chemistry* 2001, 44, 4176-4185.
- [125] Rosenzweig, H. S.; Rakhmanova, V. A.; MacDonald, R. C. *Bioconjugate Chemistry* 2001, 12, 258-263.
- [126] Gao, H.; Hui, K. M. *Gene Therapy* 2001, 8, 855-863.
- [127] Ren, T.; Zhang, G.; Liu, F.; Liu, D. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2000, 10, 891-894.
- [128] Walker, S.; Sofia, M. J.; Kakarla, R.; Kogan, N. A.; Wierichs, L.; Longley, C. B.; Bruker, K.; Axelrod, H. R.; Midha, S.; Babu, S.; Kahne, D. . *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 1996, 93, 1585-1590.
- [129] Ferrari, M. E.; Rusalov, D.; Enas, J.; Wheeler, C. J. *Nucleic Acids Research* 2002, 30, 1808-1816.
- [130] Patel, M.; Vivien, E.; Hauchecorne, M.; Oudrhiri, N.; Ramasawmy, R.; Vigneron, J.-P.; Lehn, P.; Lehn, J.-M. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001, 281, 536-543.
- [131] Pinnaduwege, P.; Schmitt, L.; Huang, L. *Biochimica et Biophysica Acta* 1989, 985, 33-37.
- [132] Cameron, F. H.; Moghaddam, M. J.; Bender, V. J.; Whittaker, R. G.; Mott, M.; Lockett, T. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999, 1417, 37-50.
- [133] Rosenzweig, H. S.; Rakhmanova, V. A.; McIntosh, T. J.; MacDonald, R. C. *Bioconjugate Chemistry* 2000, 11, 306-313.
- [134] Ren, T.; Liu, D. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1999, 9, 1247-1250.

- [135] Ren, T.; Zhang, G.; Song, Y. K.; Liu, D. *Journal of Drug Targeting* 1999, 7, 285-292.
- [136] Delepine, P.; Guillaume, C.; Floch, V.; Loisel, S.; Yaouanc, L.-L.; Clement, J.-C.; Des Abbayes, H. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2000, 89, 629-638.
- [137] Fichert, T.; Regelin, A.; Massing, U. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2000, 10, 787-791.
- [138] Srilakshmi, G. V.; Sen, J.; Chauduri, A.; Ramadas, Y.; Rao, N. M. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002, 1559, 87-95.
- [139] Wang, J.; Guo, X.; Xu, Y.; Barron, L.; Szoka Jr., F. C. *Journal of Medicinal Chemistry* 1998, 41, 2207-2215.
- [140] Roosgen, A.; Smisterova, J.; Driessen, C.; Anders, J. T.; Wagenaar, A.; Hoekstra, D.; Hulst, R.; Engberts, J. B. F. N. *European Journal of Organic Chemistry* 2002, 1271-1277.
- [141] Obika, S.; Yu, W.; Shimoyama, A.; Uneda, T.; Miyashita, K.; Doi, T.; Imanishi, T. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2001, 9, 245-254.
- [142] Dileep, P. V.; Antony, A.; Bhattacharya, S. *FEBS Letters* 2001, 509, 327-331.
- [143] Ilies, M. A.; Seitz, W. A.; Balaban, A. T. *Current Pharmaceutical Design* 2002, 8, 2441-2473.
- [144] Nantz, M. H.; Li, L.; Zhu, J.; Aho-Sharon, K. L.; Lim, D.; Erickson, K. L. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998, 1394, 219-223.
- [145] Floch, V.; Le Bolc'h, G.; Gable-Guillaume, C.; Le Bris, N.; Yaouanc, J. J.; des Abbayes, H.; Ferec, C.; Clement, J. C. *European Journal of Medicinal Chemistry* 1998, 33, 923-934.
- [146] Banerjee, R.; Das, P. K.; Srilakshmi, G. V.; Chaudhuri, A.; Rao, N. M. *Journal of Medicinal Chemistry* 1999, 42, 4292-4299.
- [147] Laxmi, A. A.; Vijayalakshmi, P.; Kaimal, T. N. B.; Chauduri, A.; Ramadas, Y.; Rao, N. M. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001, 289, 1057-1062.
- [148] Ansell, S. M.; Kojic, L. D.; Hankins, J. S.; Sekirov, L.; Boey, A.; Lee, D. K.; Bennett, A. R.; Klimuk, S. K.; Harasym, T. O.; Dos Santos, N.; Semple, S. C. *Bioconjugate Chemistry* 1999, 10, 653-666.
- [149] Ren, T.; Liu, D. X. *Tetrahedron Letters* 1999, 40, 7621-7625.
- [150] Stewart, L.; Manwell, M.; Hillery, E.; Etheridge, C. J.; Cooper, R. G.; Stark, H.; van-Heel, M.; Preuss, M.; Alton, E. W. F. W.; Miller, A. D. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction 2* 2001, 624-632.
- [151] Oku, N.; Yamazaki, Y.; Matsuura, M.; Sugiyama, M.; Hasegawa, M.; Nango, M. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001, 52, 209-218.
- [152] Frederic, M.; Scherman, D.; Byk, G. *Tetrahedron Letters* 2000, 41, 675-679.
- [153] Hyvonen, Z.; Plotniece, A.; Riene, I.; Chekavichus, B.; Duburs, G.; Urtti, A. *Biochimica Et Biophysica Acta- Biomembranes* 2000, 1509, 451-466.
- [154] Keil, O.; Bojar, H.; Prisack, H.-B.; Dall, P. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2001, 11, 2611-2613.
- [155] Zhu, M. Z.; Wu, Q. H.; Guo, Q. X. *Chinese Chemical Letters* 2001, 12, 779-802.
- [156] Soto, J.; Bessodes, M.; Pitard, B.; Mailhe, P.; Scherman, D.; Byk, G. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2000, 10, 911-914.

- [157] Schultze, U.; Schmidt, H.-W.; Safinya, C.-R. *Bioconjugate Chemistry* 1999, 10, 548-552.
- [158] Sochanik, A.; Kaida, I.; Mitrus, I.; Rajca, A.; Szala, S. *Cancer Gene Therapy* 2000, 7, 513-520.
- [159] Huang, C.-Y.; Uno, T.; Murphy, J. E.; Lee, S.; Hamer, J. D.; Escobedo, J. A.; Cohen, F. E.; Radhakrishnan, R.; Dwarki, V.; Zuckermann, R. N. *Chemistry & Biology* 1998, 5, 345-354.
- [160] Lee, E. R.; Marshall, J.; Siegel, C. S.; Jiang, C. W.; Yew, N. S.; Nichols, M. R.; Nietupski, J. B.; Ziegler, R. J.; Lane, M. B.; Wang, K. X.; Wan, N. C.; Scheule, R. K.; Harris, D. J.; Smith, A. E.; Cheng, S. H. *Human Gene Therapy* 1996, 7, 1701-1717.
- [161] MacDonald, R. C.; Ashley, G. W.; Shida, M. M.; Rakhmanova, V. A.; Tarahovsky, Y. S.; Pantazatos, D. P.; Kennedy, M. T.; Pozharski, E. V.; Baker, K. A.; Jones, R. D.; Rosenzweig, H. S.; Choi, K. L.; Qiu, R.; McIntosh, T. J. *Biophysical Journal* 1999, 77, 2612-2629.
- [162] Chen, T.; Wong, K. F.; Fenske, D. B.; Palmer, L. R.; Cullis, P. R. *Bioconjugate Chemistry* 2000, 11, 433-437.
- [163] Wetzler, B.; Byk, G.; Frederic, M.; Airiau, M.; Blanche, F.; Pitard, B.; Scherman, D. *Biochemical Journal* 2001, 356, 747-756.
- [164] Bessodes, M.; Dubertret, C.; Jaslin, G.; Scherman, D. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2000, 10, 1393-1395.
- [165] Zhu, M.-Z.; Wei, J.-N.; Wu, Q.-H.; Zheng, X.-Q.; Guo, Q.-X. *Synthetic Communications* 2000, 30, 2325-2333.
- [166] Obika, S.; Yu, W.; Shimoyama, A.; Uneda, T.; Minami, T.; Miyashita, K.; Doi, T.; Imanishi, T. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 1999, 22, 187-190.
- [167] Ghosh, Y. K.; Indi, S. S.; Bhattacharya, S. *Journal of Physical Chemistry B* 2001, 105, 10257-10265.
- [168] Ghosh, Y. K.; Visweswariah, S. S.; Bhattacharya, S. *Febs Letters* 2000, 473, 341-344.
- [169] Ghosh, Y. K.; Viweswariah, S. S.; Bhattacharya, S. *Bioconjugate Chemistry* 2002, 13, 378-384.

**CAPITOLO 1**  
**METODI SPERIMENTALI UTILIZZATI ED ELABORAZIONE DATI**

## METODI SPERIMENTALI UTILIZZATI

### *Composti*

Il bromuro di propandiil- $\alpha,\omega$ -bis(dodecildimetilammonio) (12-3-12) e il bromuro di propandiil- $\alpha,\omega$ -bis(ottildimetilammonio) (8-3-8) sono stati sintetizzati presso il Dipartimento di Chimica Generale ed Organica Applicata dell'Università di Torino.

Il bis-C<sub>10</sub>-BEC, il bis-C<sub>12</sub>-BEC, il bis-C<sub>14</sub>-BEC sono stati sintetizzati presso la Technical University of Wroclaw. Le soluzioni sono state preparate usando acqua bidistillata bollita di fresco in atmosfera di azoto e la concentrazione delle soluzioni è stata espressa in molalità,  $m$  (mol kg<sup>-1</sup>).

La serie di tensioattivi gemini dipiridinici parzialmente fluorurati sono stati sintetizzati presso il Dipartimento di Chimica Generale e Organica Applicata dell'Università di Torino.

Il  $N$ -[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)etil]- $N,N$ -dimetil- $N$ -octilammonio bromuro (C<sub>8</sub>AGCB), il  $N$ -[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)etil]- $N,N$ -dimetil- $N$ -dodecilammonio bromuro (C<sub>12</sub>AGCB),  $N$ -[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)etil]- $N,N$ -dimetil- $N$ -esadecilammonio bromuro (C<sub>16</sub>AGCB) e  $L$ ' $N$ -[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)etil]- $N,N$ -dimetil- $N$ -octilammonio bromuro,  $N$ -[2-( $\beta$ -D-glucopiranosil)etil]- $N,N$ -dimetil- $N$ -dodecilammonio bromuro (C<sub>12</sub>DGCB) e  $N$ -[2-( $\beta$ -D-glucopiranosil)etil]- $N,N$ -dimetil- $N$ -esadecilammonio bromuro (C<sub>16</sub>DGCB) sono stati sintetizzati presso il Dipartimento di Chimica Generale ed Organica Applicata dell'Università di Torino. La purezza è stata controllata attraverso un NMR, analisi elementare e TLC: eluente BAW (butanolo: acido acetico:acqua=4:1:5 - fase organica) su gel di silice (Merck).

Le soluzioni sono state preparate per pesata usando acqua bollita e bidistillata fresca, conservata sotto azoto. Le concentrazioni delle soluzioni sono state espresse come molalità,  $m$  (mol kg<sup>-1</sup>).

La 1,2-dipalmitoil-sn-glicerico-3-fosfatidilcolina (DPPC) è stata acquistata presso la Avanti Polar Lipids, Birmingham, Alabama e la  $L$ - $\alpha$ -dioleoilfosfatidiletanolamina (C18:1,[*cis*]-9) (DOPE) dalla Sigma-Aldrich.

### *Preparazione e conservazione del DNA*

Il DNA plasmidico è stato purificato attraverso centrifugazione a gradiente di cesio cloruro. Una soluzione stock del plasmide 0.7  $\mu$ M in acqua milliQ (Millipore Corp., Burlington, MA) è stato conservato a -20°C. Il DNA plasmidico linearizzato (pEGFP-C1) è stato ottenuto tagliandolo con un enzima di restrizione EcoRI (Roche), in colonna (Genomed) e precipitato con alcol. Il *pellet* di plasmide linearizzato è stato lavato con etanolo al 70%, seccato all'aria e dissolto in H<sub>2</sub>O distillata per ottenere una concentrazione finale di 1  $\mu$ g/ $\mu$ l.

### ***Colture cellulari***

La linea cellulare di rhabdomyosarcoma umano RD-4, ottenute da David Derse, National Cancer Institute, Frederick, Maryland, sono state mantenute in monostrato usando un medium di crescita contenente 90% di DMEM, 10% di FBS, 2 mM di L-glutamina, 100 IU/ml di penicillina, 10 µg/ml di streptomicina. Quando le cellule hanno raggiunto il 70-90% di confluenza (ogni 3-5 giorni) sono state poste in un terreno di coltura fresco, e incubate a 37°C in atmosfera umidificata di 95% aria/5% CO<sub>2</sub>.

### ***Misure di conducibilità***

Le misure di conducibilità sono state condotte con un conduttimetro dotato di una cella di conducibilità con una costante di cella di 0.943 cm<sup>-1</sup>, come già riportato [1]. L'aggiunta di soluzioni concentrate di tensioattivo da una buretta e la raccolta dei dati di conducibilità sono stati fatti usando un computer controllato da un sistema automatico, lavorando con un programma scritto in Quick Basic.

### ***Misure di Tensione Superficiale***

La tensione superficiale è stata misurata utilizzando un tensiometro digitale Lauda (TE1C/3). Le misure sono state fatte a 25±0.1°C utilizzando un anello Du Noüy (in lega Pt/Ir (80/20), circonferenza: 60 ±0.2 mm, diametro del filo: 0.4 mm, peso: 1.6 g). La temperatura del campione è controllata a ±0.1°C con un bagno termostato ad acqua circolante (ISCO GTR 2000 IIX). I dati sono stati corretti in accordo con il metodo di Zuidema e Waters [2]. Lo strumento è stato calibrato con acqua deionizzata e bidistillata ogni volta che è stata fatta la misura. Le soluzioni fresche sono state fatte riposare per alcune ore prima di misurare la tensione superficiale. E' stato effettuato un set di misure ad intervalli di 15 minuti fino a non osservare più alcun cambiamento. La deviazione standard delle misure è inferiore a 0.15 mN/m. L'assenza di un minimo nel grafico della tensione superficiale vs log concentrazione nella regione post-micellare mostra che nei prodotti finali non ci sono o sono scarse le impurezze attive a livello della superficie.

### ***Metodi termodinamici***

Le entalpie di diluizione sono state misurate utilizzando un microcalorimetro Termometric TAM (flow mixing cell), equipaggiato con un Nano Amplificatore 221, a 298 K. Il Termostato TAM (2277-011, da 5° a 90°C) è stabile fino a ±0.1 mK. Le soluzioni preparate di fresco e portate alla temperatura sperimentale prima dell'iniezione con l'utilizzo di un bagno criotermostato Heto sono state diluite in una cella di misura mixing del microcalorimetro in rapporto 1:1 utilizzando acqua priva di CO<sub>2</sub>.

Le soluzioni e l'acqua sono iniettate per mezzo di una pompa peristaltica Gilson Miniplus 2 e i loro flussi sono misurati per pesata. La calibrazione elettrica è fatta prima e dopo ogni misura.

La densità e la velocità del suono delle soluzioni sono state misurate con un densimetro Paar DSA 5000 a tubo vibrante, che misura la densità (±0.000001 g cm<sup>-3</sup>) e la velocità del suono (±0.1 m sec<sup>-1</sup>) con un'elevata accuratezza in ampi intervalli di viscosità e temperatura. La temperatura è controllata fino a ±1·10<sup>-3</sup> K. Il densimetro è basato su una cella di misura addizionale fatta di acciaio inossidabile e su un'alta

risoluzione elettronica, cosicché la velocità del suono del campione può essere determinata accuratamente. Entrambe le celle di misura sono a temperatura controllata, tramite l'uso di un termometro interno e due termometri integrati al platino Pt 100. Lo strumento è stato calibrato prima di ogni serie di misure utilizzando acqua bidistillata degasata ( $d_o = 0.997043 \text{ g cm}^{-3}$ ,  $u_o = 1497 \text{ m sec}^{-1}$  at 298 K) ed aria secca ( $d = 0.001169 \text{ g cm}^{-3}$  at  $P = 1 \text{ bar}$ ).

### ***Preparazione del campione per calorimetria a scansione differenziale (DSC)***

Gli studi DSC sono effettuati come descritto nei riferimenti [3-4]. Il comportamento dei tensioattivi in studio è analizzato in presenza di vescicole multilamellari (MLVs), preparate utilizzando due metodi:

*Metodo I:* il DPPC è dissolto in cloroformio, le tracce residue sono rimosse con un flusso di azoto secco sotto pompa. Il film lipidico sulla parete del flask viene disperso aggiungendo le soluzioni acquose dei tensioattivi acetilati o disacetilati alle appropriate concentrazioni. Quindi si scuote intensamente a circa 60°C per 15 minuti in modo da ottenere una sospensione lattiginosa di liposomi. La concentrazione finale del lipide è di 25 mg/cm<sup>3</sup>. La sospensione lipidica viene caricata nella cella del campione del microcalorimetro DSC (Mettler Toledo Thermal Analysis System D.S.C 821°). La velocità di scansione è di 2°C/min, e l'incubazione (a 4°C) è stata fatta per 3 giorni.

*Metodo II:* il DPPC e un'appropriata quantità di tensioattivo acetilato o disacetilato vengono dissolte in cloroformio. In seguito il cloroformio è fatto evaporare per formare un film sottile della miscela sulla parete del flask. Dopodiché viene aggiunta acqua bidistillata e si procede come descritto sopra.

I cicli termici sono ripetuti per tre volte; l'errore sperimentale nella temperatura è  $\pm 0.2$  e nella risposta termica ( $\Delta H$ )  $\pm 5\%$ .

### ***EMSA (Electrophoresis Mobility Shift Assay)***

Le reazioni di legame sono state eseguite in un volume finale di 14  $\mu\text{l}$  con 10  $\mu\text{l}$  di Tris/HCl 20 mM pH 8, 1  $\mu\text{l}$  di plasmide (1  $\mu\text{g}$  di pEGFP-C1) e 3  $\mu\text{l}$  delle soluzioni dei tensioattivi cationici in studio a diverse concentrazioni finali, comprese tra 25 e 200  $\mu\text{M}$ . La reazione di legame è lasciata avvenire a temperatura ambiente per 1 ora. Sono stati quindi aggiunti 5  $\mu\text{l}$  di glicerolo in H<sub>2</sub>O 1 g/ml a ciascuna miscela e quindi caricate su un gel di agarosio 1% di TA (40 mM Tris-Acetate). Il gel viene fatto scorrere per 2.5 ore in un tampone di TA a 10 V/cm. Nelle soluzioni tampone non è stato messo EDTA poiché compete nella reazione con il DNA.

### ***Saggio di trasfezione transiente***

Le trasfezioni sono state eseguite in 6 pozzetti, quando le cellule erano confluenti all'80% (approssimativamente  $3 \cdot 10^5$  cellule) nel giorno della trasfezione. Sono stati aggiunti 3  $\mu\text{g}$  di plasmide, i tensioattivi in studio in 1 ml di medium privo di siero ad una concentrazione finale di 15  $\mu\text{M}$ , mescolati rapidamente e quindi incubati a temperatura ambiente per 20 minuti. Ogni miscela è stata aggiunta gentilmente alle cellule dopo aver aspirato il medium di coltura. Le formulazioni dei lipoplessi sono state ottenute aggiungendo il DOPE alla miscela plasmide-tensioattivo a differenti rapporti molari

tensioattivo:DOPE (1:1, 1:2 e 2:1), dove la concentrazione di tensioattivo è stata mantenuta di 15  $\mu\text{M}$ . È stato usato come controllo positivo il reagente di trasfezione lipidico neutro GenePORTER.

La miscela e le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera umidificata di 95% aria/5% CO<sub>2</sub> per 5 ore. Infine, 1 ml di medium contenente il 20% di FBS è stato addizionato in ogni pozzetto di trasfezione e poi incubato per 72 ore. [5].

Le cellule trasfettate sono state osservate sotto microscopia di fluorescenza per monitorare l'espressione di EGFP. Per ciascun pozzetto sono stati esaminati 5 campi casuali ed ogni esperimento è stato ripetuto tre volte. Le differenze statistiche tra i trattamenti sono state calcolate con il test di Student e l'analisi multifattoriale ANOVA.

### ***Preparazione del campione e AFM imaging***

I campioni di DNA sono stati preparati diluendo il DNA plasmidico alla concentrazione finale di 0.5 nM nel buffer di deposizione (4 mM HEPES, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, pH = 7.4) con o senza il C<sub>16</sub>AGCB od il C<sub>16</sub>DGCB. Il DOPE è stato dissolto in etanolo prima di essere aggiunto. La miscela è stata incubata per 5 minuti a temperatura ambiente, quindi una goccia di 20  $\mu\text{l}$  è stata depositata sulla mica (Ted Pella, Redding, CA) per un minuto. Il disco di mica è stato lavato con acqua milliQ e asciugato con un flusso di azoto.

È stato utilizzato un microscopio Nanoscope IIIA (Digital Instruments Inc. Santa Barbara, CA) operante in tapping mode. Sono state usate punte commerciali (NSC-15 Micromash Corp., Estonia). Le immagini 512x512 pixel sono state ottenute con una scan size di 2  $\mu\text{m}$  a una velocità di scansione di 3-4 linee per secondo e sono state rielaborate attraverso il software Nanoscope.

## Elaborazione dati sperimentali

### *Proprietà Termodinamiche*

I dati sperimentali sono stati espressi in termini di quantità molari apparenti e parziali del soluto, come è usuale in soluzioni termodinamiche, assumendo la diluizione infinita come stato di riferimento. Le quantità molari apparenti e parziali sono state ottenute dai dati sperimentali usando metodi già descritti dettagliatamente [6-14].

Richiamiamo che, con riferimento allo stato di diluizione infinita, l'entalpia molare di diluizione,  $\Delta H_d$ , è data da:

$$\Delta H_d = L_{\Phi,f} - L_{\Phi,i} \quad (1)$$

dove  $L_{\Phi}$  è l'entalpia relativa molare apparente e gli indici  $f$  e  $i$  stanno rispettivamente per le concentrazioni finali (dopo la diluizione) ed iniziali (prima della diluizione).

Per tensioattivi ionici nella regione premicellare, l'entalpia relativa molare apparente può essere espressa attraverso una polinomiale in  $m^{1/2}$ . Fermando l'espansione seriale al terzo termine otteniamo:

$$L_{\Phi} = A_L m^{1/2} + B_L m + C_L m^{3/2} \quad (2)$$

dove  $A_L$  è la pendenza limite di Debye-Huckel per le entalpie relative che tiene conto delle interazioni soluto-soluto a lungo raggio. I parametri  $B_L$  and  $C_L$  sono stati ottenuti dai punti sperimentali nella regione premicellare attraverso l'interpolazione della curva sperimentale col metodo dei minimi quadrati.

Nella regione micellare, le entalpie molari apparenti sono state calcolate attraverso l'equazione (1) e, quando è necessario un valore di  $L_{\Phi}$  vs.  $m$  non misurato sperimentalmente, attraverso interpolazione grafica.

Le entalpie molari parziali  $L_2$  sono state determinate disegnando la miglior curva per le entalpie molari apparenti vs.  $m$  e quindi dal calcolo delle quantità molari parziali come  $\Delta(mL_{\Phi})/\Delta m$  interpolato dai punti ad intervalli regolari.

### ***Volumi e compressibilità adiabatiche***

I volumi molari apparenti,  $V_\phi$  e le compressibilità adiabatiche,  $K_{s,\phi}$  sono stati calcolati per mezzo delle seguenti equazioni [15-18]

$$V_\phi = \frac{M}{d} - \frac{10^3(d - d_o)}{mdd_o} \quad (3)$$

$$K_{s,\phi} = \frac{M\beta_s}{d} - \frac{10^3(\beta_{s,o}d - \beta_s d_o)}{mdd_o} \quad (4)$$

dove  $d$  è la densità della soluzione di molalità  $m$ ,  $M$  è il peso molecolare del tensioattivo, e  $d_o$  è la densità del solvente.  $\beta_{s,o}$  e  $\beta_s$  sono rispettivamente i coefficienti di compressibilità adiabatica del solvente e del soluto. L'ultimo è calcolato dalla velocità del suono,  $u$ , e dai dati di densità come

$$\beta_s = 100/(u^2 d) \quad (5)$$

Nel caso delle proprietà volumetriche, al fine di estrarre dagli andamenti i parametri di micellizzazione, si è utilizzata la seguente equazione, ricavata da un modello di transizione pseudofase in cui la transizione da monomero a pseudofase aggregata è considerata un processo a due stadi che avviene all'equilibrio

$$X_\phi = X_{\phi,m} - (\text{cmc} \cdot \Delta X_{\phi,m})(1/m) \quad (6)$$

Qui  $X$  sta per la proprietà studiata. I valori di  $X_{\phi,m}$ , la proprietà in fase micellare, e  $\Delta X_{\phi,m}$ , il cambiamento della proprietà alla micellizzazione, possono essere ottenuti col metodo dei minimi quadrati, se i valori di cmc sono noti. I valori di  $X_{\phi,\text{cmc}}$ , il valore alla cmc, è ottenuto da

$$X_{\phi,\text{cmc}} = X_{\phi,m} - \Delta X_{\phi,m} \quad (7)$$

### ***Tensioni superficiali***

Il logaritmo della concentrazione micellare critica (cmc) è stato ottenuto come l'ascissa del punto di intersezione delle due porzioni lineari del grafico  $\gamma$  vs  $\log C$ , prima e dopo la cmc. La pendenza della porzione lineare di ogni curva sotto la cmc è stata determinata col metodo dei minimi quadrati.

La concentrazione eccesso superficiale  $\Gamma_{\text{max}}$  [mol cm<sup>-2</sup>], e l'area per molecola all'interfaccia  $A_{\text{min}}$  [Å<sup>2</sup>] all'interfaccia acqua/aria sono state calcolate usando l'isoterma di adsorbimento di Gibbs.

$$\Gamma_{\max} = -\frac{1}{2.303nRT} \left( \frac{\partial \gamma}{\partial \log C} \right)_T \quad (8)$$

$$A_{\min} = \frac{10^{16}}{N\Gamma_{\max}} \quad (9)$$

dove  $(-\delta\gamma/\delta\log C)_T$  è la pendenza del grafico a temperatura  $T$  costante,  $\gamma$  è in dyn/cm,  $R=8.314 \cdot 10^7$  ergs mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> (costante dei gas),  $N$  è il numero di Avogadro ed  $n$  è una costante che equivale al numero di specie che si originano in soluzione per dissociazione del tensioattivo e la cui concentrazione varia alla superficie cambiando la concentrazione di tensioattivo nella fase bulk ( $C$ ). Per tensioattivi non ionici  $n=1$ , per tensioattivi ionici univalenti (ed anche per i tensioattivi gemini da noi analizzati, costituiti da una testa cationica di natura piridinica ed un controione cloruro) si utilizza generalmente il valore  $n=2$ , per tensioattivi bolaformi e di bis-ammonio quaternario si dovrebbe utilizzare il valore  $n=3$ .

$\Gamma_{\max}$  (concentrazione eccesso superficiale) è la massima concentrazione di specie adsorbite alla cmc.

$A_{\min}$  (area per molecola all'interfaccia) è la minima area che una molecola dovrebbe occupare nello strato aria/acqua in condizioni di saturazione superficiale alla cmc.

$C_{20}$  è la concentrazione molare del tensioattivo richiesta per ridurre la tensione superficiale del solvente di 20 dyn/cm. Questo parametro misura quindi l'efficienza di adsorbimento del tensioattivo sulla superficie.

$pC_{20}$  equivale al logaritmo negativo in base dieci della  $C_{20}$ .

$\gamma_{\lim}$  è il valore costante a cui tende la tensione superficiale quando si sono formate le micelle.

$cmc/C_{20}$  è un parametro che confronta la tendenza del tensioattivo a formare micelle con la tendenza ad adsorbirsi alla superficie. Un elevato valore di  $cmc/C_{20}$  indica che il tensioattivo ha una maggiore tendenza ad adsorbirsi all'interfaccia aria/acqua rispetto alla tendenza a formare micelle. Un incremento di questo rapporto indica che la micellizzazione è più inibita dell'adsorbimento o che l'adsorbimento è più facilitato della micellizzazione, mentre un decremento indica l'inverso.

### **Conducibilità**

Dalle curve di titolazione conduttometriche, la  $cmc$  è stata ottenuta dall'ascissa del punto di intersezione delle linee rette ottenute dall'interpolazione dei punti prima e dopo la  $cmc$ . Il valore di  $\alpha$ , il grado di dissociazione del controione, è ottenuto dal rapporto tra le pendenze delle linee rette prima e dopo la  $cmc$ . Il grado di legame del controione,  $\beta$ , è ottenuto dalla relazione  $\beta = (1 - \alpha)$ .

Poichè l'interpolazione grafica può essere imprecisa, soprattutto quando le curve si arrotondano in prossimità della *cmc*, abbiamo calcolato la *cmc* utilizzando la metodologia proposta da Carpena et al. [19]. Essi propongono di calcolare direttamente l'equazione dell'integrale della sigmoide, integrale che dovrebbe corrispondere alla curva dei dati sperimentali. Abbiamo seguito quest'approccio e preparato un *software* a questo scopo.

Si ottiene quindi l'equazione:

$$F(x) = F(0) + A_1 x + \Delta x(A_2 - A_1) \ln \left[ \frac{1 + \exp(x - x_0) / \Delta x}{1 + \exp(-x_0) / \Delta x} \right] \quad (\text{A.1})$$

I parametri  $A_1$  and  $A_2$  rappresentano, rispettivamente, i valori asintotici per piccoli e grandi valori di  $x$  (la concentrazione) e  $x_0$  rappresenta il punto centrale della sigmoide, cioè la *cmc* e  $\Delta x$  rappresenta l'ampiezza della sigmoide, cioè della transizione.

Per ottenere i valori dei parametri che compaiono nell'equazione (A.1) attraverso un *fitting* non lineare dei dati sperimentali, abbiamo costruito dapprima il vettore dei parametri  $A(i)$ , eseguendo le seguenti sostituzioni:

$$\begin{aligned} A(1) &= A_1 \\ A(2) &= \Delta x (A_2 - A_1) \\ A(3) &= \exp(-x_0 / \Delta x) \\ A(4) &= \Delta x \end{aligned} \quad (\text{A.3})$$

L'eq(A.1) si trasforma in

$$y = A(1) x + A(2) \ln \left\{ \frac{1 + A(3) \exp(x/A(4))}{1 + A(3)} \right\} \quad (\text{A.4})$$

dove  $y = \kappa - \kappa_w$  (con  $\kappa_w$  = conducibilità dell'acqua) e  $x = m$  (molarità). I parametri sono stati ottenuti da una procedura che utilizza miglior *fitting* iterativo per la ricerca di valori che minimizzano la somma delle deviazioni standard tra i dati osservati e calcolati. Come algoritmo di minimizzazione, abbiamo il metodo *steepest descent* dove ad ogni ciclo di affinamento, la procedura di ricerca per il minimo della sommatoria delle deviazioni viene fatta per ogni parametro.

I dati di *input* sono il numero totale di punti sperimentali, le coppie di valori  $x$  (molarità) e  $y$  (conducibilità), i parametri  $E$  (fattore di convergenza) ed  $E1$  (grandezza iniziale dello *step*) ed i valori iniziali dei parametri da ottimizzare, ottenuti dai dati sperimentali elaborati col metodo lineare descritto in precedenza.

Una volta ottenuto il vettore  $A(i)$  i parametri ottimizzati sono calcolati attraverso le equazioni

$$A_1 = A(1)$$

$$A_2 = A(2) / A(4) + A(1)$$

$$cmc = - [\ln(A(3))] \cdot A(4) \quad (A.5)$$

$$\Delta x = A(4)$$

$$\beta = 1 - [A(2)/A(1)]$$

## BIBLIOGRAFIA

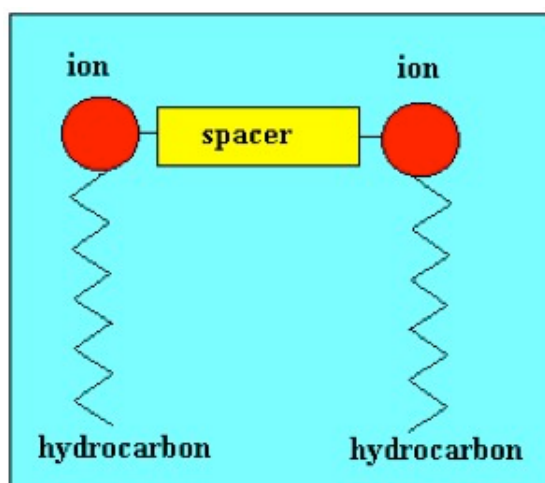
- [1] Viscardi, G.; Quagliotto, P.; Barolo, C.; Savarino, P.; Barni, E.; Fiscaro, E. Synthesis and surface and antimicrobial properties of novel cationic surfactants. *J. Org. Chem.* 2000, 65 (24), 8197-8203.
- [2] Zuidema, H. H.; Waters, G. W. Ring method for the determination of interfacial tension. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 1941, 13, 312-313.
- [3] P.C. Bell, M. Bergsma, I.P. Dolbnya, W. Bras, M.C.A. Stuart, A. E. Rowan, M.C. Feiters, J.B.F.N. Engberts, Transfection mediated by gemini surfactants: engineered escape from the endosomal compartment, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 1551-1558.
- [4] P. Quagliotto, G. Viscardi, C. Barolo, D. D'Angelo, E. Barni, C. Compari, E. Duce, E. Fiscaro, Synthesis and Properties of New Glucocationic Surfactants: Model Structures for Marking Cationic Surfactants with Carbohydrates, *J. Org. Chem.* 70(24) (2005) 9858-9866.
- [5] J. Dahmen, T. Frejd, G. Magnusson, G. Noori, A.S. Carlström, 2-Bromoethyl glycosides, part 5. Synthesis of spacer-arm, lipid, and ethyl glycosides of the trisaccharide portion [ $\alpha$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glc] of the blood-group Pk antigen: preparation of neoglycoproteins, *Carbohydr. Res.* 127 (1984) 15-25.
- [6] R. De Lisi, E. Fiscaro, S. Milioto, E. Pelizzetti, P. Savarino, Thermodynamic Properties of N-Octyl- and N-Dodecyl-Nicotinamide Chlorides in water, *J. Solution Chem.* 19 (1990) 247-270.
- [7] E. Fiscaro, E. Pelizzetti, M. Barbieri, P. Savarino, G. Viscardi, Aqueous Micellar Solutions of Some N-Alkyl-Nicotinamide and N-Alkyl-Pyridinium Halide Surfactants: Apparent and Partial Molar Enthalpies, *Thermochimica Acta* 168 (1990) 143-159.
- [8] E. Fiscaro, M. Barbieri, E. Pelizzetti, P. Savarino, Temperature Dependence of Enthalpic Properties of Aqueous Micellar Solutions of Some N-Alkyl-Nicotinamide Chloride Surfactants, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 87 (1991) 2983-2987.
- [9] E. Fiscaro, E. Pelizzetti, E. Lanfredi, P. Savarino, Osmotic Coefficients of N-nonyl- and N-decyl-Nicotinamide Chloride Surfactant Aqueous Solutions, *Progr. Colloid Polym. Sci.* 84 (1991) 474-482.
- [10] E. Fiscaro, E. Pelizzetti, G. Viscardi, P. Quagliotto, L. Trossarelli, Thermodynamic Properties of Aqueous Micellar Solutions of N-1H,1H,2H,2H Perfluoro-Octyl and Decyl Pyridinium Chlorides, *J. Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 84 (1994) 59-70.
- [11] E. Fiscaro, A. Ghiozzi, E. Pelizzetti, G. Viscardi, P. Quagliotto, Effect of the Counterion on Thermodynamic Properties of Aqueous Micellar Solutions of 1-(3,3,4,4,5,5,6,6,6-nonafluorohexyl) Pyridinium Halides. Part I: Apparent and Partial Molar Enthalpies and Volumes at 298 K, *J. Colloid Interface Sci.* 182 (1996) 549-557.
- [12] E. Fiscaro, A. Ghiozzi, E. Pelizzetti, G. Viscardi, P. Quagliotto, Effect of the Counterion on Thermodynamic Properties of Aqueous Micellar Solutions of 1-(3,3,4,4,5,5,6,6,6-nonafluorohexyl) Pyridinium Halides. Part II: Apparent and Partial Molar Enthalpies and Osmotic Coefficients at 313 K, *J. Colloid Interface Sci.* 184 (1996) 147-154.

- [13] J.E. Desnoyers, G. Perron, in R. Zana, (Ed.), *Surfactant Solutions - New Methods of Investigation*, Marcel Dekker Inc., New York, 1987, p.1 and references therein.
- [14] R. De Lisi, E. Fiscaro, S. Milioto, Thermodynamic Properties and Conductivities of some Dodecylsurfactants in Water, *J. Solution Chem.* 17 (1988) 1015-1041.
- [15] S.D. Wetting, R.E. Verrall, Thermodynamic Studies of Aqueous m-s-m Gemini Surfactant Systems, *Journal of Colloid and Interface Science* 235 (2001) 310-316.
- [16] R. De Lisi, S. Milioto, R.E. Verrall, Partial molar volumes and compressibilities of alkyltrimethylammonium bromides, *J. Solution Chem.* 19 (1990) 665-692.
- [17] M. Iqbal, R.E. Verral, Partial molar volumes and adiabatic compressibilities of glyceryl peptides at 25° C, *J. Phys. Chem.* 91 (1987) 967-971.
- [18] V. Chalikian, A.P. Sarvazyan, K. Breslauer, Partial molar volumes, expansibilities, and compressibilities of  $\alpha$ , $\omega$ -aminocarboxylic acids in aqueous solutions between 18 and 55 °C, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 13017-13026.
- [19] Carpena, P., Aguiar, J., Bernaola-Galvan, P., Ruiz, C. Carnero, *Langmuir*, 2002, 18, 6054

**CAPITOLO 2**  
**TENSIOATTIVI CATIONICI**

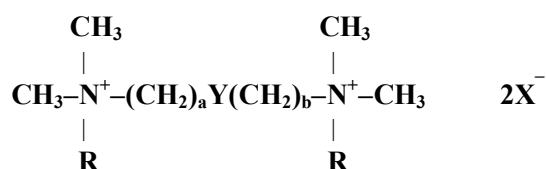
## PROPRIETA' TERMODINAMICHE E BIOLOGICHE DEI TENSIOATTIVI *GEMINI*

I tensioattivi *gemini*, o dimerici, sono composti costituiti da due parti anfifiliche legate, a livello delle teste polari, da un gruppo spaziatore che può essere di diversa natura: idrofilico o idrofobico, rigido o flessibile (Figura 1). Recentemente essi sono stati al centro di numerosi studi sperimentali. Questo, in parte, è dovuto alle opportunità uniche che queste molecole possono fornire in termini di variazione sia della dimensione che della composizione chimica dello spaziatore che tiene unite le due teste polari.



**Figura 1:** rappresentazione schematica dei tensioattivi *gemini*.

I tensioattivi gemini più studiati sono i cosiddetti tensioattivi *gemini m-s-m* (Figura 2), dove  $m$  indica il numero degli atomi di carbonio delle catene alchiliche alle estremità, mentre  $s$  il numero di metileni uniti a formare lo spaziatore. Variazioni delle dimensioni del gruppo spaziatore hanno mostrato, attraverso una serie di misure, di portare a cambiamenti nella morfologia di aggregazione, passando da micelle cilindriche per spaziatori corti, a micelle sferiche per spaziatori di media lunghezza ed infine a vescicole per catene spaziatrici lunghe [1].



**Figura 2:** struttura generale dei tensioattivi *m-s-m*, dove  $\text{R}=\text{C}_m\text{H}_{2m+1}$ ,  $\text{Y}=\text{CH}_2$ ,  $\text{X}=\text{controione}$  e  $a+b+1=s$ .

I vantaggi dei tensioattivi *gemini* rispetto ai relativi monomeri hanno portato ad un aumento della ricerca in questo campo, e gli studi riguardanti l'uso pratico delle molecole di *gemini* apparsi in letteratura di recente hanno mostrato che l'iniziale interesse speculativo è stato seguito da applicazioni pratiche [2-4]. Le tre proprietà principali alla base di tale interesse sono [5-85]:

1. concentrazione micellare critica (cmc) di uno o due ordini di grandezza più bassa di quella dei corrispondenti tensioattivi convenzionali (monomeri);
2. maggiore attività superficiale, quindi maggiore efficienza rispetto ai monomeri corrispondenti nel diminuire la tensione superficiale dell'acqua;
3. vantaggiose proprietà viscoelastiche, come l'ispessimento effettivo; infatti soluzioni acquose dei tensioattivi dimerici con spaziatore breve possono avere viscosità molto alte a concentrazioni relativamente basse, mentre le soluzioni dei corrispondenti tensioattivi monomerici hanno viscosità basse.

Il fatto che le proprietà dei tensioattivi dimerici possano essere molto diverse da quelle dei corrispondenti monomeri è stato messo in relazione con la distribuzione delle distanze tra i gruppi di testa nelle micelle formate da questi due tipi di tensioattivi [5]. Per i tensioattivi convenzionali la distribuzione ha un massimo ad una distanza di equilibrio termodinamico  $d_T \approx 0.7-0.9$  nm. Per i tensioattivi dimerici la distribuzione è bimodale, con un primo massimo alla distanza termodinamica  $d_T$  ed un altro più piccolo ad una distanza  $d_s$  che corrisponde alla lunghezza dello spaziatore. Questa lunghezza è determinata dalle lunghezze e dagli angoli di legame tra gli atomi che costituiscono lo spaziatore. Ci si aspetta che la distribuzione bimodale delle distanze dei gruppi di testa, e l'effetto del legame chimico tra tali gruppi sull'aggregazione delle catene alchiliche di tensioattivo nel core delle micelle, abbiano una grande influenza sulla forma delle micelle e sulle proprietà in soluzione. La distanza  $d_s$  può essere variata per renderla più piccola, uguale, o più grande di  $d_T$  modificando la struttura dello spaziatore.

Le applicazioni potenziali dei tensioattivi dimerici proposte in base alle loro peculiari proprietà hanno portato ad un rinnovato interesse dell'industria nei loro confronti.

E' stato riportato che tali composti hanno migliori proprietà di solubilizzazione, bagnabilità e capacità schiumogena rispetto ai tensioattivi classici [6]. Queste proprietà, in genere, sono usate per valutare il comportamento del tensioattivo. Inoltre, le temperature di Krafft dei composti dimerici con spaziatori idrofili sono generalmente molto basse, attribuendo a questi tensioattivi la capacità di essere usati in acqua fredda.

Infine i tensioattivi cationici d'ammonio bisquaternari mostrano una maggiore attività biologica rispetto ai corrispondenti monomeri, e sono risultati più attivi sia su scala molare che di peso per quanto riguarda l'attività germicida e battericida, e l'abilità nel legare le proteine [3,7].

Piuttosto recentemente è stato proposto il loro uso come vettori non virali in terapia genica [8-10].

Tra questi, i tensioattivi *gemini* sembrano essere i più promettenti [8-11]. Nel campo dei tensioattivi cationici, sono state studiate in particolare le strutture che portano un gruppo ammonico quaternario come

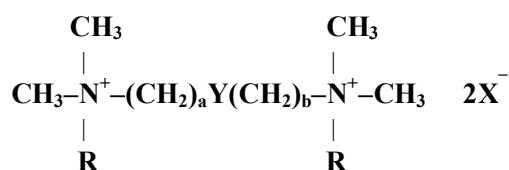
testa polare, a causa del loro semplice e veloce percorso sintetico [4,12-20]. Negli ultimi anni sono state preparate strutture nuove e più adeguate, che mostrano il grande interesse connesso con questi tipi di molecole [21]. Con lo scopo di raccogliere dati chimico fisico utili per correlare la struttura dei tensioattivi con l'abilità di trasfezione, sono state sottoposte a studi termodinamici le soluzioni dei più semplici e conosciuti tensioattivi *gemini*, i bromuri ammonici bisquaternari. Questi composti sono stati ampiamente studiati sotto il profilo chimico fisico da Zana e collaboratori [4,12-20]. I loro risultati sono un utile punto di partenza per l'interpretazione dei dati termodinamici.

La natura e la lunghezza dello spaziatore sono i parametri più importanti nel determinare le proprietà di tali composti.

**EVIDENZA TERMODINAMICA PER LA TRANSIZIONE “SPHERE TO ROD” DELLE  
MICELLE DI ALCUNI BROMURI DI PROPANDIIL- $\alpha,\omega$ -BIS(ALCHILDIMETILAMMONIO) IN  
SOLUZIONE ACQUOSA**

**Sintesi**

Presso il dipartimento di Chimica Generale ed Organica Applicata dell'Università di Torino, col quale il nostro gruppo di ricerca collabora da diverso tempo, sono stati sintetizzati vari tipi di tensioattivi d'ammonio bisquaternari, di cui si riporta di seguito la formula generale:



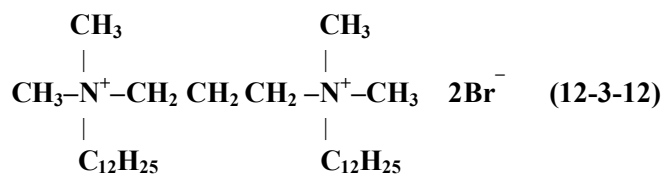
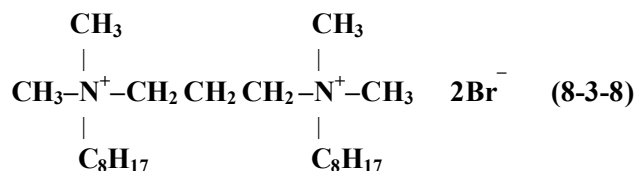
dove  $\text{R} = \text{C}_m\text{H}_{2m+1}$ ,  $\text{Y} = \text{CH}_2$  e  $\text{X} =$  controione, e che sono stati abbreviati col simbolo “ $m-s-m$ ” (nel quale  $s$  è il numero di atomi di carbonio dello spaziatore:  $s = a+b+1$ ).

L'interesse maggiore di tale serie di composti è dato dall'analisi delle modificazioni delle proprietà chimico-fisiche al variare della struttura chimica, per cui i parametri principalmente messi in gioco sono:

1. il numero di atomi di carbonio dello spaziatore Y, ovvero la sua lunghezza;
2. la lunghezza della catena laterale  $m$ ;
3. l'utilizzo di differenti controioni;
4. l'effetto delle modifiche delle proprietà precedenti sulla misura della tensione superficiale, di cmc, di Krafft point e, infine, sulla forma e struttura delle micelle.

Una volta stabiliti i fattori coinvolti, il criterio seguito è stato rappresentato dalla possibilità di ottenere i vari derivati con il minore sforzo sintetico, in modo da individuare le variabili implicate nel cambiamento del comportamento chimico-fisico.

Gli studi, in particolare, sono stati effettuati sui tensioattivi con  $s = 3$  e  $m = 8$  e  $12$ , di seguito riportati:



Tali tensioattivi sono stati sintetizzati attraverso un protocollo generale simile a quelli trovati in letteratura [86-87].

***Bromuro di propandiil- $\alpha,\omega$ -bis(ottildimetilammonio) (8-3-8)***

La N,N,N-ottildimetilammina (45.77 g, 0.291 mol) è stata sciolta in etanolo anidro e riscaldata a refluxo. Una soluzione di 1,3-dibromopropano (29.28 g, 0.145 mol) in etanolo è stata aggiunta sgocciolando lentamente. La reazione è stata fermata dopo 20 ore. La soluzione è stata evaporata ed il solido residuo è stato sospeso due volte in acetato di etile, fornendo così un solido bianco che è stato cristallizzato da metanolo/acetato di etile. I cristalli sono stati filtrati su un imbuto buckner sotto flusso di gas inerte. I cristalli aghiformi bianchi sono molto igroscopici. Resa: 47.28 g (63%).  $R_f$ : 0.03  $Al_2O_3$  (acetato di etile/metanolo 75:25);  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  0.87 ppm (t, 6H, 2  $CH_3$ ), 1.29 (m, 20H, 10  $CH_2$ ), 1.67 (m, 4H,  $N^+CH_2CH_2$ ), 2.17 (m, 2H,  $N^+CH_2CH_2CH_2N^+$ ), 3.06 (m, 12H, 4  $N^+CH_3$ ), 3.35 (m, 8H, 4  $N^+CH_2$ ).

***Bromuro di propandiil- $\alpha,\omega$ -bis(dodecildimetilammonio) (12-3-12)***

La N,N,N-dodecildimetilammina (10.45 g, 0.049 mol) è stata sciolta in etanolo anidro e riscaldata a refluxo. Una soluzione di 1,3-dibromopropano (5.00 g, 0.025 mol) in etanolo è stata aggiunta sgocciolando lentamente. La reazione è stata fermata dopo 24 ore. La soluzione è stata raffreddata a 0 °C ed è stata filtrata la massa solida. Un'ulteriore evaporazione della soluzione etanolica fornisce una seconda resa di prodotto solido. Il solido è stato cristallizzato da etanolo/acetato di etile. I cristalli sono stati filtrati su un imbuto buckner sotto flusso di gas inerte. I cristalli aghiformi bianchi sono molto igroscopici. Resa: 11.60g (75%).  $R_f$ : 0.03  $Al_2O_3$  (acetato di etile/metanolo 75:25);  $^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  0.86 ppm (t, 6H, 2  $CH_3$ ), 1.24 (m, 20H, 10  $CH_2$ ), 1.77 (m, 4H,  $N^+CH_2CH_2$ ), 2.66 (m, 2H,  $N^+CH_2CH_2CH_2N^+$ ), 3.38 (m, 12H, 4  $N^+CH_3$ ), 3.53 (m, 4H, 4  $N^+CH_2CH_2$ -catena), 3.80 (m, 4H, 4  $N^+CH_2CH_2CH_2N^+$ ).

## Risultati

I dati sperimentali sono stati espressi in termini di quantità molari apparenti e parziali del soluto, come abituale in termodinamica delle soluzioni, assumendo la diluizione infinita come stato di riferimento. Le quantità molari apparenti e parziali sono state ottenute dai dati sperimentali usando metodi descritti in dettaglio altrove [88-93].

Per motivo di chiarezza, si ricorda che, con riferimento allo stato di diluizione infinita, l'entalpia molare di diluizione,  $\Delta H_d$ , è data dalla equazione (1).

Per i tensioattivi ionici, nella regione premicellare, l'entalpia relativa molare apparente può essere espressa per mezzo di una polinomiale di  $m^{1/2}$ , equazione (2), fermando l'espansione seriale al terzo termine.

Nella regione micellare le entalpie molari apparenti sono state valutate per mezzo dell'equazione (1) e dell'interpolazione grafica.

Le entalpie molari parziali  $L_2$  sono state determinate tracciando la migliore curva delle entalpie molari apparenti in funzione della molalità e poi calcolando le quantità molari parziali come  $\Delta(m\Phi_L)/\Delta m$  dai punti interpolati ad intervalli regolari.

I calori di diluizione e le entalpie molari apparenti e parziali a 298 K, ottenuti per mezzo delle equazioni (1) e (2), per i composti da noi studiati, sono elencati nelle Tabelle 1 e 2. Nelle Figure 3 e 4 sono mostrati i grafici delle entalpie molari apparenti e parziali in funzione della molalità, per i composti 8-3-8 e 12-3-12.

I volumi molari apparenti,  $V_\phi$ , e le compressibilità adiabatiche,  $K_{s,\phi}$ , sono stati calcolati per mezzo delle equazioni (3) e (4). I coefficienti di compressibilità adiabatica del soluto sono stati ottenuti dalla equazione (5).

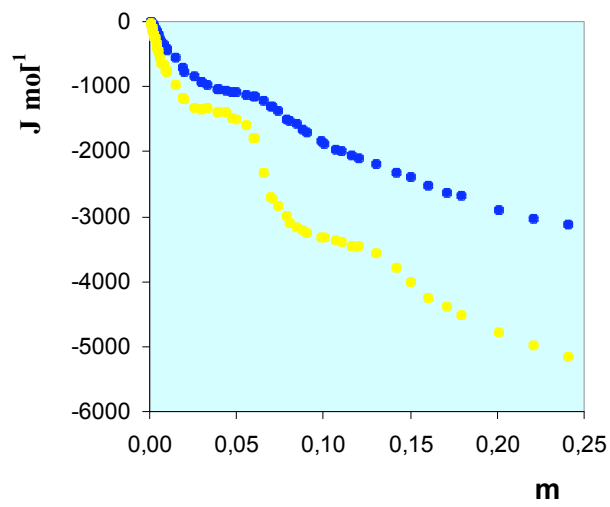
I dati di densità, velocità del suono, volumi molari apparenti, compressibilità adiabatiche e coefficienti di compressibilità adiabatica sono riportati nelle Tabelle 3 e 4, rispettivamente per 8-3-8 e 12-3-12. Nelle Figure 5 e 6 sono mostrati i grafici dei volumi molari apparenti in funzione della molalità, mentre in Figura 7 sono messe a confronto le compressibilità adiabatiche di tali composti in funzione della molalità.

Nella Tabella 5 sono indicate alcune proprietà, relative ai composti studiati, in fase micellare, dopo la micellizzazione e alla cmc.

**Tabella 1** Molalità ( $m$ ), entalpie di diluizione ( $\Delta H_d$ ), entalpie molari apparenti ( $\Phi_L$ ) e parziali ( $L_2$ ), del tensioattivo gemini 8-3-8, in acqua a 298 K (il pedice  $i$  indica stato iniziale,  $f$  stato finale).

$m_i$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$m_f$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$\Delta H_d$ (J mol <sup>-1</sup> )	$\Phi_{L_i}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$\Phi_{L_f}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{2i}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{2f}$ (J mol <sup>-1</sup> )
0.00150	0.00075	17.40	-34	-3	-120	-25
0.00201	0.00094	55.92	-57	-10	-155	-40
0.00301	0.00142	83.03	-106	-31	-240	-95
0.00401	0.00189	96.57	-155	-52	-375	-125
0.00501	0.00212	134.88	-204	-63	-450	-200
0.00502	0.00231	139.86	-205	-72	-460	-205
0.00602	0.00287	157.26	-257	-100	-555	-240
0.00703	0.00324	192.18	-309	-117	-640	-275
0.00802	0.00379	203.21	-347	-144	-675	-325
0.00903	0.00427	227.21	-395	-168	-750	-400
0.01003	0.00491	246.38	-446	-200	-775	-450
0.02007	0.00973	352.49	-764	-412	-1190	-760
0.03012	0.01454	373.63	-932	-559	-1345	-975
0.04017	0.01931	336.15	-1036	-700	-1400	-1175
0.05014	0.02543	246.54	-1081	-835	-1500	-1325
0.06012	0.03028	228.75	-1153	-925	-1790	-1345
0.07017	0.03324	324.91	-1299	-975	-2700	-1325
0.08027	0.03912	485.50	-1521	-1036	-3090	-1390
0.09029	0.04414	643.99	-1698	-1055	-3250	-1400
0.10025	0.04709	799.52	-1874	-1075	-3325	-1480
0.11032	0.05532	855.27	-1990	-1135	-3380	-1600
0.12042	0.06028	950.17	-2102	-1152	-3445	-1800
0.13051	0.06543	964.29	-2189	-1225	-3575	-2320
0.14166	0.07070	1012.55	-2317	-1305	-3795	-2725
0.15064	0.07368	1024.35	-2394	-1370	-4005	-2830
0.16049	0.07894	1020.28	-2520	-1500	-4250	-2980
0.17070	0.08445	1046.95	-2626	-1580	-4390	-3175
0.17909	0.08787	1038.93	-2688	-1650	-4520	-3220
0.20100	0.09869	1058.08	-2898	-1840	-4780	-3320
0.22074	0.10729	1070.11	-3030	-1960	-4990	-3370
0.24079	0.11648	1053.75	-3113	-2060	-5150	-3460

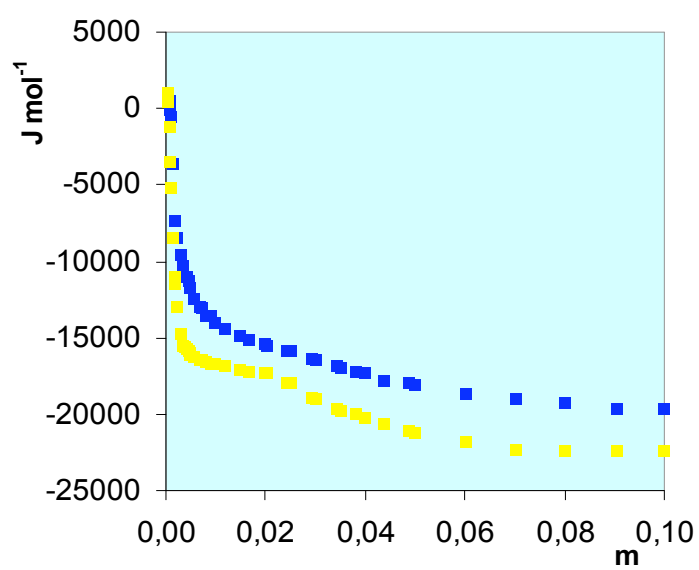
**Figura 3.** Entalpie relative molari apparenti (pallini blu) ed entalpie relative molari parziali (pallini gialli) del tensioattivo gemini 8-3-8 in funzione della concentrazione di tensioattivo.



**Tabella 2.** Molalità ( $m$ ), entalpie di diluizione ( $\Delta H_d$ ), entalpie molari apparenti ( $\Phi_L$ ) e parziali ( $L_2$ ) del tensioattivo gemini 12-3-12, in acqua a 298 K (il pedice  $i$  indica stato iniziale,  $f$  stato finale).

$m_i$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$m_f$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$\Delta H_d$ (J mol <sup>-1</sup> )	$\Phi_{L_i}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$\Phi_{L_f}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{2i}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{2f}$ (J mol <sup>-1</sup> )
0.00070	0.00034	410.82	535	939	-1200	1050
0.00090	0.00041	1021.78	-101	940	-3500	800
0.00100	0.00050	1411.61	-601	885	-5200	380
0.00199	0.00101	6775.12	-7376	-601	-11000	-5250
0.00301	0.00152	5975.42	-9550	-3576	-14800	-8500
0.00401	0.00205	3600.52	-10976	-7376	-15750	-11500
0.00501	0.00248	3301.36	-11800	-8500	-16100	-13000
0.00591	0.00299	2993.46	-12543	-9550	-16300	-14800
0.00702	0.00351	2770.29	-13020	-10250	-16450	-15500
0.00801	0.00393	2594.45	-13570	-10976	-16600	-15700
0.00902	0.00450	2360.66	-13610	-11250	-16700	-15950
0.01002	0.00498	2226.45	-14026	-11800	-16800	-16000
0.01507	0.00722	1863.99	-14963	-13100	-17100	-16450
0.02005	0.00990	1464.16	-15494	-14030	-17350	-16750
0.02509	0.01199	1495.24	-15945	-14450	-17950	-16900
0.03005	0.01486	1552.64	-16482	-14930	-19000	-17050
0.03512	0.01674	1791.52	-16941	-15150	-19750	-17200
0.04007	0.01973	1849.64	-17299	-15450	-20250	-17350
0.05015	0.02454	2163.16	-18063	-15900	-21250	-17900
0.06021	0.02931	2282.41	-18682	-16400	-21850	-18900
0.07010	0.03437	2192.04	-19092	-16900	-22350	-19600
0.08025	0.03820	2117.07	-19317	-17200	-22450	-20050
0.09020	0.04383	1859.14	-19709	-17850	-22450	-20600
0.10017	0.04867	1649.19	-19684	-18000	-22500	-21150

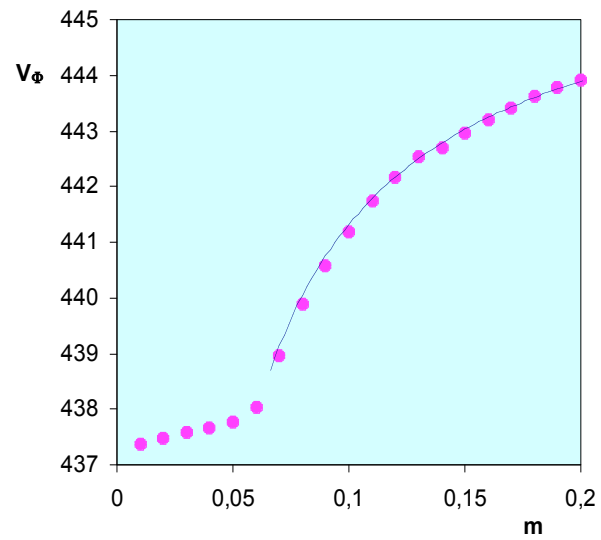
**Figura 4.** Entalpie relative molari apparenti (quadrati blu) ed entalpie relative molari parziali (quadrati gialli) del tensioattivo gemini 12-3-12 in funzione della concentrazione di tensioattivo.



**Tabella 3.** Densità ( $d$ ), volume molare apparente ( $V_\phi$ ), velocità del suono ( $U$ ), coefficiente di compressibilità adiabatica ( $\beta_s$ ) e compressibilità isoentropiche ( $K_{s,\phi}$ ) in funzione della molalità ( $m$ ), del tensioattivo gemini 8-3-8, in acqua a 298 K.

$m$ (mol Kg <sup>-1</sup> )	$d$ (g cm <sup>3</sup> )	$V_\phi$ (cm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	$U$ (m s <sup>-1</sup> )	$10^5\beta_s$ (bar <sup>-1</sup> )	$K_{s,\phi}$ (cm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> bar <sup>-1</sup> )
0.25020997	1.013526	444.40	1525.15	4.2422	0.009537
0.24002640	1.012933	444.34	1524.66	4.2473	0.009373
0.22995073	1.012355	444.21	1524.19	4.2524	0.009193
0.22005399	1.011767	444.15	1523.74	4.2573	0.008998
0.21008085	1.011182	444.02	1523.29	4.2622	0.008772
0.20028054	1.010594	443.92	1522.73	4.2676	0.008553
0.19001667	1.009974	443.79	1522.28	4.2727	0.008274
0.18002204	1.009370	443.63	1521.79	4.2780	0.007994
0.16999773	1.008765	443.42	1521.31	4.2833	0.007671
0.15999497	1.008155	443.19	1520.84	4.2885	0.007305
0.15006922	1.007543	442.95	1520.38	4.2937	0.006891
0.14006686	1.006917	442.70	1519.91	4.2990	0.006419
0.13018288	1.006278	442.53	1519.40	4.3046	0.005913
0.11999737	1.005634	442.16	1518.88	4.3104	0.005284
0.11003225	1.004999	441.73	1518.39	4.3159	0.004544
0.10001859	1.004361	441.18	1517.70	4.3220	0.003694
0.09003018	1.003710	440.58	1517.14	4.3285	0.002657
0.08004755	1.003049	439.89	1516.50	4.3350	0.001424
0.07004101	1.002384	438.96	1515.73	4.3423	-0.000062
0.06014616	1.001701	438.03	1514.61	4.3517	-0.001623
0.05004699	1.000950	437.77	1512.43	4.3675	-0.002589
0.04002278	1.000185	437.67	1509.46	4.3881	-0.002790
0.03001422	0.999412	437.58	1506.47	4.4089	-0.003072
0.02001050	0.998631	437.49	1503.36	4.4307	-0.003273
0.01000846	0.997842	437.36	1500.21	4.4528	-0.003633

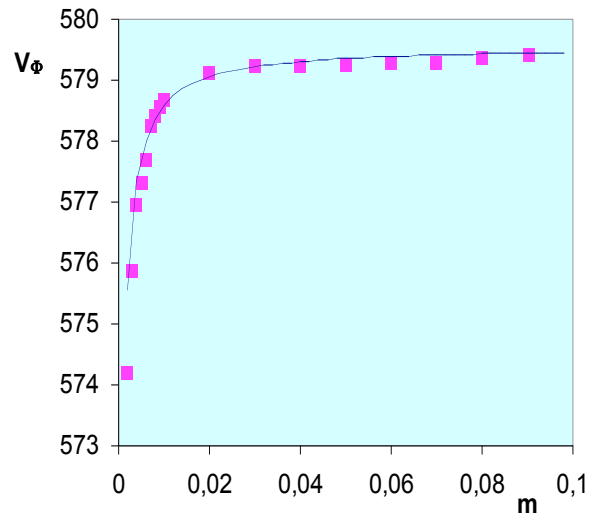
**Figura 5.** Volume molare apparente del tensioattivo 8-3-8 in funzione della concentrazione di tensioattivo. Sono inclusi anche i risultati dell'interpolazione dei dati sperimentali attraverso l'equazione (6) (linea continua).



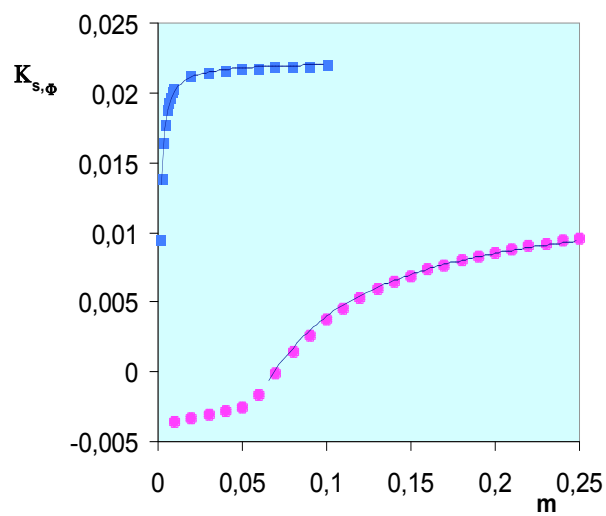
**Tabella 4.** Densità ( $d$ ), volume molare apparente ( $V_\phi$ ), velocità del suono ( $U$ ), coefficiente di compressibilità adiabatica ( $\beta_s$ ) e compressibilità isoentropiche ( $K_{s,\phi}$ ) in funzione della molalità ( $m$ ), del tensioattivo gemini 12-3-12, in acqua a 298 K.

$m$ (mol Kg <sup>-1</sup> )	$d$ (g cm <sup>3</sup> )	$V_\phi$ (cm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	$U$ (m s <sup>-1</sup> )	$10^5 \beta_s$ (bar <sup>-1</sup> )	$K_{s,\phi}$ (cm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> bar <sup>-1</sup> )
0.100490	1.001863	579.51	1499.78	4.4375	0.021917
0.090213	1.001402	579.43	1499.65	4.4403	0.021831
0.080046	1.000937	579.36	1499.40	4.4438	0.021800
0.070019	1.000472	579.28	1499.18	4.4472	0.021741
0.060002	0.999998	579.27	1498.94	4.4507	0.021680
0.050010	0.999521	579.24	1498.69	4.4544	0.021604
0.040002	0.999038	579.21	1498.38	4.4583	0.021489
0.030035	0.998547	579.22	1498.13	4.4620	0.021419
0.020018	0.998052	579.12	1497.85	4.4659	0.021168
0.010003	0.997553	578.68	1497.59	4.4697	0.020264
0.009002	0.997506	578.55	1497.58	4.4700	0.019944
0.008002	0.997453	578.41	1497.57	4.4703	0.019566
0.007000	0.997406	578.24	1497.54	4.4707	0.019249
0.006011	0.997358	577.70	1497.51	4.4711	0.018669
0.005001	0.997307	577.31	1497.51	4.4713	0.017703
0.004001	0.997256	576.95	1497.50	4.4716	0.016384
0.003002	0.997206	575.85	1497.51	4.4718	0.013813
0.002001	0.997152	574.19	1497.49	4.4721	0.009379

**Figura 6.** Volume molare apparente del tensioattivo 12-3-12 in funzione della concentrazione di tensioattivo. Sono inclusi anche i risultati dell'interpolazione dei dati sperimentali attraverso l'equazione 6 (linea continua).



**Figura 7.** Compressibilità isoentropiche molari apparenti del tensioattivo gemini 8-3-8 (rosa) e 12-3-12 (blu) in funzione della concentrazione di tensioattivo. Sono indicati anche i risultati ottenuti dall'interpolazione attraverso l'equazione 6 (linea continua).



**Tabella 5.** Valori di  $X_{\phi}^{\circ}$ , la proprietà a diluizione infinita,  $X_{\phi,M}$ , la proprietà in fase micellare,  $\Delta X_{\phi,M}$ , il cambiamento della proprietà dopo micellizzazione,  $X_{\phi,cmc}$ , la proprietà alla cmc, per i composti studiati.

composto	X	$X_{\phi}^{\circ}$	$X_{\phi,M}$	$\Delta X_{\phi,M}$	$X_{\phi,CMC}$	cmc
<b>8-3-8</b>	$V^a$	437.3	446.5(1)	9.5(2)	437.2(2)	0.056
	$K_s^b$	-0.003842	.01305(10)	0.01633(10)	-0.00329(10)	
<b>12-3-12</b>	$V^a$	571.2 <sup>d</sup>	579.6(2)	11.7(2)	567.8(2)	0.00091
	$K_s^b$	-0.00536 <sup>e</sup>	0.02225(10)	0.02572(10)	-0.00348(10)	

(a)  $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$

(b)  $\text{bar}^{-1} \text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$

(c) mole  $\text{kg}^{-1}$

(d) dal rif. 94

(e) dall'approccio del contributo di gruppo (rif. 99)

## Discussione

Fino ad ora sono stati pubblicati solo pochi dati sulla termodinamica delle soluzioni dei tensioattivi *gemini* [20, 93], e sono ancora aperte un gran numero di questioni sul loro comportamento. Per esempio, non è ancora stato completamente chiarito se l'approccio del contributo di gruppo sia valido anche nel caso dei tensioattivi *gemini*, e se sia possibile usare il contributo di gruppo ottenuto dagli studi dei monomeri per prevedere le proprietà delle soluzioni di tensioattivi *gemini*. Inoltre, si sa [16, 18] che questa classe di tensioattivi subisce in soluzione una transizione strutturale da micelle sferiche ad allungate, ma non ci sono evidenze sperimentali che esse siano individuabili attraverso l'uso di metodi termodinamici. In generale, per quanto riguarda i tensioattivi normali, la loro transizione di fase in soluzione implica quantità di calore troppo piccole per essere rilevate da misure di entalpia, ma altre proprietà termodinamiche derivate seconde sembrano essere sensibili alla transizione strutturale [89].

Noi abbiamo scelto di svolgere misure su due bromuri ammonici biquaternari tensioattivi, aventi lo stesso spaziatore, costituito da tre gruppi metilenici, e differenti lunghezze della catena, chiamati composti diottile (8-3-8) e didodecile (12-3-12). Questa scelta è dovuta principalmente a due ragioni: i) la ben documentata transizione “*sphere-to-rod*” per il composto 12-3-12 [16, 18] e per i composti aventi uno spaziatore corto; ii) dati di conducibilità [17] che mostrano il differente comportamento tra 8-3-8 e 12-3-12 nella regione premicellare. Infatti, alcuni articoli molto interessanti riguardo al numero di aggregazione e la forme delle micelle del composto didodecile in funzione della lunghezza dello spaziatore sono comparsi in letteratura molto tempo fa, mostrando i cambiamenti strutturali del 12-3-12 in funzione della concentrazione. Sono state utilizzate tecniche di ‘time-resolved fluorescence quenching’ (TRFQ) per la determinazione del numero di aggregazione e di microscopia di trasmissione elettronica alla temperatura criogenica (Cryo-TEM) per la visualizzazione diretta degli aggregati. A concentrazioni vicine alla cmc, le micelle di 12-3-12 sono sferiche con un numero di aggregazione di 25: questo significa che circa 50 catene dodeciliche sono legate insieme. Questo numero aumenta significativamente con la concentrazione suggerendo un cambiamento di forma verso micelle allungate, confermato dalle immagini ‘Cryo-TEM’ e dall'andamento della viscosità. Misure di ‘*small angle neutron scattering*’ (SANS) convengono con le osservazioni di cui sopra. In letteratura sono riportati un valore di cmc di 55mM ed un grado di ionizzazione  $\alpha=0.27$  per 8-3-8 [15] e  $\text{cmc}=0.91$  mM per 12-3-12 [13, 14]. In un articolo precedente [12] è stato riportato per 8-3-8 un valore di 20 mM.

Dati di conducibilità in funzione della concentrazione per 8-3-8 [15], mostrano una prima brusca variazione di pendenza a 20 mM ed un secondo salto a 55 mM. Il valore di concentrazione cui avviene la seconda variazione di pendenza è stato assunto come cmc, in seguito ai dati di adsorbimento spettrofluorometrico ed ultrasonico. Da nostri esperimenti di conducibilità, qui non riportati, è stato determinato un valore di  $56 \text{ mmol kg}^{-1}$  per la cmc di 8-3-8, in buon accordo con i dati di letteratura riportati sopra: questo valore è stato utilizzato nei successivi calcoli. I dati ottenuti da uno studio di conducibilità elettrica dei composti precedenti sono stati interpretati in termini di accoppiamento ionico nella zona premicellare per il composto 8-3-8 [17]. Al contrario il 12-3-12 si comporta normalmente come un elettrolita

forte. Questi fatti ben documentati come influiscono sulle proprietà termodinamiche delle soluzioni acquose? Noi ci aspettiamo che, a causa del forte effetto energetico delle interazioni ioniche, l'andamento delle entalpie molari parziali in funzione della concentrazione sia influenzato dalle osservazioni fatte precedentemente.

### ***Entalpie molari apparenti e parziali***

L'andamento generale atteso per i tensioattivi ionici è, in effetti, il seguente: le curve, dopo un aumento nella zona premicellare, tendono a livellarsi alle concentrazioni sopra la cmc, dove esse sono quasi parallele. L'abbassamento delle curve nella regione micellare, proporzionale al numero di atomi di carbonio nella catena alchilica, è attribuito alle interazioni elettrostatiche nella soluzione micellare. Le curve delle entalpie molari apparenti e parziali dei composti studiati in funzione della concentrazione, riportati nelle Figure 3 e 4, mostrano un andamento molto particolare. Le curve del 12-3-12 a concentrazioni molto basse sono positive, come in genere ci si aspetta. Al contrario, le curve delle entalpie molari apparenti e parziali dell'8-3-8 in funzione della concentrazione mostrano nella regione premicellare un andamento differente: nonostante il più alto valore di cmc, esse sono sempre negative partendo dalle più basse concentrazioni esaminate. La spiegazione di questo differente e inusuale comportamento può essere trovata nelle interazioni predominanti nelle soluzioni diluite dovute alla lunghezza della estremità idrofobica, come già suggerito dalla interpretazione dei dati di conducibilità [11, 17]: per l'8-3-8, le interazioni di accoppiamento ionico che implicano processi esotermici, sono prevalenti, mentre il 12-3-12 si comporta in modo regolare. Le entalpie molari parziali di quest'ultimo diminuiscono esattamente sotto la cmc fino ad un primo plateau, dovuto alla formazione delle micelle sferiche, poi si vede chiaramente un nuovo salto più piccolo che inizia alle concentrazioni superiori a 0.02 m fino ad un secondo plateau stimato alle concentrazioni superiori di 0.045 m. Nel caso del composto dodecilico, le entalpie di diluizione sono state misurate fino alla concentrazione di 0.1 m: campioni di concentrazione superiore non possono essere iniettati nella cella del nostro calorimetro, a causa della viscosità molto alta, ulteriore evidenza di un cambiamento nella struttura della soluzione. Il ben documentato cambiamento nella forma delle micelle, sopra riportato, potrebbe offrire una possibile spiegazione del comportamento osservato, essendo il primo salto associato alla formazione delle micelle sferiche, il secondo alla transizione da micelle sferiche ad allungate.

Per 8-3-8 il primo plateau finisce alla cmc. Poi, dopo un primo salto, che corrisponde alla formazione delle micelle sferiche, si arriva ad un secondo plateau. Un salto meno ripido, concentrato attorno a 0.15 m sembra corrispondere alla formazione di micelle allungate, in accordo con i dati di letteratura.

Allo scopo di ottenere il cambiamento di entalpia sopra la micellizzazione,  $\Delta H_M$ , noi abbiamo applicato un modello di transizione di pseudo-fase, nel quale il processo di aggregazione è considerato come una fase di transizione, dal momento che avviene all'equilibrio. In questo modello si assume che, alla cmc, le proprietà molari parziali presentino una discontinuità dovuta alla formazione della pseudo-fase. I parametri della micellizzazione sono stati ottenuti estrapolando alla cmc l'andamento delle proprietà molari parziali prima e dopo la cmc [88, 93]. Infatti, attorno alla cmc, avvengono cambiamenti piuttosto netti, ma essi non

sono mai discontinui, specialmente per tensioattivi con catena idrofobica corta. Seguendo questa procedura, risulta  $\Delta H_M = -1.9 \text{ kJ mol}^{-1}$  per 8-3-8 e  $\Delta H_M = -16.9 \text{ kJ mol}^{-1}$  per 12-3-12 per la formazione delle micelle sferiche. Nella transizione “sphere-to-rod” sembra essere implicata una grande quantità di calore. Dai grafici in Figura 3, in accordo con l’interpretazione proposta sopra,  $\Delta H_{s \rightarrow r}$  risulta  $-1.5 \text{ kJ mol}^{-1}$  per 8-3-8 e  $-3.9 \text{ kJ mol}^{-1}$  per 12-3-12.

Qualche tempo fa alcuni di noi ebbero l’opportunità di osservare un andamento paragonabile per le entalpie molari parziali di un tensioattivo anionico, il 4-(esilcarbonilammino)-2-idrossibenzoato di potassio (KPAS-C<sub>7</sub>) in soluzione di KOH 0.02 m [91, 92]. Alla concentrazione del tensioattivo di circa  $0.14 \text{ mol Kg}^{-1}$ , un repentino cambiamento nella pendenza suggerì una transizione strutturale nella soluzione, sperimentalmente attribuita alla transizione “*sphere-to-rod*”. In quel momento noi avevamo proposto, come fattore determinante, la possibilità di un riarrangiamento intramicellare dei legami idrogeno tra l’OH ed il gruppo carbossilico della regione salicilica da legami idrogeno intramolecolari a intermolecolari. I risultati ottenuti dallo studio dei composti *gemin*i 8-3-8 e 12-3-12 sembrano supportare la nostra ipotesi. Infatti, quando si forma un legame idrogeno intermolecolare, il sistema sembra una specie di tensioattivo *gemin*i con uno spaziatore molto corto, simile al composto 8-3-8 che noi abbiamo analizzato. Questa conformazione potrebbe giustificare la transizione “*sphere-to-rod*” osservata. Inoltre, il valore di  $\Delta H_{s \rightarrow r}$  per KPAS-C<sub>7</sub>, attorno a  $-1.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ , è esattamente confrontabile con quello di 8-3-8.

### ***Volumi e compressibilità adiabatica***

I volumi molari apparenti per i tensioattivi *gemin*i di tipo *m-s-m* in soluzione acquosa sono già stati studiati da Wettig e Verral [94]. Le compressibilità adiabatiche sono qui riportate per la prima volta. Nelle Figure 5 e 6 sono mostrati rispettivamente gli andamenti dei volumi molari apparenti di 8-3-8 e 12-3-12, e nella Figura 7 le compressibilità molari apparenti adiabatiche in funzione della concentrazione. Nonostante la grande accuratezza che noi abbiamo utilizzato nei nostri esperimenti, le curve non mostrano un peculiare andamento attorno alle concentrazioni alle quali ci aspetteremmo la transizione “sphere-to-rod”. Questo significa che il cambiamento nel volume coinvolto in tale transizione, se presente, è dello stesso ordine di grandezza dell’errore sperimentale. Il cambiamento nel volume sopra la micellizzazione è principalmente dovuto al cambiamento nella struttura delle molecole di acqua coinvolte nell’effetto idrofobico [95, 96] ed al cambiamento nella elettrostrizione della parte polare della molecola, modulata dal valore di  $\alpha$ , il grado di ionizzazione della micella: le proprietà volumetriche, come volume e compressibilità, riflettono, infatti, le interazioni soluto-solvente. E’ evidente che, quando inizia la formazione delle micelle, avviene un grande cambiamento in queste interazioni. Un ulteriore cambiamento nella struttura delle micelle, nel quale sono coinvolte principalmente le interazioni soluto-soluto di van der Waals, dà origine ad un cambiamento più piccolo nel volume molare apparente del tensioattivo. Gli stessi concetti sono validi per quanto riguarda le compressibilità.

Allo scopo di estrarre i parametri di micellizzazione, i dati volumetrici sono stati analizzati assumendo un modello di transizione di pseudo-fase [15, 94].

I valori dei volumi molari apparenti alla cmc ed in fase micellare concordano molto bene con quelli trovati da Wettig e Verral [94]. Il buon accordo tra i dati sperimentali e quelli stimati è mostrato nelle figure 13-15, nelle quali la linea continua rappresenta la funzione calcolata. Inoltre, nel caso di 8-3-8, il valore sperimentale di  $\Phi_X^\circ$ , ottenuto dall'extrapolazione a diluizione infinita dei dati sotto la cmc (riportati in Tabella 5), è confrontabile con i valori ottenuti da differenti approcci del contributo di gruppo [94, 97, 98].

Il contributo di gruppo del gruppo metilenico nel cambiamento del volume molare apparente sopra la micellizzazione, ottenuto dal confronto tra 8-3-8 e 12-3-12, è ridotto rispetto a quelli ottenuti dagli studi dei tensioattivi normali [90]. La riduzione di questo contributo di gruppo nel caso dei tensioattivi *gemini* è confermata dai dati riportati nel rif. 94, se vengono considerati i composti con spaziatore 3, escluso 8-3-8. Una possibile spiegazione di questo comportamento è che le catene alchiliche dei tensioattivi *gemini* siano già associate in soluzione, come noi avevamo proposto qualche anno fa [93].

Le compressibilità isoentropiche (vedi Figura 7), mostrano andamenti, in funzione di  $m$ , simili a quelli dei volumi, con un brusco aumento alla cmc, terminando con un plateau nella regione micellare, senza mostrare peculiarità. Nonostante sia generalmente accettato che queste proprietà, derivate seconde e di più alto ordine della energia libera, siano più sensibili alla transizione in soluzione, questo non avviene per le compressibilità che noi abbiamo misurato. La compressibilità, come le altre proprietà volumetriche, è strettamente associata alla struttura della sfera di idratazione della molecola: la rottura della cavità rigida contenente la porzione idrofobica della molecola di tensioattivo, insieme alla riduzione della elettrostrizione dovuta al legame del controione nelle micelle, permette un maggiore cambiamento del volume con la pressione. Ancora una volta la analogia tra il processo di micellizzazione e il "folding" delle proteine o dei polipeptidi è molto stretta: le proteine nello stato nativo e i polipeptidi "folded" mostrano compressibilità positiva. Al contrario, con l'approccio del contributo di gruppo sono state stimate compressibilità negative per lo stato completamente "unfolded", e i tensioattivi da noi studiati hanno mostrato compressibilità negative sotto la cmc (vedi Tabella 5). E' generalmente accettato che il contributo di gruppo del  $-\text{CH}_2-$  per la compressibilità molare è negativo ( $-1.9 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  in rif. 99,  $-1.6 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  in rif. 100) a diluizioni infinite. Noi abbiamo valutato  $K_{s,\Phi}^\circ$  di 8-3-8 extrapolando a diluizioni infinite l'andamento sperimentale sotto la cmc, mentre  $K_{s,\Phi}^\circ$  di 12-3-12 applicando il primo dei contributi di gruppo di cui sopra (Tabella 5). Entrambi i valori, come ci si aspettava, sono negativi. Nella Tabella 5 sono riportati anche i valori di  $K_{s,\Phi,\text{CMC}}$ , le compressibilità alla cmc, ottenute dalla equazione 7: essi sono negativi e l'allungamento della catena idrofobica abbassa i valori in misura limitata rispetto alla diluizione infinita. In fase micellare il contributo del gruppo  $-\text{CH}_2-$  diventa positivo: dai dati in Tabella 5 può essere ottenuto il valore di  $1.17 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ , più basso del valore di  $1.5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  ottenuto nel rif. 101 per il cambiamento nella compressibilità molare adiabatica, sopra la micellizzazione, dei monomeri dei bromuri di alchiltrimetilammonio. Il valore più basso rispetto ai monomeri potrebbe avvalorare le ipotesi sopra riportate di parziale associazione delle catene prima della cmc.

## Conclusioni

La valutazione delle entalpie molari apparenti e parziali a 298K di soluzioni acquose dei tensioattivi cationici *gemi* bromuro di propandiil- $\alpha,\omega$ -bis(ottildimetilammonio) e bromuro di propandiil- $\alpha,\omega$ -bis(dodecildimetilammonio) in funzione della concentrazione, permette la determinazione del cambiamento di entalpia associato alla transizione “sphere-to-rod” in fase micellare, ben documentato per i sistemi di cui sopra dai risultati ottenuti dagli studi di “*time-resolved fluorescence quenching*” (TRFQ) e microscopia di trasmissione elettronica alla temperatura criogenica (crio-TEM). I cambiamenti nelle entalpie al di sopra della micellizzazione e per la transizione da micelle sferiche ad allungate sono stati ottenuti dai dati sperimentali usando un modello di transizione di pseudo-fase. La transizione “sphere-to-rod” sembra essere un processo esotermico e la quantità di calore implicata aumenta all’aumentare della lunghezza della catena.  $\Delta H_{s \rightarrow r}$  risulta  $-1.5 \text{ kJ mol}^{-1}$  per 8-3-8 e  $-3.9 \text{ kJ mol}^{-1}$  per 12-3-12.

Inoltre i dati qui riportati sono un ulteriore contributo in supporto all’interpretazione di un andamento simile delle entalpie molari parziali di un tensioattivo anionico, il 4-(esilcarbonilammino)-2-idrossibenzoato di potassio (KPAS-C<sub>7</sub>) in soluzione di KOH 0.02 m, precedentemente studiato dal gruppo di ricerca presso il quale è stato svolto tale lavoro: a causa della formazione di legami idrogeno intermolecolari, questo tensioattivo può assumere una struttura molto simile a quella dei composti *gemi*. Il valore di  $\Delta H_{s \rightarrow r}$ , molto simile a quello di 8-3-8, potrebbe sostenere questa ipotesi.

D’altra parte, nessuna prova della transizione di cui sopra è messa in evidenza dagli andamenti delle proprietà volumetriche in funzione della molalità, nei limiti della precisione dei metodi sperimentali usati.

Il metodo del contributo di gruppo, usando i valori ottenuti dallo studio dei monomeri, sembra non essere adatto nel caso dei composti *gemi*.

Le compressibilità molari adiabatiche, qui riportate per la prima volta, mostrano un contributo di gruppo negativo per il gruppo metilenico, quando il tensioattivo è presente in soluzione come singola molecola, in accordo con i dati di letteratura, riflettendo la sua struttura solvatata. In fase micellare, il contributo del gruppo -CH<sub>2</sub>- diventa positivo: è stato ottenuto un valore di  $1.17 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  per il cambiamento nella compressibilità molare adiabatica sopra la micellizzazione, più basso di quello dei monomeri di bromuri di alchiltrimetilammonio. I valori più bassi del contributo del gruppo metilenico sulle proprietà volumetriche rispetto ai monomeri, supporta l’ipotesi di parziale associazione delle catene prima della cmc.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] S. D. Wettig, R. E. Verrall, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2001, 235, 310-316.
- [2] a) M. J. Rosen, D. J. Tracy, *J. Surfactants Deterg.*, 1998, 1, 547-554 e riferimenti inclusi. b) per una review più recente, vedi: F. M. Menger, J. S. Keiper, *Angew., Chem. Int. Ed.*, 2000, 39, 1906-1920.
- [3] E. Fiscaro, C. Compari, B. Róøycka-Roszak, G. Viscardi, P. Quagliotto, *Curr. Top. Colloid Interface Sci.*, 1997, 2, 54-68 e riferimenti inclusi.
- [4] R. Zana, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 1996, 1, 566-571 e riferimenti inclusi.
- [5] D. Danino, A. Kaplun, Y. Talmon, R. Zana, *Structure and Flow in Surfactant Solutions* (C. A. Herb and R. K. Prud'homme, Eds.), *ACS Symp. Am. Chem. Soc.*, Washington, DC, 1994, Ser. 578, 6, 105.
- [6] M. J. Rosen, *Chem. Technol.*, 1993, 30.
- [7] G. Viscardi, P. Quagliotto, C. Barolo, P. Savarino, E. Barni, E. Fiscaro, *J. Org. Chem.*, 2000, 65, 8197-8203.
- [8] P. C. Bell, M. Bergsma, I. P. Dolbnya, W. Bras, M. C. A. Stuart, A. E. Rowan, M.C. Feiters, J. B. F. N. Engberts, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 1551-1558.
- [9] A. J. Kirby, P. Camillieri, J. B. F. N. Engberts, M. C. Feiters, R. J. M. Nolte, O. Soderman, M. Bergsma, P. C. Bell, M. L. Fielden, C. L. Garcia Rodriguez, P. Guedat, A. Kremer, C. McGregor, C. Perrin, G. Ronsin, M. C. P. van Eijk, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, 42, 1448-1457.
- [10] X. Chen, J. Wang, N. Shen, Y. Luo, L. Lin, M. Liu, R. K. Thomas, *Langmuir*, 2002, 18, 6222-6228.
- [11] P. Quagliotto, G. Viscardi, C. Barolo, E. Barni, S. Bellinvia, C. Santoro, C. Compari, E. Fiscaro, in preparazione.
- [12] R. Zana, M. Benraou, R. Rueff, *Langmuir*, 1991, 7, 1072-1075.
- [13] E. Alami, H. Levy, R. Zana, *Langmuir*, 1993, 9, 940-944.
- [14] E. Alami, G. Beinert, P. Marie, R. Zana, *Langmuir*, 1993, 9, 1465-1467.
- [15] M. Frindi, B. Michels, H. Levy, R. Zana, *Langmuir*, 1994, 10, 1140-1145.
- [16] D. Danino, Y. Talmon, R. Zana, *Langmuir*, 1995, 11, 1448-1456.
- [17] R. Zana, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2002, 246, 182-190.
- [18] H. Hirata, N. Hattori, M. Ishida, H. Okabayashi, M. Frusaka, R. Zana, *J. Phys. Chem*, 1995, 99, 17778-17784.
- [19] R. Zana, *Surfactant Science Series*, 2003, 112 (*Structure-Performance Relationships in Surfactants* (2nd Edition)), 341-380 e riferimenti inclusi.
- [20] L. Grosmaire, M. Chorro, C. Chorro, S. Partyka, R. Zana, *Prog. Colloid Polym Sci*, 2000, 115, 31-35.
- [21] L. Perez, J. L. Torres, A. Mansera, C. Solanas, M. R. Infante, *Langmuir*, 1996, 12, 5296-5301.
- [22] F. Devinsky, I. Lacko, F. Bittererova, L. Tomeckova, *J. Colloid Interface Sci*, 1986, 114, 314 e riferimenti inclusi.
- [23] F. Devinsky, I. Lacko, *Tenside Deterg*, 1990, 27, 344.
- [24] A. Pinazo, M. Diz, C. Solans, M. A. P'és, P. Era, M. R. Infante, *J. Am. Oil Chem. Soc*, 1993, 70, 37.
- [25] F. Devinsky, L. Masarova, I. Lacko, *J. Colloid Interface Sci*, 1985, 105, 235 e riferimenti inclusi.

- [26] F. M. Menger, J. S. Keiper, V. Azov, *Langmuir*, 2000, 16, 2062.
- [27] F. M. Menger, C. A. Littau, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 10083.
- [28] A. Espert, R. v. Klitzing, P. Poulin, A. Colin, R. Zana, D. Langevin, *Langmuir*, 1998, 14, 1140.
- [29] A. Pinazo, M. R. Infante, C.-H. Chang, E. I. Franses, *Colloids Surf. A*, 1994, 87, 117.
- [30] T. Takemura, M. Shiina, M. Izumi, K. Nakamura, M. Miyazaki, K. Torigoe, K. Esumi, *Langmuir*, 1999, 15, 646.
- [31] K. Esumi, K. Taguma, Y. Koide, *Langmuir*, 1996, 12, 4039.
- [32] Z. X. Li, C. C. Dong, R. K. Thomas, *Langmuir*, 1999, 15, 4392.
- [33] J. Eastoe, S. Nave, A. Downer, A. Paul, A. Rankin, K. Tribe, J. Penfold, *Langmuir*, 2000, 16, 4511.
- [34] R. Zana, *J. Colloid Interface Sci*, 2002, 246, 182.
- [35] E. Alami, G. Beinert, P. Marie, R. Zana, *Langmuir*, 1993, 9, 1465.
- [36] E. Alami, H. L'evy, R. Zana, A. Skoulios, *Langmuir*, 1993, 9, 940.
- [37] F. M. Menger, S. Wrenn, *J. Phys. Chem.*, 1974, 78, 1387.
- [38] M. Dreja, W. Pyckhout-Hintzen, H. Mays, B. Tiecke, *Langmuir*, 1999, 15, 391.
- [39] H. Diamant, D. Andelman, *Langmuir*, 1994, 10, 2910; 1995, 11, 3605.
- [40] M. J. Rosen, J. H. Mathias, L. Davenport, *Langmuir*, 1999, 15, 7340.
- [41] L. Song, M. J. Rosen, *Langmuir*, 1996, 12, 1149.
- [42] M. In, V. Bec, O. Aguerre-Chariol, R. Zana, *Langmuir*, 2000, 16, 141.
- [43] T. Gao, M. J. Rosen, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1994, 71, 771.
- [44] M. Rosen, L. D. Song, *J. Colloid Interface Sci*, 1996, 179, 261.
- [45] C. Chorro, M. Chorro, O. Dolladille, S. Partyka, R. Zana, *J. Colloid Interface Sci*, 1998, 199, 169.
- [46] C. Chorro, M. Chorro, O. Dolladille, S. Partyka, R. Zana, *J. Colloid Interface Sci*, 1999, 210, 134.
- [47] L. Grosmaire, Doctorat de l'Université Montpellier 2, University of Montpellier 2, Montpellier, France, July 2001.
- [48] K. Esumi, M. Goino, Y. Koide, *J. Colloid Interface Sci*, 1996, 183, 539.
- [49] S. Manne, T. E. Schaffer, Q. Huo, P. K. Hansma, D. E. Morse, G. D. Stucky, I. A. Aksay, *Langmuir*, 1993, 13, 6382.
- [50] R. Zana, *Adv. Colloid Interface Sci*, 2002.
- [51] M. J. Rosenand, D. J. Tracy, *J. Surf. Deterg.*, 1998, 1, 547.
- [52] Y.-P. Zhu, A. Masuyama, Y. Kobata, Y. Nakatsuji, M. Okahara, M. J. Rosen, *J. Colloid Interface Sci*, 1993, 158, 40 e riferimenti inclusi.
- [53] R. Zana, 2002, 246, 175.
- [54] J. Zhao, S. D. Christian, B. M. Fung, *J. Phys. Chem. B*, 1998, 102, 761.
- [55] R. Zana, *Langmuir*, 1996, 12, 1208.
- [56] T. A. Camesano, R. Nagarajan, *Colloids Surf.*, 2000, 167, 165.
- [57] Y.-P. Zhu, K. Ishahara, A. Masuyama, Y. Nakatsuji, M. Okahara, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, 1993, 42, 1611.
- [58] R. Zana, M. Benraou, R. Rueff, *Langmuir*, 1991, 7, 1072.
- [59] F. Devinsky, I. Lacko, T. Imam, *Acta Fac. Pharm.*, 1990, 44, 103.
- [60] S. De, V. K. Aswal, P. S. Goyal, S. Bhattacharya, *J. Phys. Chem.*, 1996, 100, 11664.
- [61] L. Perez, A. Pinazzo, M. J. Rosen, M. R. Infante, *Langmuir*, 1998, 14, 2307.
- [62] B. Bai, H. Yan, R. K. Thomas, *Langmuir*, 2001, 17, 4501.
- [63] B. Bai, J. Wang, H. Yan, Z. Li, R. K. Thomas, *J. Phys. Chem. B*, 2001, 105, 3105.

- [64] L. Grosmaire, M. Chorro, C. Chorro, S. Partyka, R. Zana, *J. Colloid Interface Sci.*, in stampa.
- [65] R. E. Verrall, S. D. Wettig, *J. Colloid Interface Sci.*, 2001, 235, 301.
- [66] M. Frindi, B. Michels, H. L'evy, R. Zana, *Langmuir*, 1994, 10, 1140.
- [67] H. Hirata, N. Hattori, M. Ishida, H. Okabayashi, M. Furusaka, R. Zana, *J. Phys. Chem.*, 1995, 99, 17778.
- [68] N. Hattori, H. Hirata, H. Okabayashi, M. Furusaka, C. J. O'Connor, R. Zana, *Colloid Polym. Sci.*, 1999, 277, 95.
- [69] V. K. Aswal, S. De, P. S. Goyal, S. Bhattacharya, R. K. Heenan, *Phys. Rev. E*, 1998, 57, 776.
- [70] V. K. Aswal, S. De, P. S. Goyal, S. Bhattacharya, R. K. Heenan, *Phys. Rev. E*, 1999, 59, 3116.
- [71] F. M. Menger, J. S. Keiper, B. N. A. Mbadugha, K. L. Caran, L. S. Romsted, *Langmuir*, 2000, 16, 9092.
- [72] R. Zana, Y. Talmon, *Nature*, 1993, 362, 228.
- [73] D. Danino, Y. Talmon, R. Zana, *Langmuir*, 1995, 11, 1448.
- [74] A. Bernheim-Groswasser, R. Zana, Y. Talmon, *J. Phys. Chem. B*, 2000, 104, 4005.
- [75] D. Danino, Y. Talmon, H. L'evy, G. Beinert, R. Zana, *Science*, 1995, 269, 1420.
- [76] M. In, O. Aguerre-Chariol, R. Zana, *J. Phys. Chem. B.*, 1999, 103, 7747.
- [77] R. Zana, *Encyclopedia of Surface and Colloid Science* (A. Hubbard, Ed.), Dekker, New York, 2002.
- [78] R. Zana, W. Ulbricht, *Colloids Surf. A*, 2001, 183–185, 487.
- [79] Th. Dam, J. B. F. N. Engberts, J. Karthäuser, S. Karaborni, N. M. van Os, *Colloids Surf. A*, 1996, 118, 41.
- [80] U. Kastner, R. Zana, *J. Colloid Interface Sci.*, 1999, 218, 468.
- [81] R. Zana, M. Benrraou, *J. Colloid Interface Sci.*, 2000, 226, 286.
- [82] M. Pisarcik, M. Soldan, D. Bakos, F. Devinsky, I. Lacko, *Colloids Surf. A*, 1999, 150, 207.
- [83] M. Pisarcik, T. Imae, F. Devinsky, I. Lacko, D. Bakos, *J. Colloid Interface Sci.*, 2000, 228, 207.
- [84] S. Fuller, N. Shinde, G. J. Tiddy, G. S. Attard, O. Howell, *Langmuir*, 1996, 12, 1117.
- [85] N. Hattori, M. Hara, H. Okabayashi, C. J. O'Connor, *Colloid Polym. Sci.*, 1999, 277, 306.
- [86] a) R. Zana, M. Benrraou, R. Rueff, *Langmuir*, 1991, 7, 1072-1075. b) T. Dam, J.B.F.N Engberts, J. Karthäuser, S. Karaborni, N.M. van Os, *Colloids Surf. A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 1996, 118, 41-49.
- [87] E. Fiscaro, C. Compari, E. Duce paper in preparation.
- [88] J. E. Desnoyers, G. Perron, in *Surfactant Solutions - New Methods of Investigation*, Ed. R. Zana, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, p.1 e riferimenti inclusi.
- [89] R. De Lisi, E. Fiscaro, S. Milioto, *J. Solution Chem.*, 1988, 17, 1015.
- [90] E. Fiscaro, A. Ghiozzi, E. Pelizzetti, G. Viscardi, P. Quagliotto, *J. Colloid Interface Sci.*, 1996, 182, 549.
- [91] E. Fiscaro, E. Pelizzetti, M. Barbieri, P. Savarino, G. Viscardi, *Thermochimica Acta*, 1990, 162, 277-290.
- [92] E. Fiscaro, C. Compari, P. Quagliotto, G. Viscardi, *J. Colloid Interface Sci.*, 2002, 255(2), 410-416.
- [93] B. Rozycka-Roszak, E. Fiscaro, A. Ghiozzi, *J. Colloid Interface Sci.*, 1996, 184, 209-215.
- [94] S. D. Wetting, R. E. Verral, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2001, 235, 310-316.

- [95] E. Fiscaro, C. Compari, A. Braibanti, in preparazione.
- [96] A. Braibanti, E. Fiscaro, C. Compari, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2000, 61, 461-481.
- [97] P. Gianni, L. Lepori, *Journal of Solution Chemistry*, 1996, 25, 1-42.
- [98] P. Gianni, L. Lepori, *Journal Solution Chemistry*, 2000, 29, 405-447.
- [99] M. Iqbal, and R. E. Verral, *J. Phys. Chem.*, 1987, 91, 967-971.
- [100] T. V. Chalikian, A. P. Sarvazyan, K. Breslauer, *J. Phys. Chem.*, 1993, 97, 13017-13026.
- [101] De Lisi, S. Milioto, R. E. Verral, *J. Solution Chem.*, 1990, 19, 665-692.

## CLORURI DI AMMONIO BISQUATERNARIO BIOLOGICAMENTE ATTIVI: PROPRIETA' CHIMICO-FISICHE DI ANFIFILI A LUNGA CATENA E LORO VALUTAZIONE COME VETTORI NON-VIRALI PER "GENE DELIVERY"

Fra i tensioattivi gemini [1], le strutture più studiate, sotto il profilo dell'attività biologica e delle proprietà chimico-fisiche sono, come si è detto, i sali di ammonio bisquaternario (bisQUATS) e, in questo ambito, i derivati della N,N-bisdimetil-1,2-etandiammina, di formula generale  $/C_nH_{2n+1}OOCCH_2(CH_3)_2N^+CH_2CH_2N^+(CH_3)_2CH_2COOC_nH_{2n+1}/ 2Cl^-$  (bis- $C_n$ -BEC), dove  $n$  sta per il numero di atomi di carbonio della catena alchilica legata al gruppo carbossilico). Essi, almeno formalmente, possono essere considerati come doppi derivati anfifilici esterei della betaina ( $C_n$ -BEC), appartenenti alla classe dei tensioattivi "soft", ovvero tensioattivi capaci di trasformarsi in prodotti inattivi, evitando reazioni sito-specifiche non volute e, per questo, biodegradabili.

I tensioattivi cationici con un ammonio bisquaternario mostrano un'attività biologica maggiore dei rispettivi monomeri e risultano essere più attivi sia per quanto riguarda l'attività germicida che per la capacità di legare le proteine [2,3]. Recentemente è stato proposto l'impiego dei tensioattivi gemini come vettori non-virali in terapia genica [4-7], considerando la possibilità di sfruttare il loro carattere cationico che risulta necessario per legare e compattare il DNA e la loro elevata attività superficiale.

### Risultati

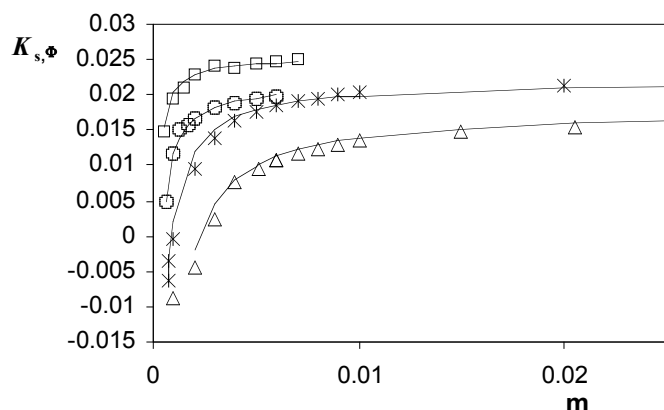
Sia i derivati anfifilici esterei della betaina che i derivati della N,N-bisdimetil-1,2-etandiammina sono stati sintetizzati presso la Technical University of Wroclaw dove sono state effettuate anche le misure di calorimetria a scansione differenziale [8-10].

### *Compressibilità adiabatiche apparenti*

I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 1. In Figura 1 sono mostrate le compressibilità isoentropiche molari apparenti in funzione della concentrazione. Gli andamenti mostrati, in funzione di  $m$ , sono simili a quelli dei volumi [11-16], con un brusco incremento alla cmc, che si conclude in un *plateau* nella regione micellare.

**Tabella 1** Velocità del suono ( $U$ ), coefficienti di compressibilità adiabatica ( $\beta_s$ ) e compressibilità isoentropiche ( $K_{s,\Phi}$ ) in funzione della molalità ( $m$ ) dei tensioattivi gemini Bis- $C_n$ BEC, in acqua a 298 K.

$m$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$U$ (m s <sup>-1</sup> )	$10^5\beta_s$ (bar <sup>-1</sup> )	$K_{s,\Phi}$ (cm <sup>3</sup> bar <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
Bis- $C_{10}$ -BEC			
0.03004	1500.35	4.4506	0.016100
0.02046	1499.49	4.4572	0.015464
0.01500	1499.00	4.4610	0.014747
0.01001	1498.53	4.4646	0.013508
0.00900	1498.45	4.4653	0.012996
0.00800	1498.36	4.4660	0.012426
0.00700	1498.29	4.4666	0.011563
0.00600	1498.18	4.4674	0.010607
0.00602	1498.18	4.4673	0.010633
0.00509	1498.11	4.4680	0.009414
0.00400	1498.05	4.4690	0.007631
0.00300	1497.97	4.4691	0.002448
0.00200	1497.86	4.4699	-0.004543
0.00100	1497.50	4.4724	-0.008667
Bis- $C_{12}$ -BEC			
0.00601	1497.67	4.4708	0.019905
0.00500	1497.60	4.4714	0.019426
0.00400	1497.52	4.4720	0.018919
0.00300	1497.40	4.4728	0.018121
0.00200	1497.33	4.4733	0.016618
0.00170	1497.31	4.4735	0.015651
0.00130	1497.25	4.4739	0.014997
0.00100	1497.25	4.4739	0.011664
0.00060	1497.22	4.4741	0.004738
Bis- $C_{14}$ -BEC			
0.00703	1497.62	4.4714	0.024916
0.00600	1497.56	4.4718	0.024639
0.00500	1497.48	4.4724	0.024502
0.00400	1497.43	4.4727	0.023873
0.00300	1497.32	4.4734	0.024010
0.00200	1497.26	4.4739	0.022747
0.00151	1497.09	4.4733	0.020894
0.00100	1497.14	4.4746	0.019451
0.00050	1497.09	4.4750	0.014845



**Figura 1.** Compressibilità apparenti molarie isoentropiche del Bis-C<sub>10</sub>BEC ( $\Delta$ ), del Bis-C<sub>12</sub>BEC (O), del Bis-C<sub>14</sub>BEC ( $\square$ ) e del tensioattivo gemini 12-3-12 (\*) in funzione della concentrazione del tensioattivo. La linea continua mostra il “fitting” dei dati sperimentali per mezzo dell’Eq. (6) .

La Tabella 2 mostra i valori ottenuti applicando il modello di pseudo-fase

**Tabella 2** Compressibilità isoentropica nella fase micellare,  $K_{s, \Phi, M}$ , variazione della compressibilità isoentropica nel processo di micellizzazione,  $\Delta K_{s, \Phi, M}$ , compressibilità isoentropica del monomero alla cmc,  $K_{s, \Phi, cmc}$ , compressibilità isoentropica alla cmc del monomero calcolata applicando l’additività di gruppi,  $K_{s, \Phi, cmc, calc}^a$ , per i composti in esame.

Composto	$K_{s, \Phi, M}^a$	$\Delta K_{s, \Phi, M}^a$	$K_{s, \Phi, cmc}^a$	$10^5 cmc^b$	$K_{s, \Phi, cmc, calc}^a$
Bis-C <sub>10</sub> -BEC	0.01789	0.02655	-0.008658	168	-0.00867
Bis-C <sub>12</sub> -BEC	0.02158	0.03056	-0.008972	32.4	-0.00895
Bis-C <sub>14</sub> -BEC	0.02542	0.03481	-0.009395	15.8	-0.00930

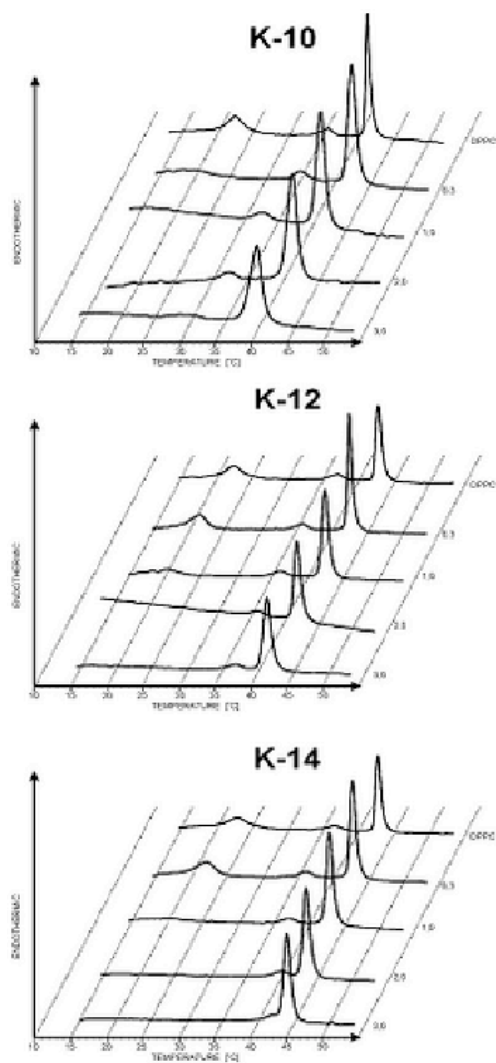
<sup>a</sup> bar<sup>-1</sup> cm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>

<sup>b</sup> mol kg<sup>-1</sup>

Nella stessa tabella sono inoltre presenti i valori di cmc per i composti in studio, ottenuti con esperimenti conduttimetrici qui non riportati, valori che sono in perfetto accordo con i dati di letteratura [15]. Il buono accordo tra i dati sperimentali e quelli calcolati è mostrato in Figura 1, nella quale la linea continua rappresenta la funzione calcolata. Inoltre, i valori di  $K_{s, \Phi, cmc}$ , ottenuti con l’eq. (7), sono in accordo con i valori stimati con l’approccio del contributo di gruppo, partendo dal valore sperimentale per il bis-C<sub>10</sub>-BEC e usando il contributo di gruppo del bromuro di alchiltrimetilammonio riportato da Dawson [17] e confermato da Fukada [18]. Questo contributo di gruppo ( $-0.87 \times 10^{-4}$  cm<sup>3</sup> bar<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>) è di poco inferiore a quello riportato da altri autori a diluizione infinita ( $-1.9 \times 10^{-4}$  cm<sup>3</sup> bar<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> Ref. [13], e  $-1.6 \times 10^{-4}$  cm<sup>3</sup> bar<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> in Ref. [14]), ma si riferisce allo stesso tipo di composti e sembra essere stato valutato molto accuratamente.

### Risultati DSC

L’influenza del bis-C<sub>10</sub>BEC, del bis-C<sub>12</sub>BEC e del bis-C<sub>14</sub>BEC sul comportamento della fase termotropica dei liposomi di DPPC è rappresentata in Figura 2.



**Figura. 2.** Curve DSC per MLVs a rapporti molari crescenti bis- $C_n$ -BEC/DPPC. Le curve sono state normalizzate rispetto alla quantità di DPPC.

I composti studiati influenzano in modo differente sia la temperatura che l'entalpia di pretransizione tra la fase gel e la fase ondulata (“*ripple*”), così come la transizione principale alla fase lamellare liquido-cristallina (Tabella 3).

**Tabella 3** Temperature di transizione ( $T_p$ ,  $T_m$ ) ed entalpie ( $\Delta H_p$ ,  $\Delta H_m$ ) per la pre-transizione e la fase principale di transizione delle miscele di bis- $C_n$ BEC/DPPC a vari rapporti molarli bis- $C_n$ BEC/lipide ( $n_k/n_L$ )

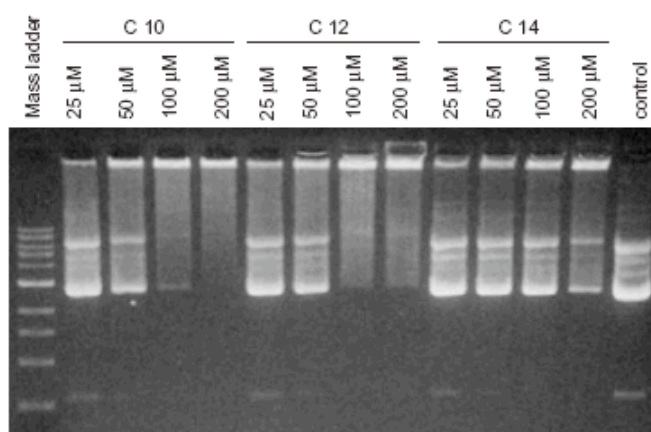
$n_k/n_L$	$T_p$ [°C]	$\Delta H_p$ [kJ/mol]	$T_m$ [°C]	$\Delta H_m$ [kJ/mol]
Bis- $C_{10}$ -BEC				
0.00	35.8	7.5	41.3	34.3
0.01	34.1	6.9	41.2	46.0
0.03	32.2	7.4	40.3	48.6
0.06	30.8	5.8	39.7	48.9
0.10	29.0	6.0	38.4	45.2
Bis- $C_{12}$ -BEC				
0.00	35.8	7.5	41.4	34.3
0.01	34.6	7.4	41.2	43.7
0.03	34.8	8.2	41.0	48.7
0.06	35.6	6.1	41.0	44.5
0.10	35.8	5.0	40.2	43.0
Bis- $C_{14}$ -BEC				
0.00	35.3	7.5	41.4	34.3
0.01	35.1	5.9	41.4	41.6
0.03	36.0	5.8	41.7	41.5
0.06	38.8	4.8	42.2	41.1
0.10	-	-	42.4	44.4

I composti bis- $C_{10}$ -BEC e bis- $C_{12}$ -BEC diminuiscono un po' la temperatura della fase principale di transizione ( $T_m$ ), mentre bis- $C_{14}$ -BEC la incrementa. Tutti i composti, ma il bis- $C_{14}$ -BEC più degli altri, aumentano l'entalpia di transizione ( $\Delta H_m$ ). Allo stesso modo del caso della fase principale di transizione, bis- $C_{10}$ -BEC e bis- $C_{12}$ -BEC spostano la pre-transizione verso temperature inferiori. Contrariamente al bis- $C_{10}$ -BEC ed al bis- $C_{12}$ -BEC, il bis- $C_{14}$ -BEC sposta gradualmente la pre-transizione più vicino alla transizione principale, ed alle concentrazioni più elevate le transizioni si sovrappongono.

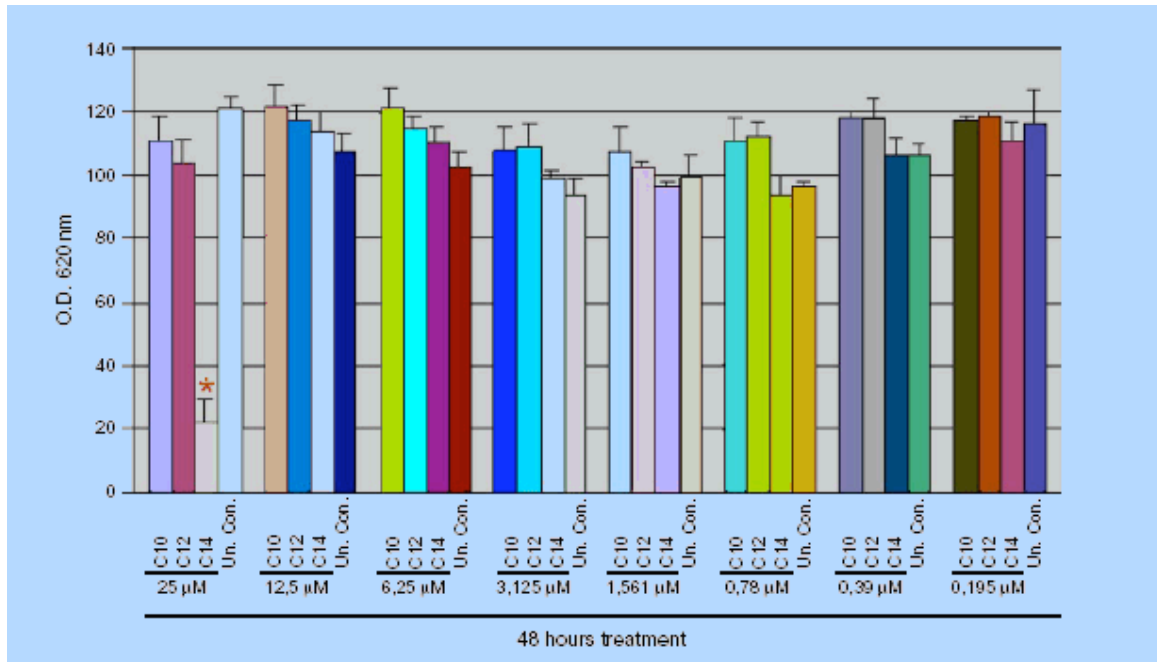
### **Saggi biologici**

Partendo dalle proprietà chimico-fisiche di queste molecole, che ci hanno portato a supporre una possibile interazione con substrati biologici come il DNA e con la superficie cellulare, abbiamo deciso di eseguire uno studio preliminare in questo senso. Le interazioni di bis- $C_{10}$ -BEC, di bis- $C_{12}$ -BEC e di bis- $C_{14}$ -BEC con il plasmide DNA pEGFP-C1 4731 bp (Clontech) sono state studiate attraverso il saggio EMSA (*Electrophoresis Mobility Shift Assay*) in gel di agarosio. Si è osservato uno spostamento lineare per tutte e tre le molecole, che ha inizio ad una concentrazione di 12.5  $\mu$ M ed è completato tra i 100 e 200  $\mu$ M per bis- $C_{10}$ -BEC e bis- $C_{12}$ -BEC (Figura 3). Questi dati dimostrano l'interazione di bis- $C_{10}$ -BEC, bis- $C_{12}$ -BEC e bis- $C_{14}$ -BEC con il DNA, basata probabilmente sull'interazione tra la carica positiva del tensioattivo e la carica negativa del DNA; questo è stato confermato dall'attività competitiva osservata quando è stato incluso l'EDTA nella reazione di legame (i dati non sono mostrati). Quindi, si è voluto testare la citotossicità delle molecole per valutare la possibilità di utilizzarle per rilasciare costrutti di DNA plasmidico all'interno delle cellule. Per questo scopo è stato effettuato un saggio di proliferazione MTT. Le cellule RD-4 sono state poste in 96 pozzetti (3000 cellule per pozzetto) e sono state aggiunte differenti concentrazioni (25, 15.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, e 0.19  $\mu$ M) di bis- $C_{10}$ -BEC, bis- $C_{12}$ -BEC e bis- $C_{14}$ -BEC. 48 ore dopo il trattamento, il

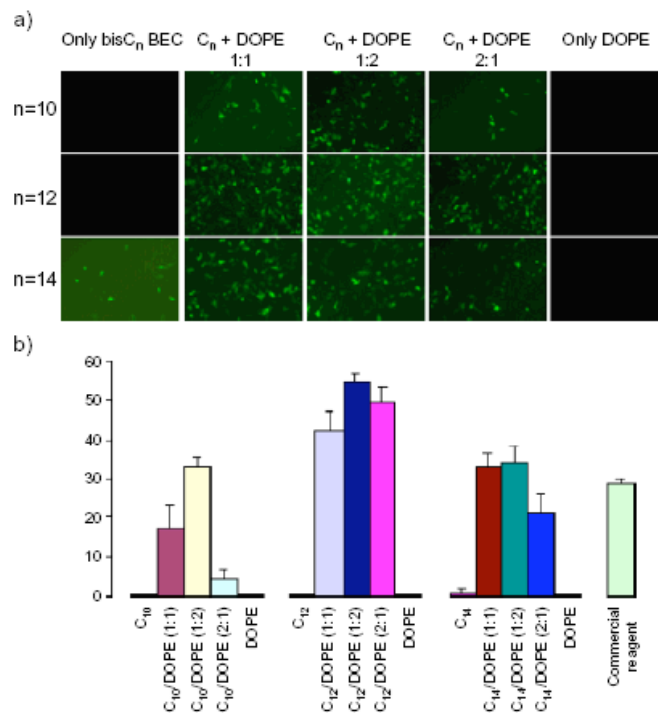
numero relativo di cellule metabolicamente attive è stato stimato dalla riduzione del bromuro di 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT). Il bis-C<sub>14</sub>-BEC è stata la sola molecola ad avere mostrato citotossicità alla concentrazione più alta di 25 µM. Al contrario, non è stata osservata citotossicità per il bis-C<sub>10</sub>-BEC e per il bis-C<sub>12</sub>-BEC, almeno alle concentrazioni testate (Figura 4). Infine per verificare la capacità di bis-C<sub>10</sub>-BEC e bis-C<sub>12</sub>-BEC e bis-C<sub>14</sub>-BEC di rilasciare il DNA all'interno delle cellule, è stato eseguito un saggio di trasfezione transiente con un plasmide dotato di cassetta di espressione di EGFP sotto il controllo del primo immediato promotore di CMV (pEGFP-C1, Clontech) per monitorare l'espressione di EGFP sotto microscopia a fluorescenza. Sebbene il bis-C<sub>14</sub>-BEC sia stata l'unica molecola che abbia mostrato citotossicità alla concentrazione di 25 µM, è stata anche l'unica capace di rilasciare DNA all'interno delle cellule come dimostrato dall'espressione di EGFP (Figura 5a e b), anche se con un'efficienza molto inferiore (1%) a quella ottenuta con un reagente commerciale standard di trasfezione (GenePORTER, Gene Therapy System) che è stato utilizzato usato come controllo positivo di trasfezione (Figura 5c). Sembra che il DOPE aumenti l'attività di trasfezione di formulazioni cationiche attraverso la stabilizzazione del complesso DNA/lipide [19,20] e facilitando l'*escape* endosomiale, grazie alle sue proprietà fusogeniche. E' stata quindi testata *in vitro* l'efficienza di trasfezione del bis-C<sub>10</sub>BEC, del bis-C<sub>12</sub>BEC e del bis-C<sub>14</sub>BEC formulati con il DOPE a differenti rapporti molari bis-C<sub>n</sub>BEC:DOPE (1:1, 1:2 e 2:1). Le concentrazioni del bis-C<sub>10</sub>BEC, bis-C<sub>12</sub>BEC e bis-C<sub>14</sub>BEC sono state fissate a 15 µM. Sorprendentemente si è ottenuto, per tutti e tre i composti, un forte aumento dell'efficienza di trasfezione, se comparata con quella di un agente commerciale standard di trasfezione, come dimostrato dall'espressione di EGFP (Figura 5a); il maggiore incremento (55%) si è verificato per il bis-C<sub>12</sub>BEC al rapporto molare 1:2 (Figura 5b). Al contrario, si osserva una trasfezione nulla per il DOPE da solo (Figura 5a e b).



**Figura 3** Risultati del saggio EMSA dei composti in studio



**Figura 4.** Effetti del bis-C<sub>10</sub>-BEC, del bis-C<sub>12</sub>-BEC e del bis-C<sub>14</sub>-BEC sulla proliferazione della linea cellulare RD-4 col test MTT dopo 48 ore di incubazione. I valori sono la media  $\pm$ S.D. di tre esperimenti indipendenti (n=8 per trattamento, p<0.05)



**Figura 5.** Trasfezione di cellule RD-4 con i bis-C<sub>n</sub>BEC (n = 10, 12, 14) da soli, con i bis-C<sub>n</sub>BEC+DOPE a differenti rapporti molari e con il DOPE da solo. (a) osservazione al microscopio a fluorescenza delle cellule trasfettate (come mostrato dalle cellule verdi che hanno espresso EGFP). (b) efficienza di trasfezione ottenuta con i bis-C<sub>n</sub>BEC (n=10, 12, 14) da soli, con i bis-C<sub>n</sub>BEC+DOPE a differenti rapporti molari e con il DOPE da solo e con il controllo positivo di un reagente commerciale standard di trasfezione. Cinque campi random sono stati esaminati per ogni pozzetto ed ogni esperimento è stato ripetuto tre volte. Le differenze statistiche tra i trattamenti sono state calcolate con lo Student test e l'analisi multifattoriale ANOVA.

## Discussione

La maggior parte dei vettori non-virali sono lipidi cationici (citofectine) [20,21] o polimeri cationici [22]. Alcune delle caratteristiche fondamentali delle citofectine sono ora conosciute [23–26]: i gruppi cationici sono necessari per neutralizzare le cariche anioniche dei gruppi fosfato del DNA, riuscendo in questo modo a compattarlo ottenendo complessi di forma pressappoco sferica aventi piccole dimensioni se confrontate con il DNA nudo. La natura anfifilica di queste molecole è generalmente richiesta per interagire con le membrane fosfolipidiche e per rilasciare il DNA a tempo debito. I liposomi cationici sono composti da lipidi cationici specifici per assicurare un'efficiente condensazione del DNA e l'*uptake* cellulare dei complessi e da lipidi *helper* come la dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) [20]. Seguendo queste linee guida, l'uso di citofectine a carica multipla dovrebbe portare ad un aumento dell'interazione DNA-citofectina. Dal momento che i tensioattivi cationici *gemini* [2,15,26], preparati e sistematicamente studiati come tensidi nei primi anni novanta, hanno un numero di cariche maggiore di uno, potrebbero essere degli ottimi candidati per complessare il DNA e per la trasfezione. Queste strutture possono essere adsorbite sulle superfici e di conseguenza sul DNA con un'efficienza quasi maggiore di un ordine di grandezza, rispetto ai loro "monomeri". Lo studio delle loro interazioni con il DNA e come vettori di trasfezione è stato proposto negli ultimi anni, ma poco o nulla è apparso in letteratura sulle relazioni struttura-proprietà, sia per ciò che riguarda la loro attività biologica, sia per quanto riguarda la natura complessante e trasfettante [5,27–29].

Recentemente il gruppo di Engberts a Groninigen (NL) ha dimostrato che i tensioattivi piridinici con doppia catena hanno una grande efficacia in applicazioni che riguardano la terapia genica, sia per quanto riguarda la loro efficienza che la loro tossicità marginale [27,30–32,34]. Tensioattivi gemini di tipo ammonio terziario con degli zuccheri nella struttura hanno dimostrato un'alta efficienza di trasfezione senza il lipide *helper* [28], ed anche i composti di ammonio diquaternario sono stati proposti come agenti di trasfezione [35]. Con lo scopo di trovare una molecola sintetica da poter utilizzare come vettore per la trasfezione, un grande numero di composti gemini è stato testato e sono stati suggeriti alcuni fattori chiave per la progettazione di nuovi tensioattivi [5,33]. I composti qui studiati sono molto semplici e, alla luce degli appena menzionati fattori chiave, non ci si poteva aspettare un'alta attività come agenti trasfettanti senza un lipide *helper*. Tuttavia, il loro studio potrebbe portare informazioni sul meccanismo di interazione con le membrane e sulle relazioni struttura–attività. La stragrande maggioranza dei sali di ammonio quaternario (QUATS) mostra attività antimicrobica, se hanno la capacità di formare micelle [2]. E' stato scoperto che sia l'attività germicida che l'abilità nel legare le proteine dei QUATS mostrano un massimo quando il valore della cmc è compreso tra  $1 \times 10^{-2}$  e  $1 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>, indipendentemente dal fatto che il tensioattivo sia monomero o polimerico. I derivati esterei della betaina, che sono stati precedentemente studiati [36–38], mostrano attività biologica e influenzano il deassorbimento degli ioni calcio ed il trasporto degli anioni solfato attraverso le membrane [39–42]. Tra gli altri, è stato trovato che le micelle formate dal C<sub>n</sub>-BEC sono idratate fino al gruppo CH<sub>2</sub>COO- e quelle di n-alchiltrimetilammonio fino ai due gruppi metilenici [37]. Per questa ragione i C<sub>n</sub>-BEC monomeri, per quanto riguarda le proprietà micellari, sono equivalenti al rispettivo cloruro di N-alchiltrimetilammonio con catena più lunga di due gruppi metilenici [36,38]. E' anche stato

mostrato che il bis- $C_n$ -BEC influenza il deassorbimento del calcio dalle membrane dei liposomi [40,41] e induce l'emolisi degli eritrociti del maiale. A questo proposito, la loro efficacia è superiore a quella del  $C_n$ -BEC, analoghi a singola catena [42]. L'attività biologica dei bis- $C_n$ BEC è stata confermata dai risultati ottenuti. Infatti, come gli  $n$ -alchiltrimetilammonio cloruri con catene a differente lunghezza [43], tutti i composti studiati interagiscono con il DNA, come mostrato dai risultati del saggio EMSA (Figura 3), e sono in grado di trasfettare il DNA, quando coformulati con il DOPE, con un'efficienza maggiore di quella di un reagente commerciale standard di trasfezione (Figura 5a e b). Allo scopo di ottenere una migliore comprensione del meccanismo di interazione tra i composti anfifilici biologicamente attivi e le membrane, sono stati inoltre raccolti dati termodinamici delle soluzioni acquose di alcune permeatossine. Questi dati, in realtà, sono risultati molto interessanti sia dal punto di vista teorico sia allo scopo di definire un modello di interazione. Per esempio, essi avvalorano la precedente osservazione [44], ovvero che il gruppo benzilico del cloruro di N-dodecil-N-benzilmorfolinio (DMeMC) si comporta come se fosse una seconda catena idrocarburica e ci permette anche di valutare la sua lunghezza come equivalente a cinque gruppi metilenici [45]. Da questa osservazione, a sua volta, si è dedotto che il gruppo benzilico di questo composto, durante l'interazione con la membrana modello, dovrebbe essere incorporato all'interno del doppio strato fosfolipidico, cosa che è stata provata sperimentalmente [10,46].

Nel caso dei composti gemini in studio, i dati termodinamici [15] suggeriscono l'ipotesi che la catena alchilica dei dimeri sia già parzialmente associata in soluzione e che la struttura delle loro micelle sia molto diversa da quelle formate dai rispettivi monomeri. Inoltre, l'andamento della cmc in funzione della lunghezza della catena dei monomeri e dei dimeri, suggerisce che l'associazione delle catene probabilmente non coinvolge i primi tre gruppi metilenici delle catene alchiliche legati ai gruppi carbossilici. Quando sono state effettuate queste determinazioni, non c'era la possibilità di misurare le compressibilità di questi composti. Quindi si è deciso di compiere questo tipo di misure sia per completare lo studio termodinamico delle loro soluzioni sia perché queste sono strettamente connesse con la struttura della sfera di idratazione. Le proprietà volumetriche, come il volume e la compressibilità, infatti riflettono le interazioni soluto solvente. È ovvio che un grande cambiamento di queste interazioni si ha quando inizia la formazione delle micelle. Dai valori di  $K_{s,\phi,cmc}$ , ottenuti dall'eq (7), si ottiene un contributo di gruppo per ogni gruppo  $-CH_2-$  di  $-0.92 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ , in accordo con quelli trovati da Dawson et al. [17] e Fukada et al. [18]. È generalmente accettato che il contributo del  $-CH_2-$  sulla compressibilità molare è negativo e piuttosto piccolo a temperatura ambiente. Questo è dovuto al bilancio tra il contributo negativo provocato dall'aumento della densità delle molecole d'acqua intorno alla cavità e il contributo positivo della cavità stessa. In questo caso, il contributo di gruppo è stato ottenuto considerando il numero totale dei gruppi  $-CH_2-$  presenti in ogni molecola di tensioattivo gemini invece che la lunghezza di ciascuna delle catene alchiliche. Il valore della compressibilità adiabatica molare apparente dei bis- $C_n$ -BEC nello stato micellare,  $K_{s,\phi,M}$ , è elevato e positivo. Dalla correlazione lineare tra  $K_{s,\phi,M}$  e il numero di gruppi  $-CH_2-$ ,  $n$ , è stato ottenuto il contributo del gruppo  $-CH_2-$ , uguale a  $+0.94 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ , molto simile a quello riportato nel rif. [17] ( $0.97 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) e simile a quello ottenuto per alcuni tensioattivi *gemini* di propandil- $\alpha,\omega$ -

bis(dimetilalchilammonio bromuro) ( $1.15 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) [47]. Come conseguenza della formazione delle micelle, la distruzione della cavità rigida contenente la parte idrofobica della molecola di tensioattivo, insieme con la riduzione dell'elettrostrizione dovuta al legame del controione alle micelle, permette un maggiore cambiamento di volume al variare della pressione. Dai dati in Tabella 2, il contributo di gruppo del  $-\text{CH}_2-$  alla variazione della compressibilità alla micellizzazione risulta di  $1.03 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ , simile al  $1.17 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  per i composti *gemini* del rif. [47], ma inferiore al valore  $1.5 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  ottenuto nel rif. [12] per i monomeri di bromuro di alchiltrimetilammonio. Il valore inferiore rispetto ai monomeri potrebbe supportare l'ipotesi, sopra riportata, della parziale associazione delle catene prima della cmc. Fino ad ora sono disponibili solo pochi dati riguardo alla compressibilità delle soluzioni di tensioattivi *gemini*, per poter fare dei confronti soddisfacenti. Sono state eseguite misure di compressibilità isoentropica di propandil- $\alpha,\omega$ -bis(dimetilooctilammonio bromuro) (8-3-8) e di propandil- $\alpha,\omega$ -bis(dimetildodecilammonio bromuro) (12-3-12) in funzione della molarità a 298 K [47]. Nonostante la differenza del numero di gruppi metilenici a ponte tra i due azoti carichi, possiamo approssimativamente osservare che il valore della compressibilità alla cmc è inferiore nel caso del bis- $\text{C}_n$ -BEC, come ci si aspetterebbe considerando che i contributi di gruppo di  $=\text{O}$ ,  $-\text{NH}_2$  ed altri gruppi sono in valore assoluto più elevati del contributo del gruppo  $-\text{CH}_2-$  e rientrano nell'intervallo tra  $-5$  e  $-10 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  [48].

Il valore nello stato micellare di bis- $\text{C}_{12}$ -BEC è simile a quello del 12-3-12, e conferma che il guscio di idratazione del gruppo  $-\text{CH}_2\text{-COO-}$  dei derivati esterei della betaina è invariato nelle micelle ma, per quanto riguarda la compressibilità, questo gruppo sembra non essere equivalente a due gruppi metilenici, come per le altre proprietà termodinamiche delle loro soluzioni. Sembrerebbe che il diverso comportamento delle proprietà biologiche mostrato dal bis- $\text{C}_{14}$ -BEC (vedi sotto) non sia dovuto ad un brusco cambiamento nella sfera di idratazione della molecola, dal momento che vale l'additività del contributo di gruppo del  $-\text{CH}_2-$  nella serie omologa qui studiata. D'altra parte, il valore della cmc, messo in relazione con il cambiamento di energia libera per la formazione delle micelle, diminuisce di un fattore di circa cinque dal bis- $\text{C}_{10}$ -BEC al bis- $\text{C}_{12}$ -BEC e di un fattore di circa due dal bis- $\text{C}_{12}$ -BEC al bis- $\text{C}_{14}$ -BEC.

Tuttavia, il bis- $\text{C}_{14}$ BEC è l'unica molecola in grado di rilasciare il DNA all'interno delle cellule anche senza un lipide *helper*, come mostrato dall'espressione di EGFP (Figura 5). Questo risultato è in accordo con le osservazioni sopra riportate, secondo le quali l'attività biologica dei tensioattivi cationici aumenta con la lunghezza della catena fino ad un punto critico [49] e, nel caso della serie omologa di alchenediil- $\alpha,\omega$ -bis(dimetilalchilammonio bromuri), il termine con due catene alchiliche a 16 atomi di carbonio è generalmente molto più attivo biologicamente [7]. In effetti, è stato osservato che, a partire dagli studi sul monomero  $\text{C}_n$ -BEC in funzione della lunghezza della catena [38], il gruppo carbossilico in prossimità della testa polare può essere considerato equivalente al gruppo  $-\text{CH}_2-$ . In realtà, il confronto degli andamenti delle proprietà termodinamiche del  $\text{C}_{10}$ -BEC con quelle del cloruro di dodeciltrimetilammonio (DTAC) supporta l'ipotesi che i primi due gruppi metilenici del DTAC ed il gruppo  $-\text{CH}_2\text{-COO-}$  dei derivati esterei betainici non perdano il loro guscio di idratazione quando sono coinvolti nella formazione delle micelle. Questo significa che il bis- $\text{C}_{14}$ -BEC può essere considerato equivalente al bis-QUATS con due catene  $\text{C}_{16}$ . I risultati

ottenuti col DSC confermano un diverso comportamento del bis-C<sub>14</sub>-BEC rispetto al bis-C<sub>10</sub>-BEC e al bis-C<sub>12</sub>-BEC. Tali risultati tuttavia suggeriscono che i composti studiati non modificano molto la struttura e l'organizzazione del doppio strato fosfolipidico. Ad ogni modo, il bis-C<sub>14</sub>-BEC stabilizza la fase gel mentre il bis-C<sub>10</sub>-BEC e il bis-C<sub>12</sub>-BEC la destabilizzano un po'. Il bis-C<sub>14</sub>-BEC aumenta la  $T_m$  della DPPC, come gli alogenuri di N-alchiltrimetilammonio con C<sub>16</sub> e catene più lunghe [50], mentre gli altri bisQUATS diminuiscono  $T_m$  come i tensioattivi con catene più corte [9,10,50]. Il bis-C<sub>10</sub>-BEC diminuisce maggiormente il valore di  $T_m$  e mostra un effetto di fluidificazione un po' più marcato del bis-C<sub>12</sub>-BEC, che può essere connesso con la sua compressibilità più bassa. Tutti i composti sembrano essere attivi a livello della superficie di membrana. Il bis-C<sub>14</sub>-BEC sposta la temperatura e l'entalpia di pretransizione in direzione opposta al bis-C<sub>10</sub>-BEC e al bis-C<sub>12</sub>-BEC. Questo suggerisce che il bis-C<sub>14</sub>-BEC interagisce con l'interfaccia in modo diverso dagli altri bis-QUATS, dal momento che la pre-transizione è sensibile principalmente ai cambiamenti nella regione interfacciale [49] e sembra stabilizzare la fase ondulata ("ripple"), come si deduce dall'aumento della temperatura di pre-transizione. In accordo con Cevc [51], lo spostamento della temperatura di pre-transizione è determinato dallo stato delle molecole d'acqua e dalla concentrazione del soluto nella parte interna della regione interfacciale. Questo ci porta a dire che una parte significativa della zona polare del composto è situata nella porzione curva della fase ondulata ("ripple") e ciò, a sua volta, potrebbe favorire la compattazione del DNA.

## Conclusioni

Tutti i tensioattivi cationici bis-C<sub>n</sub>-BEC studiati, che differiscono per la lunghezza della catena, interagiscono con il DNA e sono capaci di trasferirlo, quando coformulati con il DOPE, con un'efficienza maggiore di quella di un reagente commerciale standard di trasfezione. Il bis-C<sub>14</sub>-BEC è la sola molecola in grado di rilasciare il DNA all'interno della cellula da sola, come mostrato dall'espressione di EGFP anche se con una bassa efficienza. Questo potrebbe essere connesso col fatto che il bis-C<sub>14</sub>-BEC interagisce col liposoma della DPPC, che simula le membrane cellulari, in modo leggermente diverso da altri composti. In particolare, il bis-C<sub>14</sub>-BEC aumenta di poco la stabilità dei liposomi a differenza di altri composti che mostrano un piccolo effetto fluidificante e sembra stabilizzare la fase ondulata (*"ripple"*). Questo potrebbe essere dovuto al posizionamento di larga parte del composto nella porzione curva della fase ondulata (*"ripple"*) della DPPC che, di conseguenza, potrebbe favorire la compattazione del DNA.

Mentre le compressibilità molari apparenti sotto la cmc sono negative, a causa del contributo di gruppo negativo del -CH<sub>2</sub>-, i valori della compressibilità adiabatica molare apparente dei bis-C<sub>n</sub>-BEC nello stato micellare,  $K_{s,\phi,M}$ , sono grandi e positivi. Dalla correlazione lineare tra  $K_{s,\phi,M}$  e il numero di gruppi -CH<sub>2</sub>,  $n$ , si può ottenere il contributo del gruppo -CH<sub>2</sub>-, che è pari a  $+0.94 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ , inferiore a quello generalmente proposto per i tensioattivi convenzionali. Questo fatto potrebbe supportare l'ipotesi, precedentemente riportata, della parziale associazione delle catene alchiliche prima della cmc. Il contributo del gruppo -CH<sub>2</sub>- al cambiamento della compressibilità alla micellizzazione risulta di  $1.03 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ . Tale additività indica che la diversa attività biologica del bis-C<sub>14</sub>-BEC non è dovuta ad un brusco cambiamento nella sfera di idratazione della molecola all'aumentare della lunghezza della catena.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] (a) M.J. Rosen, D.J. Tracy, Gemini surfactants, *J. Surfactants Deterg.* 1 (1998) 547– 554 (and references therein); (b) (for a more recent review, see) F.M. Menger, J.S. Keiper, Gemini surfactants, *Angew. Chem., Int. Ed.* 39 (2000) 1906– 1920.
- [2] E. Fiscaro, Gemini surfactants: chemico-physical and biological properties, *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2 (1997) 45– 63.
- [3] G. Viscardi, P. Quagliotto, C. Barolo, P. Savarino, E. Barni, E. Fiscaro, Synthesis and surface and antimicrobial properties of novel cationic surfactants, *J. Org. Chem.* 65 (2000) 8197– 8203.
- [4] P.C. Bell, M. Bergsma, I.P. Dolbnya, W. Bras, M.C.A. Stuart, A.E. Rowan, M.C. Feiters, J.B.F.N. Engberts, Transfection mediated by gemini surfactants: engineered escape from the endosomal compartment, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 1551– 1558.
- [5] A.J. Kirby, P. Camilleri, J.B.F.N. Engberts, M.C. Feiters, R.J.M. Nolte, O. Soderman, M. Bergsma, P.C. Bell, M.L. Fielden, C.L. Garcia Rodriguez, P. Guedat, A. Kremer, C. McGregor, C. Perrin, G. Ronsin, M.C.P. van Eijk, Gemini surfactants: new synthetic vectors for gene transfection, *Angew. Chem., Int. Ed.* 42 (2003) 1448–1457.
- [6] X. Chen, J. Wang, N. Shen, Y. Luo, L. Lin, M. Liu, R.K. Thomas, Gemini surfactant/DNA complex monolayers at the air–water interface: effect of surfactant structure on the assembly, stability, and topography of monolayers, *Langmuir* 18 (2002) 6222– 6228.
- [7] P. Quagliotto, G. Viscardi, C. Barolo, E. Barni, S. Bellinvia, C. Santoro, C. Compari, E. Fiscaro, Gemini pyridinium surfactants: 3. Synthesis and physico–chemical properties of long chain amphiphiles and their evaluation as possible candidates for gene transfection, submitted for publication.
- [8] B. Rozycka-Roszak, S. Witek, S. Przystalski, A comparison of the micellization of selected amphiphilic *N,N'*-bisdimethyl-1,2-ethanediamine derivatives with some amphiphilic betaine ester derivatives, *J. Colloid Interface Sci.* 130 (1989) 181– 185.
- [9] B. Rozycka-Roszak, H. Pruchnik, Effect of counterions on the influence of thermotropic phase behaviour of phosphatidylcholine, *Z. Naturforsch.* 55c (2002) 240– 244.
- [10] B. Rozycka-Roszak, A. Przyczyna, Interaction between *N*-dodecyl-*N,N*-dimethyl-*N*-benzylammonium halides and phosphatidylcholine bilayers — the effect of counterions, *Chem. Phys. Lipids* 123 (2003) 209– 221.
- [11] S.D. Wetting, R.E. Verrall, Thermodynamic studies of aqueous m–s–m gemini surfactant systems, *J. Colloid Interface Sci.* 235 (2001) 310– 316.
- [12] R. De Lisi, S. Milioto, R.E. Verrall, Partial molar volumes and compressibilities of alkyltrimethylammonium bromides, *J. Solution Chem.* 19 (1990) 665– 692.
- [13] M. Iqbal, R.E. Verrall, Partial molar volumes and adiabatic compressibilities of glyceryl peptides at 25 °C, *J. Phys. Chem.* 91 (1987) 967–971.

- [14] T.V. Chalikian, A.P. Sarvazyan, K. Breslauer, Partial molar volumes, expansibilities, and compressibilities of  $\alpha,\omega$ -aminocarboxylic acids in aqueous solutions between 18 and 55 °C, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 13017–13026
- [15] B. Rozycka-Roszak, E. Fiscaro, A. Ghiozzi, Thermodynamic study of aqueous micellar solutions of biologically active bisquaternary ammonium chlorides, *J. Colloid Interface Sci.* 184 (1996) 209–215.
- [16] M. Frindi, B. Michels, H. Levy, R. Zana, Alkanediyl- $\alpha,\omega$ -bis(dimethylalkylammonium bromide) surfactants: 4. Ultrasonic absorption studies of amphiphile exchange between micelles and bulk phase in aqueous micellar solution, *Langmuir* 10 (1994) 1140–1145.
- [17] E. Kudryashov, T. Kapustina, S. Morrissey, V. Buckin, K. Dawson, The compressibility of alkyltrimethylammonium bromide micelles, *J. Colloid Interface Sci.* 203 (1998) 59–68.
- [18] K. Fukada, J. Li, M. Fujii, T. Kato, T. Seimiya, Adiabatic compressibility of aqueous solutions of amphiphiles with an ammonium group as the hydrophilic domain, *J. Oleo Sci.* 51 (2002) 103–111.
- [19] F. Liu, J. Yang, L. Huang, D. Liu, Effect of non-ionic surfactants on the formation of DNA/emulsion complexes and emulsion-mediated gene transfer, *Pharm. Res.* 13 (1996) 1642–1646.
- [20] T. Hara, F. Liu, D. Liu, L. Huang, Emulsion formulations as a vector for gene delivery in vitro and vivo, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 24 (1997) 265–271.
- [21] G.D. Schmidt-Wolf, I.G. Schmidt-Wolf, Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update, *Trends Mol. Med.* 9 (2003) 67–72.
- [22] S. Mansouri, P. Lavigne, K. Corsi, M. Benderdour, E. Beaumont, J. Fernandes, Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57 (2004) 1–8.
- [23] A.D. Miller, Cationic liposomes for gene therapy, *Angew. Chem., Int. Ed.* 37 (1998) 1768–1785.
- [24] (a) C.W. Pouton, L.W. Seymour, Key issues in non-viral gene delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46 (2001) 187–203; (b) M.C. Pedroso de Lima, S. Simones, P. Pires, H. Faneca, N. Duzgunes, Cationic lipid–DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2001) 277–294.
- [25] P. Vierling, C. Santaella, J. Greiner, Highly fluorinated amphiphiles as drug and gene carrier and delivery systems, *J. Fluorine Chem.* 107 (2001) 337–354.
- [26] R. Zana, Novel surfactants — preparation, applications, and biodegradability dimeric (gemini) surfactants, in: K. Holmberg (Ed.), *Surfactant Science Series*, vol. 74, Marcel Dekker, New York, 1998, p. 241.
- [27] A.A. Meekel, A. Wagenaar, J.E. Kroeze, P. Haadsma, B. Bosgraaf, M.C. Stuart, A. Brisson, M.H. Ruiters, D. Hoekstra, J.B.F.N. Engberts, Synthesis of pyridinium amphiphiles used for transfection and some characteristics of amphiphile/DNA complex formation, *Eur. J. Org. Chem.* (2000) 665–673.
- [28] M.L. Fielden, C. Perrin, A. Kremer, M. Bergsma, M.C. Stuart, P. Camilleri, J.B.F.N. Engberts, Sugar-based tertiary amino gemini surfactants with a vesicle-to-micelle transition in the endosomal pH range mediate efficient transfection in vitro, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 1269–1279.

- [29] (a) S.J. Ryhanen, J.M. Saily, T. Paukku, S. Borocci, G. Mancini, J.M. Holopainen, P.K.J. Kinnunen, Surface charge density determines the efficiency of cationic gemini surfactant based lipofection, *Biophys. J.* 84 (2003) 578– 587; (b) K.H. Jennings, I.C.B. Marshall, M.J. Wilkinson, A. Kremer, A.J. Kirby, P. Camilleri, Aggregation properties of a novel class of cationic gemini surfactants correlate with their efficiency as gene transfection agent, *Langmuir* 18 (2002) 2426– 2429.
- [30] I. van der Woude, A. Wagenaar, A.A.P. Meekel, M.B.A. ter Beest, Marcel H.J. Ruiters, J.B.F.N. Engberts, D. Hoekstra, Novel pyridinium surfactants for efficient, nontoxic in vitro gene delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 1160– 1165.
- [31] I. van der Woude, H.W. Visser, M.B.A. ter Beest, A. Wagenaar, M.H.J. Ruiters, J.B.F.N. Engberts, D. Hoekstra, Parameters influencing the introduction of plasmid DNA into cells by the use of synthetic amphiphiles as a carrier system, *Biochim. Biophys. Acta* 1240 (1995) 34– 40.
- [32] J.B.F.N. Engberts, D. Hoekstra, Vesicle-forming synthetic amphiphiles, *Biochim. Biophys. Acta* 1241 (1995) 323– 340.
- [33] P.C. Bell, M. Bergsma, I.P. Dolbnya, W. Bras, M.C.A. Stuart, A.E. Rowan, M.C. Feiters, J.B.F.N. Engberts, Transfection mediated by gemini surfactants: engineered escape from the endosomal compartment, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 1551–1558.
- [34] I.S. Zuhorn, V. Oberle, W.H. Visser, J.B.F.N. Engberts, U. Bakowsky, E. Polushkyn, D. Hoekstra, Phase behavior of cationic amphiphiles and their mixtures with helper lipid influences lipoplex shape, DNA translocation, and transfection efficiency, *Biophys. J.* 83 (2002) 2096– 2108.
- [35] H.S. Rosenzweig, V.A. Rakmanova, R.C. MacDonald, Diquaternary ammonium compounds as transfection agents, *Bioconjug. Chem.* 12 (2001) 258– 263.
- [36] B. Rozycka-Roszak, S. Przystalski, S. Witek, Calorimetric studies of the micellization of some amphiphilic betaine ester derivatives, *J. Colloid Interface Sci.* 125 (1988) 80– 85.
- [37] B. Rozycka-Roszak, U. Walkowiak, S. Witek, S. Przystalski, Micelle hydration by proton NMR, *Colloid Polym. Sci.* 267 (1989) 831–833.
- [38] B. Rozycka-Roszak, E. Fisticaro, Effect of the carboxylic group on thermodynamic properties of aqueous micellar solutions of amphiphilic betaine ester derivatives, *J. Colloid Interface Sci.* 159 (1993) 335.
- [39] J. Kuczera, T. Janas, S. Przystalski, S. Witek, M. Oswiecimska, Influence of some amphiphilic derivatives of glycine esters on sulfate ion transport across lecithin liposome membrane, *Stud. Biophys.* 105(1985) 167– 176.
- [40] J. Kuczera, A. Fogt, S. Witek, Calcium ion desorption from lecithin membrane influenced by amphiphilic mono- and bis-ammonium chlorides, *Stud. Biophys.* 128 (1988) 169– 177.
- [41] J. Kuczera, J. Gabrielska, R. Zylka, S. Przystalski, S. Witek, D. Grobelny, Influence of the size of the polar part of amphiphile ammonium salts on ion transport across liposome membrane, *Stud. Biophys.* 96 (1983) 203–211.
- [42] H. Kleszczynska, J. Sarapuk, S. Przystalski, M. Kilian, Mechanical properties of red cell and BLM in the presence of some mono- and bis-quaternary ammonium salts, *Stud. Biophys.* 135 (1990) 191–199.

- [43] R.S. Dias, B. Lindman, M.G. Miguel, Compaction and decompaction of DNA in the presence of cationic amphiphile mixtures, *J. Phys. Chem., B* 106 (2002) 12608– 12612.
- [44] B. Rozycka-Roszak, Micellization of some amphiphilic quaternary ammonium chlorides, *J. Colloid Interface Sci.* 140 (1990) 538–540.
- [45] B. Rozycka-Roszak, E. Fiescaro, Thermochemical study of aqueous micellar solutions of some amphiphilic quaternary ammonium chlorides at 313K, *Thermochim. Acta* 205 (1992) 19– 31.
- [46] B. Rozycka-Roszak, T. Cierpicki, <sup>1</sup>H NMR studies of micellar solutions of N-dodecyl-N,N-dimethyl-N-benzylammonium chloride, *J. Colloid Interface Sci.* 218 (1999) 529– 534.
- [47] E. Fiescaro, C. Compari, E. Duce, C. Contestabili, G. Viscardi, P. Quagliotto, First evaluation of thermodynamic properties for spheres to elongated micelles transition of some propanediyl- $\alpha,\omega$ -bis(dimethylalkylammonium bromide) surfactants in aqueous solutions, *J. Phys. Chem., B* (2005) in press.
- [48] V.A. Buckin, B.I. Kankiya, R.L. Kazaryan, Hydration of nucleosides in dilute aqueous solutions ultrasonic velocity and density measurements, *Biophys. Chem.* 34 (1989) 211– 223.
- [49] P. Balgavy, F. Devinsky, Cut-off effects in biological activities of surfactants, *Adv. Colloid Interface Sci.* 66 (1996) 23–63.
- [50] K. Lohner, Effects of small organic molecules on phospholipid phase transitions, *Chem. Phys. Lipids* 57 (1991) 341–362.
- [51] G. Ceve, Polymorphism of the bilayer membranes in the ordered phase and the molecular origin of the lipid pretransition of rippled lamellae, *Biochim. Biophys. Acta* 1062 (1991) 59– 69.

## TENSIOATTIVI GEMINI PIRIDINICI PARZIALMENTE FLUORURATI: SINTESI, STUDIO CONDUTTIMETRICO E TENSIDICO

Il mondo dei tensioattivi fluorurati è molto interessante, affascinante e complesso grazie alle particolari proprietà chimiche delle molecole fluorurate. Sono stati fatti molti studi sulla chimica, sul comportamento anfifilico e sull'attività biologica degli anfifili fluorurati. Una loro importante caratteristica è quella di essere in grado di sciogliere grandi quantità di ossigeno e questo spiega la formazione di emulsioni di perfluorocarburi in acqua, alcuni dei quali hanno suscitato interesse nel campo delle applicazioni cliniche come trasportatori dell'ossigeno per sostituire il sangue in situazioni di emergenza e sono solitamente noti come "sostituti del sangue" [1,2].

Sono state anche scoperte altre importanti attività biologiche. Alcuni composti di una serie di anfifili fluorurati con una porzione galattosidica hanno mostrato attività anti-HIV molto interessante assieme ad una tossicità molto bassa, diventando così candidati per applicazioni nella terapia dell'AIDS [3]. Negli ultimi anni la sfida nella sintesi per trovare strutture cationiche, adatte ad applicazioni in terapia genica e/o in *gene delivery*, ha prodotto una *plethora* di composti, alcuni dei quali sono costituiti da tensioattivi fluorurati [4]. Le applicazioni in questo campo sono state riservate al classico tipo di tensioattivi e solamente pochi lavori hanno riguardato la sintesi e l'applicazione in *gene delivery* di tensioattivi gemini [5-12].

Nel campo dei tensioattivi gemini cationici le strutture più studiate appartengono alla famiglia dei sali di ammonio quaternario [13]. Molto recentemente è stata riportata la sintesi dei primi tensioattivi gemini piridinici [14], che sono stati preparati e studiati nella speranza di trovare relazioni struttura-attività per quanto riguarda la loro capacità di trasportare il DNA. Tra le strutture di tensioattivi per i quali è stata dimostrata attività o compatibilità biologica, si sono messe in evidenza quelle con una porzione fluorurata [4]. Inoltre, i tensioattivi gemini piridinici aumentano sostanzialmente la cinetica di idrolisi degli esteri organofosforici in acqua, dando luogo a risultati migliori rispetto ai tensioattivi gemini alchilammonici [15].

Attualmente le serie di tensioattivi gemini con una catena fluorocarburica sintetizzate sono molto poche [16-20], e qui si riporta la prima serie di tensioattivi gemini piridinici fluorurati. In questo lavoro di tesi verrà presentata la sua sintesi ed il suo comportamento anfifilico ottenuto da misure di conducibilità e di tensione superficiale. Risultati peculiari sono emersi dalla caratterizzazione di questi tensioattivi, la cui interpretazione prevede un loro particolare riarrangiamento conformazionale e la formazione di aggregati premicellari.

### Sintesi

I *melting point* sono stati ottenuti su una lastra calda equipaggiata con un microscopio (Reichert) e non sono stati corretti. Sono stati registrati gli spettri  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) e  $^{19}\text{F}$  NMR (400 MHz) con uno spettrometro JEOL EX400 NMR in DMSO- $d_6$ . Gli spettri FT-IR sono stati registrati in KBr con uno spettrometro Shimadzu 8400 FT-IR. Gli spettri UV sono stati registrati in etanolo al 95% con uno spettrometro Pye Unicam UV2. La TLC è stata eseguita su gel di silice 60 F<sub>254</sub> o su lastre basiche di allumina

(Merck) usando etere di petrolio /etil acetato o BAW (Butanolo: Acido Acetico:Acqua 4:1:5, fase organica) come eluenti.

La purificazione cromatografica è stata fatta con flash cromatografia (FC) usando gel di silice (Merck, 40-63  $\mu\text{m}$ ) od allumina basica. E' stato usato un forte scambiatore anionico (Merck, forte scambiatore anionico III). La vetreria usata per la sintesi è stata accuratamente asciugata, assemblata e purificata con argon. Le 2,2'-(alcanedil)bispiridine usate sono state preparate come già descritto [14]. La procedura di scambio ionico è stata descritta altrove [14]. Per i passaggi di scambio ionico, per le misure di conducibilità e di tensione superficiale è stata usata acqua MilliQ (conducibilità: 0.05  $\mu\text{S}$ ; tensione superficiale: 72.8 mN/m).

### ***3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluoroottilmetansolfonato (1) [21]***

Il 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluorottanolo (49.18 g, 0.135 mol) e la piridina (38 ml) sono stati introdotti in un pallone a tre colli e la temperatura è stata portata a 15°C. Il metansolfonil cloruro (16.17 g, 11 ml, 0.141 mol) è stato lentamente aggiunto in mezz'ora sgocciolandolo nella soluzione, con un accurato controllo della temperatura. Un solido bianco è stato separato dalla soluzione. Dopo tre ore, la sospensione è stata trattata con HCl diluito. La piridina è stata quindi rimossa dalla soluzione acquosa, mentre il prodotto solido bianco è stato filtrato su un filtro buchner. Il solido è stato sciolto in diclorometano e la soluzione è stata lavata varie volte con acqua per eliminare l'acidità residua. La fase organica è stata quindi asciugata con carbonato di potassio ed evaporato, dando un solido bianco. Resa: 54.22 g (94%), m.p. 46°C,  $R_f$ : 0.65 su silice (eluente: etere di petrolio /etil acetato 75:25),  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2.62 (tt, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CF}_2$ ), 3.07 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.52 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CF}_2$ ),  $^{19}\text{F}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  -81.64 ( $\text{CF}_3$ ), -114.37 ( $\text{CF}_2\text{CH}_2$ ), -122.70, ( $\text{CF}_2$ ), -123.70, ( $\text{CF}_2$ ), -124.34 ( $\text{CF}_2$ ), -126.98 ( $\text{CF}_3\text{CF}_2$ ), FT-IR (KBr): 1352, 1338, 1234, 1198, 1172, 1146, 1120, 738  $\text{cm}^{-1}$ , Anal. Calc. per  $\text{C}_9\text{H}_7\text{F}_{13}\text{O}_3\text{S}$ : C, 24.45; H, 1.60. Trovato: C, 24.41; H, 1.64.

### ***3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluorottiltrifluorometansolfonato (2) [21]***

Una soluzione equimolare di 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluorottanolo e piridina in diclorometano sono state aggiunte goccia a goccia ad una soluzione di anidride trifluorometansolfonica in diclorometano secco, portate a 0°C sotto argon. La reazione è stata portata avanti per quindici minuti e successivamente è stata spenta con acqua, la soluzione è stata quindi estratta e separata. La fase organica è stata portata a secco con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ed evaporata. Il risultante olio è stato immediatamente usato per le reazioni di quaternarizzazione. Resa 92%. Data l'estrema reattività del prodotto non è stato possibile caratterizzarlo, ma è stato usato direttamente per le reazioni di quaternarizzazione.

***1,1'-di(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluorottil)-2,2'-trimetilenbispiridinio ditrifluorometansolfonato (3a)***

Il tridecafluorottiltrifluorometansolfonato (5.45 g, 0.011 mol) è stato introdotto in un pallone a tre colli con cloroformio anidro (50 ml) sotto argon. La soluzione è stata scaldata a 60°C ed una soluzione di cloroformio di 1,3-bis(2-piridil)propano (0.87 g, 0.0044 mol) è stata aggiunta goccia a goccia. La reazione è stata fermata dopo un'ora e mezza. Durante la reazione, un solido bianco è stato separato sulla superficie della soluzione, solido che aumenta considerevolmente quando la soluzione viene raffreddata. Il solido è stato filtrato e lavato con cloroformio freddo, dando una prima raccolta di un solido cristallino bianco. Una seconda raccolta è stata recuperata dalla concentrazione della soluzione di cloroformio restante in un volume più piccolo e dal raffreddamento in frigorifero. Il solido ottenuto è stato filtrato e lavato con etil acetato, che ha rimosso le ultime impurità e ha reso un solido cristallino bianco. Resa 4.12 g. 79 %, m.p. 203-206°C,  $R_f$  0.28 su silice (eluente BAW 40:10:50), UV (etanolo)  $\lambda_{max}$  269 nm,  $\log\epsilon$  4.13,  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.31 (m, 2H,  $\text{PyCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Py}$ ), 3.17 (m, 4H,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.26 (t, 4H,  $\text{PyCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Py}$ ), 4.95 (t, 4H,  $\text{N}^+\text{CH}_2$ ), 8.09 (t, 2H,  $\text{H}_{meta}$ ), 8.16 (d, 2H,  $\text{H}'_{meta}$ ), 8.62 (t, 2H,  $\text{H}_{para}$ ), 9.12 (d, 2H,  $\text{H}_{orto}$ ),  $^{19}\text{F-NMR}$ : (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  -78.30 ( $\text{CF}_3\text{SO}_3$ ), -80.92 ( $\text{CF}_3$ ), -113.34 ( $\text{CF}_2\text{CH}_2$ ), -122.34, ( $\text{CF}_2$ ), -123.37, ( $2\text{CF}_2$ ), -126.47 ( $\text{CF}_3\text{CF}_2$ ), FT-IR (KBr): 3090, 1636, 1516, 1484, 1252, 1192, 790  $\text{cm}^{-1}$ , Anal. Calc. per  $\text{C}_{31}\text{H}_{22}\text{F}_{32}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$ : C, 31.27; H, 1.86; N, 2.35. Trovato: C, 31.34; H, 1.83; N, 2.29.

***1,1'-di(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluorottil)-2,2'-tetrametilenbispiridinio ditrifluorometansolfonato (4a)***

La reazione è stata eseguita come per il **3a**. Durante la reazione, un solido bianco è stato separato sulla superficie della soluzione, solido che aumenta considerevolmente quando la soluzione viene raffreddata. Il solido è stato filtrato e lavato con cloroformio freddo, dando una prima raccolta di un solido cristallino bianco (3.49 g). Una seconda raccolta è stata recuperata dalla concentrazione della soluzione di cloroformio restante in un volume più piccolo e dal raffreddamento in un frigorifero. Il solido ottenuto è stata filtrato e lavato con etil acetato, che ha rimosso le ultime impurità e ha reso un solido cristallino bianco. (0.77 g.). Resa 4.25 g. 82 %, m.p. 137-139°C,  $R_f$  0.15 su silice (eluente BAW), UV (etanolo)  $\lambda_{max}$  269 nm,  $\log\epsilon$  3.97,  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.95 (m, 4H,  $\text{PyCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.20 (m, 8H,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$  e  $\text{PyCH}_2$ ), 4.94 (t, 4H,  $\text{N}^+\text{CH}_2$ ), 8.06 (t, 2H,  $\text{H}_{meta}$ ), 8.10 (d, 2H,  $\text{H}'_{meta}$ ), 8.57 (t, 2H,  $\text{H}_{para}$ ), 9.11 (d, 2H,  $\text{H}_{orto}$ ),  $^{19}\text{F-NMR}$ : (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  -78.28 ( $\text{CF}_3\text{SO}_3$ ), -80.86 ( $\text{CF}_3$ ), -113.36 ( $\text{CF}_2\text{CH}_2$ ), -122.30, ( $\text{CF}_2$ ), -123.30, ( $\text{CF}_2$ ), -123.45 ( $\text{CF}_2$ ), -126.43 ( $\text{CF}_3\text{CF}_2$ ), FT-IR (KBr): 2930, 1636, 1537, 1483, 1288, 1155, 807  $\text{cm}^{-1}$ , Anal. Calc. per  $\text{C}_{32}\text{H}_{24}\text{F}_{32}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$ : C, 31.91; H, 2.01; N, 2.33. Trovato: C, 31.97; H, 2.00; N, 2.29.

***1,1'-di(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluorottil)-2,2'-ottametilenbispiridinio ditrifluorometansolfonato (5a)***

La reazione è stata eseguita come per il **3a**. La reazione è stata fermata ed è stato separato un olio viscoso marrone. La fase liquida è stata accuratamente rimossa ed il restante olio è stato sciolto e recuperato

con metanolo ed evaporato sotto vuoto. E' stato ottenuto un olio viscoso marrone. Resa 2.98 g. 92 %,  $R_f$  0.25 su silice (eluente BAW), UV (etanolo)  $\lambda_{\max}$  269 nm,  $\log \epsilon$  4.16,  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.42 (m, 8H, 4CH<sub>2</sub>), 1.75 (m, 4H, PyCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.12 (2 triplette, 8H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> e PyCH<sub>2</sub>), 4.91 (t, 4H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 8.03 (t, 2H, H<sub>meta</sub>), 8.08 (d, 2H, H'<sub>meta</sub>), 8.55 (t, 2H, H<sub>para</sub>), 9.10 (d, 2H, H<sub>orto</sub>),  $^{19}\text{F-NMR}$ : (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  -78.44 (CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>), -81.12 (CF<sub>3</sub>), -113.43 (CF<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), -122.41, (CF<sub>2</sub>), -123.41, (CF<sub>2</sub>), -123.65 (CF<sub>2</sub>), -126.60 (CF<sub>3</sub>CF<sub>2</sub>), FT-IR (KBr): 3090, 2931, 1632, 1514, 1484, 1274, 1168, 790 cm<sup>-1</sup>, Anal. Calc. per C<sub>36</sub>H<sub>32</sub>F<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>: C, 34.30; H, 2.56; N, 2.22. Trovato: C, 34.25; H, 2.50; N, 2.28.

***1,1'-di(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluorottil)-2,2'-dodecametilenbispiridinio ditrifluoro metansolfonato (6a)***

La reazione è stata eseguita come per il **3a**. La reazione è stata fermata ed è separato un olio viscoso marrone. La fase liquida è stata accuratamente rimossa e il restante olio è stato sciolto e recuperato con metanolo ed evaporato sotto vuoto. E' stato ottenuto con un olio viscoso marrone. Resa 2.37 g. 91 %,  $R_f$  0.29 su silice (eluente BAW), UV (etanolo)  $\lambda_{\max}$  269 nm,  $\log \epsilon$  3.97,  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.42 (m, 16H, 8CH<sub>2</sub>), 1.75 (m, 4H, PyCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.12 (2 triplette, 8H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> e PyCH<sub>2</sub>), 4.91 (t, 4H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 8.03 (t, 2H, H<sub>meta</sub>), 8.08 (d, 2H, H'<sub>meta</sub>), 8.55 (t, 2H, H<sub>para</sub>), 9.10 (d, 2H, H<sub>orto</sub>),  $^{19}\text{F-NMR}$ : (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  -78.37 (CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>), -80.97 (CF<sub>3</sub>), -113.27 (CF<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), -122.29, (CF<sub>2</sub>), -123.30, (CF<sub>2</sub>), -123.54 (CF<sub>2</sub>), -126.45 (CF<sub>3</sub>CF<sub>2</sub>), FT-IR (KBr): 3086, 2933, 1628, 1516, 1480, 1272, 1166, 802 cm<sup>-1</sup>, Anal. Calc. per C<sub>40</sub>H<sub>40</sub>F<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>: C, 36.48; H, 3.06; N, 2.13. Trovato: C, 36.51; H, 3.02; N, 2.11.

***1,1'-di(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluorottil)-2,2'-trimetilenbispiridinio dimetanesolfonato (3b)***

***Sintesi con tridecafluorottilmetansolfonato I***

Il tridecafluorottilmetansolfonato **1** (28.02 g, 0.063 mol) è stato introdotto in un pallone a tre colli e scaldato a 140°C, sotto agitazione. Il 1,3-bis(2-piridinil)propano base (5.00 g, 0.025 mol) è stato introdotto in piccole quantità in due ore. Come la reazione procede, la viscosità del sistema aumenta e l'agitazione diventa progressivamente più difficile. La reazione è stata fermata dopo sei ore con un rapido raffreddamento (bagno di ghiaccio) e il prodotto grezzo di reazione è stato sospeso diverse volte in etil acetato dando un solido che è stato purificato per cristallizzazione con etanolo/etil acetato caldo. E' stata ottenuta una polvere grigia. Resa 10.20 g. 37%.

**Per scambio ionico:** il prodotto **3a** è stato sottoposto a scambio ionico secondo un protocollo già descritto [14]. La cristallizzazione dalla stessa miscela di solvente usata sopra dà un solido bianco. Resa 95%, m.p. 295-303°C,  $R_f$  0.26 su silice (eluente BAW), UV (etanolo)  $\lambda_{\max}$  204, 271 nm,  $\log \epsilon$  4.16, 4.35,  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.32 (m, 2H, PyCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Py), 2.34 (s, 6H, CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>), 3.15 (m, 4H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.28 (t, 4H, PyCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Py), 4.96 (t, 4H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 8.07 (t, 2H, H<sub>meta</sub>), 8.17 (d, 2H, H'<sub>meta</sub>), 8.61 (t, 2H, H<sub>para</sub>), 9.12 (d, 2H, H<sub>orto</sub>),  $^{19}\text{F-NMR}$ : (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  -81.09 (CF<sub>3</sub>), -113.26 (CF<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), -122.36, (CF<sub>2</sub>), -123.43, (2CF<sub>2</sub>), -126.47 (CF<sub>3</sub>CF<sub>2</sub>), FT-IR (KBr): 3066, 2922, 2854, 1640, 1524, 1458, 1346, 1202, 1126, 1050, 780 cm<sup>-1</sup>, Anal. Calc. per C<sub>31</sub>H<sub>28</sub>F<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>: C, 34.39; H, 2.61; N, 2.59. Trovato: C, 34.35; H, 2.56; N, 2.63.

### ***1,1'-di(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluorottil)-2,2'-trimetilenbispiridinio dicloruro (3c)***

Il prodotto ottenuto dallo scambio ionico è stato congelato-seccato ottenendo una polvere bianco-grigia. La cristallizzazione da etanolo/etil acetato ha dato cristalli bianco-grigi.

Resa 89%, m.p. 208-210°C,  $R_f$  0.29 su silice (eluente BAW), UV (etanolo)  $\lambda_{\max}$  203, 270 nm,  $\log \epsilon$  3.02, 3.18,  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.32 (m, 2H,  $\text{PyCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Py}$ ), 3.16 (m, 4H,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.25 (t, 4H,  $\text{PyCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Py}$ ), 4.97 (t, 4H,  $\text{N}^+\text{CH}_2$ ), 8.07 (t, 2H,  $\text{H}_{\text{meta}}$ ), 8.18 (d, 2H,  $\text{H}'_{\text{meta}}$ ), 8.61 (t, 2H,  $\text{H}_{\text{para}}$ ), 9.13 (d, 2H,  $\text{H}_{\text{orto}}$ ),  $^{19}\text{F}$ -NMR: (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  -81.35 ( $\text{CF}_3$ ), -113.63 ( $\text{CF}_2\text{CH}_2$ ), -122.36, ( $\text{CF}_2$ ), -123.69, ( $2\text{CF}_2$ ), -126.86 ( $\text{CF}_3\text{CF}_2$ ), FT-IR (KBr): 3042, 2926, 2858, 1632, 1514, 1240, 1186, 1122, 1030, 786  $\text{cm}^{-1}$ , Anal. Calc. per  $\text{C}_{29}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{F}_{26}\text{N}_2$ : C, 36.16; H, 2.30; N, 2.91. Trovato: C, 36.10; H, 2.35; N, 2.93.

### ***1,1'-di(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluorottil)-2,2'-tetrametilenbispiridinio dimetansolfonato (4b)***

#### ***Sintesi con tridecafluorottilmetansolfonato***

La sintesi è stata fatta in condizioni simili a quelle del prodotto **3b**. Resa. 58%.

**Per scambio ionico:** Resa 89%, m.p. 295°C – dec.,  $R_f$  0.17 su silice (eluente BAW), UV (etanolo)  $\lambda_{\max}$  271 nm,  $\log \epsilon$  4.16,  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  2.00 (m, 4H,  $\text{PyCH}_2\text{CH}_2$ ), 2.34 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{SO}_3$ ), 3.18 (m, 4H,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 3.25 (t, 4H,  $\text{PyCH}_2\text{CH}_2$ ), 4.96 (t, 4H,  $\text{N}^+\text{CH}_2$ ), 8.07 (t, 2H,  $\text{H}_{\text{meta}}$ ), 8.17 (d, 2H,  $\text{H}'_{\text{meta}}$ ), 8.61 (t, 2H,  $\text{H}_{\text{para}}$ ), 9.15 (d, 2H,  $\text{H}_{\text{orto}}$ ),  $^{19}\text{F}$ -NMR: (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  -81.13 ( $\text{CF}_3$ ), -113.32 ( $\text{CF}_2\text{CH}_2$ ), -122.41, ( $\text{CF}_2$ ), -123.40, -123.56 ( $2\text{CF}_2$ ), -126.39 ( $\text{CF}_3\text{CF}_2$ ), FT-IR (KBr): 3066, 2932, 2864, 1640, 1522, 1468, 1236, 1160, 810  $\text{cm}^{-1}$ , Anal. Calc. per  $\text{C}_{32}\text{H}_{30}\text{F}_{26}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$ : C, 35.05; H, 2.76; N, 2.55. Trovato: C, 35.13; H, 2.72; N, 2.52.

### ***1,1'-di(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluorottil)-2,2'-tetrametilenbispiridinio dicloruro (4c)***

**Per scambio ionico:** Resa 87%, m.p. 238-240°C,  $R_f$  0.19 su silice (eluente BAW), UV (etanolo)  $\lambda_{\max}$  270 nm,  $\log \epsilon$  4.11,  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.95 (m, 4H,  $\text{PyCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.32 (m, 8H,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$ , e  $\text{PyCH}_2$ ), 4.97 (t, 4H,  $\text{N}^+\text{CH}_2$ ), 8.07 (t, 2H,  $\text{H}_{\text{meta}}$ ), 8.13 (d, 2H,  $\text{H}'_{\text{meta}}$ ), 8.59 (t, 2H,  $\text{H}_{\text{para}}$ ), 9.15 (d, 2H,  $\text{H}_{\text{orto}}$ ),  $^{19}\text{F}$ -NMR: (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  -80.99 ( $\text{CF}_3$ ), -113.16 ( $\text{CF}_2\text{CH}_2$ ), -122.20, ( $\text{CF}_2$ ), -123.33, -123.48 ( $2\text{CF}_2$ ), -126.39 ( $\text{CF}_3\text{CF}_2$ ), FT-IR (KBr): 3070, 2928, 2869, 1642, 1520, 1465, 1235, 1157, 820  $\text{cm}^{-1}$ . Anal. Calc. per  $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{F}_{26}\text{N}_2$ : C, 36.87; H, 2.47; N, 2.87. Trovato: C, 36.83; H, 2.49; N, 2.85.

### ***1,1'-di(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluorottil)-2,2'-ottametilenbispiridinio dimetansolfonato (5b)***

**Per scambio ionico:** Si ottiene un olio viscoso leggermente marrone. Resa 7.90 g., 87 %,  $R_f$  0.22 su silice (eluente BAW), UV (etanolo)  $\lambda_{\max}$  269 nm,  $\log \epsilon$  4.12,  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.43 (m, 8H,  $4\text{CH}_2$ ), 1.73 (m, 4H,  $\text{PyCH}_2\text{CH}_2$ ), 2.29 (s, 6H,  $\text{CH}_3\text{SO}_3$ ), 3.12 (m, 4H,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$ , e  $\text{PyCH}_2$ ), 4.92 (t, 4H,  $\text{N}^+\text{CH}_2$ ), 8.04 (t, 2H,  $\text{H}_{\text{meta}}$ ), 8.10 (d, 2H,  $\text{H}'_{\text{meta}}$ ), 8.57 (t, 2H,  $\text{H}_{\text{para}}$ ), 9.13 (d, 2H,  $\text{H}_{\text{orto}}$ ),  $^{19}\text{F}$ -NMR: (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  -81.26 ( $\text{CF}_3$ ), -113.47 ( $\text{CF}_2\text{CH}_2$ ), -122.47, ( $\text{CF}_2$ ), -123.48, -123.67 ( $2\text{CF}_2$ ), -126.69 ( $\text{CF}_3\text{CF}_2$ ), FT-IR (KBr): 3072, 2933, 2874, 1640, 1520, 1468, 1238, 1161, 800  $\text{cm}^{-1}$ , Anal. Calc. per  $\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{F}_{26}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$ : C, 37.51; H, 3.32; N, 2.43, Trovato: C, 37.54; H, 3.27; N, 2.40.

***1,1'-di(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluorottil)-2,2'-ottametenbispiridinio dicloruro (5c)***

**Per scambio ionico:** Resa: 1.33 g, 58 %, m.p. 123-126°C,  $R_f$  0.19 su silice (eluente BAW), UV (etanolo)  $\lambda_{\max}$  271 nm,  $\log \epsilon$  4.10,  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.40 (m, 8H, 4CH<sub>2</sub>), 1.75 (m, 2H, PyCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.12 (m, 8H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> and PyCH<sub>2</sub>), 4.95 (t, 4H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 8.05 (t, 2H, H<sub>meta</sub>), 8.10 (d, 2H, H'<sub>meta</sub>), 8.57 (t, 2H, H<sub>para</sub>), 9.19 (d, 2H, H<sub>orto</sub>),  $^{19}\text{F-NMR}$ : (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  -80.90 (CF<sub>3</sub>), -113.27 (CF<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), -122.30, (CF<sub>2</sub>), -123.30, -123.52 (2CF<sub>2</sub>), -126.43 (CF<sub>3</sub>CF<sub>2</sub>), FT-IR (KBr): 3066, 2931, 2881, 1647, 1528, 1468, 1244, 1154, 826 cm<sup>-1</sup>. Anal. Calc. per C<sub>34</sub>H<sub>32</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>26</sub>N<sub>2</sub>: C, 39.51; H, 3.12; N, 2.71, Trovato: C, 39.56; H, 3.09; N, 2.67.

***1,1'-di(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluorottil)-2,2'-dodecametenbispiridinio dimetansolfonato (6b)***

**Per scambio ionico:** Si ottiene un olio viscoso leggermente marrone. Resa 80 %,  $R_f$  0.19 su silice (eluente BAW), UV (etanolo)  $\lambda_{\max}$  270 nm,  $\log \epsilon$  4.19,  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.27 (bs, 12H, 6CH<sub>2</sub>), 1.43 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 1.73 (m, 2H, PyCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.29 (s, 6H, CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>), 3.10 (m, 8H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, and PyCH<sub>2</sub>), 4.92 (t, 4H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 8.04 (t, 2H, H<sub>meta</sub>), 8.09 (d, 2H, H'<sub>meta</sub>), 8.54 (t, 2H, H<sub>para</sub>), 9.13 (d, 2H, H<sub>orto</sub>),  $^{19}\text{F-NMR}$ : (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  -81.05 (CF<sub>3</sub>), -113.31 (CF<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), -122.34, (CF<sub>2</sub>), -123.35, -123.54 (2CF<sub>2</sub>), -126.53 (CF<sub>3</sub>CF<sub>2</sub>), FT-IR (KBr): 3063, 2928, 2878, 1638, 1526, 1465, 1242, 1152, 826 cm<sup>-1</sup>, Anal. Calc. per C<sub>40</sub>H<sub>46</sub>F<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>: C, 39.74; H, 3.84, N, 2.32. Trovato: C, 39.72; H, 3.87; N, 2.36.

***1,1'-di(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluorottil)-2,2'-dodecametenbispiridinio dicloruro (6c)***

**Per scambio ionico:** Il trattamento con etil acetato ha dato un solido. Resa 88 %, m.p. 108-110°C,  $R_f$  0.05 su silice (eluente BAW), UV (etanolo)  $\lambda_{\max}$  270 nm,  $\log \epsilon$  4.17,  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.31 (m 16H, 8CH<sub>2</sub>), 1.73 (m, 4H, PyCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.12 (m, 8H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, and PyCH<sub>2</sub>), 4.94 (t, 4H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 8.02 (t, 2H, H<sub>meta</sub>), 8.09 (d, 2H, H'<sub>meta</sub>), 8.54 (t, 2H, H<sub>para</sub>), 9.15 (d, 2H, H<sub>orto</sub>),  $^{19}\text{F-NMR}$ : (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  -80.82 (CF<sub>3</sub>), -113.18 (CF<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), -122.23, (CF<sub>2</sub>), -123.23, -123.46 (2CF<sub>2</sub>), -126.36 (CF<sub>3</sub>CF<sub>2</sub>), FT-IR (KBr): 3068, 2931, 2882, 1640, 1525, 1470, 1244, 1154, 826 cm<sup>-1</sup>, Anal. Calc. per C<sub>38</sub>H<sub>40</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>26</sub>N<sub>2</sub>: C, 41.89; H, 3.70, N, 2.57. Trovato: C, 41.94; H, 3.64; N, 2.53.

***1-(3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluorottil)piridinio ioduro (7d) e cloruro [22-24] (7c)***

La piridina è stata aggiunta in un pallone a tre colli (88.75 g, 93.4 ml, 1.12 mol) e scaldata a riflusso sotto agitazione magnetica. Il 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluorottil ioduro (96.17 g, 0.203 mol) è stato aggiunto lentamente goccia a goccia e la reazione è stata fatta proseguire per le successive sei ore. Dopo raffreddamento è stato separato un precipitato giallo, che è stato filtrato e cristallizzato varie volte da acetone. Sono stati ottenuti cristalli gialli dello ioduro **7d**. Resa 85.3 g 76%, m.p. 234-236°C,  $R_f$  0.32 su silice (eluente BAW), UV (etanolo)  $\lambda_{\max}$  260 nm,  $\log \epsilon$  3.68,  $^1\text{H NMR}$  (CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  3.31 (m, 2H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 5.19 (t, 2H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>), 8.29 (t, 2H, H<sub>meta</sub>), 8.79 (t, 1H, H<sub>para</sub>), 9.28 (d, 2H, H<sub>orto</sub>), FT-IR (KBr): 3068, 2931, 2882, 1640, 1525, 1470, 1244, 1154, 826 cm<sup>-1</sup>, Anal. Calc. per C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>F<sub>13</sub>NI: C, 28.23; H, 1.61, N, 2.53. Trovato: C, 28.25; H, 1.57; N, 2.51.

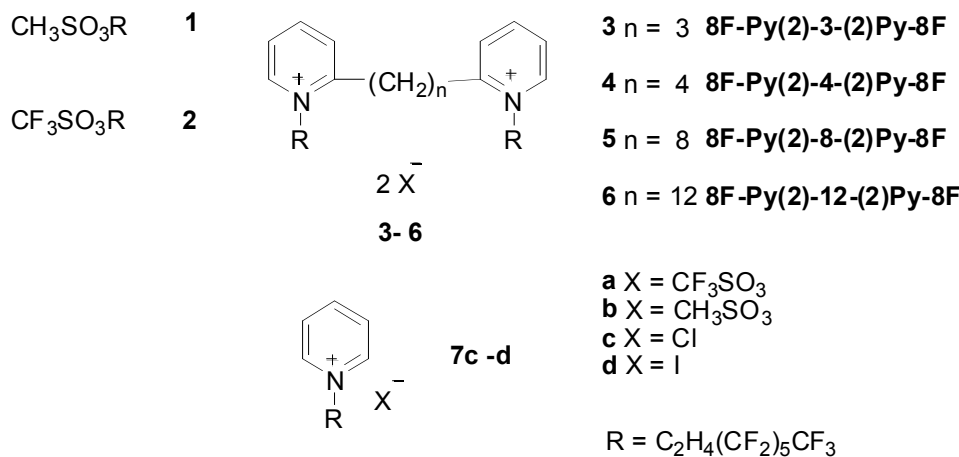
Dopo il solito scambio ionico, è stato ottenuto il **7c** come cristalli bianchi. Si è prestata attenzione nel congelare-seccare il prodotto prima della cristallizzazione da acetone-metanolo dal momento che tracce di acqua causano una consistente diminuzione della resa della cristallizzazione. Il prodotto è molto igroscopico. Resa: 80%,  $R_f$  0.32 su silice (eluente BAW), UV (etanolo)  $\lambda_{\max}$  260 nm,  $\log \epsilon$  3.66,  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  3.26 (m, 2H,  $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$ ), 5.16 (t, 2H,  $\text{N}^+\text{CH}_2$ ), 8.27 (t, 2H,  $\text{H}_{\text{meta}}$ ), 8.77 (t, 1H,  $\text{H}_{\text{para}}$ ), 9.23 (d, 2H,  $\text{H}_{\text{orto}}$ ), FT-IR (KBr): 3068, 2931, 2882, 1640, 1525, 1470, 1244, 1154, 826  $\text{cm}^{-1}$ , Anal. Calc. per  $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{ClF}_{13}\text{N}$ : C, 33.82; H, 1.97, N, 3.03. Trovato: C, 33.79; H, 1.99; N, 3.08.

## Risultati e Discussione

La preparazione dei prodotti è evidenziata nello Schema 1. L'approccio sintetico è stato simile a quello già usato nella preparazione dei tensioattivi gemini alchil piridinici [14].

Il 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridecafluorotilmetansulfonato **1** è stato preparato secondo una via di sintesi nota, tuttavia le procedure di purificazioni sono molto difficoltose. Come già riportato [14], la viscosità del sistema aumenta nel corso della reazione, ostacolando così l'agitazione. Inoltre, la resa dei prodotti è molto bassa (circa 30-40 % come massimo) principalmente a causa delle difficoltà di purificazione. Per di più, quando si lavora con le basi con spaziatori più lunghi ( $n = 8, 12$ ), la procedura di purificazione appena illustrata non ha funzionato. Mentre l'uso di un solvente ha parzialmente risolto il problema sintetico in un caso precedente [14], qui l'utilizzo di solventi non ha dato alcun risultato. In questo caso, il maggiore effetto elettronattrattivo della catena fluorurata aumenta probabilmente l'acidità degli idrogeni del metilene direttamente legati al gruppo  $\text{CF}_2$ . Questo effetto promuoverebbe la reazione di eliminazione sulla sostituzione nucleofila, dando un alchene che può polimerizzare, con la produzione dei catrami. Questi fatti possono spiegare la minor resa ottenuta, confrontata con quella dei tensioattivi gemini alchil piridinici ed i problemi di purificazione hanno origine da elevate quantità di catrami.

### Quadro I. Prodotti preparati nel presente lavoro.



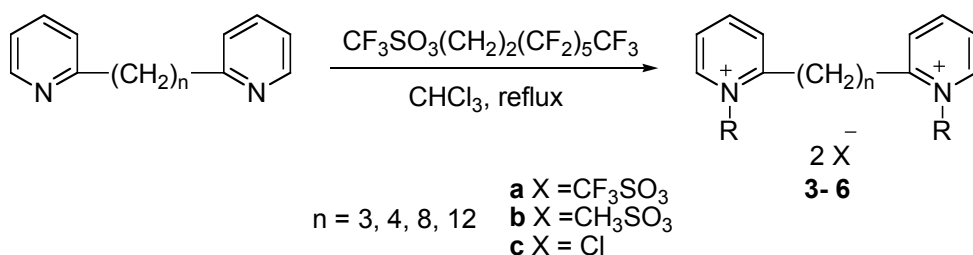
Il problema della quaternarizzazione di piridina parzialmente ingombrate è stato precedentemente discusso e risolto con l'uso di alchil trifluorometansolfonati al posto di alchil metansolfonati [14].

La sintesi dei composti **3-6** è stata così fatta secondo questa procedura già descritta, che è stata leggermente adattata al presente caso.

Il tridecafluorotiltrifluorometansulfonato **2** è stato così preparato con rese eccellenti [21]. Queste assunzioni nella reazione di quaternarizzazione hanno dato i prodotti aspettati **3a-6a** con rese migliori (69-82%) migliorando così la procedura di purificazione. Proprio l' $\alpha,\omega$ -bis(2-piridil)alcano è stato aggiunto goccia a goccia al perfluoroalchiletile triflato caldo usando il cloroformio come solvente per assicurare che la reazione prenda la via desiderata, minimizzando così la reazione di eliminazione. Dall'inversione dell'ordine di reazione, la resa diminuisce di circa il 10-15%.

I prodotti **3b-6b** e **3c-6c** sono stati ottenuti da un semplice protocollo di scambio ionico [14].

**Schema 1.** Sintesi dei tensioattivi gemini piridinici fluorurati **3-6**.



Inoltre, i tensioattivi piridinici **7c-d** sono stati preparati, da semplice quaternarizzazione della piridina con il tridecafluorottil ioduro e il successivo scambio ionico. Queste strutture sono state studiate come lo stato di riferimento monomero per tensioattivi gemini piridinici fluorurati.

### Caratterizzazione Anfifilica

#### Misure di conducibilità

La concentrazione micellare critica (cmc) ed il grado di legame del controione ( $\beta$ ) (composti **4b-6b**, **3c-6c**, **7c** e **7d**) sono stati ricavati dalle misure di conducibilità (Tabella 1). Come già riportato, per ottenere la cmc è stata usata l'extrapolazione di due regimi lineari nella regione premicellare e postmicellare, come ascissa dell'intersezione di queste due linee. Questo approccio è di difficile applicazione quando il punto di discontinuità nel grafico di conducibilità specifica vs concentrazione molare (C) non è ben definito a causa di una transizione graduale tra lo stato monomero e quello micellare. Molto recentemente è stato proposto un approccio con l'uso di un *fitting* non lineare [29,30]. L'applicazione di questo nuovo metodo ai dati ottenuti dai tensioattivi gemini ha dato risultati molto buoni, evitando l'influenzamento che il ricercatore può introdurre usando il primo metodo. Il *fitting* non lineare è stato completamente descritto in letteratura [29,30] con la sua prima applicazione per i tensioattivi gemini [14]. I valori di cmc e di  $\beta$  dei composti in studio sono stati ottenuti con entrambi i metodi di analisi, per consentire il confronto con i dati in letteratura, solitamente ottenuti con il primo metodo (Tabella 1).

Per il composto **3b** il Krafft point è 42.2°C, mostrando come sia completamente solubile a temperatura ambiente. Sono state determinate le cmc dei monomeri, del cloruro **7c** e dello ioduro **7d**. Il composto **7c** ha una cmc circa dieci volte più alta di quella dei corrispondenti tensioattivi gemini (**3c-6c**), la quale è in accordo con quelle trovate in generale per i tensioattivi gemini [11,13,26,27,36]. Il tensioattivo **7d** mostra una cmc di circa la metà rispetto al **7c**. Un effetto più piccolo del controione potrebbe essere ottenuto dall'analisi di tensioattivi simili a catena più corta [31,32], mentre il tensioattivo ottilico [31,32] ed in particolare il tensioattivo dodecil piridinico [33,34] che ha un'idrofobicità simile ai **7c-7d**, mostrano un effetto maggiore. Entrambi i tensioattivi **7c** e **7d** mostrano una prima discontinuità ad una concentrazione più bassa della cmc (vedi Tabella 1, nota d), ed è stato già riscontrato che un comportamento simile è correlato alla formazione di coppie ioniche a basse concentrazioni [25,35].

Le cmc dei sali metansolfonato (**4b-6b**) sono più alte di quelle dei sali cloruro (**3c-6c**). Sia i metansolfonati (**4b-6b**) che i cloruri (**3c-6c**) mostrano una diminuzione della cmc quando lo *spacer* si

allunga. E' interessante come la cmc si dimezzi in entrambe le serie di composti quando lo *spacer* varia la sua lunghezza da tre a dodici metileni. Questo piccolo effetto della lunghezza dello *spacer* sul valore della cmc è peculiare, dal momento che tale effetto è presente anche nel caso di tensioattivi gemini dodecilici piridinici non fluorurati, dove la cmc addirittura diminuisce di circa sette volte nel caso dei cloruri [14]. Questi risultati sembrano sottolineare una situazione in cui lo *spacer* alchilico non può avvolgersi liberamente intorno alle catene idrofobiche, come invece accade per tensioattivi gemini, dal momento che le catene fluoroalchiliche sono sia idrofobiche che oleofobiche. Tuttavia, ci sono possibilità per lo *spacer* di avvolgersi vicino alla superficie, per diminuire il contatto con l'acqua. Questa opportunità potrebbe essere efficace per spacer con un buon grado di libertà, cioè per il dodecametilenico.

Il grado di legame del controione  $\beta$  esprime il numero dei controioni che sono strettamente legati alla micelle nello strato di Stern, per controbilanciare le repulsioni coulombiane che si oppongono al processo di micellizzazione. Da un punto di vista qualitativo, può aiutare il descrivere alcuni aspetti del comportamento di aggregazione micellare. Deve essere sottolineato che dovrebbero essere utilizzati metodi migliori per stimare questo parametro, dal momento che è stato dimostrato che il rapporto tra le pendenze delle due porzioni lineari pre- e post-micellari sottostima il contributo micellare ottenuto dalla conducibilità [36]. I valori di  $\beta$ , ottenuti dal metodo classico, sono stati riportati per dare consistenza ai dati precedentemente pubblicati in letteratura, mentre l'utilizzo di tecniche differenti per misurare la conducibilità e misure emf permettono di ottenere risultati migliori [37].

Il cloruro monomero **7c** mostra un maggiore valore del grado di legame del controione  $\beta$  (68%), rispetto al cloruro dodecil piridinico, per il quale è stato ottenuto un valore del 60% [14]. Il corrispondente ioduro, **7d**, mostra un elevato valore di  $\beta$ , in accordo con altri tensioattivi alchil piridinici [38]. Per quanto ne sappiamo, i dati sull'effetto che il controione metansolfonato di anfifili fluorurati può avere sono scarsi, anche se qualche esempio di tensioattivi alchil piridinici metansolfonati è presente in letteratura [38], che mostrano un grado di legame del controione molto basso (circa 53%). In questo caso, il basso grado di legame del controione sembra derivare dallo scarso impaccamento delle micelle. Questo è in contrasto con quanto riscontrato recentemente per i tensioattivi dodecilici gemini piridinici metansolfonati [14], che hanno un grado di legame del controione alto, pari al 74%. Questi tensioattivi gemini piridinici con uno *spacer* corto sembrano legare strettamente uno dei due controioni tra gli anelli piridinici carichi.

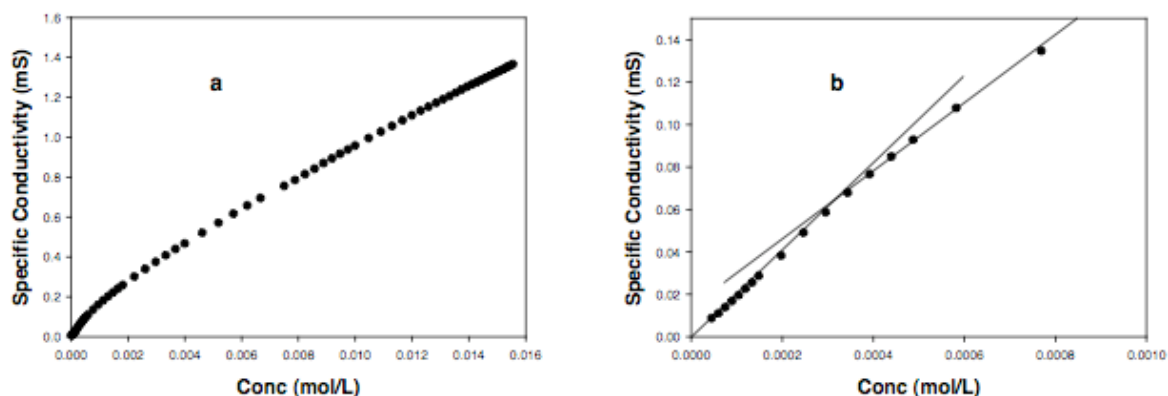
Nel caso dei tensioattivi gemini piridinici fluorurati i cloruri mostrano un più elevato grado di legame del controione rispetto ai metansolfonati. Questo comportamento è opposto a quello mostrato dai tensioattivi gemini dodecilici [14], dove i metansolfonati hanno valori di  $\beta$  maggiori di quelli dei cloruri. Questi effetti dipenderebbero dalla diversa natura della catena idrofobica.

I tensioattivi gemini piridinici fluorurati metansolfonati (**4b-6b**) mostrano un grado di legame del controione simile a quello dei sopra citati tensioattivi alchilpiridinici [38]. Nelle serie tensioattivi gemini piridinici fluorurati cloruri, il valore di  $\beta$  è minore per le strutture gemini (**3c-6c**) rispetto ai rispettivi monomeri (**7c**). Così, il loro valore di  $\beta$  è minore di quello mostrato dai tensioattivi gemini dodecilpiridinici [14]. Questo deriverebbe dalla difficoltà di questi tensioattivi gemini nel trovare una conformazione in grado

di legare un controione tra le teste polari così strettamente come avviene per i tensioattivi gemini dodecildiridinici, probabilmente a causa della repulsione tra le due differenti porzioni idrofobiche che costituiscono la molecola, ovvero lo *spacer* idrogenato e le code fluorurate.

In entrambe le serie, alchilica e fluorurata, il composto con uno *spacer* ottametileno mostra un valore di  $\beta$  più basso e ciò è in accordo con quanto trovato per le serie dodecifiche [14]. Può essere ipotizzato uno scarso impaccamento delle molecole di tensioattivo sia all'interfaccia aria/acqua che in fase micellare, dovuto ad un riarrangiamento conformazionale che il tensioattivo adotta alla superficie poiché ha bassa densità di carica superficiale.

Un comportamento particolare è stato mostrato dal composto **6c**, per il quale si è riscontrata una discontinuità nel grafico della conducibilità specifica vs.  $C$  a bassa concentrazione, circa tre volte minore della cmc (Figura 1b). Il composto **6c** mostra un comportamento simile a quello dei tensioattivi piridinici monomerici e di altri tensioattivi cationici. Il grado di legame del controione a livello di questa prima discontinuità è basso, circa il 6%, e potrebbe essere prova della formazione di strette coppie ioniche strette tra il tensioattivo e il suo controione [25,35]. Il grado di formazione di queste coppie ioniche sembra tuttavia minore di quello che avviene nel caso dei monomeri **7c** e **7d**. Infatti, normalmente, la loro formazione è favorita quando la concentrazione aumenta [39] e potrebbe essere più evidente, se avviene, per i monomeri, dal momento che hanno una cmc più elevata.



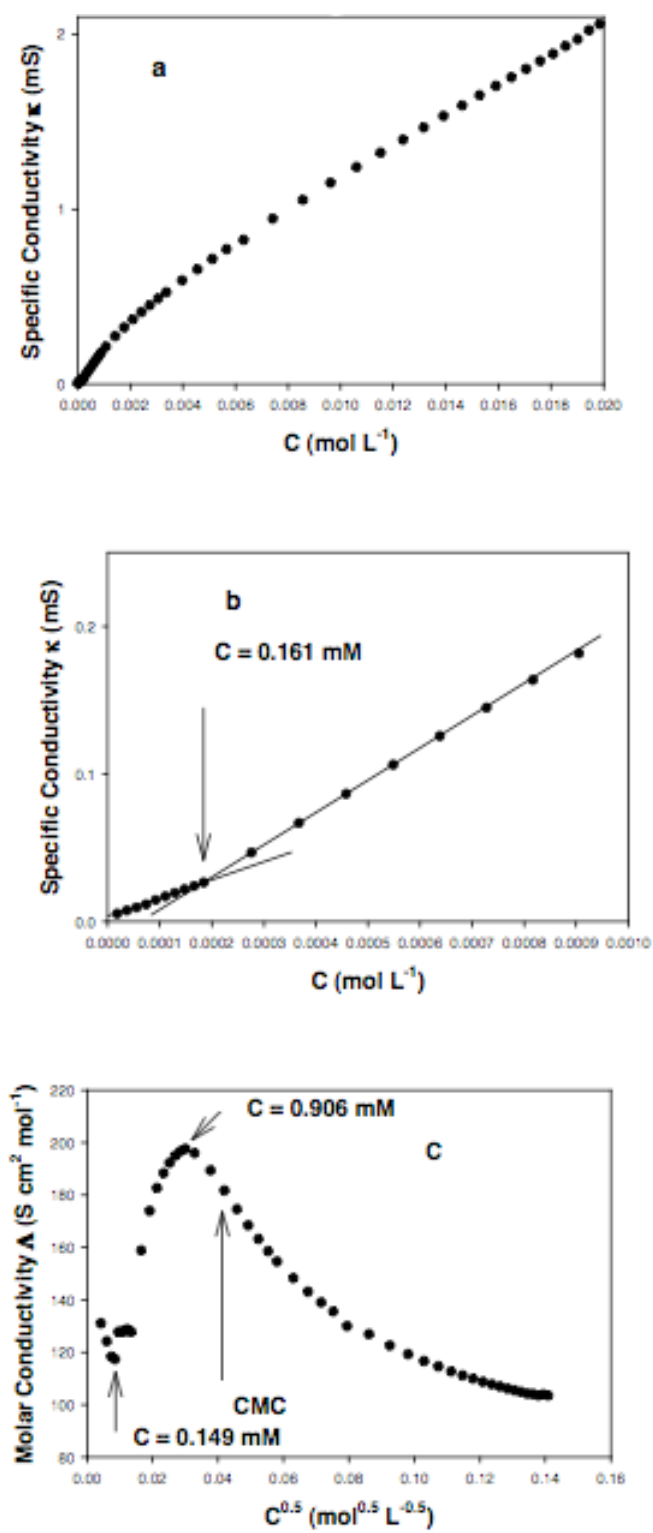
**Figura 1.** Conducibilità specifica vs  $C$  per il composto **6c**: **a**) tutto il range di concentrazione, **b**) regione delle basse concentrazioni.

Come abbiamo visto recentemente per i tensioattivi gluco-cationici [40], e come riscontrato da altri autori [39], diversi tensioattivi mostrano la tendenza ad aggregarsi in fase premicellare.

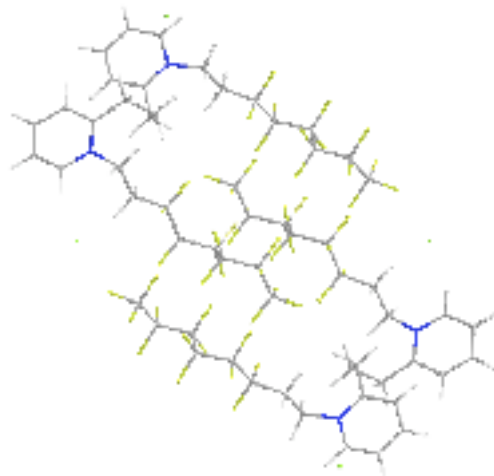
I dati di conducibilità possono anche essere riportati come grafici della conducibilità molare ( $\Lambda$ ) vs  $C^{0.5}$ . I tensioattivi gemini riportati mostrano alcuni punti che sembrano indicare un andamento asintotico a concentrazioni molto basse (Fig 2c). Questo normalmente è prova della formazione di coppie ioniche strette [14,25,35]. In questo caso è difficile accertare se l'andamento asintotico esista o possa essere evidenziato lavorando a concentrazioni più basse di quelle esaminate. I composti **3-6** mostrano la presenza di un massimo nel grafico (composto **4**, Fig 2c). Normalmente il massimo è più evidente quando l'idrofobicità della molecola aumenta ed è prova della formazione di aggregati premicellari in soluzione [37,39]. Il termine

coppia ionica si riferisce al legame del controione al tensioattivo di carica opposta. In questo caso, la parziale neutralizzazione delle cariche provoca una diminuzione della conducibilità e entrambi i grafici, di  $\kappa$  vs C e di  $\Lambda$  vs  $C^{0.5}$ , mostrerebbero una leggera curvatura verso l'asse delle C come riportato da Zana e qui trovato per il composto **6c** (vedi Figura 1b) e per il monomero **7c**. La mancanza di tale comportamento nel grafico di  $\kappa$  vs C nell'intervallo di concentrazione studiato e le difficoltà nell'evidenziare l'andamento asintotico a basse concentrazioni nel grafico  $\Lambda$  vs  $C^{0.5}$  non permettono di chiarire se le coppie ioniche si formino o meno in tutta la serie di composti. Inoltre, Zana ha mostrato in modo qualitativo che la conduttanza di un dimero è più alta di quella di un monomero, purché il riarrangiamento dei monomeri nel dimero sia in grado di lasciarlo completamente ionizzato [39]. Una possibilità è quella che i due monomeri formino un dimero dall'accoppiamento delle loro catene e lasciando le due teste polari lontane tra loro, all'estremità del dimero (come una struttura bolaforme) (vedi Figura 3).

In queste condizioni, il dimero è: a) completamente ionizzato, b) un po' più piccolo della semplice somma dei volumi dei due tensioattivi monomeri solvatati; e c) richiederebbe meno acqua per essere "solvatato". Di conseguenza la loro capacità di diffusione e migrazione nella soluzione dovrebbe essere più rapida e la conducibilità del dimero dovrebbe essere più alta di quella dei due tensioattivi monomeri. Inoltre, Pinazo et al. [37] hanno valutato questo tipo di comportamento da un punto di vista teorico e quantitativo ed hanno ottenuto grafici di  $\Lambda$  vs  $C^{0.5}$  che presentano un massimo. Questa discussione può essere estesa alla formazione di oligomeri come trimeri, tetrameri e così via, purché essi non leghino controioni. Come risultato, il grafico di  $\kappa$  vs C dovrebbe mostrare, nella regione premicellare a basse concentrazioni, una leggera curvatura verso l'asse  $\kappa$ . Questo si osserva in Figura 2b per il composto **4b** ad una C di circa 0.16 mM. In più,  $\Lambda$  aumenterà all'aumentare di C e il grafico di  $\Lambda$  vs  $C^{0.5}$  mostrerà un aumento dei valori di  $\Lambda$ . È stato trovato un minimo nel grafico di  $\Lambda$  vs  $C^{0.5}$  (Figura 2c), in eccellente accordo con la discontinuità sopra citata nel grafico di  $\kappa$  vs C (0.149 mM vs 0.161 mM). All'aumentare della concentrazione, gli oligomeri cresceranno ulteriormente fino a che la loro conducibilità inizia a diminuire dal momento che, per tenere uniti i monomeri a formare l'aggregato, hanno bisogno di legare fermamente alcuni controioni per diminuire la repulsione delle teste polari cationiche. Questo spiega perché nei grafici di  $\Lambda$  vs  $C^{0.5}$  è presente un massimo (per il composto **4b**, in Figura 2c, a 0.906 mM, mentre la cmc per questo tensioattivo ha un valore doppio: 1.71 mM). Anche per gli altri tensioattivi gemini in studio sono stati comprovati due tipi di andamenti peculiari. La discontinuità a basse concentrazioni nel grafico della conducibilità specifica vs. C e il massimo nel grafico della conducibilità equivalente sono presenti a concentrazioni più basse della cmc, confermando così l'ipotesi della formazione di aggregati premicellari. Questo è evidente per tutti i tensioattivi gemini riportati, per i quali i grafici sono simili a quelli in Figura 1.



**Figura 2.** (a, b) Grafici di conducibilità specifica vs  $C$  e (c) conducibilità molare  $\Lambda$  vs  $C^{0.5}$  per il composto **4b**: a) conducibilità specifica vs  $C$  su tutto la *range* di concentrazione, b) conducibilità specifica vs  $C$  a basse concentrazioni.



**Figura 3.** Disposizione dei tensioattivi in dimeri.

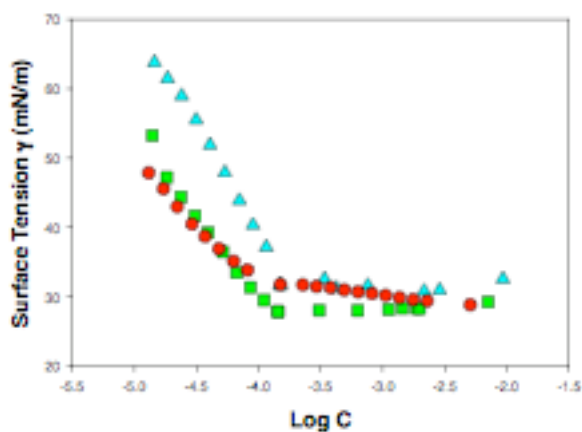
### ***Misure di tensione superficiale***

Le misure di tensione superficiale ( $\gamma$  vs  $\log C$ ) sono state effettuate a 298 K. I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 1 e in Figura 4 e 5. Il composto **3b** mostra un alto valore del *Krafft Point* e la sua tensione superficiale  $\gamma$  vs  $\log C$  non è stata riportata [28].

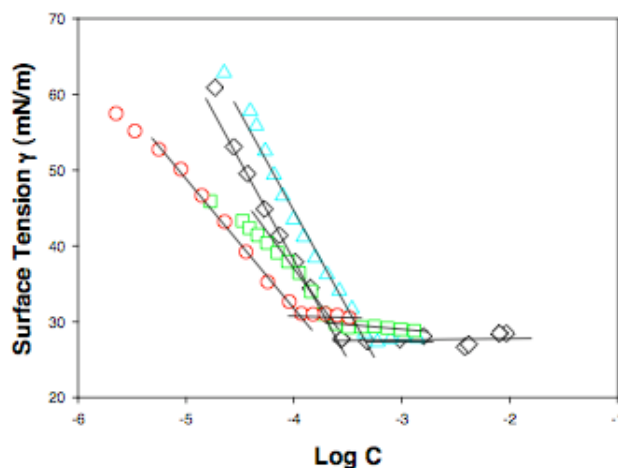
**Tabella 1.** Proprietà anfifiliche dei tensioattivi **3-6** e **7c-d** a 25°C determinate per via conduttimetrica e tensiometrica.

Composti	cmc <sup>a</sup> mM (b)	$\beta^a$ %	cmc <sup>b</sup> mM	$\beta^b$ %	cmc <sup>c</sup> mM (a)	Ratio (b)/(a)	$\gamma_{cmc}$ mN/m	$\Gamma$ *10 <sup>-10</sup> mol/cm <sup>2</sup>	A <sub>min</sub> Å <sup>2</sup>	pC <sub>20</sub>	cmc/C <sub>20</sub>
<b>4b</b>	1.93	51	1.71	51	0.16	12.0	31.6	2.903	57	4.41	4
<b>5b</b>	1.40	43	1.39	43	0.13	10.4	28.4	1.934	86	4.98	13
<b>6b</b>	1.05	54	1.11	55	0.089	11.8	31.2	1.511	110	5.17	13
<b>3c</b>	1.91	62	1.82	63	0.28	6.8	27.7	2.214	75	4.54	10
<b>4c</b>	1.86	63	1.76	62	0.50	3.7	27.7	2.089	79	4.40	11
<b>5c</b>	1.29	52	1.22	52	0.25	5.2	29.2	1.542	108	5.08	19
<b>6c</b>	1.10	55	1.04	54	0.12	9.2	30.9	1.395	119	5.15	21
- <sup>d</sup>	0.33	6	0.30	4							
<b>7c<sup>e</sup></b>	20.31	68	20.09	67	22.40	0.9	28.3	2.64	62.8	2.38	5.37
- <sup>d</sup>	4.51	21	4.61	16							
<b>7d<sup>f</sup></b>	9.64	84	10.24	84	7.99	1.2	18.5	3.307	50.2	2.99	7.88
- <sup>d</sup>	0.34	16	0.33	16							

a) da conducibilità, metodo classico. b) da conducibilità, *fit* non lineare c) da tensione superficiale. d) prima discontinuità, dovuta alla formazione di coppie ioniche; e) vedi anche rif. 21. f) misurato a 30°C, Krafft Point = 28.4°C.



**Figura 4.** Grafici di tensione superficiale vs. log C per i composti **4b** (▲), **5b** (■) e **6b** (●).



**Figura 5.** . Grafici di tensione superficiale vs log C per i composti **3c** (◇), **4c** (△), **5c** (□) e **6c** (○).

Diversi parametri sono stati determinati dai grafici  $\gamma$  vs logC: (i) la concentrazione micellare critica (cmc), ottenuta come concentrazione al punto di intersezione delle due porzioni lineari dei grafici  $\gamma$  vs logC; (ii) la concentrazione eccesso superficiale  $\Gamma_{\max}$  [mol cm<sup>-2</sup>], calcolata usando l'equazione di adsorbimento di Gibbs (8) [41,42]; (iii) l'area per molecola all'interfaccia  $A_{\min}$  [Å<sup>2</sup>], calcolata usando l'equazione (9); (iv) l'efficienza nella riduzione della tensione superficiale, misurata come  $C_{20}$  (o  $pC_{20}$ ), cioè la concentrazione molare di tensioattivo richiesta per ridurre la tensione superficiale del solvente di 20 mN/m [34]; (v) l'efficienza della riduzione della tensione superficiale, misurata dalla tensione superficiale alla cmc,  $\gamma_{\text{cmc}}$ ; (vi) il rapporto  $\text{cmc}/C_{20}$ , ovvero la misura della capacità di formare micelle, relativa alla tendenza ad adsorbire all'interfaccia the aria/acqua.

Nei calcoli della concentrazione eccesso superficiale, il valore di  $n$  per l'equazione di Gibbs è il numero di specie ioniche la cui concentrazione all'interfaccia varia al variare della concentrazione del tensioattivo in soluzione. In assenza di elettroliti aggiunti alla soluzione acquosa, il valore di  $n$  per tensioattivi ionici diminuisce all'aumentare della concentrazione del tensioattivo a causa della variazione della concentrazione del controione.

Il valore di  $n$  (il numero di specie la cui concentrazione all'interfaccia cambia al variare di  $C$ ) è considerato 2, sebbene per gemini divalenti (con uno ione di tensioattivo e due controioni), sono stati proposti sia il valore di 2 che di 3 [43]. Per tensioattivi gemini, è stato trovato che uno dei due controioni è spesso stretto tra le due teste polari cariche, specialmente quando lo *spacer* è molto corto [44]. L'uso di un differente valore di  $n$  tuttavia non influisce sull'andamento generale delle aree superficiali, inoltre le ultime evidenze ci hanno permesso di utilizzare  $n = 2$  con una certa sicurezza.

In generale, le cmc dei tensioattivi gemini fluorurati determinate attraverso la tensione superficiale mostrano un andamento simile alle cmc determinate per via conduttimetrica. Comunque, i valori di cmc derivanti dalla tensione superficiale sono più bassi dei corrispondenti ottenuti per via conduttimetrica. Risultati simili sono stati ottenuti da Pinazo ed al. [37] per tensioattivi gemini idrogenati derivati dell'arginina. Infatti, si è notato che le cmc ottenute da misure di fluorescenza e di conducibilità sono simili tra loro ma molto più alte di quelle determinate con misure di tensione superficiale, un risultato dimostrato

recentemente anche da Esumi *et al.* [45] per tensioattivi trimerici. Molto recentemente, Rosen *et al.* hanno trovato che la formazione di aggregati premicellari, soprattutto per tensioattivi gemini con spaziatori corti, fa sì che i valori di cmc, determinati sia da misure di tensione superficiale che di conducibilità, siano sostanzialmente diversi [43]. Questo risultato permette di ipotizzare che, a concentrazioni ben al di sotto della cmc, questi tensioattivi possano formare piccoli aggregati premicellari non attivi a livello di superficie. Questi sistemi (es **6c**) hanno la tendenza a formare coppie ioniche con i loro controioni a basse concentrazioni. Queste strutture possono formare, in principio, piccoli aggregati premicellari con un basso numero di aggregazione. E' stato anche evidenziato l'effetto della formazione di coppie ioniche sulla tensione superficiale in regioni molto diluite come nella regione premicellare [25]. Sia la formazione di coppie ioniche che di aggregati premicellari possono influenzare l'assorbimento, che si manifesta in un andamento peculiare del grafico  $\gamma$  vs  $\log C$ . Nel caso della formazione di coppie ioniche, si osserva la formazione di un plateau a circa 60-65 mN/m [25]. Si è notato che la cmc ha un valore di concentrazione molto basso e si ha la formazione del plateau di tensione superficiale a un valore all'incirca di 30mN/m, che è tipico dei tensioattivi fluorurati. La formazione degli aggregati premicellari potrebbe prevenire un ulteriore adsorbimento, e la tensione superficiale potrebbe non essere ulteriormente ridotta. Quando gli aggregati premicellari portano alla formazione delle micelle, la tecnica conduttimetrica è in grado di rilevarne la formazione.

Si può sottolineare che la tensione superficiale tende a livellarsi raggiunta la cmc, assumendo un valore costante non appena l'aggregazione premicellare ha avuto inizio (vedi Fig 2b e c per il composto **4b**) e prima che i preaggregati raggiungano la loro massima concentrazione (al massimo della conducibilità molare, vedi Figura 2c) e inizino a trasformarsi in micelle regolari. Come esempio, il composto **4b** mostra due conducibilità peculiari, rispettivamente a 0.149 mM e 0.9 mM, e la cmc tensidica risulta essere di 0.16 mM. Questo andamento è stato osservato per tutti i gemini in studio.

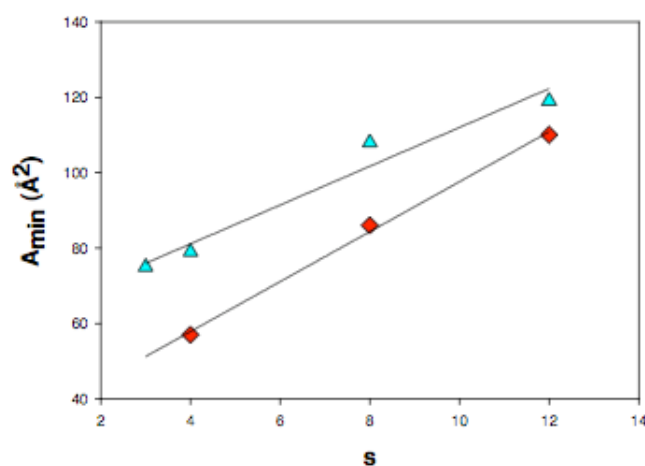
Ricordiamo che i tensioattivi fluorurati danno origine a micelle con un basso numero di aggregazione: questo potrebbe spiegare perché il rapporto (b)/(a) in Tabella 1 è intorno a 10, ovvero un ordine di grandezza inferiore rispetto a quello riportato in letteratura [37].

Per i tensioattivi monomericici l'andamento generale prevede che i valori di  $\beta$  diminuiscano con l'aumentare di  $A_{\min}$ , data la riduzione di densità di carica. L'aumento osservato di  $\beta$  e di  $A_{\min}$  all'aumentare della lunghezza dello spaziatore suggerisce la formazione di aggregati non globulari con basso numero di aggregazione [37].

La capacità di ridurre la tensione superficiale è mostrata dal valore di  $\gamma_{\lim}$  e di  $pC_{20}$ . L'efficacia nella riduzione della tensione superficiale aumenta quando lo *spacer* si accorcia (es. **3c-6c**): questo potrebbe giustificare il migliore impaccamento delle molecole alla superficie aria-acqua. Infatti, la presenza di porzioni oleofobiche e fluorofobiche nella stessa molecola, che sono incompatibili l'una con l'altra, potrebbe impedire allo *spacer* polimetilenico di avvolgersi attorno alle catene fluorurate, lasciandole ampiamente esposte all'acqua. Quando lo *spacer* viene accorciato, l'impaccamento è aumentato a causa della diminuzione del contatto non favorevole acqua-metilene. Questa interpretazione è supportata dall'andamento

di  $A_{\min}$  in funzione della lunghezza dello spaziatore,  $s$ , molto differente da quello mostrato nel caso , per esempio, dei tensioattivi alcandil- $\alpha,\omega$ -bis(dodecildimetil)ammonio bromuro [41,46], per i quali il valore di  $A_{\min}$  aumenta all'aumentare di  $s$  fino ad un valore di 6-8, e oltre. Infatti, è stato suggerito che questa dipendenza da  $s$  sia dovuta alla localizzazione dello *spacer* all'interfaccia aria-acqua. Quando lo *spacer* è corto, giace più o meno prono all'interfaccia, ma quando è più lungo, cambia la sua conformazione e l'aumento della sua idrofobicità causa l'avvolgimento dello *spacer* in aria. In questo modo, le teste polari possono avvicinarsi riducendo così il valore di  $A_{\min}$ . Questo non succede per i composti in studio: l'aumento lineare di  $A_{\min}$  in funzione di  $s$  (Figura 6), con pendenza simile sia per i metansolfonati che per i cloruri, suggerisce che non ci sono variazioni nella conformazione delle molecole all'interfaccia, dal momento che lo *spacer* idrogenato non può avvolgersi attorno alle catene fluorurate.  $A_{\min}$  aumenta di circa  $6 \text{ \AA}^2$  per  $-\text{CH}_2-$  aggiunto allo *spacer*.

Vale la pena notare l'effetto considerevole del controione sull'impaccamento all'interfaccia: il controione metansolfonato dà valori di  $A_{\min}$  sempre più bassi di quelli del cloruro (Figura 6). Una spiegazione possibile è in relazione alla sua struttura elettronica che rende possibile un'efficiente riduzione della densità di carica sulla superficie delle micelle. Questa osservazione è in accordo con i valori generalmente più bassi di  $\beta$  per i metansolfonati rispetto ai cloruri. Infatti, i tensioattivi aventi gli *spacer* più corti mostrano, con il metansolfonato come controione, un valore molto basso di  $\beta$ , probabilmente dovuto alla distribuzione di carica non uniforme sulla superficie dell'aggregato, originata dal fatto che lo *spacer* molto corto [47] obbliga i due gruppi ionici della molecola a stare vicini l'uno all'altro più di quanto non lo siano i gruppi carichi di molecole adiacenti: questo fa sì che l'ingombrante controione si disponga a ponte tra due molecole adiacenti.



**Figura 6.**  $A_{\min}$ , l'area minima per molecola all'interfaccia, in funzione della lunghezza dello *spacer*  $l$ , per i cloruri **3c-6c** ( $\blacktriangle$ ), e i metansolfonati **4b-6b** ( $\bullet$ ).

Il valore di  $pC_{20}$  dipende dalla lunghezza dello *spacer* (**3c-6c**) e presenta un valore minimo con il gruppo tetrametilenico (**4c**). L'aumento della lunghezza dello *spacer* e dell'idrofobicità, comunque, aumentano il valore di  $C_{20}$ , dimostrando che la più elevata idrofobicità dell'intera molecola avrebbe come risultato l'aumento della tendenza ad adsorbire alla superficie aria-acqua. Il parametro  $cmc/C_{20}$  dà alcune indicazioni sulla tendenza ad adsorbire o a micellizzare. In particolare, l'aumento della lunghezza dello *spacer* causa un aumento del rapporto  $cmc/C_{20}$ , cioè il composto diventa più incline ad adsorbire alla superficie che non a formare micelle. Questa abilità è all'incirca dalle due alle quattro volte più elevata di quella del corrispondente monomero, per il controione cloruro (confronto **3c-6c** vs **7c**).

## Conclusioni

Una serie di tensioattivi gemini dipiridinici fluorurati è stata preparata per quaternarizzazioni di  $\alpha,\omega$ -(2-piridil)alcani. La reazione è stata eseguita usando l'alchil trifluorometansolfonato come agente quaternarizzante, ottenendo rese molto buone. I tensioattivi sono stati caratterizzati da misure di conducibilità e di tensione superficiale che evidenziano la tendenza di queste molecole a dare uno strato adsorbito più compatto con il controione metansolfonato, piuttosto che con il cloruro. I valori di  $A_{\min}$ , ottenuti da misure di tensione superficiali attraverso l'applicazione dell'equazione di Gibbs, mostrano che queste molecole non cambiano conformazione all'interfaccia aria/acqua in funzione della lunghezza dello *spacer*, come i tensioattivi alcandil- $\alpha,\omega$ -bis(dodecildimetil)ammonio bromuro, data la non-idealità della miscela tra porzioni fluorurate e idrogenate. Inoltre si pensa che avvenga la formazione di aggregati non globulari con un numero di aggregazione che diminuisce all'aumentare della lunghezza dello *spacer*. La tensione superficiale ha raggiunto alla cmc un valore di 27 mN/m, mostrando buone proprietà di superficie. Le cmc diminuiscono con la lunghezza dello *spacer*, ma una minore dipendenza è stata trovata rispetto ai corrispondenti tensioattivi gemini alchil piridinici. Questo risultato è stato interpretato come un'evidenza della difficoltà che gli *spacer* alchilici lunghi hanno ad avvolgersi intorno alle catene fluorurate. Un risultato peculiare è la differenza tra le cmc ricavate da misure di tensione superficiale rispetto a quelle ricavate con misure di conducibilità. Questa differenza potrebbe essere causata dalla formazione di aggregati premicellari. Questa famiglia di composti è attualmente sotto studio per testarne la capacità trasfettiva e per meglio spiegarne il processo di aggregazione.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Riess, J. G.; Krafft, M. P. Fluorinated materials for in vivo oxygen transport (blood substitutes), diagnosis and drug delivery. *Biomaterials* 1998, 19, 1529-1539.
- [2] Fluorinated Surfactants and Repellents; Marcel Dekker: New York, 2003; Vol. 97.
- [3] Faroux-Corlay, B.; Clary, L.; Gadras, C.; Hammache, D.; Greiner, J.; Santaella, C.; Aubertin, A. M.; Vierling, P.; Fantini, J. Synthesis of single- and double-chain fluorocarbon and hydrocarbon galactosyl amphiphiles and their anti-HIV-1 activity. *Carbohydr. Res.* 2000, 327, 223-260.
- [4] Vierling, P.; Santaella, C.; Greiner, J. Highly fluorinated amphiphiles as drug and gene carrier and delivery systems. *J. Fluorine Chem.* 2001, 107, 337-354.
- [5] Fielden, M. L.; Perrin, C.; Kremer, A.; Bergsma, M.; Stuart, M. C.; Camilleri, P.; Engberts, J. B. F. N. Sugar-based tertiary amino gemini surfactants with a vesicle-to-micelle transition in the endosomal pH range mediate efficient transfection in vitro. *Eur. J. Biochem.* 2001, 268, 1269-1279.
- [6] Jennings, K. H.; Marshall, I. C. B.; Wilkinson, M. J.; Kremer, A.; Kirby, A. J.; Camilleri, P. Aggregation properties of a novel class of cationic gemini surfactants correlate with their efficiency as gene transfection agents. *Langmuir* 2002, 18 (6), 2426-2429.
- [7] McGregor, C.; Perrin, C.; Monck, M.; Camilleri, P.; Kirby, A. J. Rational Approaches to the Design of Cationic Gemini Surfactants for Gene Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 6215-6220.
- [8] Meekel, A. A.; Wagenaar, A.; Kroeze, J. E.; Haadsma, P.; Bosgraaf, B.; Stuart, M. C.; Brisson, A.; Ruiters, M. H.; Hoekstra, D.; Engberts, J. B. F. N. Synthesis of pyridinium amphiphiles used for transfection and some characteristics of amphiphile/DNA complex formation. *Eur. J. Org. Chem.* 2000, 665-673.
- [9] Zana, R. Gemini (dimeric) surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 1996, 1, 566-571.
- [10] Zana, R. Micellization of amphiphiles: selected aspects. *Colloids Surf. A: Physicochemical and Engineering Aspects* 1997, 123-124, 27-35.
- [11] Zana, R. Dimeric and oligomeric surfactants. Behavior at interfaces and in aqueous solution: a review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2002, 97, 205-253.
- [12] Menger, F. M.; Keiper, J. S. Gemini Surfactants. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000, 39, 1906-1920.
- [13] In, M. Gemini Surfactants and Surfactant Oligomers. In *Reactions and Synthesis in Surfactant Systems*, Texter J., Ed.; Marcel Dekker: New York, 2001; pp 59-110.
- [14] Quagliotto, P.; Viscardi, G.; Barolo, C.; Barni, E.; Bellinvia, S.; Fiscaro, E.; Compari, C. Gemini Pyridinium Surfactants: Synthesis and Conductometric Study of a Novel Class of Amphiphiles. *J. Org. Chem.* 2003, 68 (20), 7651-7660.
- [15] Ghosh, K. K.; Kolay, S.; Bal, S.; Stanami, M. L.; Quagliotto, P.; Dafonte, P. R. Effect of cationic gemini surfactants on the hydrolysis of carboxylate and phosphate esters using hydroxamate ions. *Colloid Polym. Sci.* 2007, in press (<http://dx.doi.org/10.1007/s00396-007-1769-7>).

- [16] Huc, I. O. R. Gemini surfactants: studying micellisation by H-1 and F-19 NMR spectroscopy. *Chem. Comm.* 1999, 2025-2026.
- [17] Dieng, S. Y.; Szönyi, S.; Jouani, M. A.; Trabelsi, H.; Cambon, A. Synthèse de nouveaux tensioactifs perfluoroalkylés bicaténaires anioniques, non ioniques et dianioniques dérivés des 2-chloro-[2-(F-alkyl)éthylthio]acétates d'éthyle. *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1997, 134, 235-241.
- [18] Gaysinski, M.; Joncheray, L.; Guittard, F.; Cambon, A.; Chang, P. *J. Fluor. Chem.* 1995, 74, 131.
- [19] Matsuoka, K.; Moroi, Y. Micellization of fluorinated amphiphiles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2003, 8, 227-235.
- [20] Asakawa, T.; Okada, T.; Hayasaka, T.; Kuwamoto, K.; Ohta, A.; Miyagishi, S. The unusual micelle micropolarity of partially fluorinated gemini surfactants sensed by pyrene fluorescence. *Langmuir* 2006, 22, 6053-6055.
- [21] Marvel, C. S.; Sekera, V. C. n-dodecyl (lauryl) p-toluenesulfonate. Horning, E. C. [Coll. Vol. III], 366-369. 1955. New York, John Wiley & Sons. Organic Synthesis Ref Type: Serial (Book, Monograph)
- [22] Fiscaro, E.; Pelizzetti, E.; Viscardi, G.; Quagliotto, P.; Trossarelli, L. Thermodynamic properties of aqueous micellar solutions of N-(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)pyridinium chloride and N-(1H,1H,2H,2H-perfluorodecyl)pyridinium chloride. *Colloids Surf. A: Physicochemical and Engineering Aspects* 1994, 84, 59-70.
- [23] Asakawa, T.; Hisamatsu, H.; Miyagishi, S. Micellar pseudophase separation regions of 1H,1H,2H,2H-perfluoroalkylpyridinium chloride and hydrocarbon surfactants by group contribution method. *Langmuir* 1995, 11, 478-482.
- [24] Asakawa, T.; Ishikawa, K.; Miyagishi, S. Aqueous Solution Properties of Pyridinium-Type Perfluorinated Surfactants and Simulation of Mixture CMC. *J. Colloid Interface Sci.* 2001, 240, 363-367.
- [25] Viscardi, G.; Quagliotto, P.; Barolo, C.; Savarino, P.; Barni, E.; Fiscaro, E. Synthesis and surface and antimicrobial properties of novel cationic surfactants. *J. Org. Chem.* 2000, 65 (24), 8197-8203.
- [26] Zana, R. Alkanediyl- $\alpha,\omega$ -bis(dimethylalkylammonium bromide) Surfactants: II. Krafft Temperature and Melting Temperature. *J. Colloid Interface Sci.* 2002, 252 (259), 261.
- [27] Kamenka, N.; Burgaud, I.; Treiner, C.; Zana, R. Interaction of copper(II) dodecyl sulfate with poly(ethylene oxide) and poly(vinylpyrrolidone): self-diffusion, fluorescence probing, and conductivity study. *Langmuir* 1994, 10 (10), 3455-3460.
- [28] Zuidema, H. H.; Waters, G. W. Ring method for the determination of interfacial tension. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 1941, 13, 312-313.
- [29] Aguiar, J.; Molina-Bolivar, J. A.; Peula-Garcia, J. M.; Carnero Ruiz C. Thermodynamics and Micellar Properties of Tetradecyltrimethylammonium Bromide in Formamide-Water Mixtures. *J. Colloid Interface Sci.* 2002, 255, 382-390.
- [30] Carpena, P.; Aguiar, J.; Bernaola-Galván, P.; Carnero Ruiz, C. Problems Associated with the Treatment of Conductivity-Concentration Data in Surfactant Solutions: Simulations and Experiments. *Langmuir* 2002, 18, 6054-6058.

- [31] Fiscaro, E.; Ghiozzi, A.; Pelizzetti, E.; Viscardi, G.; Quagliotto, P. Effect of the counterion on thermodynamic properties of aqueous micellar solutions of 1-(3,3,4,4,5,5,6,6,6-nonafluorohexyl)pyridinium halides I. Apparent and partial molar enthalpies and volumes at 298 K. *J. Colloid Interface Sci.* 1996, 182 (2), 549-557.
- [32] Fiscaro, E.; Ghiozzi, A.; Pelizzetti, E.; Viscardi, G.; Quagliotto, P. Effect of the counterion on thermodynamic properties of aqueous micellar solutions of 1-(3,3,4,4,5,5,6,6,6-nonafluorohexyl)pyridinium halides II. Apparent and partial molar enthalpies and osmotic coefficients at 313 K. *J. Colloid Interface Sci.* 1996, 184 (1), 147-154.
- [33] Rosen, M. J.; Dahanayake, M.; Cohen, A. W. Relationship of structure to properties in surfactants. 11. Surface and thermodynamic properties of N-dodecylpyridinium bromide and chloride. *Colloids Surf.* 1982, 5, 159-172.
- [34] Rosen, M. J. *Surfactants and Interfacial Phenomena*; second ed.; John Wiley & Sons: New York, 1989.
- [35] Fuoss, R. M.; Chu, V. F. Bolaform electrolytes. II. Conductance of 1,3-, 1,4-, 1,5-di-(trimethylammonium)-polymethylene halides in water and in methanol. *J. Am. Chem. Soc.* 1951, 73 (3), 949-952.
- [36] Sugihara, G.; Nakamura, A. A.; Nakashima, T.-H.; Araki, Y.; Okano, T.; Fujiwara, M. *Colloid Polym. Sci.* 1997, 275, 790-796.
- [37] Pinazo, A.; Wen, X.; Perez, L.; Infante, M. R.; Franses, E. I. Aggregation Behavior in Water of Monomeric and Gemini Cationic Surfactants Derived from Arginine. *Langmuir* 1999, 15, 3134-3142.
- [38] Bijma, K.; Engberts, J. B. F. N. Effect of the counterions on properties of micelles formed by alkylpyridinium surfactants. 1. Conductometry and <sup>1</sup>H-NMR chemical shifts. *Langmuir* 1997, 13, 4843-4849.
- [39] Zana, R. Alkanediyl-a,w-bis(dimethylalkylammonium bromide) Surfactants: 10. Behavior in Aqueous Solution at Concentrations below the Critical Micellization Concentration: An Electrical Conductivity Study. *J. Colloid Interface Sci.* 2002, 246, 182-190.
- [40] Quagliotto, P.; Viscardi, G.; Barolo, C.; D'Angelo, D.; Barni, E.; Compari, C.; Duce, E.; Fiscaro, E. Synthesis and Properties of New gluco-cationic surfactants: model structures for marking cationic surfactants with carbohydrates. *J. Org. Chem.* 2005, 70, 9857-9866.
- [41] Alami, E.; Beinert, G.; Marie, P.; Zana, R. Alkanediyl-a,w-(dimethylalkylammonium bromide) surfactants. 3. Behaviour at the air-water interface. *Langmuir* 1993, 9, 1465-1467.
- [42] Pérez, L.; Pinazo, A.; Rosen, M. J.; Infante, M. R. Surface activity properties at equilibrium of novel gemini cationic amphiphilic compounds from arginine, Bis(Arg). *Langmuir* 1998, 14, 2307-2315.
- [43] Tsubone, K.; Arakawa, Y.; Rosen, M. J. Structural Effects on Surface and Micellar Properties of Alkanediyl-a,w-bis(sodium N-acyl-b-alaninate) Gemini Surfactants. *J. Colloid Interface Sci.* 2003, 262, 516-524.

- [44] Li, Z. X.; Dong, C. C.; Thomas, R. K. Neutron reflectivity studies of the surface excess of gemini surfactants at the air water interface. *Langmuir* 1999, 15, 4392-4396.
- [45] Yoshimura, T.; Yoshida, H.; Ohno, A.; Esumi, K. Physicochemical Properties of Quaternary Ammonium Bromide-type Trimeric Surfactants. *J. Colloid Interface Sci.* 2003, 267, 167-172.
- [46] Pisárcik, M.; Rosen, M. J.; Polakovicova, M.; Devinsky, F.; Lacko, I. Area per surfactant molecule values of gemini surfactants at the liquid-hydrophobic solid interface. *J. Colloid Interface Sci.* 2005, 289, 560-565.
- [47] Camesano, T. A.; Nagarajan, R. Micelle formation and CMC of gemini surfactants: a thermodynamic model. *Colloids Surf. A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2000, 167, 165-177

## PROPRIETA' CHIMICO-FISICHE E BIOLOGICHE DI NUOVI TENSIOATTIVI GLUCO-CATIONICI

Negli ultimi anni, il nostro gruppo di ricerca ha caratterizzato attentamente da un punto di vista termodinamico le soluzioni acquose di alcune serie omologhe di tensioattivi cationici, in particolare di tensioattivi N-alchilpiridinio e N-alchilnicotinamide, sia idrogenati [1-4] che parzialmente fluorurati [5-7], in cui la coda idrofobica è legata all'azoto portante la carica positiva. Sono state determinate le proprietà tensidiche e termodinamiche in funzione della concentrazione delle soluzioni acquose di molti dei membri delle serie menzionate sopra.

L'interesse scientifico ed applicativo verso i tensioattivi cationici è aumentato, in parte per la possibilità di utilizzare gli anfifili cationici come vettori in *gene delivery* [8-12].

Le strutture contenenti una parte zuccherina si trovano frequentemente compresi nella famiglia dei cosiddetti biotensioattivi, cioè i tensioattivi naturali di origine microbica. Essi mostrano proprietà uniche, come blande condizioni di produzione, bassa tossicità, elevata biodegradabilità e compatibilità ambientale [13].

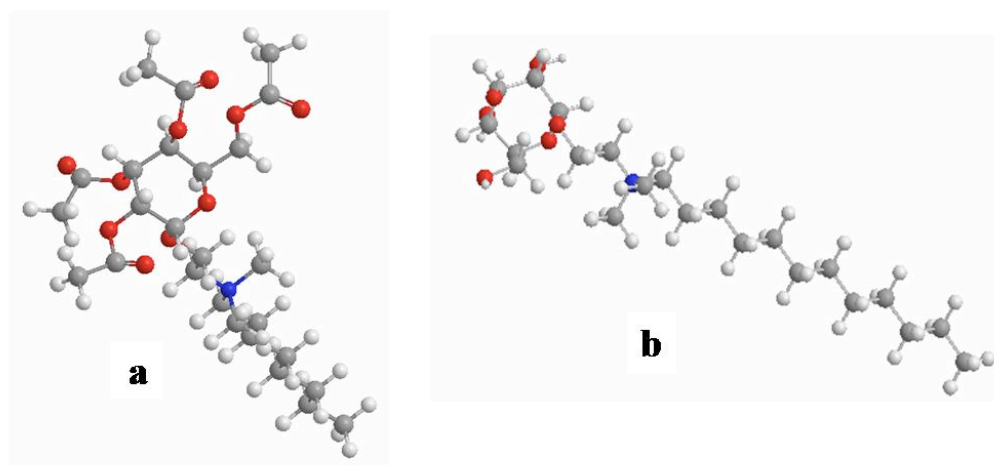
La presenza di una porzione glucosidica nel tensioattivo cationico sembra deprimere sostanzialmente l'attività batteriostatica, permettendo di dire che queste strutture potrebbero essere più biocompatibili. Questo è un prerequisito necessario a tutte le strutture per essere impiegate in applicazioni biomediche, specialmente se devono essere usate in quantità considerevoli come *carrier* di farmaci o di DNA. In questo caso, una struttura appartenente alla serie di tensioattivi cationici gemini aventi nella struttura un lattosio ha mostrato una buona attività contro il virus HIV in studi in vitro [14]. Questo fatto è stato attribuito alla somiglianza del loro gruppo polare alla testa polare del GalCer, un glicolipide espresso sulla superficie delle cellule infettate dall'HIV e riconosciute dalla proteina gp120, che è tipica del virus dell'AIDS [15].

Fra i biotensioattivi, quelli di tipo glicolipidico sono stati i più ampiamente studiati e sono i più promettenti per l'utilizzo e la produzione industriale, con grandi potenziali applicazioni nel campo delle scienze biomediche [16].

Inoh *et al.* [17] hanno scoperto che MEL-A aumenta drammaticamente l'efficienza di trasfezione genica mediata da liposomi cationici con un derivato cationico del colesterolo. Studi come questo potrebbero portare allo sviluppo di procedure di terapia genica e di trasfezione genica mediate da un vettore non-virale sicuro ed efficiente. Inoltre, il legame di una opportuna struttura saccaridica o oligosaccaridica a un tensioattivo cationico può essere usato per marcare selettivamente un liposoma per aumentare sia la possibilità di essere riconosciuto da un particolare recettore, sia la capacità di trasfezione nei confronti di un ben definito tipo di cellule bersaglio [18-21].

I tensioattivi glucosidici gemini, che mostrano diagrammi di fase pH-dipendenti, sembrano essere candidati promettenti come veicoli in "*gene- e drug-delivery*" per applicazioni biomediche [22]. In vista di sviluppare strutture cationiche più complesse, abbiamo progettato la sintesi di una serie modello di composti glucocationici a idrofobicità modulabile, sia grazie alla catena idrofobica, sia alla presenza o alla rimozione

della protezione acetilica sui gruppi ossidrilici glucosidici [23] (Figura 1). In letteratura sono riportati veramente pochi composti con attività di superficie aventi nella stessa molecola una porzione cationica ed una glucosidica connesse da legami covalenti [24-27]. Lattes et al. [14,28,29] hanno sintetizzato e studiato composti glucocationici con molti centri chirali e che mostrano proprietà inusuali e talvolta un'alta attività biologica. Tuttavia, le strutture preparate differiscono da quelle da noi sintetizzate dal momento che appartengono ad una più generale classe di tensioattivi cationici, ottenuti dal mescolamento di due composti, uno portante una porzione acida e l'altro una basica, in un rapporto 1:1.



**Figura 1.** Esempio di composti in studio: strutture del composto dodecilico a) acetilato; b) disacetilato (controione bromuro non mostrato).

## Sintesi

### **2-Bromoetil-2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranoside (1)**

#### **Metodo A**

Il composto **1** è preparato in accordo coi metodi riportati in letteratura [33]. Una soluzione di penta-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosio (63.5 g, 0.16 mol) e 2-bromo etanolo (13.9 ml, 0.19 mol) in diclorometano anidro (250 ml) viene introdotta in un pallone tondo a tre colli, posto al buio ed equipaggiato di un imbuto sgocciolatore. La soluzione viene raffreddata a 0°C, dopo aver aggiunto sgocciolando per un periodo di oltre 80 minuti il BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (100 ml, 0.81 mol). La soluzione viene quindi agitata a 0°C per tre ore, e poi lasciata per venti ore a temperatura ambiente. Il completamento della reazione è monitorato tramite TLC (acetato di etile-etero di petrolio 30:70; R<sub>f</sub>=0.3). Alla fine la miscela di reazione è diluita con altro diclorometano (50 ml), quindi si aggiunge acqua fredda (250 ml) e si agita con vigore. La fase organica viene separata e lavata ripetutamente con acqua, quindi saturata con bicarbonato di sodio, disidratata con solfato di sodio e concentrata al rotavapor. Il residuo ottenuto è purificato attraverso flash cromatografia su gel di silice usando come solvente acetato di etile-etero di petrolio (30:70). Si ottengono cristalli bianchi. La resa del prodotto è di 39.97 g (54%).

#### **Metodo B**

Il composto **a** (0.5 g, 1.02 mM) è sciolto a 25°C in 25 ml di diclorometano anidro in un pallone a tre colli in atmosfera di argon. Il 2-bromoetanolo (0.14 g, 0.079 ml, 1.12 mM) viene aggiunto goccia a goccia sotto agitazione seguito poi da etere di trifloruro di boro (0.144 g, 0.129 ml, 1.02 mM). La reazione è lasciata andare a temperatura ambiente ed il suo andamento è monitorato tramite TLC (gel di silice, etere di petrolio-acetato di etile 70:30), fino a che i reattivi iniziali sono scomparsi. La reazione è spenta dall'aggiunta di una soluzione acquosa di carbonato di sodio al 10%. La fase organica è estratta per tre volte con una soluzione acquosa di carbonato di sodio al 10% fino alla neutralità, lavata con acqua, trattata con solfato di sodio e quindi filtrata. Il solvente è rimosso a pressione ridotta, dando un olio denso giallo-marrone. Si ottiene il prodotto puro (0.33 g, 71% resa), che cristallizza immediatamente dalla frazione eluita usando la flash cromatografia su colonna di gel di silice e come eluente etere di petrolio-acetato di etile 70:30.

M.p. 119-120°C; R<sub>f</sub> = 0.30 su silice (etero di petrolio/acetato di etile 70:30); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -12,5 (c = 0,78 CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 1.99, 2.01, 2.05, 2.07 (4 s, 12H, 4 CH<sub>3</sub>COO); 3.44 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Br); 3.69 (ddd, 1H, H<sub>5</sub>); 3.80 (ddd, 1H, OCH<sub>2a</sub>CH<sub>2</sub>Br); 4.11 (dd, 1H, H<sub>6a</sub>); 4.15 (dd, 1H, OCH<sub>2b</sub>CH<sub>2</sub>Br); 4.24 (dd, 1H, H<sub>6b</sub>); 4.55 (d, 1H, H<sub>1</sub>, J<sub>1,2</sub> = 7.69 Hz); 5.00 (dd, 1H, H<sub>2</sub>); 5.07 (t, 1H, H<sub>4</sub>); 5.20 (t, 1H, H<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 170.5 (CH<sub>3</sub>COO); 170.1 (CH<sub>3</sub>COO); 169.3 (2 CH<sub>3</sub>COO); 100.9 (C<sub>1</sub>); 72.5 (C<sub>3</sub>); 71.8 (C<sub>5</sub>); 70.9 (C<sub>2</sub>); 69.7 (OCH<sub>2</sub>), 68.2 (C<sub>4</sub>); 61.7 (C<sub>6</sub>); 29.8 (CH<sub>2</sub>Br); 20.6 (2 CH<sub>3</sub>COO); 20.5 (2 CH<sub>3</sub>COO); FT-IR (KBr): cm<sup>-1</sup> 2962, 2884, 1752, 1432, 1370, 1224, 1042, 904, 834, 510; MS-ESI: (m/z) Atteso: 455, sperimentale 477, 479 (M + Na<sup>+</sup>). Anal. Calc. da C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>BrO<sub>10</sub>: C, 42.21; H, 5.09. Trovato: C, 42.27; H, 5.03.

## **2-Bromoetil-2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranoside (2)**

### **Metodo A**

Nella prima fase, la miscela anomerica di 2-bromoetil-2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranoside viene preparata seguendo i metodi riportati in letteratura [43]. La miscela anomerica (0.68 g,  $2.2 \cdot 10^{-3}$  mol) è disciolta in piridina (4ml) e sgocciolata in un pallone a tre colli contenente una soluzione di anidride acetica (3.15 ml,  $3.33 \cdot 10^{-2}$  mol) in piridina (8ml) precedentemente raffreddata a  $0^{\circ}\text{C}$ , sotto agitazione. Dopo 80 minuti la miscela è lasciata ritornare a temperatura ambiente e fatta reagire per quattro ore, quindi spenta con ghiaccio (50 ml). Il prodotto viene separato come olio, al quale vengono aggiunti 15 ml di HCl conc. La miscela è estratta con diclorometano e la fase organica lavata con una soluzione di  $\text{NaHCO}_3$  fino alla neutralizzazione. L'evaporazione del solvente sotto vuoto, dopo aver essiccato con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , porta alla formazione di un olio viscoso che, dopo flash cromatografia su colonna di gel di silice (etere di petrolio-acetato di etile 70:30), fornisce un olio giallo pallido con una resa del 10% (basata su glucosio iniziale).

### **Metodo B: anomerizzazione del composto 1**

Il composto **1** (3 g, 6.59 mmol) viene introdotto in un pallone a tre colli e disciolto in 20 ml di diclorometano, il tutto sotto agitazione e in atmosfera di argon a temperatura ambiente. Il cloruro ferrico anidro (5.3 g, 32.7 mmol) viene aggiunto velocemente alla reazione. La soluzione nera è lasciata reagire tutta la notte e in seguito spenta con acqua (20 ml). La fase organica è estratta tre volte con acqua, essiccata con cloruro di calcio ed evaporata, dando un olio marrone scuro. La flash cromatografia su colonna di gel di silice con etere di petrolio-acetato di etile 30:70 dà un olio incolore che solidifica stando a riposo. Si ottiene una pasta solida bianca.

Prodotto 0.91 g (30%);  $R_f = 0.21$  su silice (etere di petrolio/acetato di etile 70:30);  $[\alpha]_{578\text{nm}}^{25^{\circ}\text{C}} = +112.52$  ( $c = 0.558$ ,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 1.99, 2.00, 2.06, 2.07 (4 s, 12H, 4  $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 3.49 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{Br}$ ); 3.82, 3.97 (2 quintupletti simmetrici, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$ ), 4.08-4.11 (m, 2H,  $\text{H}_5+\text{H}_{6a}$ ); 4.20-4.24 (m, 1H,  $\text{H}_{6b}$ ); 4.83 (dd, 1H,  $\text{H}_2$ ); 5.04 (t, 1H,  $\text{H}_4$ ); 5.13 (d, 1H,  $\text{H}_1$ ,  $J_{1,2} = 3.8$  Hz); 5.47 (t, 1H,  $\text{H}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 170.6 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 170.2 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 170.0 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 169.6 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 96.0 ( $\text{C}_1$ ); 70.8 ( $\text{C}_2$ ); 69.9 ( $\text{C}_3$ ); 68.8 ( $\text{C}_4$ ); 68.5 ( $\text{OCH}_2$ ), 67.7 ( $\text{C}_5$ ); 61.9 ( $\text{C}_6$ ); 29.8 ( $\text{CH}_2\text{Br}$ ); 20.7 (2  $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 20.6 (2  $\text{CH}_3\text{COO}$ ); FT-IR (KBr):  $\text{cm}^{-1}$  2958, 1750, 1434, 1372, 1244, 1038, 904, 834, 756, 694, 602, 554, 524; MS-ESI: (m/z) Atteso: 455, sperimentale 477, 479 ( $\text{M} + \text{Na}^+$ ). Anal. Cal. da  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{BrO}_{10}$ : C, 42.21; H 5.09. Trovato: C, 42.25; H, 5.06.

### **N-[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)etil]-N,N-dimetil-N-octilammonio bromuro (3, $\text{C}_8\text{AGCB}$ )**

Il composto **1** (10.49 g, 0.023 mol), sciolto in etanolo anidro, viene introdotto in un pallone a tre colli, lavorando in atmosfera di argon. La miscela è scaldata a refluxo, quindi si aggiunge goccia a goccia una soluzione etanolica di N,N-dimetilottilammina (3.21 g, 0.0204 mol). Dopo ventiquattro ore, si aggiunge un 10% in eccesso del composto **1** e la reazione prosegue per altre ventiquattro ore. Il solvente viene rimosso e si ottiene un olio viscoso, che è purificato mediante flash cromatografia, utilizzando una colonna di allumina basica e come eluente, prima acetato di etile-metanolo 80:20 e poi acetato di etile-metanolo 50:50. Il risultato

è uno sciroppo viscoso giallo pallido, che viene successivamente purificato dalle tracce di ammina attraverso una sospensione di etere di petrolio e piccole quantità di cloroformio, sotto agitazione. Alla fine si ottiene una polvere bianca. La resa del prodotto è del 70%.

M.p. 95-100°C;  $R_f = 0.05$  su silice (MAC Metanolo: Acido Acetico: Cloroformio 20:10:70); 0.17 su alumina basica (acetato di etile/metanolo 70:30);  $[\alpha]^{25^\circ\text{C}}_{578\text{nm}} = -12.12$  ( $c = 0.775$ , MeOH).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 0.86 (t, 3H  $\text{CH}_3$ ); 1.30 (m, 10H, 5  $\text{CH}_2$ ); 1.70 (m, 2H,  $\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ); 1.95, 2.01, 2.04, 2.07 (4 s, 12H, 4  $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 3.32(s, 3H,  $\text{N}^+\text{CH}_3$ ); 3.35(s, 3H,  $\text{N}^+\text{CH}_3$ ); 3.48 (t, 2H,  $\text{N}^+\text{CH}_2$ ); 3.80 (m, 1H,  $\text{H}_5$ ); 3.94 (ddd, 1H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{aN}^+$ ), 4.08-4.22 (m, 4H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{bN}^+$ ,  $\text{OCH}_2\text{aCH}_2\text{N}^+$ , 2 $\text{H}_6$ ); 4.33 (dd, 1H,  $\text{OCH}_2\text{bCH}_2\text{N}^+$ ); 4.66 (d, 1H,  $\text{H}_1$ ,  $J_{1,2} = 8.02$  Hz); 4.90 (dd, 1H,  $\text{H}_2$ ); 5.02 (t, 1H,  $\text{H}_4$ ); 5.08 (t, 1H,  $\text{H}_3$ );  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$ (ppm) 0.88 (t, 3H  $\text{CH}_3$ ); 1.29 (m, 10H, 5  $\text{CH}_2$ ); 1.66 (m, 2H,  $\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ ); 1.95, 2.00, 2.03, 2.04 (4 s, 12H, 4  $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 3.04 (s, 6H, 2  $\text{N}^+\text{CH}_3$ ); 3.30 (t, 2H,  $\text{N}^+\text{CH}_2$ ); 3.57 (t, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$ ), 4.03-4.22 (m, 5H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$ ,  $\text{H}_5$ , 2 $\text{H}_6$ ); 4.82 (dd, 1H,  $\text{H}_2$ ); 4.93-4.97 (m, 2H,  $\text{H}_1$ ,  $\text{H}_4$ ); 5.29 (t, 1H,  $\text{H}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 170.4 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 169.7 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 169.3 (2  $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 100.1 ( $\text{C}_1$ ); 72.2 ( $\text{C}_3$ ); 72.0 ( $\text{C}_5$ ); 70.8 ( $\text{C}_2$ ); 67.9 ( $\text{C}_4$ ); 66.0 ( $\text{N}^+\text{CH}_2$ ); 63.5 ( $\text{OCH}_2$ ), 62.9 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$ ); 61.3 ( $\text{C}_6$ ); 51.5 (2  $\text{N}^+\text{CH}_3$ ); 31.4, 29.0; 28.8; 26.0 (4  $\text{CH}_2$ ); 22.6 ( $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 22.4 ( $\text{CH}_2$ ); 20.7 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 20.6 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 20.4 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 20.3 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 13.9 ( $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) 170.1 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 169.6 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 169.3 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 169.2 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 98.9 ( $\text{C}_1$ ); 72.0 ( $\text{C}_3$ ); 70.8 ( $\text{C}_5$ ); 70.6 ( $\text{C}_2$ ); 68.1 ( $\text{C}_4$ ); 64.1 ( $\text{N}^+\text{CH}_2$ ); 62.6 ( $\text{OCH}_2$ ); 62.2 ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$ ); 61.6 ( $\text{C}_6$ ); 50.8 (  $\text{N}^+\text{CH}_3$ ); 50.7 (  $\text{N}^+\text{CH}_3$ ); 31.2, 25.8 (4  $\text{CH}_2$ ); 22.1 ( $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 21.8 ( $\text{CH}_2$ ); 20.6 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 20.5 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 20.5 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 20.3 ( $\text{CH}_3\text{COO}$ ); 14.0 ( $\text{CH}_3$ ); FT-IR (KBr):  $\text{cm}^{-1}$  2928, 2858, 1752, 1438, 1372, 1226, 1166, 1042, 910; MS-ESI: (m/z) Aspettato: 612, sperimentale 532, (M – Br). Anal. Calc. da  $\text{C}_{26}\text{H}_{46}\text{BrNO}_{10}$ : C, 50.98; H, 7.57; N, 2.29. Trovato: C, 50.94; H, 7.59; N, 2.32.

*N*-[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)etil]-*N*-*N*-dimetil-*N*-dodecilammonio bromuro

**(4, C<sub>12</sub>AGCB)**

Per la sintesi del composto **4** si usano le stesse procedure descritte per il composto **3**. Si ottiene così una polvere bianca. La resa del prodotto è del 60%.

M.p. 90-93°C;  $R_f = 0.05$  su silice(MAC 20:10:70); 0.22 su allumina basica (acetato di etile/metanolo 70:30);  $[\alpha]^{25^\circ\text{C}}_{578\text{nm}} = -11.68$  ( $c = 0.78$ , MeOH);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 0.87 (t, 3H CH<sub>3</sub>); 1.26 (m, 18H, 9 CH<sub>2</sub>); 1.65 (m, 2H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.95, 2.00, 2.03, 2.04 (4 s, 12H, 4 CH<sub>3</sub>COO); 3.04(s, 6H, 2 N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>); 3.30 (t, 2H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>); 3.57 (t, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 4.03-4.22 (m, 5H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>, H<sub>5</sub>, 2H<sub>6</sub>); 4.82 (dd, 1H, H<sub>2</sub>); 4.93-4.97 (m, 2H, H<sub>1</sub>, H<sub>4</sub>); 5.29 (t, 1H, H<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 170.1 (CH<sub>3</sub>COO); 169.6 (CH<sub>3</sub>COO); 169.3 (CH<sub>3</sub>COO); 169.2 (CH<sub>3</sub>COO); 99.0 (C<sub>1</sub>); 71.9 (C<sub>3</sub>); 70.8 (C<sub>5</sub>); 70.7 (C<sub>2</sub>); 68.1 (C<sub>4</sub>); 64.1 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>); 62.6 (OCH<sub>2</sub>), 62.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 61.6 (C<sub>6</sub>); 50.8 (N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>); 50.7 (N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>); 31.4-25.8 (8 CH<sub>2</sub>); 22.2 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 21.8 (CH<sub>2</sub>); 20.6 (CH<sub>3</sub>COO); 20.5 (2 CH<sub>3</sub>COO); 20.3 (CH<sub>3</sub>COO); 14.0 (CH<sub>3</sub>); FT-IR (KBr):  $\text{cm}^{-1}$  2926, 2856, 1751, 1464, 1372, 1224, 1042, 908; MS-ESI: (m/z) Atteso: 668, sperimentale 588, (M – Br). Anal. Calc. da C<sub>30</sub>H<sub>54</sub>NO<sub>10</sub>Br: C, 53.89; H, 8.14; N, 2.09. Trovato: C, 53.83; H, 8.19; N, 2.04.

*N*-[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)etil]-*N*,*N*-dimetil-*N*-esadecilammonio bromuro (5, C<sub>16</sub>AGCB)

Per la sintesi del composto **5** si usano le stesse procedure descritte per il composto **3**. Si ottiene così una polvere bianca. La resa del prodotto è del 58.6 %.

M.p. 53-55°C;  $R_f = 0.05$  su silice (MAC 20:10:70); 0.29 su allumina basica (acetato di etile/metanolo 70:30);  $[\alpha]^{25^\circ\text{C}}_{578\text{nm}} = -16.01$  ( $c = 0.82$ , MeOH);  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 0.87 (t, 3H CH<sub>3</sub>); 1.25 (m, 26H, 13 CH<sub>2</sub>); 1.66 (m, 2H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1.96, 2.01, 2.03, 2.04 (4 s, 12H, 4 CH<sub>3</sub>COO); 3.04 (s, 6H, N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>); 3.30 (t, 2H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>); 3.57 (t, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 4.03-4.22 (m, 5H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>, H<sub>5</sub>, 2H<sub>6</sub>); 4.83 (dd, 1H, H<sub>2</sub>); 4.93-4.97 (d, 1H, H<sub>1</sub>, H<sub>4</sub>); 5.30 (t, 1H, H<sub>3</sub>);  $^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  (ppm) 170.1 (CH<sub>3</sub>COO); 169.6 (CH<sub>3</sub>COO); 169.3 (CH<sub>3</sub>COO); 169.2 (CH<sub>3</sub>COO); 99.0 (C<sub>1</sub>); 71.9 (C<sub>3</sub>); 70.8 (C<sub>5</sub>); 70.7 (C<sub>2</sub>); 68.1 (C<sub>4</sub>); 64.1 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>); 62.6 (OCH<sub>2</sub>), 62.2 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 61.6 (C<sub>6</sub>); 50.8 (N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>); 50.7 (N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>); 31.4-25.8 (12 CH<sub>2</sub>); 22.2 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 21.8 (CH<sub>2</sub>); 20.6 (CH<sub>3</sub>COO); 20.5 (2 CH<sub>3</sub>COO); 20.5 (CH<sub>3</sub>COO); 20.3 (CH<sub>3</sub>COO); 14.0 (CH<sub>3</sub>); FT-IR (KBr):  $\text{cm}^{-1}$  2924, 2854, 1739, 1462, 1438, 1372, 1213, 1166, 1037, 910, 732, 700; MS-ESI: (m/z) Atteso: 724, sperimentale 644, (M – Br). Anal. Calc. da C<sub>34</sub>H<sub>62</sub>NO<sub>10</sub>Br: C, 56.34; H, 8.62; N, 1.93. Trovato: C, 56.36; H, 8.58; N, 1.99.

### ***N*-[2-( $\beta$ -*D*-glucopiranosil)etil]-*N,N*-dimetil-*N*-octilammonio bromuro (6, C<sub>8</sub>DGCB)**

Il composto **3** (5 g, 8.16 mmol) viene messo in un pallone a tre colli a fondo tondo e sciolto in metanolo anidro (100 ml). Viene introdotto metossido di sodio (6.91 meq.) e il tutto viene messo sotto agitazione a temperatura ambiente. Il completamento della reazione è monitorato attraverso TLC (MAC 20:10:70). Alla fine della reazione è aggiunto lo scambiatore ionico Amberlite IR-120 (in forma protonata 1.57 g, 6.91 meq) sotto vigorosa agitazione. La miscela viene filtrata ed il solvente evaporato sotto vuoto. Il risultato è uno sciroppo viscoso giallo pallido. La resa del composto è 7.19 g, (90%);  $R_f = 0.05$  su silice (MAC 20:10:70);  $[\alpha]^{25}_{578} = -18.5$  ( $c = 0.53$ , MeOH);  $^1\text{H NMR}$  (D<sub>2</sub>O; acetone come riferimento)  $\delta$  (ppm) 0.80 (t, 3H CH<sub>3</sub>); 1.26 (m, 10H, 5 CH<sub>2</sub>); 1.73 (m, 2H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 3.08 (s, 6H, 2 N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>); 3.20-3.48 (m, 6H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>); 3.58 (t, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 3.68 (dd, 1H, H<sub>6a</sub>); 3.86 (dd, 1H, H<sub>6b</sub>); 4.02- 4.06 (m, 1H, OCH<sub>2a</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 4.28-4.31 (m, 1H, OCH<sub>2b</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 4.44 (d, 1H, H<sub>1</sub>,  $J_{1,2} = 7.87$  Hz);  $^{13}\text{C NMR}$  (D<sub>2</sub>O; acetone come riferimento)  $\delta$  (ppm) 104.9 (C<sub>1</sub>); 78.7 (C<sub>5</sub>); 78.4 (C<sub>3</sub>); 75.7 (C<sub>2</sub>); 72.3 (C<sub>4</sub>); 68.2 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>); 65.9 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>), 65.7 (OCH<sub>2</sub>); 63.4 (C<sub>6</sub>); 54.1 (2 N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>); 33.7-24.6 (6 CH<sub>2</sub>); 16.1 (CH<sub>3</sub>); FT-IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>) 2924, 2854, 1739, 1462, 1438, 1372, 1213, 1116; MS-ESI ( $m/z$ ) calcolato 444, 364, (M - Br) sperimentale. Anal. Calc da C<sub>34</sub>H<sub>62</sub>NO<sub>10</sub>Br: C, 48.65; H, 8.62; N, 3.15. Trovato: C, 48.71; H, 8.69; N, 3.13.

### ***N*-[2-( $\beta$ -*D*-glucopiranosil)etil]-*N,N*-dimetil-*N*-dodecilammonio bromuro (7, C<sub>12</sub>DGCB)**

#### **Metodo A**

Il composto **3** (10 g, 0.015 mol) viene messo in un pallone a tre colli a fondo tondo e sciolto in metanolo anidro (200 ml). La soluzione è stata raffreddata a 0°C, introdotto azoto gassoso e poi tenuta sotto agitazione per un'ora. La reazione è poi lasciata a temperatura ambiente e fatta continuare fino a quando il materiale di partenza scompare. Il solvente è stato evaporato sotto vuoto e il risultante prodotto sciropposo è stato cristallizzato per due volte da diclorometano/etil acetato. I cristalli sono stati recuperati attraverso filtrazione su buchner, ottenendo una polvere bianca leggermente igroscopica.

#### **Metodo B**

Sono state utilizzate le stesse procedure descritte per il composto **6**. Il risultante sciroppo è stato cristallizzato due volte da diclorometano/etil acetato. I cristalli sono stati recuperati attraverso filtrazione su buchner, ottenendo una polvere bianca leggermente igroscopica

La resa del prodotto è del 100%; P.f. 184-188°C;  $R_f = 0.05$  su silice (MAC 20:10:70);  $[\alpha]^{25}_{578\text{nm}} = -14.4$  ( $c = 0.52$ , MeOH);  $^1\text{H-NMR}$  (D<sub>2</sub>O; acetone come riferimento):  $\delta$  (ppm) 0.84 (t, 3H CH<sub>3</sub>); 1.30 (m, 18H, 9 CH<sub>2</sub>); 1.75 (m, 2H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 3.14 (s, 6H, 2 N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>); 3.25 (t, 1H, H<sub>2</sub>); 3.31 (t 1H, H<sub>4</sub>); 3.48-3.37 (t, 4H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>); 3.69-3.58 (m, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>, H<sub>6a</sub>); 3.88 (d, 1H, H<sub>6b</sub>); 4.07 (m, 1H, OCH<sub>2b</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 4.32 (m, 1H, OCH<sub>2a</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 4.47 (t, 1H, H<sub>1</sub>,  $J = 7.87$  Hz);  $^{13}\text{C-NMR DEPT}$  (D<sub>2</sub>O; acetone come riferimento):  $\delta$  (ppm); 102.5 (C<sub>1</sub>); 76.4 (C<sub>5</sub>); 76.0 (C<sub>3</sub>); 73.3 (C<sub>2</sub>); 70.0 (C<sub>4</sub>); 66.0 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>); 63.6 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>), 63.4 (OCH<sub>2</sub>); 61.1 (C<sub>6</sub>); 51.7 (2 N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>); 32.1-25.6 (10 CH<sub>2</sub>); 14.1 (CH<sub>3</sub>); FT-IR (KBr): cm<sup>-1</sup> 2922, 2854, 1464, 1416, 1374, 1160, 1074, 1044, 752; MS-ESI: ( $m/z$ ). Atteso: 500, sperimentale. 420, (M - Br). Anal. Calc.da C<sub>34</sub>H<sub>62</sub>NO<sub>10</sub>Br: C, 52.79; H, 9.26; N, 2.80. Trovato: C, 52.81; H, 9.21; N, 2.75.

***N*-[2-( $\beta$ -*D*-glucopiranosil)etil]-*N,N*-dimetil-*N*-esadecilammonio bromuro (**8**, C<sub>16</sub>DGCB)**

Per la sintesi del composto **8**, si usano le stesse procedure descritte per il composto **7** (metodo B). La resa del prodotto è del 100%; P.f. 198-200°C; R<sub>f</sub> = 0.05 su silice (MAC 20:10:70);  $[\alpha]^{25^\circ\text{C}}_{578\text{nm}} = -26.57$  (c = 0.56, MeOH); <sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O; acetone come riferimento):  $\delta$  (ppm) 0.85 (t, 3H CH<sub>3</sub>); 1.30 (m, 26H, 13 CH<sub>2</sub>); 1.76 (m, 2H, N<sup>+</sup>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 3.17 (s, 6H, 2 N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>); 3.26 (t, 1H, H<sub>2</sub>); 3.32 (t 1H, H<sub>4</sub>); 3.49-3.41 (t, 4H, N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>); 3.69-3.65 (m, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>, H<sub>6a</sub>); 3.87 (d, 1H, H<sub>6b</sub>); 4.09 (m, 1H, OCH<sub>2b</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 4.34 (m, 1H, OCH<sub>2a</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>); 4.49 (t, 1H, H<sub>1</sub>, J = 7.87 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O; acetone come riferimento):  $\delta$  (ppm); 103.0 (C<sub>1</sub>); 77.0 (C<sub>5</sub>); 76.6 (C<sub>3</sub>); 73.8 (C<sub>2</sub>); 70.5 (C<sub>4</sub>); 66.7 (N<sup>+</sup>CH<sub>2</sub>); 64.3 (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>), 63.8 (OCH<sub>2</sub>); 61.6 (C<sub>6</sub>); 52.1 (2 N<sup>+</sup>CH<sub>3</sub>); 32.8-23.5 (14 CH<sub>2</sub>); 14.7 (CH<sub>3</sub>); FT-IR (KBr): cm<sup>-1</sup> 2916, 2850, 1464, 1414, 1374, 1258, 1116, 1080, 1030, 922, 898, 724; MS-ESI: (m/z). Atteso: 556, sperimentale. 476, (M – Br). Anal. Calc. da C<sub>34</sub>H<sub>62</sub>NO<sub>10</sub>Br: C, 56.10; H, 9.78; N, 2.52. Trovato: C, 56.08; H, 9.75; N, 2.57.

## Risultati e Discussione

Con lo scopo di trovare una molecola sintetica utile come vettore in gene delivery, un grande numero di composti sono stati testati e sono stati indicati alcuni fattori chiave per progettare nuovi tensioattivi [32, 33]. L'idea di legare una porzione zuccherina a scopo di targeting ci ha portato a studiare i suoi effetti sulle proprietà chimico-fisiche e biologiche delle soluzioni, tenendo conto che Engberts e collaboratori sono stati in grado di progettare tensioattivi gemini non ionici aventi porzioni zuccherine che costituiscono le teste idrofile direttamente legate all'azoto, e che hanno dimostrato di avere un'efficienza di trasfezione eccellente [22]. Alla luce dei fattori chiave sopra menzionati, non possiamo aspettarci un'elevata efficienza come agenti di trasfezione dei composti qui in studio senza l'aiuto di un lipide helper dal momento che essi sono tensioattivi monomericici con una sola carica. La presenza nel vettore di diverse cariche positive posizionate alla giusta distanza l'una dall'altra, infatti, per nostra esperienza [34], è un prerequisito per la condensazione del DNA. Inoltre, tale studio potrebbe fornire nuove informazioni sul meccanismo di interazione con le membrane e sulle relazioni struttura-attività.

Solitamente, il primo stadio nella caratterizzazione chimico-fisica di nuovi tensioattivi è la determinazione della cmc: la conoscenza di questo dato è fondamentale, sia nella progettazione delle esperienze sia nell'interpretazione dei risultati.

Sono stati riportati i valori di cmc ed è stata sottolineata la discrepanza tra i valori di cmc ottenuti da misure di conducibilità e di tensione superficiale in funzione della concentrazione. Abbiamo ascrivito questo comportamento alla formazione di piccoli aggregati premicellari non attivi a livello superficiale ma aventi una più alta mobilità ionica rispetto al monomero, prima della formazione delle micelle vere e proprie. Questo potrebbe spiegare il fatto che i valori di cmc ottenuti attraverso misure di tensione superficiale risultano essere sempre più bassi di quelli ottenuti per via conduttimetrica.

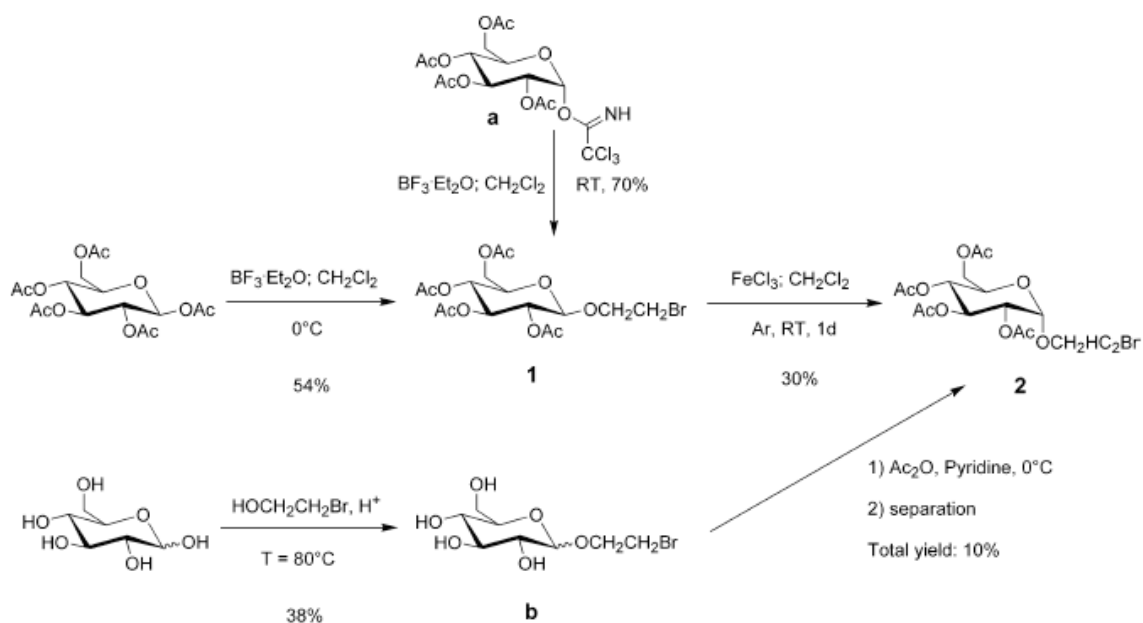
La cmc è stata valutata anche attraverso un metodo termodinamico assumendo come valore di cmc l'ascissa del primo punto di flesso delle curve di  $L_\phi$  vs.  $m$ . Nella Tabella 3 sono riportati i valori di cmc ottenuti con i diversi metodi insieme a quelli ottenuti con metodo termodinamico, in particolare a partire dalle entalpie: questi ultimi (escluso il caso del C<sub>8</sub>AGCB) sono compresi tra i valori ottenuti per via conduttimetrica e quelli ottenuti per via tensiometrica. Infatti, se la tensione superficiale è riferita ad una proprietà di superficie e la conducibilità misura una proprietà di *bulk*, la termodinamica risente di entrambi gli effetti.

## Sintesi

Al fine di eseguire la sintesi di tensioattivi gluco-cationici, attraverso la quaternarizzazione di alchildimetilammine, è richiesto come intermedio chiave il 2-bromoetil-2,3,4,6-tetracetil- $\beta$ -D-piranoside **1**, (Schema 1). Questi composti sono stati per la prima volta sintetizzati da Dahmen et al. [35-38] facendo reagire il pentacetilglucosio con bromoetano ed etere di boro trifloruro in diclorometano. La resa è circa del 40%. Con una accurata applicazione delle loro procedure, si è ottenuto un miglioramento della resa al 54%. La reazione è completamente stereoselettiva, dà solo l'anomero  $\beta$ . Si è anche provato a migliorare la

resa del prodotto, mantenendo il completo controllo stereoselettivo. L'uso del protocollo di glicosilazione di Schmidt [10,11,30-32], che coinvolge un donatore protetto glucosiltricloroacetimidato, vale a dire il 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosiltricloroacetimidato (composto **a**), dà un effettivo miglioramento della resa: dal 40% ottenuto con glucosio pentacetilato come donatore si arriva al 70%, mantenendo il totale controllo della stereoselettività. Questo è certamente dovuto all'effetto della protezione con un acetile del gruppo idrossilico in posizione 2 del glucosio. Il coinvolgimento di questo gruppo acetile nella stabilizzazione del carbocatione deriva dalla liberazione del gruppo tricloroacetimidato, dando uno ione acetossonio, e forza la reazione con l'alcol verso la completa inversione di configurazione [39,40-42]. Il miglioramento della resa nella sintesi di **1** mostra che un attento progetto di sintesi dovrebbe essere preparato per ottenere sia alte rese sia un'alta selettività. Nel caso della sintesi di carboidrati bisognerebbe ricordarsi che, la giusta disposizione sia dei gruppi protettivi sia dei gruppi attivanti la glicosilazione è di importanza fondamentale.

### SCHEMA 1. Via sintetica degli Intermedi 1 e 2



In questo caso, l'uso del ben noto tricloroacetimidato è stata una scelta abbastanza facile e ben sperimentata. In realtà a partire dai primi anni ottanta questo tipo di donatori glucosidici si sono mostrati altamente selettivi, azione che deriva da una combinazione dell'acido di Lewis, esempio di protezione del gruppo idrossilico, e dagli effetti del solvente. La larga applicazione trovata nella preparazione degli oligosaccaridi è la miglior dimostrazione del loro potere sintetico e della loro versatilità. Una più approfondita conoscenza delle differenti proprietà dei vari donatori glucosidici e dei gruppi protettivi è di estrema importanza per progettare le modificazioni sui carboidrati. Si è valutata la possibilità di ottenere anche l'anomero  $\alpha$  **2**. Il primo percorso sintetico sperimentato non è stereoselettivo. Viene preparata una miscela anomica (composto **b**) facendo reagire glucosio e bromoetano a  $80^\circ\text{C}$ , usando lo stesso alcol come solvente [43]. La reazione diretta tra bromoetano e glucosio non dà alte rese, abbassando la resa

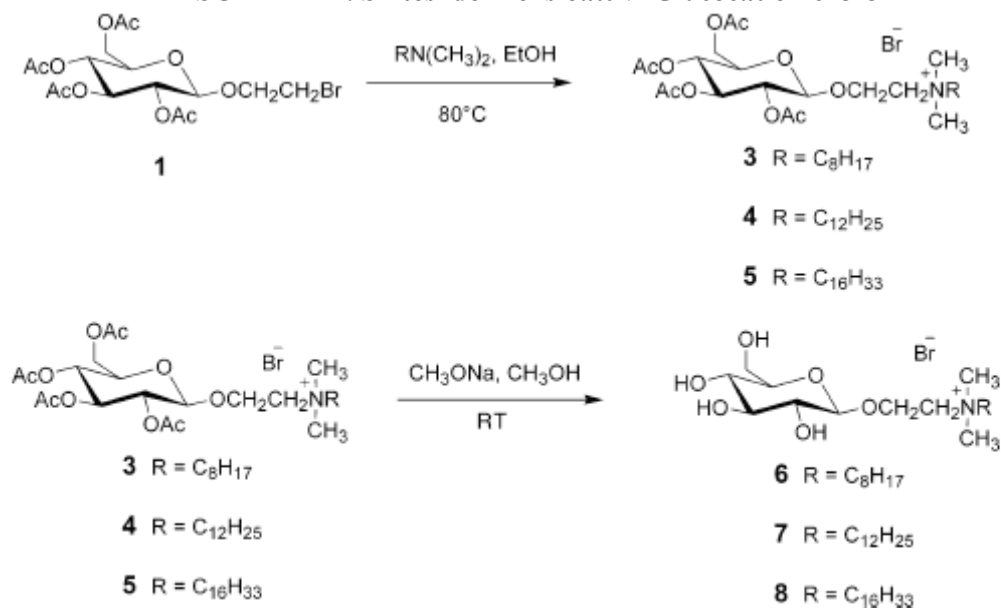
totale. La miscela viene successivamente peracetilata con anidride acetica in piridina e gli anomeri sono separati per mezzo di flash cromatografia, ottenendo comunque una bassa resa (10%). Da un semplice controllo NMR, eseguito sui protoni anomeric, potrebbe essere coinvolta una parziale anomerizzazione nello stadio di acetilazione. Questo fatto potrebbe essere il motivo di una bassa resa di sintesi del composto **2**. Anche nel prodotto grezzo da acetilare è presente una grande quantità di anomero  $\alpha$ , come ci si aspetta da una classica glucosilazione a stadi di Fischer.

Si è sperimentata una seconda via, quella della anomerizzazione di **1** in **2** ottenuta attraverso cloruro ferrico in diclorometano. Un metodo riportato in letteratura [44] mostra che l'uso del cloruro ferrico anidro per rimuovere la protezione benzilica dallo zucchero favorisce la formazione dell'anomero più stabile, cioè l'anomero  $\alpha$  con una resa considerevole. Alcuni autori hanno evidenziato che in molti casi, ma non in tutti, la protezione di un gruppo acetile sulla porzione del carboidrato è stabile verso il cloruro ferrico. Durante l'esperimento la reazione procede, ma si verifica una decomposizione del composto iniziale. In queste condizioni la reazione dà, dopo purificazione, un 30% di anomero  $\alpha$  (**2**). Questo fatto non garantisce una resa sufficiente per sfruttare praticamente questa via di produzione di tensioattivi gluco-cationici aventi una configurazione  $\alpha$ -anomeric.

I risultati ottenuti non sono incoraggianti e le sintesi di tensioattivi  $\alpha$ -gluco-cationici saranno nuovamente affrontate in futuro. Comunque il  $\beta$ -linkage del glucosio in natura è praticamente ubiquitario, mentre l' $\alpha$ -linkage è molto raro.

Si preparano i tensioattivi **3-5** dalla reazione di **1** con un adatta alchildimetilamina in etanolo a riflusso (Schema 2). La reazione va a compimento dopo due giorni. L'evaporazione del solvente produce un olio, il quale viene purificato da cromatografia e varie sospensioni in etere di petrolio in modo da rimuovere le ultime tracce di ammina, dando una polvere bianca.

**SCHEMA 2. Sintesi dei Tensioattivi Glucocationici 3-8**



I gruppi protettivi sono rimossi sotto le condizioni Zemplen [45] ( $\text{CH}_3\text{ONa}$  in  $\text{CH}_3\text{OH}$ ), dando i tensioattivi **6-8** (Schema 2). Mentre il composto **6** è isolato come olio, i composti **7** e **8** sono ottenuti come solidi dopo flash cromatografia e cristallizzazione con diclorometano/acetato di etile. Durante i primi tentativi di purificazione dei tensioattivi **6-8**, si è notato che questi prodotti potrebbero indurre la gelificazione di solventi idrofobici organici, come l'etere di petrolio. Compaiono strutture filamentose lunghe e sottili nel bulk, che sostanzialmente vanno ad aumentare la viscosità del sistema.

### ***Caratterizzazione Anfifilica e Misure di Conducibilità***

La caratterizzazione dei tensioattivi è stata effettuata attraverso misure di conducibilità e di tensione superficiale [31]. Eccetto il tensioattivo **6**, per il quale la solubilità non è abbastanza alta da permetterci di ottenere la cmc, di tutti i tensioattivi è stata misurata la conducibilità delle loro soluzioni. Un esempio di grafici relativi alla conducibilità sono stati riportati in Figura 2 per il composto **4**. L'inaspettato comportamento per quanto riguarda la solubilità del composto **6** è degno di uno studio più approfondito, che sarà condotto più avanti.

I risultati delle misure di conducibilità sono riportati in Tabella 1. Sono state ottenute le concentrazioni micellari critiche ed il grado di legame del controione (ovvero la percentuale di quanto strettamente il controione si lega alla micella per compensare la forza repulsiva che agisce tra le teste polari cariche). La cmc è stata ottenuta come intersezione delle rette disegnate tra due intervalli, pre- e postmicellare. Un metodo più preciso è stato recentemente proposto usando una funzione non lineare basata sull'integrazione della sigmoide di Boltzmann per interpolare la conducibilità equivalente ( $\kappa$ ) vs  $C$  [30,46] (Figura 1a). Questo metodo è stato utile in particolare nei casi in cui la transizione da stato monomero a stato micellare è molto graduale. Questo accade per tensioattivi che formano micelle piccole con un basso numero di aggregazione e quando la micellizzazione è anticipata dalla formazione di piccoli aggregati premicellari, come nel caso dei tensioattivi gemini [47,48].

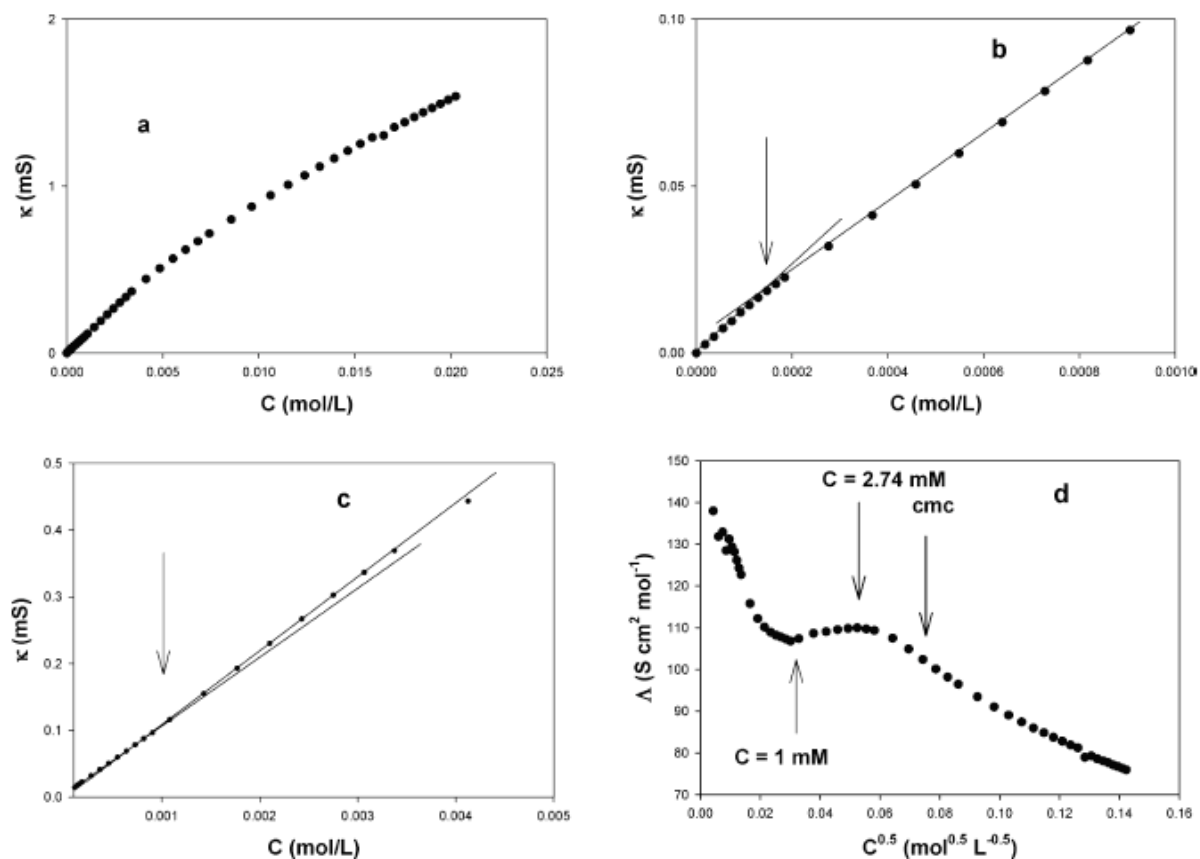
Una dettagliata discussione della teoria del metodo è stata riportata altrove, insieme alla sua prima applicazione nel caso di tensioattivi gemini [47,46]. L'utilizzo dei due metodi ha portato a risultati simili. Dal rapporto delle pendenze degli intervalli postmicellare e premicellare ( $S_{\text{post}}/S_{\text{pre}}$ ) si ottiene il grado di dissociazione micellare,  $\alpha$ , ed il grado di legame del controione,  $\beta$ , è calcolato come  $1 - \alpha$ . Le stesse pendenze sono state ottenute dal "fit" non lineare [46,49], come parametri interpolati (chiamati  $A_1$  e  $A_2$  nell'articolo originale) che sono stati usati nello stesso modo per calcolare  $\alpha$  (come  $A_2/A_1$ ) e  $\beta$ , ottenendo risultati comparabili.

I valori di cmc sono più alti per i tensioattivi disacetilati **7** e **8** dal momento che essi sono meno idrofobici di quelli acetilati (**3-5**). Per la catena dodecilica, ad esempio, il composto disacetilato **7** ha una cmc quattro volte più alta di quella del composto acetilato **4**. Gli andamenti delle cmc di tutti i tensioattivi sono in accordo con quanto atteso, poiché le cmc diminuiscono all'aumentare della lunghezza della catena. Per i due composti con catena esadecilica (composti **5** e **8**) i valori delle cmc sono simili. Un glucosio non protetto aumenta l'idrofilia del tensioattivo **8** quindi ci si dovrebbe aspettare un sostanziale aumento della cmc.

Anche se il composto acetilato **5** è più idrofobico e meno solubile in acqua, la capacità dei gruppi polari presenti sul glucosio del composto disacetilato **8** di formare una serie di legami idrogeno potrebbe stabilizzare l'impaccamento delle molecole nella micella e questo potrebbe spiegare perché due tensioattivi apparentemente differenti dato il bilancio idrofilo/lipofilo mostrano cmc simili.

I due tensioattivi esadecilici **5** e **8** mostrano anche una discontinuità nel grafico di  $\kappa$  vs  $C$  a concentrazioni molto basse che provverebbe la formazione di coppie ioniche strette [47,48]. Il corrispondente grado di legame del controione concorda con questa interpretazione.

L'analisi dei dati di legame del controione ( $\beta$ ) rivela importanti informazioni sulla struttura micellare.



**Figura 2.** Grafici di conducibilità specifica vs  $C$  e di conducibilità molare vs  $C^{0.5}$  per il composto.

**Tabella 1.** Caratterizzazione dei Tensioattivi 3-8 attraverso Misure di Conducibilità

compd	cmc (mM)	$\beta$ (%)	$\Delta$ vs $C^{0.5}$ plot shape
3	29.2	44	maximum
4	5.48	47	asynthetic/maximum
5	1.25	56	slight maximum
	0.18	38	
6	<sup>a</sup>		
7	21.3	71	asynthetic/maximum/normal
8	1.42	70	asynthetic/maximum/normal
	0.12	28	
DTAB <sup>b</sup>	15.80	77	normal
CTAB <sup>b</sup>	0.90	84	normal

<sup>a</sup> This product shows a solubility limit before attaining the theoretical cmc. <sup>b</sup> From ref 37.

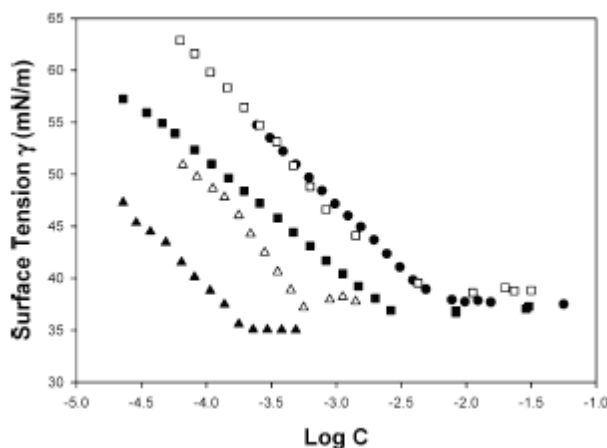
I composti acetilati (tensioattivi **3-5**) mostrano un grado di legame del controione basso, intorno al 50-60%. Questo valore è veramente basso rispetto a quello dei comuni tensioattivi cationici con uno ione bromuro come controione. Tuttavia, è stato dimostrato che quando aumentano i gruppi presenti intorno al sito dell'ammonio carico, il valore  $\beta$  si abbassa in confronto a quello che ci si attende normalmente [47,50]. Questo è dovuto all'effetto schermante dei sostituenti più ingombranti sull'atomo di azoto. La grande dimensione della testa polare diminuisce la densità di carica superficiale e la propensione a legare strettamente il controione. L'allungamento della catena idrofobica porta ad un aumento del grado di legame del controione (vedi tensioattivi **3-5**), che concorda con il comportamento dei semplici tensioattivi alchiltrimetilammonio DTAB (64 o 77%) [41-43], TTAB (74%) [42] e CTAB (79 o 84%) [50,51]. Inoltre, i tensioattivi disacetilati **7** e **8** mostrano quasi lo stesso valore di  $\beta$ , che è sensibilmente più elevato di quello dei composti acetilati. Come già anticipato, i tensioattivi esadecilici **5** e **8** mostrano una discontinuità a concentrazioni molto basse, alle quali  $\beta$  è di circa il 30-40%.

I dati di conducibilità possono anche essere riportati come grafici di conducibilità molari ( $\Lambda$ ) vs  $C^{0.5}$ . Da questi grafici è evidente che questi tensioattivi mostrano un comportamento peculiare. Tutti i tensioattivi sembrano avere un andamento asintotico a basse concentrazioni (Figura 1d). Questo è normalmente portato come prova della formazione di coppie ioniche strette [47,49,52]. I composti acetilati **3-5** mostrano la presenza di un massimo nel grafico (composto **4**, Figura 2d). Di solito, il massimo è più evidente quando l'idrofobicità della molecola aumenta ed è prova evidente della formazione di aggregati premicellari in soluzione [47,53]. L'accoppiamento ionico si riferisce al legame di un controione allo ione carico di segno opposto del tensioattivo. In questo caso, la neutralizzazione parziale delle cariche potrebbe evidenziare una diminuzione della conducibilità ed entrambi i grafici,  $\kappa$  vs  $C$  e  $\Lambda$  vs  $C^{0.5}$ , potrebbero mostrare una leggera curvatura verso l'asse delle concentrazioni. Questo è stato osservato per il grafico di  $\kappa$  vs  $C$  in Figura 2b (ad una  $C = 0.1$  mM) e considerando anche l'andamento asintotico presente a basse concentrazioni nel grafico  $\Lambda$  vs  $C^{0.5}$  si proverebbe la formazione di coppie ioniche. Inoltre, Zana ha dimostrato in via qualitativa che la conduttanza di un dimero è più alta di quella del monomero, stabilendo che la disposizione dei monomeri nel dimero è in grado di renderlo completamente ionizzato [47]. Una possibilità è che due monomeri formino un dimero attraverso l'accoppiamento delle catene idrofobiche, lasciando le due teste polari lontane l'una dall'altra ai margini del dimero (come una struttura bolaforme).

In queste condizioni, il dimero è (a) completamente ionizzato, (b) un po' più piccolo della semplice somma del volume dei due tensioattivi monomerici e (c) potrebbe richiedere meno acqua per essere "solvato". Di conseguenza, la sua capacità di diffusione e migrazione nella soluzione potrebbe essere più veloce e la conducibilità del dimero potrebbe essere più elevata di quella dei due monomeri. Pinazo et al. [53] hanno anche studiato questo tipo di comportamento da un punto di vista teorico e quantitativo ed hanno ottenuto grafici che mostrano un massimo nel grafico  $\Lambda$  vs  $C^{0.5}$ . Questa discussione può essere estesa alla formazione di oligomeri, come trimeri, tetrameri e così via, dimostrando che in pratica non legano controioni. Come risultato pratico, si potrebbe vedere nella regione premicellare del grafico  $\kappa$  vs  $C$  a basse concentrazioni una leggera curvatura verso l'asse delle  $\kappa$ . Questo si osserva in Figura 1c per il composto **4** ad

una  $C$  di circa 1 mM. In aggiunta,  $\Lambda$  aumenterà con  $C$ , ed il grafico  $\Lambda$  vs  $C^{0.5}$  mostrerà un aumento dei valori di  $\Lambda$ . All'aumentare della concentrazione gli oligomeri continueranno a crescere fino a che la loro conducibilità inizierà a diminuire dal momento che hanno bisogno, per tenere insieme i monomeri per formare gli aggregati, di legare saldamente un po' di controioni per diminuire la repulsione delle teste polari cationiche. Questo spiega perché nei grafici  $\Lambda$  vs  $C^{0.5}$  talvolta è presente un massimo (per il composto **4**, in Figura 2d, a 2.74 mM, mentre la cmc di questo tensioattivo è il doppio di tale valore, 5.48 mM). Per una dettagliata descrizione di questo fenomeno si possono consultare i due articoli citati in cui si trovano sia una descrizione qualitativa-semiquantitativa [47] che una più rigorosa descrizione quantitativa [53].

Per i composti **3-5**, il grafico segue questo comportamento quando le catene si allungano. Nel caso del composto **5** è anche difficile rilevare chiaramente la presenza di un massimo, che probabilmente si vedrebbe conducendo misure a concentrazioni più basse (questo compito non è facile [47,53]). Tuttavia si trova una discontinuità evidente nel grafico a  $C$  inferiore a 0.1 mM, che non corrisponde alla cmc ottenuta dal grafico  $\kappa$  vs  $C$  dove è di 1.25 mM, ma piuttosto ai dati di cmc provenienti da misure della tensione superficiale (vedi sotto). Lo stesso avviene per il composto **4** e per i tensioattivi disacetilati **7** e **8**. In particolare, il composto esadecilico **8** mostra un comportamento molto simile a quello del corrispondente composto acetilato **5** a concentrazioni molto basse, mentre il tensioattivo dodecilico **7** presenta un massimo molto poco accentuato. Inoltre, questi due composti mostrano anche la discontinuità che ci si aspetta normalmente alla concentrazione opportuna che ben si accorda con la cmc ottenuta dal grafico the  $\kappa$  vs  $C$ .



**Figura 3.** Grafico delle tensioni superficiali vs log  $C$  plot per i composti **3** (●), **4** (■), **5** (▲), **7** (□), e **8** (△).

### **Misure di tensione superficiale**

I risultati delle misure di tensione superficiale effettuate sui tensioattivi in studio sono riportati in in Figura 3 e in Tabella 2.

Da questa tecnica, sono stati determinati i seguenti parametri: (i) la concentrazione micellare critica; (ii)  $\gamma_{cmc}$ , ovvero la tensione superficiale alla cmc; (iii)  $C_{20}$ , ovvero la concentrazione alla quale la tensione superficiale è diminuita di 20 mN/m, un parametro che misura l'efficienza di adsorbimento; e il suo corrispondente logaritmo  $pC_{20}$ ; (iv)  $\Gamma_{max}$ , ovvero la concentrazione superficiale eccesso, la concentrazione

massima di specie adsorbite, alla cmc; (v)  $A_{\min}$ , ovvero l'area minima che una molecola può occupare all'interfaccia aria-acqua in condizioni di saturazione superficiale, alla cmc; (vi)  $cmc/C_{20}$ , ovvero un parametro che confronta la micellizzazione e la capacità di adsorbimento della molecola. Per tutti i campioni la cmc ottenuta da misure di tensione superficiale risulta essere sostanzialmente più bassa di quella ottenuta con misure di conducibilità. Il rapporto tra le cmc ottenute attraverso misure di conducibilità e quelle ottenute attraverso misure di tensione superficiale cade nell'intervallo 2-8. Lo stesso rapporto è stato precedentemente introdotto da Rosen et al. [54], in uno studio sui tensioattivi gemini *N*-acil- $\beta$ -alaninati, per mettere in evidenza comportamenti inaspettati legati principalmente alla formazione di aggregati premicellari.

L'andamento generale delle cmc ottenute da misure di tensione superficiale segue l'ordine mostrato dalle cmc ottenute da misure di conducibilità. Si è trovato un accordo generale tra le cmc tensidiche ed il massimo presente nei grafici della conducibilità molare vs  $C^{0.5}$ . Questo potrebbe tener conto della formazione di aggregati premicellari in quantità sostanziali, così che non ci sia una diminuzione della tensione superficiale tra la formazione di questi aggregati e la formazione di micelle "regolari". Quando si raggiunge il massimo nel grafico  $\Lambda$  vs  $C^{0.5}$ , gli aggregati hanno già iniziato a crescere, formando micelle regolari (vedi Figura 1d per il composto **4**, dove la concentrazione alla quale si raggiunge il massimo è in eccellente accordo con la cmc da misure di tensione superficiale). Per questo caso, l'interfaccia è già saturata con il tensioattivo vicino al punto di inizio della trasformazione da aggregati premicellari a micelle.

**Tabella 2. Caratterizzazione dei Tensioattivi 3-8 attraverso misure di tensione superficiale**

compd	cmc <sup>a</sup> (a) (mM)	cmc <sup>b</sup> (b) (mM)	ratio <sup>c</sup> b/a	$\gamma_{cmc}$ (mN/m)	pC <sub>20</sub>	$\Gamma_{\max}$ (mol cm <sup>-2</sup> )	$A_{\min}$ (Å <sup>2</sup> )	cmc/C <sub>20</sub>
3	5.78	29.2	5	37.75	3.400	1.06	157	14.5
4	2.63	5.48	2	36.97	4.061	0.90	184	30.3
5	0.21	1.25	6	35.06	5.021	1.11	150	21.7
6 <sup>d</sup>								
7	2.82	21.3	8	38.98	3.414	1.28	130	7.3
8	0.51	1.42	3	39.06	4.194	1.32	125	8.0
DTAB <sup>e</sup>	14.45	15.80		36.4		1.40	77	
CTAB <sup>e</sup>	0.80	0.90		35.3		1.12	140	

<sup>a</sup> cmc obtained by surface tension. <sup>b</sup> cmc obtained by conductivity. <sup>c</sup> Ratio of the cmc conductivity/surface tension (see Rosen et al.<sup>46</sup>), approximation to unity. <sup>d</sup> This product shows a solubility limit (see Table 1 and text). <sup>e</sup> From the literature.<sup>43,47</sup>

Dal momento che la conduttanza degli aggregati premicellari è più elevata di quella del tensioattivo monomero (vedi sotto), essi dovrebbero rimanere nella soluzione bulk e probabilmente non essere adsorbiti alla superficie aria-acqua [47]. Quando i piccoli aggregati iniziano a formarsi, la concentrazione del tensioattivo all'interfaccia rimane praticamente costante, così come la concentrazione del monomero nel bulk. Tutti i tensioattivi mostrano questo comportamento.

Le differenze tra le cmc, determinate da misure di tensione superficiale, dei tensioattivi acetilati (**3-5**) e disacetilati (**7-8**) sono piuttosto piccole. Ancora una volta, si ha un'indicazione della diversa natura dell'aggregato, rivelata appunto dalle misure eseguite con tecniche differenti. Questo è strettamente legato alla solubilità in acqua (per i composti acetilati **3-5**) ed alla serie di legami ad idrogeno che si formano tra le porzioni glucosidiche libere (per i composti disacetilati **7-8**) che favoriscono la micellizzazione (vedi sotto). La tensione superficiale limite alla cmc,  $\gamma_{cmc}$ , è più bassa per i composti **3-5** che per i composti **7-8** e

diminuisce all'aumentare della lunghezza della catena. Questo è in accordo con la diversa idrofobicità dei composti: il più idrofobico mostra una miglior capacità nel ridurre la tensione superficiale.

Il parametro  $C_{20}$  diminuisce per i composti **3-5** nell'ordine  $3 > 4 > 5$ , mostrando ancora una volta che il più elevato carattere idrofobico della molecola corrisponde ad un' aumentata propensione ad adsorbirsi. Lavorando con le eq (8) e (9), si possono calcolare la concentrazione superficiale eccesso  $\Gamma_{cmc}$  e l'area minima all'interfaccia aria-acqua [55-56],  $A_{min}$ .

Le aree così derivate possono fornire informazioni sullo spazio che ogni molecola necessita per disporsi all'interfaccia aria-acqua. Dall'analisi di questi dati di area minima, si è potuto desumere che i tensioattivi acetilati **3-5** occuperebbero maggior spazio alla superficie rispetto a quello occupato dai composti disacetilati **7** e **8**. Questo è in accordo con il più voluminoso gruppo glucosidico acetilato presente nella precedente serie di anfifili. Il risultato finale è che vi è uno scarso impaccamento all'interfaccia aria-acqua. Il voluminoso gruppo glucosidico acetilato renderebbe conto anche di un minor legame del controione e di una struttura micellare "libera" (composti **3-5**) che talvolta si riferisce alle micelle "bagnate", dal momento che lo scarso impaccamento lascerebbe abbastanza spazio all'acqua per entrare profondamente all'interno della micella. Gli anfifili disacetilati **7** e **8** mostrano un'area minore, in accordo con la struttura più piccola del gruppo glucosidico disacetilato da solo e con l'idrofilicità del glucosio, che richiede una disposizione completamente diversa di questa porzione nello strato di adsorbimento. Come mostrato in precedenza, [47] la più probabile disposizione del gruppo glucosidico è quella quasi completamente a contatto con l'acqua, ovvero il gruppo è immerso nello strato acquoso. Dai nostri risultati, la stessa ipotesi può essere fatta anche per il gruppo glucosidico acetilato nei tensioattivi **3-5**. Come conseguenza, ci si aspetta un minor valore di  $A_{min}$ , e questo stato riscontrato. Un confronto potrebbe essere fatto con strutture piuttosto simili aventi una testa polare piridinica [47]. In questo caso, l'area per un tensioattivo  $\beta$ -glucopiridinico avente una catena dodecilica è sostanzialmente più piccola ( $50 \text{ \AA}^2$ ) di quella trovata per il corrispondente composto **7**. L'area trovata per il  $\beta$ -(*n*-dodecil)glucopiranoside è di soli  $36 \text{ \AA}^2$ . Una possibile spiegazione di questo comportamento potrebbe risiedere in diversi fattori. Il primo, la differenza tra le due strutture è la presenza di uno spaziatore dimetilenico tra il glucosio e l'atomo di azoto per il composto **7**, che non è presente nella struttura piridinica, dove l'anello glucosidico è attaccato direttamente all'azoto piridinico. Questo spaziatore consentirebbe una maggiore libertà conformazionale della struttura **7** nel disporsi all'interfaccia aria-acqua. Il secondo, ma non meno importante, la presenza della carica positiva porta le teste polari a respingersi reciprocamente, dando origine ad aree maggiori rispetto a quella del semplice  $\beta$ -(*n*-dodecil)glucopiranoside. L'anello piridinico delocalizzerebbe la carica positiva e non respingerebbe molecole simili, così da permettere la formazione di una serie di legami idrogeno abbastanza forti tra i gruppi idrossilici dei glucosidici. Per il composto **7**, la carica positiva è localizzata sull'azoto del gruppo amminico e questo causerebbe una maggiore repulsione tra molecole simili. I valori dell'area sono in accordo con l'interpretazione proposta. Il grado di legame del controione per il tensioattivo **7** è leggermente minore di quello del citato tensioattivo gluco-piridinico, ma la differenza (71% per il **7** vs 73% per il tensioattivo gluco-piridinico) è troppo poca per supportare l'ipotesi. Alla luce di queste osservazioni, comunque, l'area

minima dovrebbe essere più alta per il composto **7**, esattamente come trovato. La maggiore libertà conformazionale dovuta allo spaziatore dimetilenico lascerebbe la porzione glucosidica del tutto libera di muoversi in acqua, di essere più idratata rispetto al tensioattivo glucopiridinico e di occupare maggior spazio all'interfaccia aria-acqua, anche se interagisce con gli altri gruppi glucosidici attraverso legami idrogeno.

Infine, il parametro  $cmc/C_{20}$  è alto per i composti acetilati in accordo con la loro maggiore idrofobicità e con la loro maggiore capacità ad adsorbirsi piuttosto che micellizzare. Ovviamente, questo parametro mostra valori più bassi per i composti disacetilati (**7** e **8**) a causa della loro maggiore polarità. Per ottenere ulteriori informazioni sulle relazioni struttura-attività, i tensioattivi **4** e **7** possono essere confrontati con il loro composto parente "non sostituito", il dodeciltrimetilammonio bromuro (DTAB), e lo stesso può essere fatto per i composti **5** e **8** con l'esadeciltrimetilammonio bromuro (CTAB). La presenza del glucosio acetilato diminuisce la cmc (se ci riferiamo ai valori di cmc determinati con misure di conducibilità) per il tensioattivo dodecilico **4** da una a tre volte rispetto a quella del DTAB, mentre nel caso della catena esadecilica (**5**) la cmc aumenta. La porzione glucosidica acetilata aumenta l'idrofobicità in entrambe le molecole, ma l'effetto sulla cmc è chiaramente evidente solo per il tensioattivo **4**.

In generale, quando l'aumento dell'idrofobicità è legato alla testa polare, questo fenomeno è meno evidente ma, nel caso del composto **5** vs CTAB, sembra del tutto apprezzabile. Dal momento che la differenza tra la cmc del DTAB e quella del CTAB tiene conto del comportamento che ci si aspetta dall'aggiunta di quattro metileni alla catena idrofobica, potremmo provare a stimare approssimativamente il contributo del gruppo glucosidico acetilato (e del loro spaziatore) legato alla testa polare positiva come simile all'aggiunta di due metileni alla catena idrofobica principale. Quando la stessa analisi è stata fatta sui tensioattivi disacetilati **7** e **8** nei confronti dei rispettivi composti parenti (rispettivamente DTAB e CTAB), si è visto che la porzione glucosidica causa un aumento della cmc, in accordo con l'aumento dell'idrofilicità dovuta all'addizione dello zucchero. Guardando ai dati di tensione superficiale, in particolare ai valori di  $A_{min}$ , il DTAB mostra un'area di 49-50 Å<sup>2</sup>, e questo dimostra ancora una volta che la maggior area ottenuta per il composto **7** è probabilmente dovuta alla libertà conformazionale dello zucchero che porta l'intera testa polare ad essere maggiormente idratata. Il differente tipo di carica, ione ammonio, concentrata sull'atomo di azoto o delocalizzata sull'anello piridinico (caso mostrato per un tensioattivo dodecilico β-glucopiridinico) e la libertà conformazionale del glucosio sono essenziali per determinare i valori dell'area. La maggiore densità di carica positiva presente sull'ammonio può agire nel separare le teste polari cariche nello strato adsorbito dando, come risultato, una maggiore area per il composto **7** rispetto al DTAB.

### ***Proprietà Termodinamiche***

I dati sperimentali sono stati espressi in termini di quantità molari apparenti e parziali del soluto, come è usuale in soluzioni termodinamiche, assumendo la diluizione infinita come stato di riferimento. Le quantità molari apparenti e parziali sono state ottenute dai dati sperimentali usando metodi già descritti dettagliatamente [1-7, 57, 58].

I calori di diluizione e le entalpie molari apparenti e parziali a 298 K, ottenute dalle equazioni (1) e (2), per i composti in studio sono disponibili nelle Tabelle 3-5. Nelle Figure 4, 5, 6 sono raffigurati, i grafici delle entalpie molari apparenti e parziali in funzione della molalità per i composti in studio.

**Tabella 3.** Molalità ( $m$ ), entalpie di diluizione ( $\Delta H_d$ ), entalpie molari apparenti ( $L_\phi$ ), e parziali ( $L_2$ ), del tensioattivo C<sub>8</sub>AGCB, in acqua a 298 K.

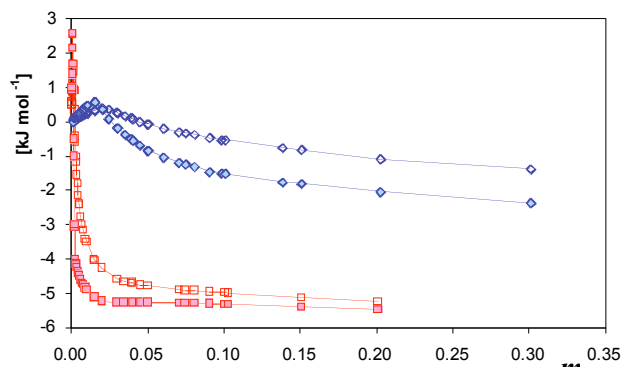
$m_i$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$m_f$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$\Delta H_d$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{\phi,i}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{\phi,f}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{2,i}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{2,f}$ (J mol <sup>-1</sup> )
0.00501	0.00247	-14.65	133	93	205	139
0.00600	0.00305	-22.82	147	103	228	155
0.00700	0.00354	-49.21	160	111	252	168
0.00801	0.00409	-55.32	173	120	275	182
0.00996	0.00489	-64.24	198	132	320	202
0.02000	0.00986	-74.47	319	196	563	317
0.02497	0.01234	-149.73	380	226	696	375
0.02800	0.01380	-187.29	419	244	782	409
0.02901	0.01430	-188.80	433	250	811	421
0.04002	0.01965	-275.95	583	315	1153	554
0.04993	0.02480	-360.45	729	378	1495	692
0.05964	0.02964	-459.40	883	441	1862	829
0.07014	0.03520	-560.43	1062	515	2291	998
0.07986	0.03976	-659.94	1237	579	2716	1144
0.09023	0.04395	-771.97	1434	639	2920	1285
0.09989	0.04893	-848.94	1581	714	3100	1459
0.14727	0.07125	-992.68	2074	1081	3370	2290
0.16850	0.07926	-1013.48	2219	1205	3340	2420
0.19851	0.09452	-838.34	2357	1519	3110	3020
0.29699	0.13958	-444.37	2444	2000	2330	3360
0.38938	0.17861	-164.18	2434	2270	2200	3300
0.50117	0.22618	87.76	2332	2420	2080	2750
0.60161	0.25425	246.01	2214	2460	1970	2510
0.70488	0.30261	549.13	2060	2450	1890	2310

**Tabella 4.** Molalità ( $m$ ), entalpie di diluizione ( $\Delta H_d$ ), entalpie molari apparenti ( $L_\phi$ ), e parziali ( $L_2$ ), del tensioattivo C<sub>12</sub>AGCB, in acqua a 298 K.

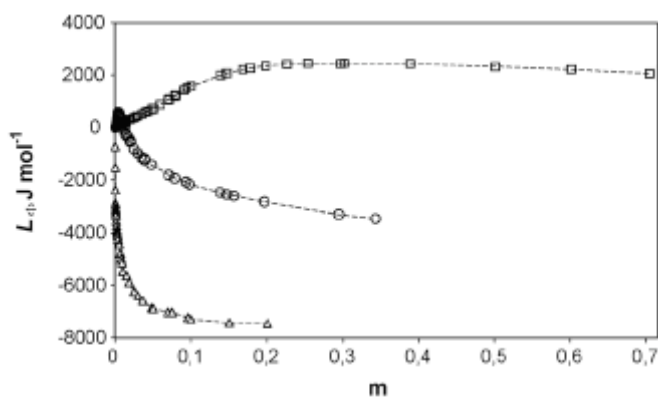
$m_i$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$m_f$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$\Delta H_d$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{\phi,i}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{\phi,f}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{2,i}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{2,f}$ (J mol <sup>-1</sup> )
0.00088	0.00046	-30.30	37	18	90	80
0.00196	0.00099	-68.64	138	44	385	110
0.00295	0.00149	-225.93	286	86	797	284
0.00393	0.00200	-324.84	476	143	1319	397
0.00491	0.00243	-322.43	524	202	660	563
0.00589	0.00301	-223.14	520	297	-170	828
0.00785	0.00392	126.48	348	475	-640	1314
0.00884	0.00446	349.69	247	596	-720	1050
0.00982	0.00498	313.06	247	560	-825	670
0.01277	0.00652	552.26	102	450	-1070	-380
0.01374	0.00692	630.39	-221	410	-1170	-455
0.01962	0.00979	679.65	-550	130	-1550	-860
0.02455	0.01231	748.91	-819	-70	-1760	-1060
0.02945	0.01459	683.32	-973	-290	-1950	-1215
0.03434	0.01718	761.89	-1121	-359	-2100	-1405
0.03924	0.01961	746.44	-1230	-484	-2230	-1550
0.07861	0.03876	741.23	-1931	-1190	-2890	-2215
0.09816	0.04790	746.02	-2156	-1410	-3080	-2465
0.14736	0.07095	759.95	-2570	-1810	-3540	-2805
0.19665	0.09322	762.68	-2833	-2070	-3945	-3030
0.29490	0.13834	830.52	-3301	-2470	-4545	-3450
0.34348	0.15645	858.27	-3458	-2600	-4720	-3605

**Tabella 5.** Molalità ( $m$ ), entalpie di diluizione ( $\Delta H_d$ ), entalpie molari apparenti ( $L_\phi$ ), e parziali ( $L_2$ ), del tensioattivo C<sub>16</sub>AGCB, in acqua a 298 K.

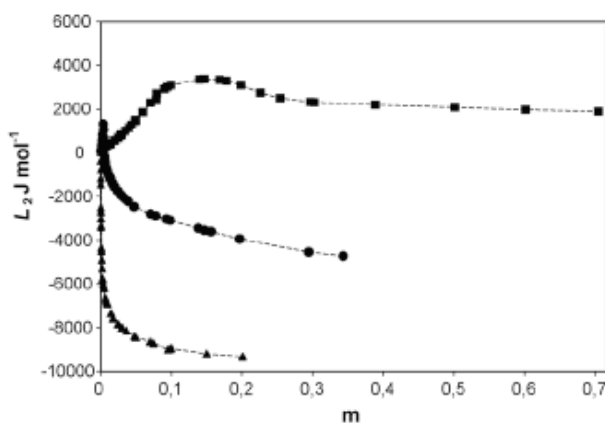
$m_i$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$m_f$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$\Delta H_d$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{\phi,i}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{\phi,f}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{2,i}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{2,f}$ (J mol <sup>-1</sup> )
0.00060	0.00029	2741.61	-2936	50	-2682	34
0.00070	0.00033	2336.13	-3081	-729	-2691	-355
0.00080	0.00038	2245.83	-3131	-1532	-3002	-756
0.00090	0.00043	2206.90	-3206	-2373	-3383	-1176
0.00100	0.00046	1894.68	-3281	-2882	-3328	-1434
0.00125	0.00058	1850.51	-3341	-2931	-4348	-2497
0.00150	0.00069	1773.28	-3551	-3071	-4463	-2690
0.00201	0.00094	1485.16	-3731	-3231	-4875	-3390
0.00301	0.00151	1247.94	-4001	-3561	-5738	-4490
0.00501	0.00252	885.01	-4431	-3901	-6175	-5290
0.00700	0.00347	857.27	-4781	-4101	-6647	-5790
0.00800	0.00400	767.50	-4981	-4231	-6758	-5990
0.01002	0.00501	717.08	-5481	-4441	-6907	-6190
0.01804	0.00915	742.90	-5881	-5131	-7583	-6840
0.03009	0.01497	657.94	-6381	-5641	-7998	-7340
0.04990	0.02478	598.60	-6881	-6231	-8439	-7840
0.07506	0.03667	576.54	-7031	-6581	-8713	-8140
0.09992	0.04850	559.32	-7281	-6861	-8949	-8390
0.15047	0.06985	558.91	-7431	-7031	-9199	-8640
0.20080	0.09571	366.98	-7451	-7231	-9327	-8990



**Figura 4.** Entalpie molari apparenti (simboli vuoti) e parziali (simboli pieni) del  $C_{12}DGCB$  (diamanti blu) e del  $C_{16}DGCB$  (quadrati rossi) in funzione della molalità del tensioattivo,  $m$ .



**Figura 5.** Entalpie molari apparenti dei tensioattivi  $C_8AGCB$  (quadrati vuoti), del  $C_{12}AGCB$  (cerchi vuoti) e del  $C_{16}AGCB$  (triangoli vuoti) in funzione della molalità del tensioattivo,  $m$ .



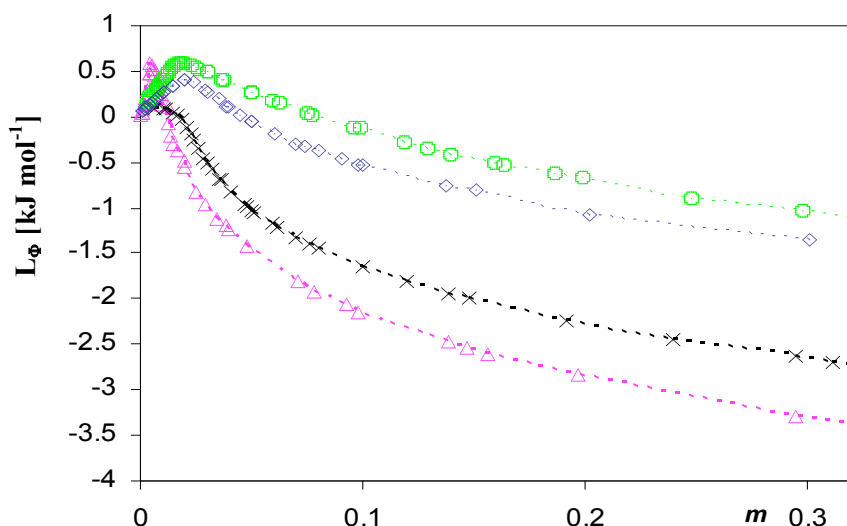
**Figura 6.** Entalpie molari parziali del  $C_8AGCB$  (quadrati pieni), del  $C_{12}AGCB$  (cerchi pieni) e del  $C_{16}AGCB$  (triangoli pieni) in funzione della molalità del tensioattivo,  $m$ .

Lo studio delle proprietà termodinamiche delle soluzioni acquose dei tensioattivi glucocationici C<sub>12</sub>DGCB e C<sub>16</sub>DGCB, mai riportate in letteratura, e il loro confronto con i dati ottenuti dai corrispondenti composti acetilati C<sub>12</sub>AGCB e C<sub>16</sub>AGCB ha permesso di valutare il contributo dato dall'acetilazione dei gruppi ossidrilici della porzione glucosilica al processo di micellizzazione [57-59].

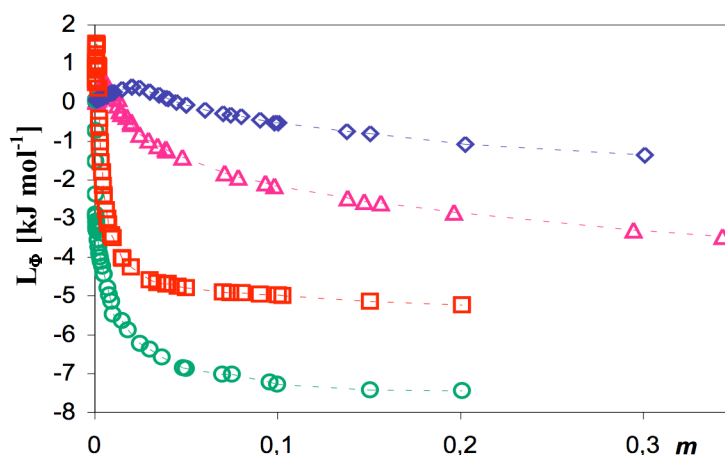
In Figura 4, le curve delle entalpie molari apparenti e parziali *vs.* *m* a 298 K sono confrontate per le diverse lunghezze di catena. Gli andamenti generali sono in accordo con quelli dei tensioattivi ionici: le curve, dopo l'aumento nella regione premicellare, tendono a livellarsi a concentrazioni sopra la cmc, dove sono pressoché parallele. L'abbassamento delle curve nella regione micellare è proporzionale al numero di atomi di carbonio della catena alchilica, come atteso.

Gli andamenti delle entalpie molari apparenti e parziali *vs.* *m*, quando confrontati con quelli di DTAB (dodeciltrimetilammonio bromuro) [60] e DEDAB (dodecildimetilettilammonio bromuro) [61] (Figura 7) suggeriscono che la sostituzione di un gruppo metilico con un gruppo voluminoso (2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosil)etilico aumenta l'idrofobicità del composto e, come conseguenza, abbassa il valore della cmc. Di contro, il gruppo disacetilato (β-D-glucopiranosil)etilico abbassa l'idrofobicità ad un livello simile a quella del DEDAB.

L'effetto della sostituzione del gruppo metilico legato all'azoto carico positivamente del DTAB da parte di un gruppo (β-D-glucopiranosil)etilico porta ad un aumento di circa 1.3 kJ mol<sup>-1</sup> nel valore di plateau delle entalpie molari apparenti *vs.* *m*, confermando la diminuzione nell'idrofobicità globale della molecola. Questo comportamento, evidenziato dal confronto con il DTAB e con il DEDAB, sembra essere il risultato di due diversi contributi. Da una parte la sostituzione di un metile legato all'azoto con un'etile, come si verifica nel passaggio da DTAB a DEDAB, porta (vedi Figura 7) ad un aumento nella regione di plateau di circa 1.6 kJ mol<sup>-1</sup>, come accade nel caso della rimozione di un metilene dalla catena idrofobica. Dall'altra, l'effetto totale del gruppo β-D-glucopiranosilico è di abbassare il plateau di -0.3 kJ mol<sup>-1</sup>. Avendo valutato in precedenza [59] che l'effetto totale del 2, 3, 4, 6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosile è quello di abbassare il plateau di -2.2 kJ mol<sup>-1</sup>, è stato possibile risalire all'effetto dell'acetilazione dei quattro gruppi OH sulla porzione zuccherina, che è di -1.9 kJ mol<sup>-1</sup>. Questo effetto è sottolineato in Figura 8, in cui è enfatizzato l'effetto dell'acetilazione sulle entalpie molari apparenti *vs.* *m*.



**Figura 7.** Entalpie relative molari apparenti del C<sub>12</sub>DGCB (diamanti blu), del C<sub>12</sub>AGCB (triangoli rosa), del DEDAB (cerchi verdi) e del DTAB (stelle nere) in funzione della molalità del tensioattivo,  $m$ .



**Figura 8.** Effetto dell'acetilazione dei gruppi ossidrilici: entalpie relative molari apparenti del C<sub>12</sub>DGCB (diamanti blu), del C<sub>12</sub>AGCB (triangoli rosa), del C<sub>16</sub>DGCB (quadrati rossi) e del C<sub>16</sub>AGCB (cerchi verdi) in funzione della molalità del tensioattivo,  $m$ .

Per ottenere la variazione di entalpia alla micellizzazione è stato applicato un modello di transizione di pseudo-fase, in cui il processo di aggregazione è considerato come una fase di transizione che avviene all'equilibrio. In questo modello è assunto che, alla cmc, le proprietà molari parziali presentano una discontinuità dovuta alla formazione di una pseudo-fase. I parametri di micellizzazione sono stati ottenuti per estrapolazione alla cmc degli andamenti delle proprietà molari parziali prima e dopo la cmc [62,59,61,5-7], insieme ai valori delle cmc calcolati per via conduttimetrica, e sono riportati in Tabella 18.

Il contributo di gruppo per il metilene ha un valore di  $-1.3 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ gruppo}^{-1}$ , in accordo con quanto ottenuto per i composti acetilati (Tabella 18) e per altri tensioattivi, come per esempio il 3-((alchilcarbonil)amino)-4-idrossibenzoato di potassio ( $-1.4 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ gruppo}^{-1}$ ) [63] e i sali di potassio degli acidi  $p$ - $n$ -alchilbenzoici [64]. Inoltre, dai valori di  $\Delta H_m$  dei C <sub>$n$</sub> DGCB e dei C <sub>$n$</sub> AGCB presenti in Tabella 18, risulta che l'acetilazione dei gruppi idrossilici sullo zucchero diminuisce la variazione dell'entalpia di micellizzazione di circa  $-1.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

### *Volumi e compressibilità adiabatiche*

Le densità sperimentali, le velocità del suono e i dati ottenuti dalle equazioni (3)-(5) [34, 61,65,68-70] sono riportate nelle Tabelle 6-17.

**Tabella 6.** Densità ( $d$ ), volume molare apparente ( $V_{\Phi}$ ) in funzione della molalità ( $m$ ), del tensioattivo C<sub>8</sub>AGCB, in acqua a 298 K.

$m$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$d$ (g cm <sup>-3</sup> )	$V_{\Phi}$ (cm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )
0.00125	0.997199	488.83
0.02001	0.999513	488.95
0.03502	1.001325	489.23
0.05002	1.003100	489.56
0.06499	1.004811	490.32
0.07504	1.005934	490.80
0.08505	1.007024	491.40
0.10007	1.008684	491.81
0.15011	1.013920	492.92
0.25036	1.023800	493.61
0.29699	1.028098	493.80
0.38938	1.036239	493.70
0.50117	1.045245	493.75
0.60161	1.049755	493.81
0.70488	1.059597	494.00

**Tabella 7.** Velocità del suono ( $U$ ), coefficiente di compressibilità adiabatica ( $\beta_s$ ), compressibilità isoentropiche ( $K_{s,\phi}$ ) in funzione della molalità ( $m$ ), del tensioattivo C<sub>8</sub>DGCB, in acqua a 298 K.

$m$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$u$ (m s <sup>-1</sup> )	$10^5 \beta_s$ (bar <sup>-1</sup> )	$K_{s,\phi}$ (cm <sup>3</sup> bar <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
0.01001	1498.87	4.4589	0.004223
0.02001	1500.71	4.4424	0.004736
0.03502	1503.34	4.4189	0.005162
0.05002	1505.78	4.3968	0.005578
0.06499	1507.92	4.3768	0.006139
0.07504	1509.22	4.3644	0.006481
0.08505	1510.39	4.3527	0.006818
0.10007	1511.86	4.3373	0.007412
0.15011	1515.49	4.2943	0.009018
0.20003	1517.96	4.2596	0.010178
0.25001	1519.91	4.2295	0.011033
0.29990	1521.62	4.2017	0.011638
0.35039	1523.17	4.1760	0.012271
0.40035	1524.64	4.1515	0.012475
0.44513	1525.60	4.1341	0.012489

**Tabella 8.** Densità ( $d$ ), volume molare apparente ( $V_\Phi$ ) in funzione della molalità ( $m$ ), del tensioattivo C<sub>12</sub>AGCB, in acqua a 298 K.

$m$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$d$ (g cm <sup>-3</sup> )	$V_\Phi$ (cm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )
0.20042	1.015641	566.72
0.15011	1.011430	566.50
0.10004	1.006970	565.90
0.08999	1.005975	565.72
0.07998	1.005056	565.31
0.07001	1.004106	565.16
0.06001	1.003145	564.88
0.05002	1.002175	564.50
0.05002	1.002179	564.44
0.04048	1.001231	564.20
0.03001	1.000198	563.40
0.02001	0.999179	562.30
0.01001	0.998164	560.30
0.00899	0.998024	560.14
0.00799	0.997916	560.05
0.00701	0.997808	560.10
0.00600	0.997697	560.22

**Tabella 9.** Velocità del suono ( $U$ ), coefficiente di compressibilità adiabatica ( $\beta_s$ ), compressibilità isoentropiche ( $K_{s,\phi}$ ) in funzione della molalità ( $m$ ), del tensioattivo C<sub>12</sub>DGCB, in acqua a 298 K.

$m$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$u$ (m s <sup>-1</sup> )	$10^5 \beta_s$ (bar <sup>-1</sup> )	$K_{s,\phi}$ (cm <sup>3</sup> bar <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
0.00100	1497.34	4.4731	-0.009841
0.00200	1497.59	4.4711	-0.002593
0.00300	1497.82	4.4692	0.000140
0.00400	1497.99	4.4677	0.002577
0.00500	1498.10	4.4665	0.004709
0.00600	1498.13	4.4658	0.006914
0.00701	1498.15	4.4652	0.008634
0.00799	1498.17	4.4646	0.009896
0.00899	1498.18	4.4641	0.010970
0.01001	1498.19	4.4634	0.012114
0.02001	1498.27	4.4584	0.015903
0.03001	1498.46	4.4527	0.017072
0.04048	1498.63	4.4471	0.017770
0.05002	1498.76	4.4421	0.018180
0.05002	1498.77	4.4421	0.018138
0.06001	1498.92	4.4369	0.018439
0.07001	1499.07	4.4318	0.018634
0.07998	1499.21	4.4267	0.018782
0.08999	1499.36	4.4218	0.018918
0.10004	1499.49	4.4167	0.018963
0.10018	1499.65	4.4172	0.019166
0.15011	1500.18	4.3932	0.019297
0.20042	1500.82	4.3712	0.019503

**Tabella 10.** Densità ( $d$ ), volume molare apparente ( $V_\phi$ ) in funzione della molalità ( $m$ ), del tensioattivo C<sub>16</sub>AGCB, in acqua a 298 K.

$m$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$d$ (g cm <sup>-3</sup> )	$V_\phi$ (cm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )
0.01002	0.998003	629.93
0.01804	0.998731	631.76
0.03009	0.999786	633.47
0.04990	1.001501	634.22
0.07501	1.003600	634.80
0.09992	1.005635	634.94
0.15047	1.009595	635.01
0.20080	1.013306	635.09

**Tabella 11.** Velocità del suono ( $U$ ), coefficiente di compressibilità adiabatica ( $\beta_s$ ), compressibilità isoentropiche ( $K_{s,\phi}$ ) in funzione della molalità ( $m$ ), del tensioattivo C<sub>16</sub>AGCB, in acqua a 298 K.

$m$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$u$ (m s <sup>-1</sup> )	$10^5 \beta_s$ (bar <sup>-1</sup> )	$K_{s,\phi}$ (cm <sup>3</sup> bar <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
0.00600	1497.29	4.4724	0.023859
0.00700	1497.30	4.4721	0.024363
0.00800	1497.35	4.4716	0.024461
0.00900	1497.35	4.4714	0.024841
0.01001	1497.41	4.4708	0.024750
0.02001	1497.65	4.4672	0.025664
0.03001	1497.87	4.4637	0.026026
0.04001	1498.08	4.4604	0.026225
0.05004	1498.29	4.4571	0.026349
0.06004	1498.51	4.4538	0.026419
0.07001	1498.69	4.4507	0.026501
0.08003	1498.85	4.4479	0.026582
0.09003	1499.01	4.4450	0.026639
0.10006	1499.18	4.4421	0.026682
0.15016	1500.06	4.4279	0.026788
0.19992	1500.84	4.4150	0.026872
0.25000	1501.62	4.4025	0.026911
0.30039	1502.34	4.3910	0.026952

**Tabella 12.** Molalità ( $m$ ), entalpie di diluizione ( $\Delta H_d$ ), entalpie molari apparenti ( $L_\phi$ ), e parziali ( $L_2$ ), del tensioattivo C<sub>12</sub>DGCB, in acqua a 298 K.

$m_i$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$m_f$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$\Delta H_d$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{\phi,i}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{\phi,f}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{2,i}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{2,f}$ (J mol <sup>-1</sup> )
0.00200	0.00100	-9.0	89	61	139	9
0.00301	0.00148	-44.4	113	75	182	116
0.00401	0.00199	-57.6	135	89	223	138
0.00501	0.00249	-54.6	157	101	266	160
0.00600	0.00299	-55.2	179	112	309	181
0.00702	0.00337	-60.9	201	121	354	197
0.00809	0.00387	-122.8	224	132	404	217
0.00910	0.00437	-121.1	247	143	453	238
0.01002	0.00491	-90.3	268	155	498	261
0.01505	0.00740	-134.8	344	209	580	360
0.02004	0.01030	-130.7	405	274	380	500
0.03008	0.01498	72.4	268	340	-180	580
0.04005	0.02002	305.9	100	400	-540	380
0.05014	0.02421	406.9	-60	375	-830	100
0.06024	0.02965	449.4	-190	290	-1030	-160
0.07021	0.03495	481.6	-292	190	-1180	-360
0.08025	0.03860	477.0	-362	115	-1300	-490
0.09027	0.04464	472.6	-463	10	-1460	-670
0.10036	0.04984	489.0	-530	-60	-1500	-830
0.15066	0.07444	491.9	-811	-320	-1790	-1240
0.20250	0.09820	563.5	-1084	-520	-2030	-1490
0.30078	0.13791	611.9	-1362	-750	-2360	-1750

**Tabella 13.** Molalità ( $m$ ), entalpie di diluizione ( $\Delta H_d$ ), entalpie molari apparenti ( $L_\phi$ ), e parziali ( $L_2$ ), del tensioattivo C<sub>16</sub>DGCB, in acqua a 298 K.

$m_i$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$m_f$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$\Delta H_d$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{\phi,i}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{\phi,f}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{2,i}$ (J mol <sup>-1</sup> )	$L_{2,f}$ (J mol <sup>-1</sup> )
0.00050	0.00025	-367.2	893	504	1400	940
0.00050	0.00025	-382.2	894	506	1400	940
0.00060	0.00029	-450.4	1034	572	1700	1000
0.00060	0.00030	-483.3	1035	590	1700	1000
0.00090	0.00046	-584.4	1407	828	2550	1350
0.00101	0.00051	-608.6	1521	904	2590	1400
0.00150	0.00076	285.2	952	1238	-500	2150
0.00150	0.00076	290.9	954	1245	-500	2150
0.00201	0.00099	1088.4	920	1508	-3050	2590
0.00251	0.00123	1897.8	-418	1480	-4000	1700
0.00301	0.00155	1970.6	-1021	950	-4150	-1000
0.00401	0.00201	2150.9	-1801	350	-4350	-3000
0.00500	0.00250	1799.0	-2399	-600	-4490	-4000
0.00601	0.00293	1590.7	-2770	-1180	-4610	-4130
0.00702	0.00350	1450.7	-3001	-1550	-4700	-4250
0.00903	0.00448	1268.8	-3419	-2150	-4840	-4420
0.01002	0.00497	1081.1	-3506	-2425	-4900	-4490
0.01508	0.00748	902.1	-4042	-3140	-5115	-4740
0.03006	0.01473	580.6	-4591	-4010	-5260	-5105
0.04017	0.01975	425.2	-4685	-4260	-5260	-5220
0.07034	0.03439	247.7	-4908	-4660	-5275	-5260
0.08048	0.03927	219.2	-4919	-4700	-5280	-5260
0.09030	0.04526	199.8	-4955	-4755	-5300	-5265
0.10033	0.04995	188.5	-4973	-4785	-5310	-5270
0.15057	0.07441	215.0	-5135	-4920	-5390	-5280
0.20083	0.10287	249.0	-5239	-4990	-5470	-5310

**Tabella 14.** Densità ( $d$ ), volume molare apparente ( $V_\phi$ ) in funzione della molalità ( $m$ ), del tensioattivo C<sub>12</sub>DGCB, in acqua a 298 K.

$m$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$d$ (g cm <sup>-3</sup> )	$V_\phi$ (cm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )
0.00803	0.997835	402.57
0.00902	0.997936	402.12
0.02004	0.999014	402.27
0.03008	0.999883	404.86
0.04005	1.000852	405.77
0.05014	1.001710	406.47
0.06024	1.002616	406.67
0.07021	1.003494	406.93
0.08025	1.004368	407.19
0.09027	1.005239	407.32
0.10036	1.006102	407.49
0.15066	1.010311	407.98
0.20250	1.014325	408.06
0.30078	1.021964	408.44

**Tabella 15.** Velocità del suono ( $U$ ), coefficiente di compressibilità adiabatica ( $\beta_s$ ), compressibilità isoentropiche ( $K_{s,\phi}$ ) in funzione della molalità ( $m$ ), del tensioattivo C<sub>12</sub>DGCB, in acqua a 298 K.

$m$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$u$ (m s <sup>-1</sup> )	$10^5 \beta_s$ (bar <sup>-1</sup> )	$K_{s,\phi}$ (cm <sup>3</sup> bar <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
0.00902	1499.48	4.4566	-0.003634
0.01001	1499.72	4.4548	-0.003561
0.01502	1500.99	4.4450	-0.003110
0.02002	1502.16	4.4358	-0.002535
0.02002	1502.25	4.4356	-0.002523
0.02513	1502.77	4.4301	-0.000662
0.03003	1503.10	4.4262	0.001057
0.03004	1503.36	4.4250	0.000803
0.03511	1503.45	4.4220	0.002274
0.04004	1504.06	4.4170	0.003099
0.05011	1504.72	4.4093	0.004563
0.06018	1505.19	4.4026	0.005667
0.07017	1505.69	4.3959	0.006431
0.08033	1506.22	4.3889	0.006997
0.09009	1506.76	4.3821	0.007403
0.10010	1507.20	4.3758	0.007787
0.12040	1508.54	4.3605	0.008149
0.13999	1509.64	4.3473	0.008525
0.15993	1510.76	4.3339	0.008791
0.18112	1511.98	4.3201	0.009040
0.20053	1512.98	4.3085	0.009283

**Tabella 16.** Densità ( $d$ ), volume molare apparente ( $V_\Phi$ ) in funzione della molalità ( $m$ ), del tensioattivo C<sub>16</sub>DGCB, in acqua a 298 K.

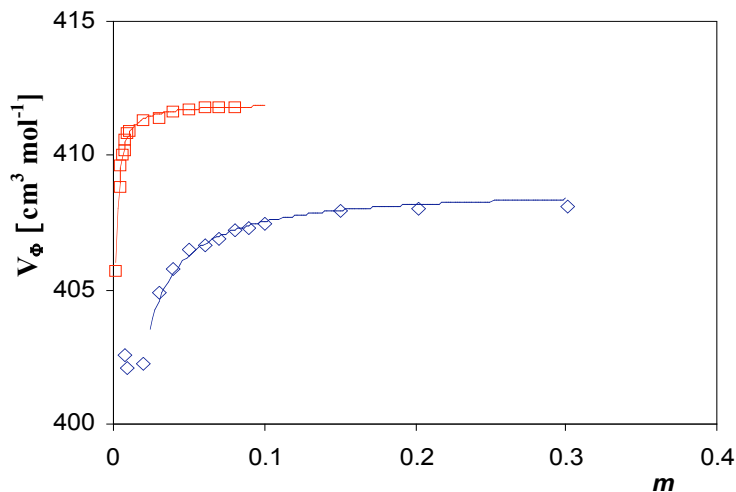
$m$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$d$ (g cm <sup>-3</sup> )	$V_\Phi$ (cm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )
0.00200	0.997236	460.69
0.00401	0.997416	463.83
0.00501	0.997505	464.61
0.00601	0.997595	465.06
0.00702	0.997687	465.20
0.00802	0.997776	465.58
0.00900	0.997864	465.81
0.01002	0.997956	465.88
0.02003	0.998855	466.30
0.03004	0.999746	466.40
0.04008	1.000626	466.60
0.05016	1.001501	466.71
0.06013	1.002359	466.79
0.07011	1.003212	466.82
0.08084	1.004124	466.81

**Tabella 17.** Velocità del suono ( $U$ ), coefficiente di compressibilità adiabatica ( $\beta_s$ ), compressibilità isoentropiche ( $K_{s,\phi}$ ) in funzione della molalità ( $m$ ), del tensioattivo C<sub>16</sub>DGCB, in acqua a 298 K.

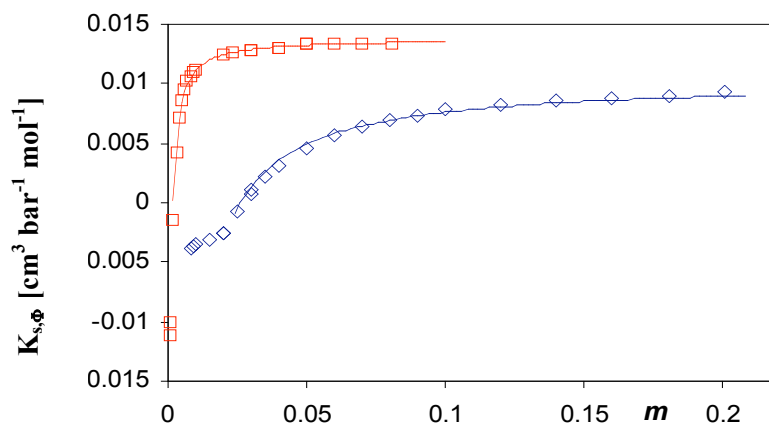
$m$ (mol kg <sup>-1</sup> )	$u$ (m s <sup>-1</sup> )	$10^5 \beta_s$ (bar <sup>-1</sup> )	$K_{s,\phi}$ (cm <sup>3</sup> bar <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )
0.00090	1497.36	4.4730	-0.009970
0.00100	1497.34	4.4730	-0.011167
0.00200	1497.48	4.4718	-0.001427
0.00301	1497.51	4.4712	0.004231
0.00401	1497.51	4.4708	0.007216
0.00501	1497.60	4.4699	0.008569
0.00601	1497.64	4.4692	0.009545
0.00702	1497.68	4.4686	0.010235
0.00802	1497.74	4.4678	0.010620
0.00900	1497.80	4.4671	0.010903
0.01002	1497.86	4.4663	0.011120
0.02003	1498.36	4.4592	0.012375
0.02306	1498.56	4.4568	0.012605
0.03004	1498.93	4.4519	0.012719
0.03018	1498.96	4.4516	0.012757
0.04002	1499.46	4.4448	0.013010
0.04008	1499.44	4.4450	0.013011
0.05005	1499.88	4.4385	0.013301
0.05016	1499.82	4.4388	0.013299
0.06013	1500.40	4.4316	0.013291
0.07011	1500.94	4.4246	0.013312
0.08084	1501.45	4.4176	0.013397

Nelle Figure 9-12 sono rappresentati rispettivamente i volumi molari apparenti e le compressibilità isoentropiche in funzione di  $m$ . Gli andamenti sono simili, con un brusco aumento alla cmc che termina in un plateau nella regione micellare. Come sottolineato nella sezione sperimentale, i volumi molari apparenti sono stati ottenuti dalla misura della frequenza di oscillazione, con la più alta accuratezza, di un tubo di vetro ad U riempito con la soluzione a concentrazione nota. Un tale grado di accuratezza è richiesto in particolare quando si misurano soluzioni diluite, cioè quando si esplora la regione premicellare. Come già sottolineato per i composti acetilati [59], anche per i composti in studio abbiamo incontrato difficoltà nell'ottenere dati riproducibili conformi ai nostri standard sperimentali. Pensiamo che questo sia dovuto alla forte tendenza di questi tensioattivi ad adsorbirsi sulle superfici di vetro. I dati qui riportati sono stati ottenuti da soluzioni preparate di fresco per pesata (non per diluizione di una soluzione più concentrata), dopo aver lavato con attenzione il tubo a U. Inoltre, il valore di cmc molto basso del C<sub>16</sub>AGCB non ha permesso lo studio nella regione premicellare.

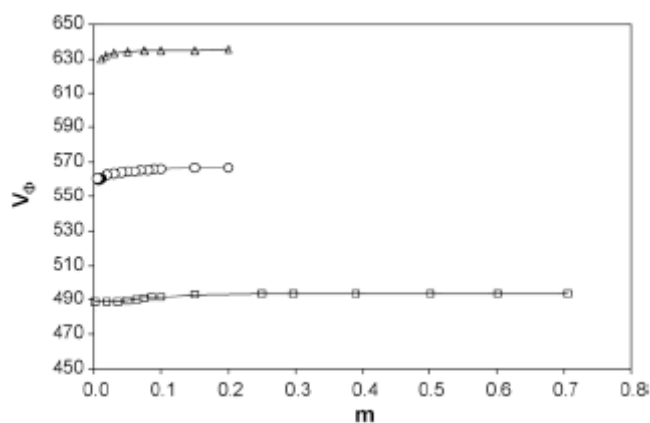
Il buon accordo tra dati sperimentali e calcolati è mostrato nelle Figure 9-12, in cui la linea continua rappresenta la funzione calcolata.



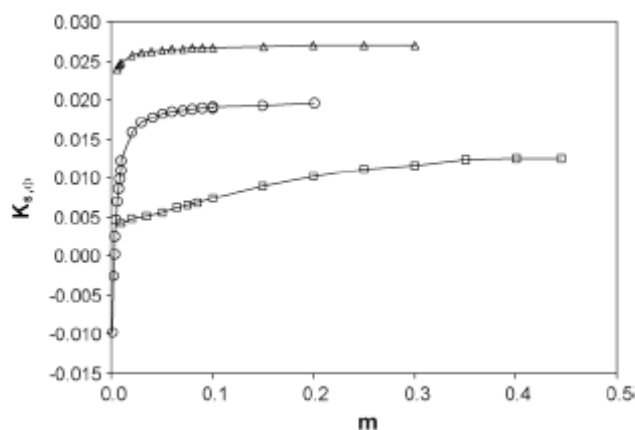
**Figura 9.** Volumi molari apparenti del C<sub>12</sub>DGCB (diamanti blu) e del C<sub>16</sub>DGCB (quadrati rossi) in funzione della molalità del tensioattivo,  $m$ . Sono anche inclusi i risultati derivanti dal fit dei dati sperimentali dall'Eq. (6) (linea solida). Per il C<sub>16</sub>DGCB i volumi sono riportati come ( $V_\phi - 55$ ) per confrontare meglio i due andamenti.



**Figura 10.** Compressibilità isoentropiche molari apparenti del C<sub>12</sub>DGCB (diamanti blu) e del C<sub>16</sub>DGCB (quadrati rossi) in funzione della molalità del tensioattivo,  $m$ . Sono anche inclusi i risultati derivanti dal fit dei dati sperimentali dall'eq. (6) (linea solida).



**Figura 11** Volumi molari apparenti del C<sub>8</sub>AGCB (quadrati vuoti), del C<sub>12</sub>AGCB (cerchi) e del C<sub>16</sub>AGCB, (triangoli) in funzione della molalità del tensioattivo,  $m$ .



**Figura 12** Compressibilità isoentropiche molari apparenti del C<sub>8</sub>AGCB (quadrati), del C<sub>12</sub>AGCB (cerchi) e del C<sub>16</sub>AGCB (triangoli) in funzione della molalità del tensioattivo,  $m$ .

Le menzionate difficoltà, sia nel misurare accuratamente i volumi e le compressibilità a basse concentrazioni che nel determinare i valori di cmc, non permettono una valutazione molto precisa dei cambiamenti delle proprietà volumetriche alla micellizzazione e quindi i dati riportati in Tabella 18 necessitano di qualche commento. I valori dei volumi molari apparenti in fase micellare ( $V_{\phi,m}$ ) differiscono di circa  $17 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  per gruppo  $-\text{CH}_2-$ . Il contributo del  $-\text{CH}_2-$  ottenuto nella regione micellare è comparabile con quello ottenuto per tensioattivi cationici di tipo piridinico o nicotinamidico [6] e indipendente dal grande ingombro sterico sulla testa polare. Per il C<sub>8</sub>AGCB, utilizzando la cmc termodinamica nella Tabella 18, dalle Eq. (6) e (7) sono stati determinati il valore dei volumi apparenti alla cmc,  $V_{\phi,cmc}$  ( $489.2 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ) e il cambio di volume alla micellizzazione,  $\Delta V_m$  ( $5.2 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ), un valore accettabile per un tensioattivo con una corta catena.

Per il C<sub>12</sub>AGCB un cambiamento nel volume alla micellizzazione di  $7.2 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  può essere ottenuto dallo stesso modello, se si assume che la cmc sia simile a quella del DEDAB e del DTAB. Questo valore è in accordo con l'andamento di  $V_{\phi}$  vs  $m$  e con il valore che possiamo ottenere applicando il contributo di gruppo per il metilene, riportato per gli alchiltrimetilammonio bromuri nel rif. [71] ( $0.5 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  gruppo<sup>-1</sup>). Assumendo lo stesso contributo di gruppo, è possibile valutare per il C<sub>16</sub>AGCB,  $\Delta V_m = 9.2 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  e, sottraendo questo valore a  $V_{\phi,m}$ ,  $V_{\phi,cmc} = 626.0 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ . Anche i parametri di compressibilità ricavati dalle Eq. (8) e (9) per il C<sub>8</sub>AGCB e il C<sub>12</sub>AGCB sono riportati in Tabella 18. Va notato che i valori calcolati e

quelli sperimentali ricavati dall' Eq. (6) non si accordano bene per il C<sub>8</sub>AGCB nella regione prima del valore di plateau, probabilmente a causa dell'ampio intervallo di concentrazioni a cui ha luogo la transizione micellare per i tensioattivi a corta catena, per i quali un modello ad azione di massa è probabilmente più appropriato. Per il C<sub>16</sub>AGCB,  $K_{s,cmc}$  è stata valutata utilizzando il contributo di gruppo ottenuto confrontando il C<sub>8</sub>AGCB ed il C<sub>12</sub>AGCB, mentre  $\Delta K_{s,cmc}$  è stata calcolata dalla differenza tra  $K_{s,m}$  (sperimentale) e  $K_{s,cmc}$ . I valori di  $K_{s,m}$  e  $\Delta K_{s,m}$  così ottenuti sono ben correlati con il numero di atomi di carbonio nella catena alchilica. Il contributo di gruppo risulta di  $1.3 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1} -\text{CH}_2^{-1}$  nella fase micellare e  $1.9 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1} -\text{CH}_2^{-1}$  per il cambiamento della compressibilità molare adiabatica alle micellizzazione, che è un valore più grande di  $1.5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ , riportato nel rif. [66] per gli alchiltrimetilammonio bromuri. Infatti, come conseguenza della formazione di micelle, la rottura della cavità rigida che ospita la parte idrofobica della molecola, insieme con la riduzione dell'elettrostrizione dovuta al legame dei controioni alla micella, porta a una maggiore variazione di volume per effetto della pressione.

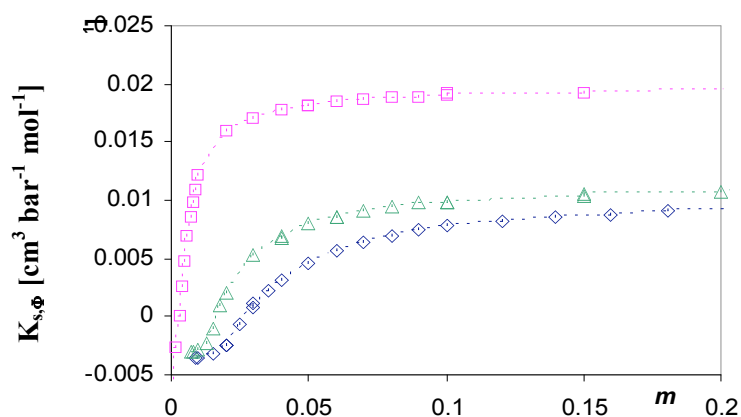
Il confronto dei volumi di C<sub>12</sub>AGCB con quelli del DEDAB e del DTAB ci permette di ricavare il volume del gruppo (2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)etile. La sostituzione di un metile con questo gruppo ingombrante causa un aumento nel volume della molecola, sia come monomero che in fase micellare, di  $272 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ . Utilizzando il volume del gruppo metilico che compare nel rif. [72] ( $19.06 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ ) il volume di tutti i sostituenti risulta di  $291 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ . Dal confronto con il DEDAB si ricava che la sostituzione di un idrogeno da parte del gruppo 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilico provoca un aumento nel volume di  $257 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ .

I valori dei volumi molari apparenti in fase micellare,  $V_{\phi,m}$ , (Tabella 18) del C<sub>12</sub>DGCB e del C<sub>16</sub>DGCB mostrano una differenza di circa  $14.5 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  per  $-\text{CH}_2-$ , un contributo di gruppo comparabile a quello ottenuto per altre classi di tensioattivi cationici [8]. I cambiamenti nel volume alla micellizzazione sono stati ottenuti dall'Eq. (6), usando il valore della cmc ottenuto da misure conduttimetriche. I  $\Delta V_m$  risultano essere di  $6.0 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  per il C<sub>12</sub>DGCB e di  $8.3 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  per il C<sub>16</sub>DGCB, con un contributo di gruppo di  $0.57 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  per  $-\text{CH}_2-$ , comparabile con quello degli alchiltrimetilammonio bromuri nel rif. [47] ( $0.5 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$  gruppo<sup>-1</sup>). I parametri di compressibilità ottenuti sempre dalle Equazioni (6) e (7) per il C<sub>12</sub>DGCB ed il C<sub>16</sub>DGCB sono riportati in Tabella 18. I valori delle compressibilità molari apparenti allo stato micellare,  $K_{s,\phi,m}$ , per i composti in studio sono alti e positivi. Il contributo di gruppo del  $-\text{CH}_2-$  in fase micellare è di  $+9 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  e risulta simile a quanto riportato nel rif [34] ( $+9.4 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1} -\text{CH}_2^{-1}$ ), nel rif. [48] ( $0.97 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) e per alcuni tensioattivi gemini propanedil- $\alpha,\omega$ -bis(dimetilalchilammonio bromuri) ( $1.15 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) [70].

Quando il tensioattivo è come monomero in soluzione, dai valori di  $K_{s,\phi,cmc}$ , ottenuti dall'Eq. (5), si ottiene un contributo negativo per le compressibilità molari apparenti per ogni gruppo  $-\text{CH}_2-$  ( $-7 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1} -\text{CH}_2^{-1}$ ), in accordo con quanto derivato dai dati riportati in rif. [49] per gli alchiltrimetilammonio bromuri, ma più elevato di quanto riportato da Dawson [73] e Fukada [74]. E', infatti, generalmente accettato che a temperatura ambiente il contributo di gruppo del  $-\text{CH}_2-$  sulla compressibilità molare è negativo e piuttosto piccolo. Questo è dovuto al bilancio tra il contributo negativo dovuto

all'aumento della densità delle molecole di acqua intorno alla cavità e il contributo positivo della cavità stessa. Per il cambiamento nella compressibilità molare adiabatica alla micellizzazione è stato ottenuto un valore di  $1.6 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1} - \text{CH}_2^{-1}$ , confrontabile con il valore di  $1.5 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ bar}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ , riportato nel rif. [66] per gli alchiltrimetilammonio bromuri.

Il confronto dei volumi del  $\text{C}_{12}\text{DGCB}$  con quelli del DTAB e del DEDAB permette di calcolare il volume occupato dal gruppo ( $\beta$ -D-glucopiranosil)etile. La sostituzione del metile del DTAB con questo gruppo provoca un aumento nel volume della molecola, sia come monomero che in fase micellare, di  $114 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ . Per avere il volume dell'intero sostituente si deve però aggiungere a questo valore il volume del gruppo metilico presente nel riferimento [51], di  $19.06 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ , e si ottiene  $133 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ . Invece, dal confronto con il DEDAB, la sostituzione di un idrogeno del gruppo etile con il gruppo  $\beta$ -D-glucopiranosil provoca un aumento di volume di  $99 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ . Inoltre, l'acetilazione della porzione zuccherina, in aggiunta ad un grande cambiamento nel volume, porta ad un alto aumento della compressibilità della molecola, come mostrato in Figura 13, in cui gli andamenti del composto dodecilico acetilato e disacetilato sono riportati in confronto con il DEDAB.



**Figura 13.** Compressibilità isoentropiche molari apparenti del  $\text{C}_{12}\text{DGCB}$  (diamanti blu), del  $\text{C}_{16}\text{AGCB}$  (quadrati rosa) e del DEDAB (triangoli verdi) in funzione della molalità del tensioattivo,  $m$ .

**Tabella 18**

	C <sub>12</sub> DGCB	C <sub>16</sub> DGCB	C <sub>12</sub> AGCB <sup>1</sup>	C <sub>16</sub> AGCB <sup>1</sup>	DTAB <sup>2</sup>	DEDAB <sup>2</sup>
cmc mmol l <sup>-1</sup>	21.3 <sup>3</sup>	1.42 <sup>3</sup>	5.48 <sup>3</sup>	1.25 <sup>3</sup>	15.1	14
$\beta$	0,71 <sup>3</sup>	0,7 <sup>3</sup>	0.47 <sup>3</sup>	0.56 <sup>3</sup>	0.68	0.05
$\Delta H_m$ kJ mol <sup>-1</sup>	-2.2	-7.3	-3.6	-8.8	Da -8 a -1.5	-2.1
$V_{\phi,cmc}$ cm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup>	402.85	458.06	559.60	626.00	288.20	302.80
$V_{\phi,m}$ cm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup>	408.85	466.96	566.80	635.20	294.80	309.40
$\Delta V_m$ cm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup>	6.0	8.3	7.2	9.2	6.6	0.25
$K_{s,\phi,cmc}$ bar <sup>-1</sup> cm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup>	-0.00236	-0.00527	0.00039	-0.00207	-0.0024	-0.00199
$K_{s,\phi,m}$ bar <sup>-1</sup> cm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup>	0.01030	0.01379	0.01978	0.02381	0.0112	0.01173
$\Delta K_{s,m}$ bar <sup>-1</sup> cm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup>	0.01266	0.019063	0.01939	0.025883	0.0136	0.01372

<sup>1</sup>rif. 59

<sup>2</sup>rif.61 e riferimenti all'interno

<sup>3</sup>Da misure di conducibilità, vedi rif. 23

## Risultati DSC

Gli effetti del C<sub>16</sub>DGCB e del C<sub>16</sub>AGCB sulle transizioni di fase del DPPC sono mostrate nelle Figure 14 e 15, rispettivamente per il metodo 1 e 2,. Il C<sub>16</sub>DGCB abbassa la temperatura di pretransizione (T<sub>p</sub>) e alla concentrazione di 0.06 la annulla per entrambi i metodi (Tabella 19). Il C<sub>16</sub>AGCB annulla la pretransizione anche alla concentrazione più bassa.

**Tabella 19.** Temperature di pretransizione (T<sub>p</sub>) e temperature di transizione di fase (T<sub>m</sub>, T<sub>m</sub><sup>I</sup> e T<sub>m</sub><sup>II</sup>) da gel a cristallo liquido.

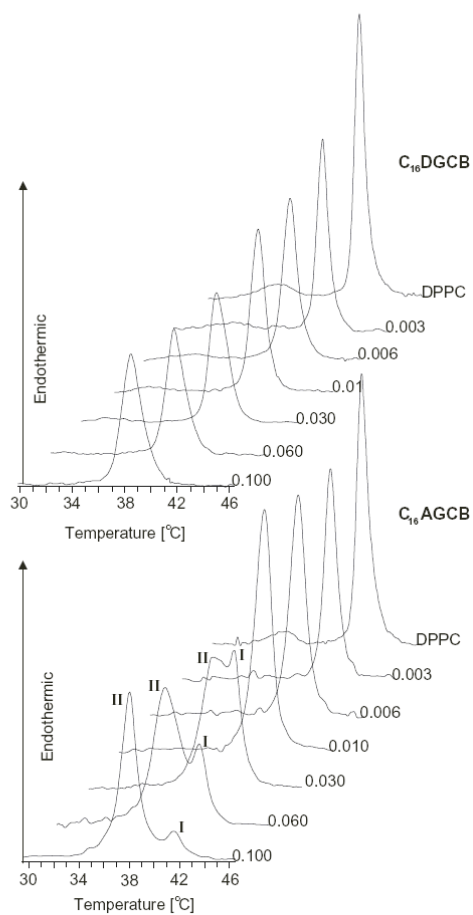
Metodo 1	T <sub>m</sub>	T <sub>p</sub>	Metodo 2		
			T <sub>m</sub>	T <sub>p</sub>	
°C					
DPPC	41.6	35.2	41.6	35.2	
n <sub>C16DGCB</sub> /n <sub>DPPC</sub>	0.003	41.3	34.5	41.0	34.4
	0.006	41.0	33.7	40.4	34.2
	0.010	40.7	32.4	40.0	31.6
	0.030	40.2	31.7	39.0	29.4
	0.060	39.3	-	37.4	-
	0.100	38.5	-	36.6	-
n <sub>C16AGCB</sub> /n <sub>DPPC</sub>	0.003	41.5	-	40.9	-
	0.006	41.4	-	40.9	-
	0.010	41.2	-	40.8	-
	0.030	41.2 (T <sub>m</sub> <sup>I</sup> ) 39.6 (T <sub>m</sub> <sup>II</sup> )	-	40.1	-
	0.060	41.0 (T <sub>m</sub> <sup>I</sup> ) 38.3 (T <sub>m</sub> <sup>II</sup> )	-	38.9	-
	0.100	41.6 (T <sub>m</sub> <sup>I</sup> ) 38.2 (T <sub>m</sub> <sup>II</sup> )	-	38.5	-

n<sub>C16DGCB</sub>/n<sub>DPPC</sub> – rapporto molare C<sub>16</sub>DGCB/DPPC

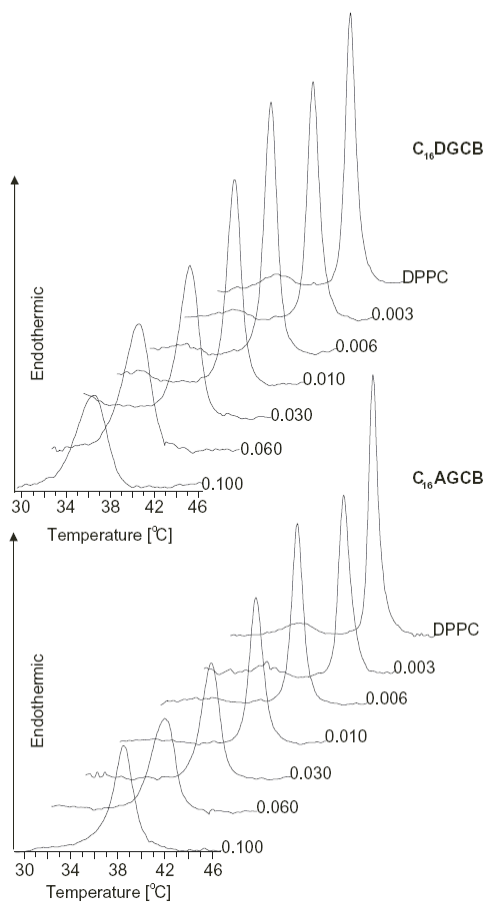
n<sub>C16AGCB</sub>/n<sub>DPPC</sub> - rapporto molare C<sub>16</sub>AGCB/DPPC

La fase principale di transizione si allarga e si sposta progressivamente verso temperature più basse all'aumentare della concentrazione dei tensioattivi studiati con entrambi i metodi. Il C<sub>16</sub>DGCB influisce sulla fase principale di transizione dei liposomi di DPPC in modo simile per entrambi i metodi, ma la sposta di più per il secondo metodo rispetto al primo. Il C<sub>16</sub>AGCB influisce sulla transizione per entrambi i metodi in modo differente. Nel caso del metodo 1, la fase principale di transizione è asimmetrica e divisa in due componenti a rapporti molari più alti di 0.03, mentre è quasi simmetrica per il secondo metodo. A differenza

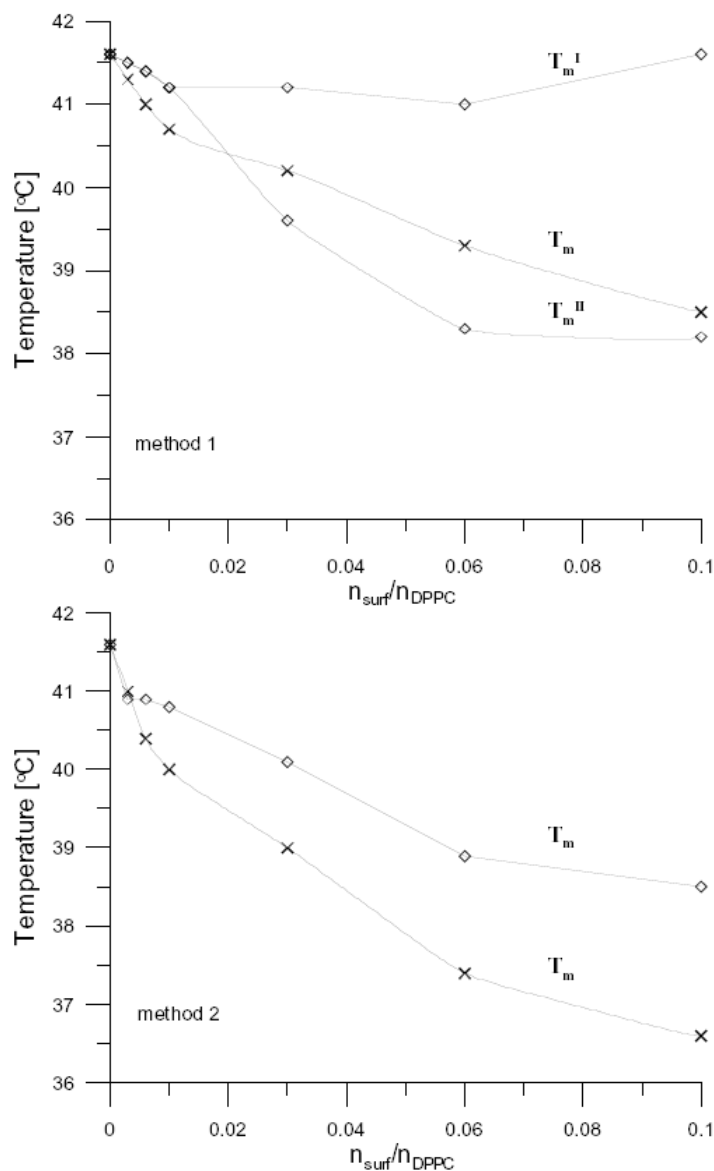
del  $C_{16}DGCB$ , il  $C_{16}AGCB$  diminuisce la temperatura della fase principale di transizione ( $T_m$ ) maggiormente nel primo metodo che nel secondo (Figura 16).



**Figura 14.** Curve calorimetriche al DSC delle MLVs in presenza di rapporti molari crescenti di  $C_{16}DGCB$  e  $C_{16}AGCB$  per il metodo 1. Le curve sono state normalizzate rispetto alla quantità di DPPC.



**Figura 15.** Curve calorimetriche al DSC delle MLVs in presenza di rapporti molari crescenti di  $C_{16}DGCB$  e  $C_{16}AGCB$  per il metodo 2. Le curve sono state normalizzate rispetto alla quantità di DPPC.



**Figura 16.** Temperature della fase di transizione ( $T_m$ ,  $T_m^I$ ,  $T_m^{II}$ ) da gel a liquido cristallino in funzione dei rapporti molari  $C_{16}AGCB/DPPC$  e  $C_{16}DGCB/DPPC$  per il metodo 1 e 2. Le croci (×) e i diamanti(◇) indicano rispettivamente  $C_{16}DGCB$  e  $C_{16}AGCB$ .

La transizione da doppio strato in fase gel a doppio strato a fase liquida-cristallina della DPPC si sposta progressivamente a temperature più basse con l'aumento della concentrazione dei composti studiati. L'opposto è stato osservato per l'esadecilmetilammonio bromuro (HTABr), il quale ha la stessa lunghezza della catena e lo stesso controione del  $C_{16}DGCB$  e del  $C_{16}AGCB$ , ma porta ad un aumento di  $T_m$  [75]. Questo effetto può essere attribuito all'interazione delle grandi teste polari dei tensioattivi glucocationici con la testa polare della DPPC. Con lo scopo di comprendere meglio il ruolo svolto dall'acqua in queste interazioni, i tensioattivi sono stati addizionati ai liposomi sia attraverso una fase acquosa (metodo 1) che attraverso una fase lipidica (metodo 2).

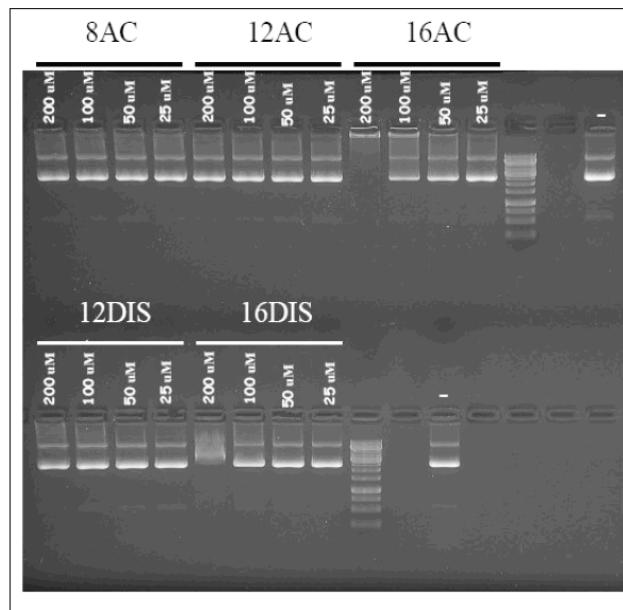
Sembra che le teste polari del  $C_{16}DGCB$  possano interagire con le teste polari dei lipidi in una modalità simile a quella degli zuccheri. Infatti, come nel caso degli zuccheri [76], il gruppo idrossilico del

C<sub>16</sub>DGCB può formare dei legami ad idrogeno con l'atomo di ossigeno dei fosfati del lipide. Di conseguenza, le interazioni elettrostatiche tra le teste polari del lipide si indeboliscono e questo causa la perdita di impaccamento del doppio strato e lo spostamento della transizione a temperature più basse. I cambiamenti nella struttura dei liposomi non sono così grandi come potrebbe invece risultare dalla presenza della pretransizione a basse concentrazioni di C<sub>16</sub>DGCB. Ci si aspetta che la formazione di legami ad idrogeno non dipenda dal modo in cui il C<sub>16</sub>DGCB viene aggiunto ai liposomi, e questo spiegherebbe perché influisca sulla transizione di fase principale in modo simile per entrambi i metodi. L'opposto si osserva per il C<sub>16</sub>AGCB. In questo caso, l'influenza del C<sub>16</sub>AGCB sulla transizione di fase principale dipende fortemente dalla modalità con cui il tensioattivo è stato aggiunto alla DPPC. La transizione viene modificata maggiormente ed è più spostata a temperature inferiori per il metodo 1 rispetto al 2. Questo suggerisce che le molecole d'acqua sono coinvolte nell'interazione tra i gruppi polari del C<sub>16</sub>AGCB e i gruppi polari del lipide, infatti, a causa della presenza dell'acetilazione, la testa polare del C<sub>16</sub>AGCB non è più in grado di formare legami ad idrogeno con i lipidi. Perciò, la testa polare del C<sub>16</sub>AGCB interagisce con i gruppi polari del lipide in modo differente rispetto al C<sub>16</sub>DGCB e le interazioni sono fortemente aumentate dalla presenza dell'acqua.

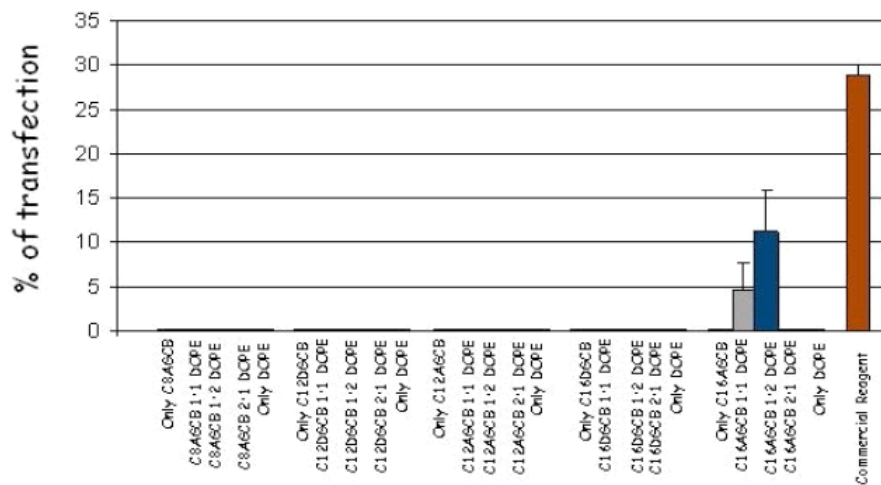
Il composto C<sub>16</sub>AGCB induce cambiamenti nella struttura dei liposomi significativamente più grandi rispetto al C<sub>16</sub>DGCB ed annulla la pretransizione anche alle più basse concentrazioni. Inoltre, in presenza del C<sub>16</sub>AGCB, la fase principale di transizione per il metodo 1 si separa in due componenti (Figura 14). La temperatura  $T_m^I$  del primo componente è quasi indipendente dalla concentrazione del tensioattivo ed è circa la stessa  $T_m$  della DPPC. Al contrario, la temperatura  $T_m^{II}$  del secondo componente dipende fortemente dalla concentrazione del tensioattivo (Figura 16). Il componente I potrebbe essere attribuito al C<sub>16</sub>DGCB–domini poveri od alla DPPC pura, ed il componente II al C<sub>16</sub>DGCB–domini ricchi.

### ***Saggi Biologici***

Le interazioni dei C<sub>n</sub>AGCB con n = 8,12,16 e C<sub>n</sub>DGCB con n = 12,16 con il DNA plasmidico pEGFP-C1 (Clontech) sono state monitorate attraverso il saggio EMSA (*Electrophoresis Mobility Shift*) su gel di agarosio. L'attività è stata osservata solo per il C<sub>16</sub>AGCB alle concentrazioni più alte e per il C<sub>16</sub>DGCB alla concentrazione di 200 μM (Figura 17). Infine, per testare la capacità degli stessi composti di rilasciare il DNA nelle cellule, è stato eseguito un saggio di trasfezione transiente con un plasmide con una cassetta di espressione di EGFP sotto il controllo del promotore CMV (pEGFP-C1, Clontech) per visualizzare l'espressione di EGFP al microscopio a fluorescenza. In accordo con i risultati EMSA, il C<sub>16</sub>AGCB è stata l'unica molecola a mostrare una bassa capacità di trasfezione quando coformulata con il DOPE (Figura 18).



**Figura 17.** Saggio EMSA: complessazione dei composti C<sub>8</sub>AGCB, C<sub>12</sub>AGCB, C<sub>16</sub>AGCB, C<sub>12</sub>DGCB e C<sub>16</sub>DGCB con il plasmide circolare pEGFP-C1. Come controllo negativo è stato utilizzato il plasmide da solo.



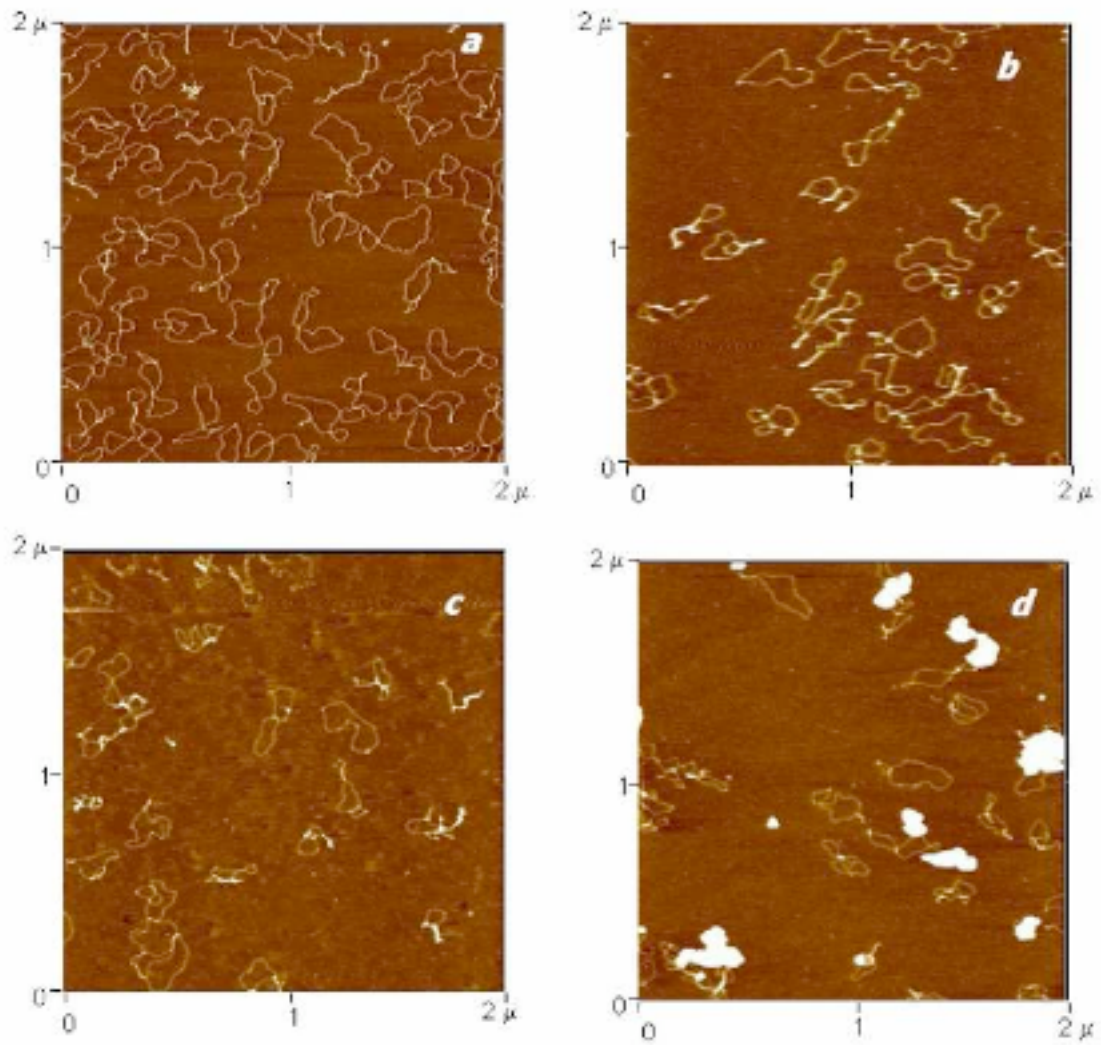
**Figura 18.** Risultati della trasfezione transiente di cellule RD-4 con i C<sub>n</sub>AGCB (n = 8, 12, 16) e C<sub>n</sub>DGCB (n = 12, 16), con o senza DOPE a differenti rapporti molari, con il DOPE da solo e del controllo positivo dell'agente commerciale standard di trasfezione.

I risultati dei saggi biologici mostrano che le strutture studiate non sono in grado di interagire in modo specifico con il DNA e di compattarlo. Per questo motivo non sono utilizzabili in gene delivery, sebbene sia stato provato che alcuni tensioattivi gemini cationici basati sullo zucchero mostrino un'eccellente efficienza di trasfezione [22]. La maggiore limitazione alla loro attività è probabilmente dovuta al fatto che sono tensioattivi con un'unica carica positiva ed a singola catena. Infatti, lipidi cationici multivalenti potrebbero formare liposomi con una maggiore densità di carica superficiale rispetto a quelli monovalenti, quindi generalmente ci si aspetta che diano luogo ad un miglior legame con il DNA ed un miglior rilascio [77]. La maggiore capacità del C<sub>16</sub>AGCB nel *delivery* del DNA, specialmente in presenza del DOPE, potrebbe essere

spiegata dal fatto che questa molecola è in grado di indurre un cambiamento più significativo rispetto al C<sub>16</sub>DGCB nella struttura delle membrane cellulari e/o per la formazione di strutture quando coformulato con il DOPE (Figura 19d).

### ***Esperimenti AFM***

Per verificare la capacità dei composti sotto studio ad indurre cambiamenti strutturali nel DNA abbiamo utilizzato l'AFM [78-79]. Questa tecnica è stata usata con successo per studiare l'interazione sia di ligandi sintetici [80, 81] sia di proteine [82] con il DNA. Gli esperimenti AFM sono stati condotti usando DNA circolare, in *tapping mode* in aria. Seguendo i risultati EMSA e di trasfezione transiente, abbiamo usato i composti con code a 16 atomi di carbonio per osservare con l'AFM la loro interazione con il DNA plasmidico. La Figura 19a mostra l'immagine tipica del DNA plasmidico da solo depositato sulla mica. Sono presenti sia plasmidi singoli che concatameri nella loro forma plectonemica con alcuni supercoil che portano la doppia elica a incrociarsi su se stessa diverse volte. Nonostante il vincolo topologico, plectonemi appaiono ben estesi sulla superficie della mica. Le Figure 19b e 19c mostrano il DNA plasmidico dopo incubazione rispettivamente con il C<sub>16</sub>AGCB ed il C<sub>16</sub>DGCB. In accordo con i risultati EMSA, l'interazione con il DNA è molto bassa e la struttura del DNA non viene modificata molto, se non per un leggero aumento nel numero di strutture supercoil. Nella Figura 19d si può vedere come l'aggiunta di DOPE in rapporto 2:1 al composto acetilato porti alla formazione di alcune strutture condensate, non omogenee sia per forma che per dimensione, anche se la maggior parte del plasmide rimane nella sua forma iniziale. L'aggiunta del DOPE da solo al plasmide o al C<sub>16</sub>DGCB invece del C<sub>16</sub>AGCB non dà immagini significativamente differenti dalle Figure 19b e 19c (dati non mostrati).



**Figure 19.** Immagini AFM del DNA plasmidico incubato con il  $C_{16}AGCB$  e il  $C_{16}DGCB$ . (a) plasmide pEGFP-C1 0.5 nM da solo. Plasmide incubato con (b)  $C_{16}AGCB$  2nM, (c)  $C_{16}DGCB$  2 nM, (d)  $C_{16}AGCB$  2nM e DOPE 4nM.

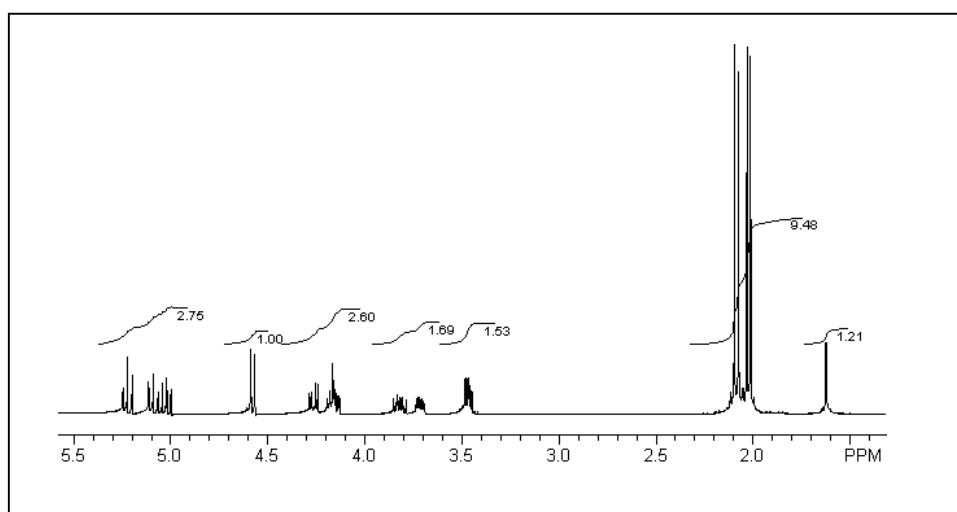
## Conclusioni

La caratterizzazione di una nuova serie di tensioattivi, appartenenti alla classe glucocationica è stata effettuata attraverso misure di conducibilità e di tensione superficiale. Le misure di conducibilità sono state utili per valutare la cmc dei tensioattivi ed hanno anche mostrato il comportamento peculiare di tali tensioattivi nell'intervallo delle concentrazioni premicellari. Infatti, è stata evidenziata sia la formazione di coppie ioniche strette che di aggregati premicellari, la cui formazione in generale è favorita dall'aumento dell'idrofobicità. Le cmc ricavate da misure di tensione superficiale risultano sostanzialmente più basse delle cmc ottenute da misure di conducibilità. Questo è stato spiegato dalla formazione di aggregati premicellari non attivi alla superficie. Inoltre, i dati ottenuti sembrano evidenziare che gli aggregati premicellari non sono più attivi a livello di superficie, ma possono crescere intorno alle normali micelle, senza influenzare il comportamento della tensione superficiale. Questi comportamenti peculiari fanno luce sulla complessità del processo di aggregazione dei tensioattivi, dimostrando che sono necessarie maggiori informazioni per spiegare le relazioni struttura-attività e prevedere il comportamento in soluzione di queste molecole chiamate "schizofreniche".

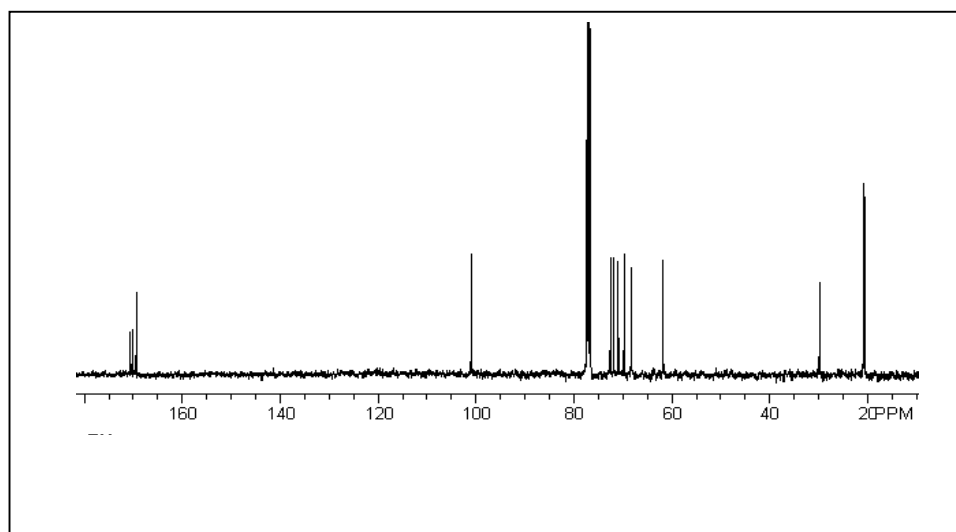
Sono state riportate le proprietà biologiche e chimico-fisiche delle soluzioni acquose del C<sub>12</sub>DGCB e del C<sub>16</sub>DGCB. Il confronto del C<sub>12</sub>DGCB e del C<sub>16</sub>DGCB con i corrispondenti composti acetilati C<sub>12</sub>AGCB e C<sub>16</sub>AGCB ci ha permesso di quantificare il ruolo giocato nel processo di micellizzazione dall'acetilazione della porzione glucosidica. Questa aumenta il carattere idrofobico della molecola e abbassa la variazione dell'entalpia di micellizzazione di circa  $-1.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Il confronto dei volumi del C<sub>12</sub>DGCB con quelli del DEDAB e del DTAB ci ha permesso di calcolare il volume occupato dal gruppo ( $\beta$ -D-glucopiranosil)etilico, risultato di  $133 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ . Invece dal confronto con il DEDAB si ricava che la sostituzione di un idrogeno con il gruppo  $\beta$ -D-glucopiranosilico porta un aumento in volume di  $99 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ . Per quel che riguarda l'interazione con le membrane di DPPC, sembra che la porzione zuccherina del composto esadecilico disacetilato formi legami idrogeno con gli atomi di ossigeno dei gruppi fosfato del lipide, spostando la transizione di fase della DPPC da doppio strato gel a doppio strato liquido-cristallino a temperature più basse. Il C<sub>16</sub>AGCB induce variazioni significativamente maggiori del C<sub>16</sub>DGCB nella struttura dei liposomi, suggerendo la formazione di domini, e l'interazione risulta fortemente aumentata alla presenza dell'acqua. Nessun composto interagisce fortemente con il DNA né è in grado di compattarlo, come si evince dai saggi EMSA e dalle immagini AFM. Solamente il C<sub>16</sub>AGCB è in grado di rilasciare un po' di DNA all'interno delle cellule quando coformulato con il DOPE. Questo potrebbe essere legato alla capacità del C<sub>16</sub>AGCB di formare domini ricchi di tensioattivo nella struttura lipidica.

## APPENDICE A

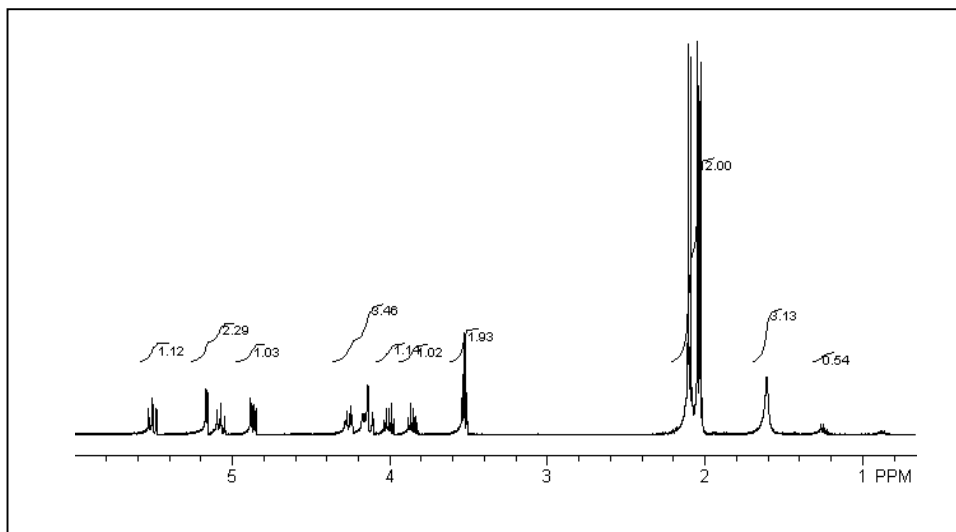
Spettro  $^1\text{H-NMR}$  per il composto **1**



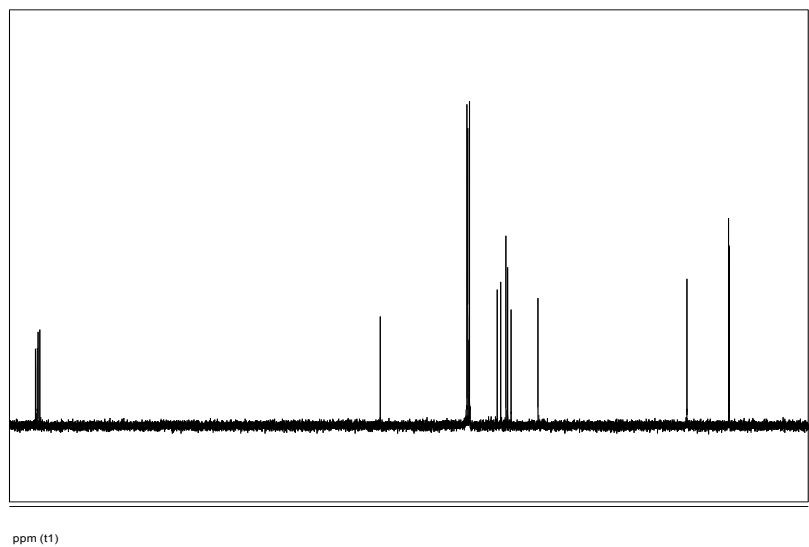
Spettro  $^{13}\text{C-NMR}$  per il composto **1**



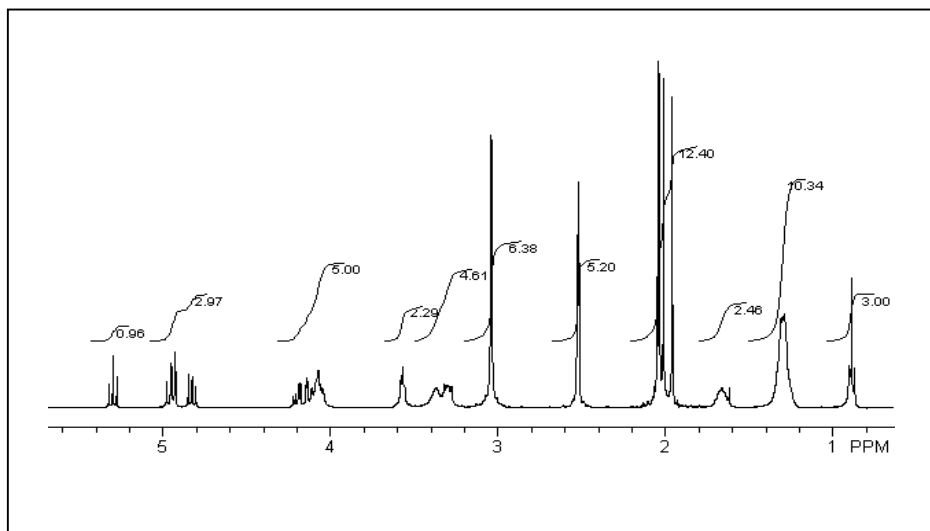
Spettro  $^1\text{H-NMR}$  per il composto **2**



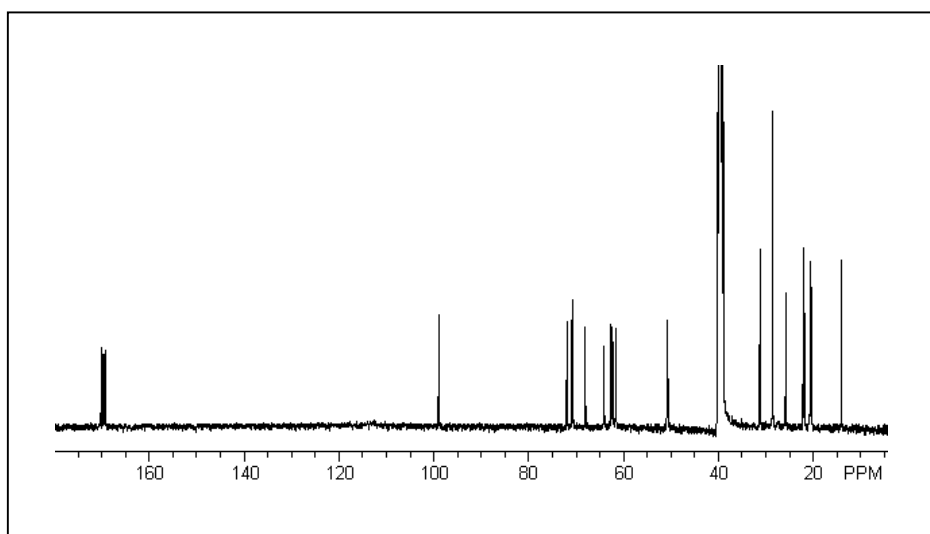
Spettro  $^{13}\text{C-NMR}$  per il composto **2**



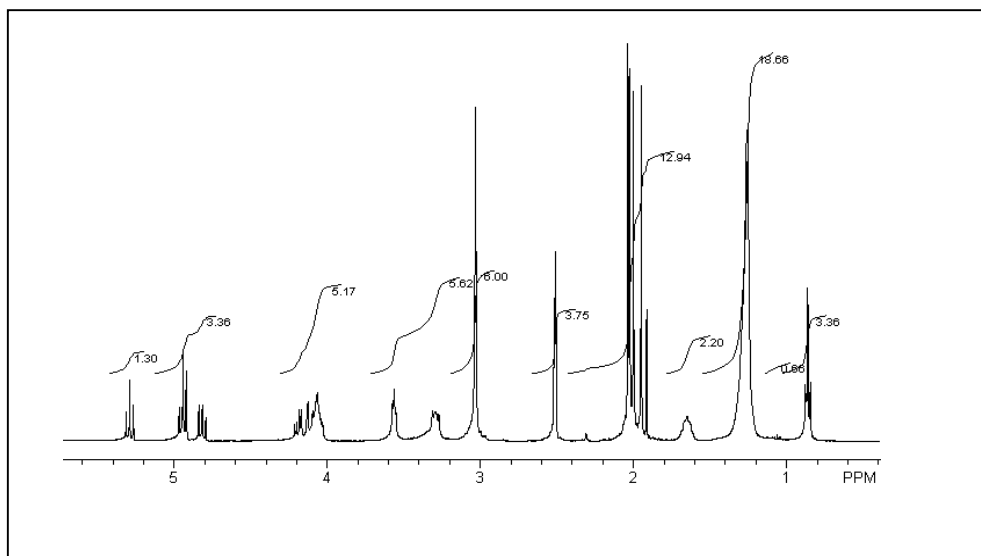
Spettro  $^1\text{H}$ -NMR del composto **3**



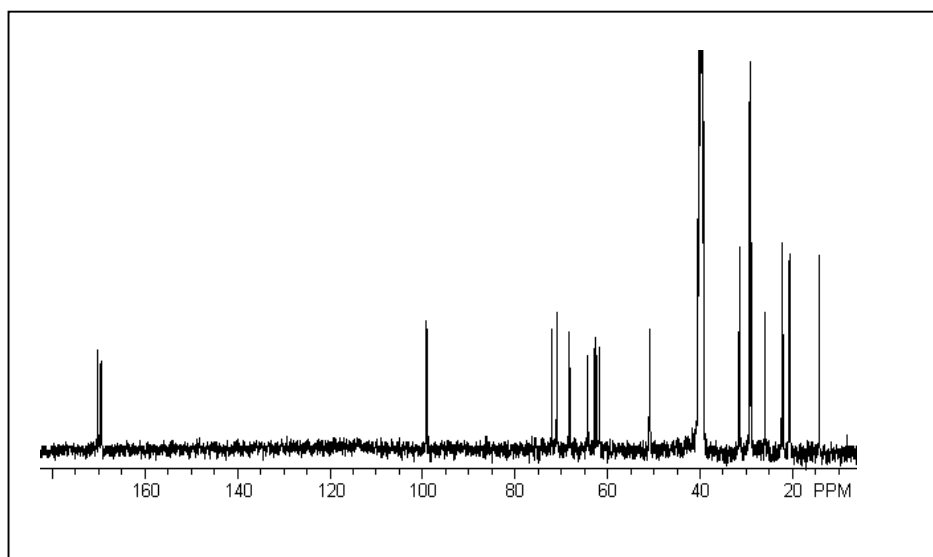
Spettro  $^{13}\text{C}$ -NMR del composto **3**



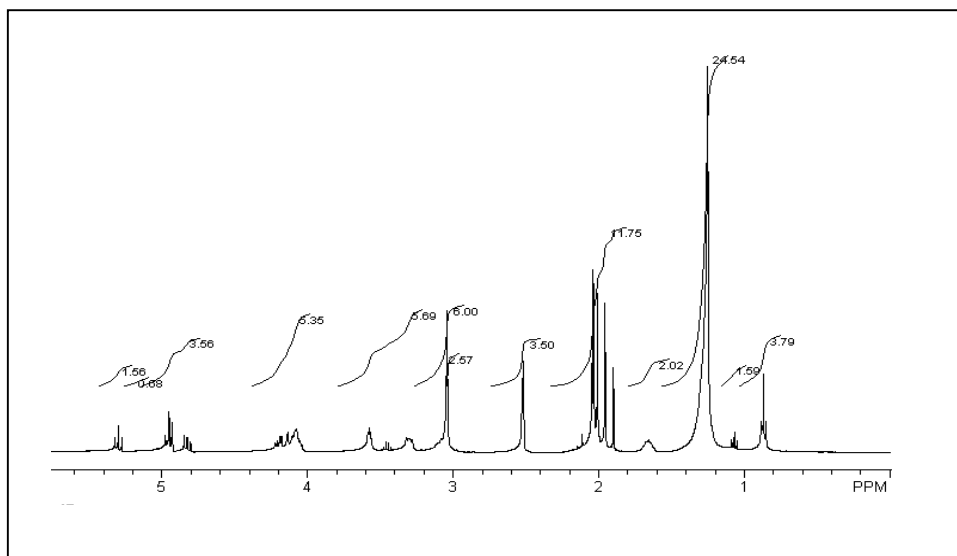
Spettro  $^1\text{H}$ -NMR del composto 4



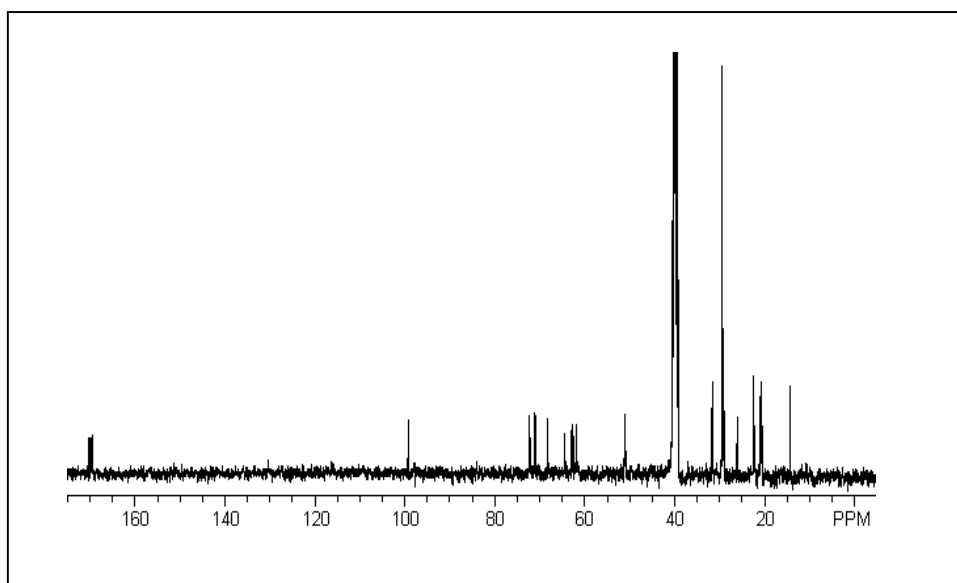
Spettro  $^{13}\text{C}$ -NMR del composto 4



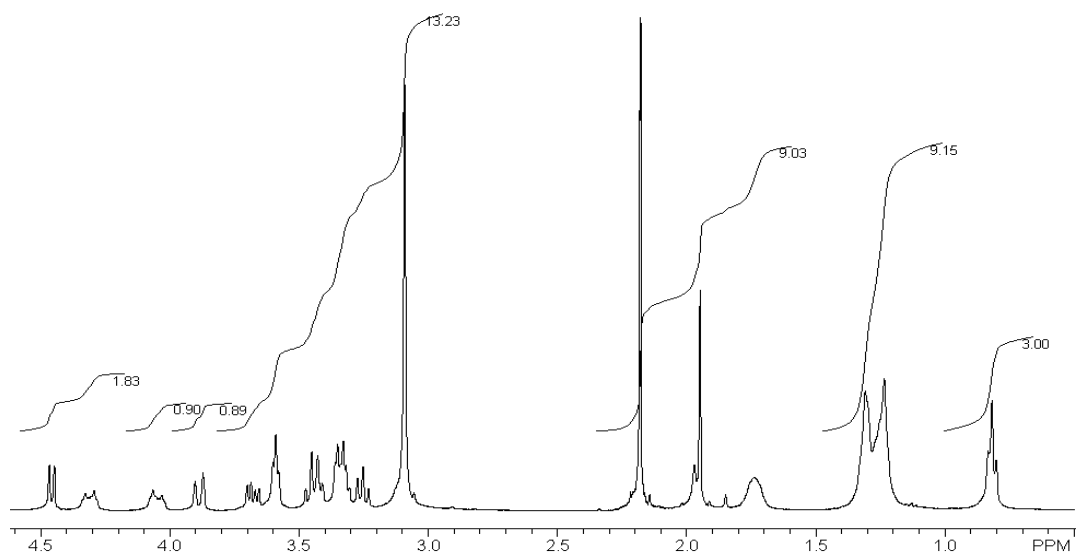
Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del composto **5**



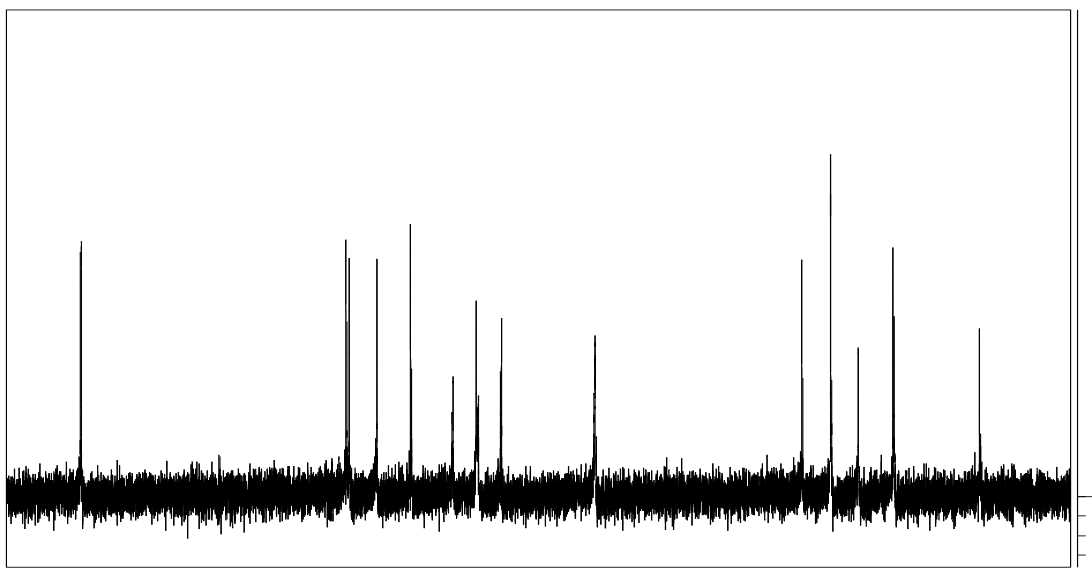
Spettro  $^{13}\text{C-NMR}$  del composto **5**



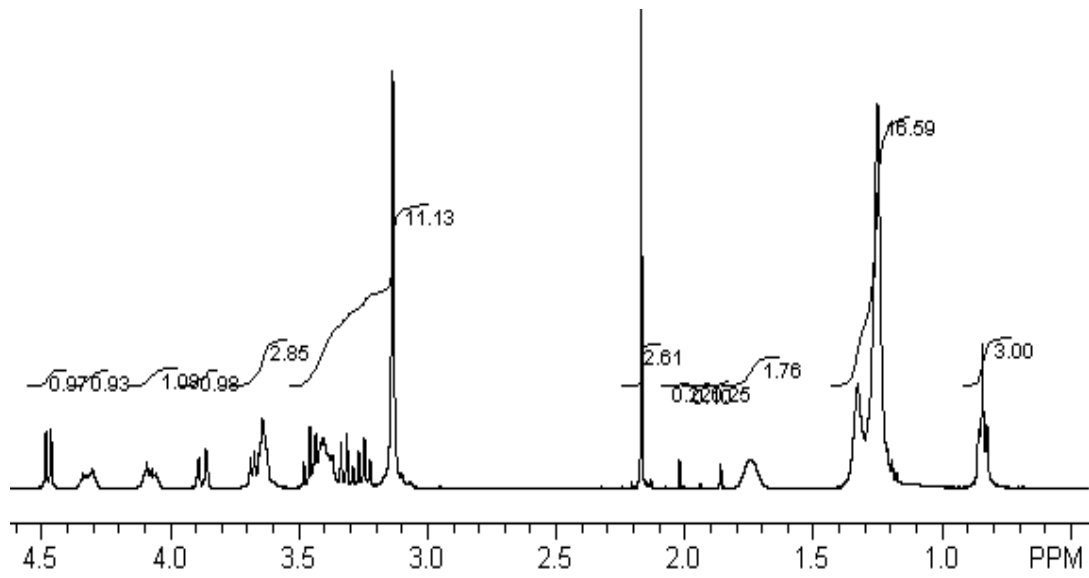
Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del composto **6**



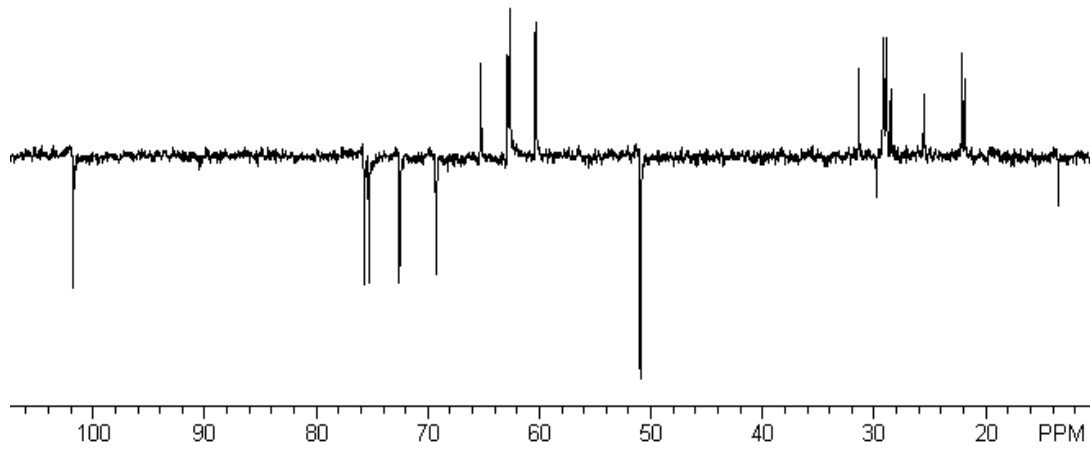
Spettro  $^{13}\text{C-NMR}$  del composto **6**



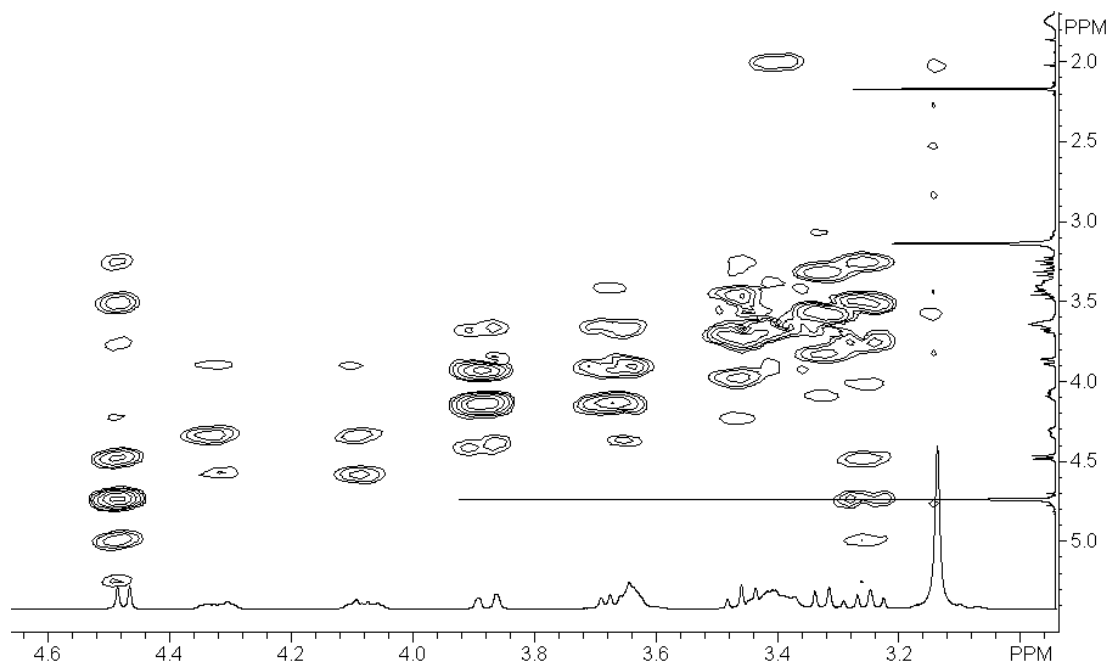
Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del composto 7



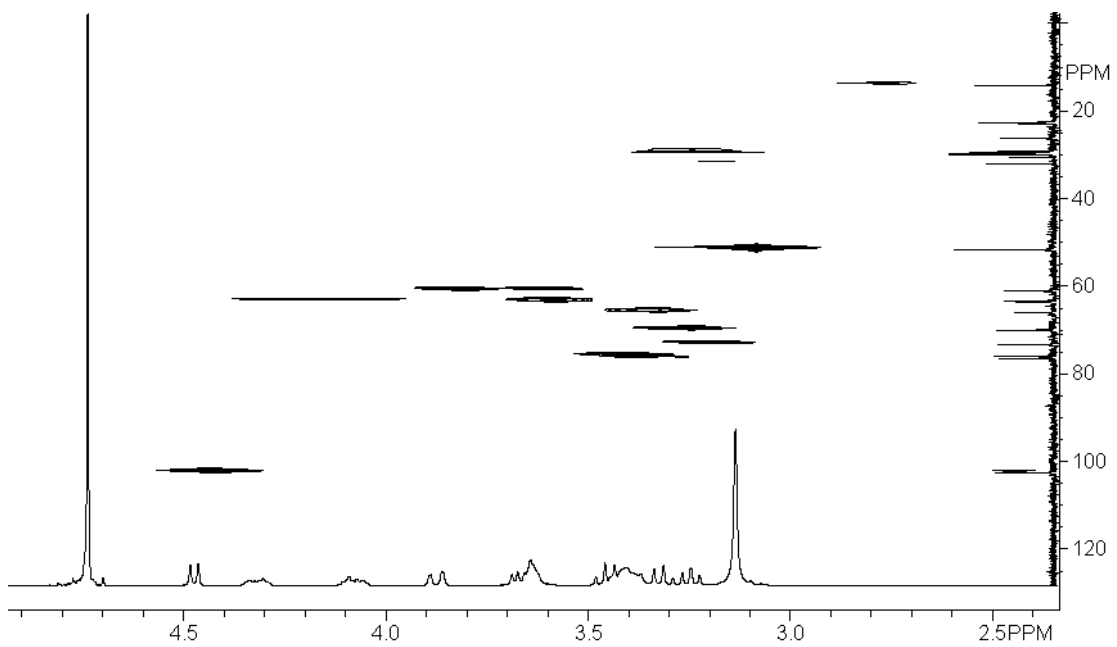
Spettro  $^{13}\text{C-NMR}$  DEPT del composto 7



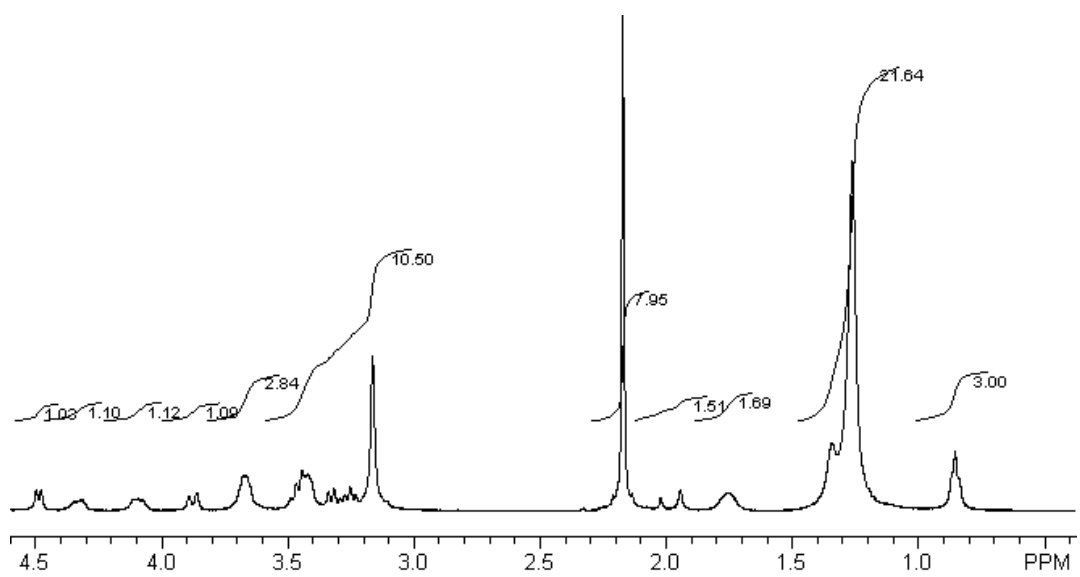
Spettro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY NMR del composto 7



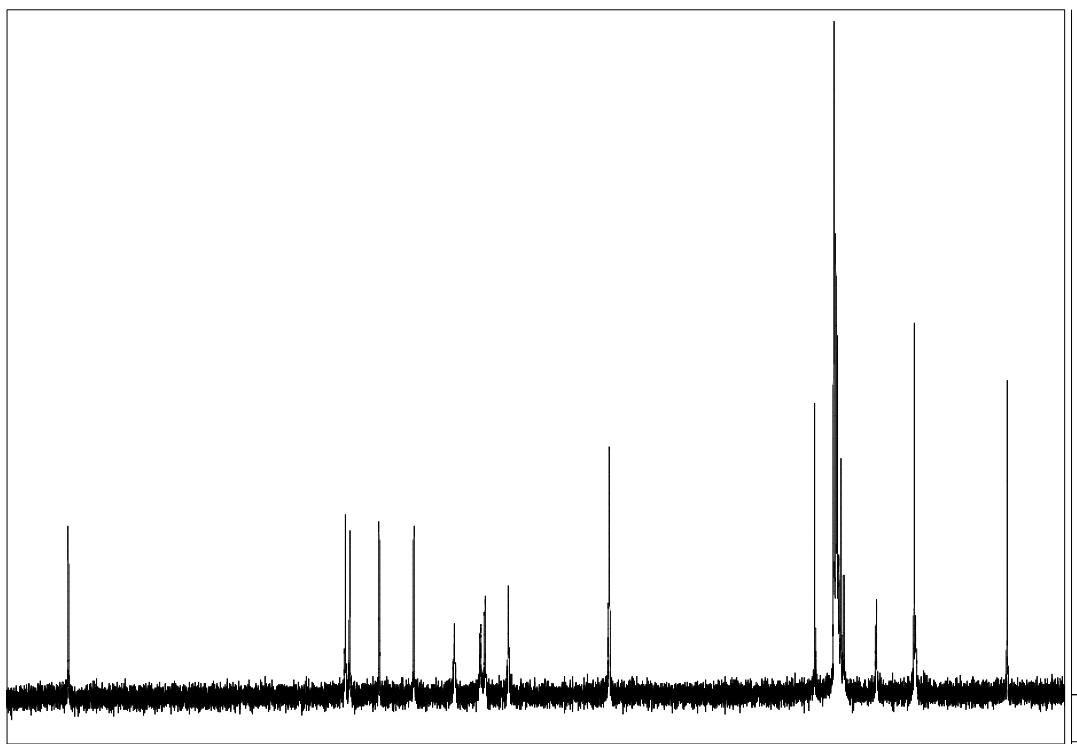
Spettro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HETCOR NMR del composto 7



Spettro  $^1\text{H-NMR}$  del composto **8**



Spettro  $^{13}\text{C-NMR}$  del composto **8**



ppm (f1)

## BIBLIOGRAFIA

- [1] R. De Lisi, E. Fiscaro, S. Milioto, E. Pelizzetti, P. Savarino, Thermodynamic Properties of N-Octyl- and N-Dodecyl-Nicotinamide Chlorides in water, *J. Solution Chem.* 19 (1990) 247-270.
- [2] E. Fiscaro, E. Pelizzetti, M. Barbieri, P. Savarino, G. Viscardi, Aqueous Micellar Solutions of Some N-Alkyl-Nicotinamide and N-Alkyl-Pyridinium Halide Surfactants: Apparent and Partial Molar Enthalpies, *Thermochimica Acta* 168 (1990) 143-159.
- [3] E. Fiscaro, M. Barbieri, E. Pelizzetti, P. Savarino, Temperature Dependence of Enthalpic Properties of Aqueous Micellar Solutions of Some N-Alkyl-Nicotinamide Chloride Surfactants, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 87 (1991) 2983-2987.
- [4] E. Fiscaro, E. Pelizzetti, E. Lanfredi, P. Savarino, Osmotic Coefficients of N-nonyl- and N-decyl-Nicotinamide Chloride Surfactant Aqueous Solutions, *Progr. Colloid Polym. Sci.* 84 (1991) 474-482.
- [5] E. Fiscaro, E. Pelizzetti, G. Viscardi, P. Quagliotto, L. Trossarelli, Thermodynamic Properties of Aqueous Micellar Solutions of N-1H,1H,2H,2H Perfluoro-Octyl and Decyl Pyridinium Chlorides, *J. Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 84 (1994) 59-70.
- [6] E. Fiscaro, A. Ghiozzi, E. Pelizzetti, G. Viscardi, P. Quagliotto, Effect of the Counterion on Thermodynamic Properties of Aqueous Micellar Solutions of 1-(3,3,4,4,5,5,6,6,6-nonafluorohexyl) Pyridinium Halides. Part I: Apparent and Partial Molar Enthalpies and Volumes at 298 K, *J. Colloid Interface Sci.* 182 (1996) 549-557.
- [7] E. Fiscaro, A. Ghiozzi, E. Pelizzetti, G. Viscardi, P. Quagliotto, Effect of the Counterion on Thermodynamic Properties of Aqueous Micellar Solutions of 1-(3,3,4,4,5,5,6,6,6-nonafluorohexyl) Pyridinium Halides. Part II: Apparent and Partial Molar Enthalpies and Osmotic Coefficients at 313 K, *J. Colloid Interface Sci.* 184 (1996) 147-154.
- [8] G.D. Schmidt-Wolf, I.G. Schmidt-Wolf, Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update, *Trends Mol. Med.* 9 (2003) 67-72.
- [9] S. Mansouri, P. Lavigne, K. Corsi, M. Benderdour, E. Beaumont, J. Fernandes, Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy, *European J. of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57 (2004) 1-8.
- [10] A.D. Miller, Cationic liposomes for gene therapy, *Angew. Chem. Int. Ed.* 37 (1998) 1768-1785.
- [11] C.W. Pouton, L.W. Seymour, Key issues in non-viral gene delivery, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 46 (2001) 187-203.
- [12] M.C. Pedroso de Lima, S. Simões, P. Pires, H. Faneca, N. Düzgünes, Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 47 (2001) 277-294.
- [13] D. Kitamoto, H. Isoda, T. Nakahara, Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants - from energy-saving materials to gene delivery carriers, *J. Biosci. Bioeng.* 94(3) (2002) 187-201.
- [14] M. Blanzat; E. Perez; I. Rico-Lattes; D. Prome; J. C. Prome; A. Lattes. *Langmuir* 1999, 15, 6163-6169.

- [15] B. Faroux-Corlay; L. Clary; C. Gadras; D. Hammache; J. Greiner; C. Santaella; A. M. Aubertin; P. Vierling; J. Fantini. *Carbohydr. Res.* 2000, 327, 223-260.
- [16] P. Singh, S.S. Cameotra, Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences, *Trends in Biotechnology* 22(3) (2004) 142-146.
- [17] Y. Inoh, D. Kitamoto, N. Hirashima, M. Nakanishi, Biosurfactants of MEL-A increase gene transfection mediated by cationic liposomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289 (2001) 57–61.
- [18] L. Huang, A. L. Klivanov, A. Mori, X. Gao, Targeted delivery of drugs and DNA with liposomes, *J. Liposome Res.* 3 (1993) 505-515.
- [19] J.S. Remy, A. Kichler, V. Mordvinov, F. Schuber, J.P. Behr, Targeted gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactose ligands: a stage toward artificial viruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 1744-1748.
- [20] T. Ferkol, J.C. Perales, F. Mularo, R.W. Hanson, Receptor-mediated gene transfer into macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 101-105.
- [21] W. Liang, X. Shi, D. Deshpande, C.J. Malanga, Y. Rojanasakul, Oligonucleotide targeting to alveolar macrophages by mannose receptor-mediated endocytosis, *Biochim. Biophys. Acta* 1279 (1996) 227-234.
- [22] P.C. Bell, M. Bergsma, I.P. Dolbnya, W. Bras, M.C.A. Stuart, A. E. Rowan, M.C. Feiters, J.B.F.N. Engberts, Transfection mediated by gemini surfactants: engineered escape from the endosomal compartment, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 1551-1558.
- [23] P. Quagliotto, G. Viscardi, C. Barolo, D. D'Angelo, E. Barni, C. Compari, E. Duce, E. Fiscaro, Synthesis and Properties of New Glucocationic Surfactants: Model Structures for Marking Cationic Surfactants with Carbohydrates, *J. Org. Chem.* 70(24) (2005) 9858-9866.
- [24] J. Dahmen, T. Frejd, G. Magnusson, G. Noori, A.S. Carlström, *Carbohydr. Res.* 127 (1984) 15-25.
- [25] J. Dahmen, T. Frejd, G. Magnusson, G. Noori, Boron trifluoride etherate-induced glycosidation: formation of alkyl glycosides and thioglycosides of 2-deoxy-2-phthalimidoglycopyranoses, *Carbohydr. Res.* 114 (1983) 328-330.
- [26] R.R. Schmidt, J. Michel, M. Roos, Glycosyl imidates, 12. Direct synthesis of O-a - and O-b -glycosyl imidates, *Liebigs Ann. Chem.* (7) (1984) 1343-1357.
- [27] R.R. Schmidt, J. Michel, Synthesis of linear and branched cellotetraoses, *Angew. Chem. Int. Ed.* 21(1) (1982) 72-73.
- [28] A. Pasc-Banu, M. Blanzat, M. Belloni, E. Perez, C. Mingotaud, I. Rico-Lattes, T. Labrot, R. Oda, Spontaneous vesicles of single-chain sugar-based fluorocarbon surfactants, *J. Fluorine Chem.* 126 (2005) 33-38.
- [29] I. Rico-Lattes, M. Blanzat, S. Franceschi-Messant, E. Perez, A. Lattes, Catanionic sugar derived surfactants, polymers and dendrimers: from molecules to targeted self-organized systems, *C. R. Chimie* 8 (2005) 807-814.
- [30] Viscardi, G.; Quagliotto, P.; Barolo, C.; Savarino, P.; Barni, E.; Fiscaro, E. Synthesis and surface and antimicrobial properties of novel cationic surfactants. *J. Org. Chem.* 2000, 65 (24), 8197-8203.

- [31] Zuidema, H. H.; Waters, G. W. Ring method for the determination of interfacial tension. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 1941, 13, 312-313.
- [32] A.J. Kirby, P. Camilleri, J.B.F.N. Engberts, M.C. Feiters, R.J.M. Nolte, O. Soderman, M. Bergsma, P.C. Bell, M.L. Fielden, C.L. Garcia Rodriguez, P. Guedat, A. Kremer, C. McGregor, C. Perrin, G. Ronsin, M.C.P. van Eijk, Gemini surfactants: New synthetic vectors for gene transfection, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 1448-1457.
- [33] H.S. Rosenzweig, V.A. Rakmanova, R.C. MacDonald, Diquaternary Ammonium Compounds as Transfection Agents, *Bioconjugate Chem.* 12 (2001) 258-263. Dahmen, J.; Frejd, T.; Gronberg, G.; Lave, T.; Magnusson, G.; Noori, G. *Carbohydr. Res.* 1983, 116, 303-307.
- [34] E. Fiscaro, C. Compari, E. Duce, G. Donofrio, B. Rózycka-Roszak, E. Woźniak, Biologically Active Bisquaternary Ammonium Chlorides: Physico-Chemical Properties of Long Chain Amphiphiles and Their Evaluation as Non-Viral Vectors For Gene Delivery, *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 1722 (2005) 224-233.
- [35] Dahmen, J.; Frejd, T.; Gronberg, G.; Lave, T.; Magnusson, G.; Noori, G. *Carbohydr. Res.* 1983, 116, 303-307.
- [36] Magnusson, G.; Noori, G.; Dahmen, J.; Frejd, T.; Lave, T. *Acta Chem. Scand. B* 1981, 35, 213-216.
- [37] Dahmen, J.; Frejd, T.; Magnusson, G.; Noori, G.; Carlström, A. S. *Carbohydr. Res.* 1984, 127, 15-25.
- [38] Dahmen, J.; Frejd, T.; Magnusson, G.; Noori, G. *Carbohydr. Res.* 1983, 114, 328-330.
- [39] Schmidt, R. R.; Klotz, W. *Synlett* 1991, 168-170.
- [40] Lemieux, R. U.; Morgan, A. R. *Can. J. Chem.* 1965, 43, 2205-2213.
- [41] Lemieux, R. U.; Morgan, A. R. *Can. J. Chem.* 1965, 43, 2214-2221.
- [42] Schmidt, R. R.; Klotz, W. *Synlett* 1991, 168-170.
- [43] Kirk, O.; Pedersen, F. D.; Fuglsang, C. C. *J. Surfactants Deterg.* 1998, 1, 37-40.
- [44] Ikemoto, N.; Kim, O. K.; Lo, L. C.; Satyanarayana, V.; Chang, M.; Nakanishi, K. *Tetrahedron Lett.* 1992, 33, 4295-4298.
- [45] Zemplén, G. *Chem. Ber.* 1927, 60, 1555-1564.
- [46] Carpena, P.; Aguiar, J.; Bernaola-Galvan, P.; Ruiz, C. C. *Langmuir* 2002, 18, 6054-6058.
- [47] Viscardi, G.; Quagliotto, P.; Barolo, C.; Savarino, P.; Barni, E.; Fiscaro, E. *J. Org. Chem.* 2000, 65 (24), 8197-8203.
- [48] Zana, R. *J. Colloid Interface Sci.* 2002, 246, 182-190.
- [49] Quagliotto, P.; Viscardi, G.; Barolo, C.; Barni, E.; Bellinvia, S.; Fiscaro, E.; Compari, C. *J. Org. Chem.* 2003, 68 (20), 7651-7660.
- [50] Buckingham, S. A.; Garvey, C. J.; Warr, G. G. *J. Phys. Chem.* 1993, 97, 10236-10244.
- [51] van Os, N. M.; Haak, J. R.; Rupert, L. A. M. *Physico-Chemical Properties of Selected Anionic, Cationic and Nonionic Surfactants*; Elsevier: Amsterdam, 1993.
- [52] Fuoss, R. M.; Chu, V. F. *J. Am. Chem. Soc.* 1951, 73 (3), 949-952.

- [53] Pinazo, A.; Wen, X.; Perez, L.; Infante, M. R.; Franses, E. I. *Langmuir* 1999, 15, 3134-3142.
- [54] Tsubone, K.; Arakawa, Y.; Rosen, M. J. *J. Colloid Interface Sci.* 2003, 262, 516-524.
- [55] Rosen, M. J. *Surfactants and Interfacial Phenomena*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: New York, 1989.
- [56] Lunkenheimer, K. On the problem of surface chemical purity of surfactants. *Phenomena, analysis, results, consequences, and prospects*. In *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*; Marcel Dekker: New York, 2002; pp 3739-3772.
- [57] J.E. Desnoyers, G. Perron, in R. Zana, (Ed.), *Surfactant Solutions - New Methods of Investigation*, Marcel Dekker Inc., New York, 1987, p.1 and references therein.
- [58] R. De Lisi, E. Fiscaro, S. Milioto, *Thermodynamic Properties and Conductivities of some Dodecylsurfactants in Water*, *J. Solution Chem.* 17 (1988) 1015-1041.
- [59] E. Fiscaro, M. Biemmi, C. Compari, E. Duce, M. Peroni, G. Viscardi and P. L. Quagliotto, *Thermodynamic Properties of Aqueous Micellar Solutions of Some New Acetylated Gluco-Cationic Surfactants*, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 301 (2007) 129-136.
- [60] R. De Lisi, E. Fiscaro, S. Milioto, *Thermodynamic Properties and Conductivities of some Dodecylsurfactants in Water*, *J. Solution Chem.* 17 (1988) 1015-1041.
- [61] E. Fiscaro, M. Biemmi, C. Compari, E. Duce, M. Peroni: *Thermodynamics of Aqueous Solutions of Dodecyltrimethylammonium Bromide*, *J. Colloid Surface Sci.*, 305 (2007) 301-307.
- [62] J.E. Desnoyers, G. Perron, in R. Zana, (Ed.), *Surfactant Solutions - New Methods of Investigation*, Marcel Dekker Inc., New York, 1987, p.1 and references therein.
- [63] E. Fiscaro, C. Compari, P. Quagliotto, G. Viscardi, *Thermodynamic Properties of the Aqueous Solution of Potassium Salts of Some 4-((alkylcarbonyl)amino)-2-hydroxybenzoic Acids at 298 and 313 K*, *J. Colloid Interface Sci.* 255(2) (2002) 410-416.
- [64] E. Fiscaro, C. Compari, Y. Moroi, *Apparent and Partial Molar enthalpies of some Potassium p-n-Alkyl-Benzoate Aqueous Solutions*, *Polyhedron*, 21 (2002) 1497-1502.
- [65] S.D. Wetting, R.E. Verrall, *Thermodynamic Studies of Aqueous m-s-m Gemini Surfactant Systems*, *Journal of Colloid and Interface Science* 235 (2001) 310-316.
- [66] R. De Lisi, S. Milioto, R.E. Verrall, *Partial molar volumes and compressibilities of alkyltrimethylammonium bromides*, *J. Solution Chem.* 19 (1990) 665-692.
- [67] M. Iqbal, R.E. Verrall, *Partial molar volumes and adiabatic compressibilities of glyceryl peptides at 25° C*, *J. Phys. Chem.* 91 (1987) 967-971.
- [68] V. Chalikian, A.P. Sarvazyan, K. Breslauer, *Partial molar volumes, expansibilities, and compressibilities of  $\alpha$ ,  $\omega$ -aminocarboxylic acids in aqueous solutions between 18 and 55 °C*, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 13017-13026.
- [69] M. Frindi, B. Michels, H. Levy, R. Zana, *Alkanediyl-  $\alpha$ ,  $\omega$ -bis(dimethylalkylammonium bromide) Surfactants. 4. Ultrasonic Absorption Studies of Amphiphile Exchange between Micelles and Bulk Phase in Aqueous Micellar Solution*, *Langmuir* 10 (1994) 1140-1145.
- [70] E. Fiscaro, C. Compari, E. Duce, C. Contestabili, P. Quagliotto, G. Viscardi, *First Evaluation of*

- Thermodynamic Properties for Spheres to Elongated Micelles Transition of Some Propanediyl- $\alpha$ ,  $\omega$ -bis(dimethylalkylammonium bromide) Surfactants in Aqueous Solutions, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 1744-1749.
- [71] R. De Lisi, C. Ostiguy, G. Perron, J.E. Desnoyer, Direct measurements of the thermodynamic properties of surfactants, *J. Colloid Interface Sci.* 71 (1979) 147-166.
- [72] P. Gianni, L. Lepori, Group contributions to the partial molar volume of ionic organic solutes in aqueous solution, *Journal of Solution Chemistry* 25 (1996) 1-42.
- [73] E. Kudryashov, T. Kapustina, S. Morrissey, V. Buckin, K. Dawson, The Compressibility of Alkyltrimethylammonium Bromide Micelles, *Journal of Colloid and Interface Science* 203 (1998) 59-68.
- [74] K. Fukada, J. Li, M. Fujii, T. Kato, T. Seimiya, Adiabatic Compressibility of Aqueous solutions of Amphiphiles with an Ammonium Group as the Hydrophilic Domain, *J. Oleo Sci.* 51 (2002) 103-111.
- [75] K. Lohner, Effects of small organic molecules on phospholipid phase transitions *Chem.Phys.Lipids*, 57 (1991) 341-362.
- [76] M. Bryszewska, R. M. Epand, Effects of sugar alcohols and disaccharides in inducing the hexagonal phase and altering membrane properties implications for diabetes mellitus. *Biochimica et Biophysica Acta* 943 (1988) 485-492 and ref. therein.
- [77] B. Martin, M. Silos, A. Aissaoui, N. Oudrhiri, M. Hauchecorne, J.P. Vigneron, J. M. Lehn, P. Lehn, *Current Pharmaceutical Design*, 11 (2005) 375-394.
- [78] C. Bustamante; C. Rivetti, Visualizing protein-nucleic acid interactions on a large scale with the scanning force microscope *C. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1996, 25, 395-429.
- [79] H. G. Hansma, Surface biology of DNA by atomic force microscopy, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 2001, 52, 71-92.
- [80] F. Sansone, M. Dudic, G. Donofrio, C. Rivetti, L. Baldini, A. Casnati, S. Cellai, and R. Ungaro, DNA Condensation and Cell Transfection Properties of Guanidinium Calixarenes: Dependence on Macrocyclic Lipophilicity, Size, and Conformation, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 14528-14536.
- [81] C. Volcke, S. Piroton, Ch. Grandfils, C. Humbert, P. A. Thiry, I. Ydens, P. Dubois, M. Raes, Influence of DNA condensation state on transfection efficiency in DNA/polymer complexes: An AFM and DLS comparative study, *M. J. Biotechnol.* 2006, 125, 11-21.
- [82] P. Ceci, S. Cellai, E. Falvo, C. Rivetti, G. L. Rossi, E. Chiancone, DNA condensation and self-aggregation of *Escherichia coli* Dps are coupled phenomena related to the properties of the N-terminus, *Nucleic Acids Res.* 2004, 32, 5935-5944.

**CAPITOLO 3**  
**PROCESSI IDROFOBICI**

## TERMODINAMICA DEI PROCESSI IDROFOBICI: SOLUBILIZZAZIONE DI SOSTANZE NON POLARI, FORMAZIONE DELLE MICELLE IN ACQUA E DI BIO-COMPLESSI

### Introduzione

L'analisi della termodinamica [1-3] della solubilizzazione di sostanze non-polari in acqua insieme alle entalpie di denaturazione di proteine ed alle entalpie di formazione delle micelle in acqua a diverse temperature, ci ha portato alla formulazione di un meccanismo molecolare del così detto legame idrofobico che preferiamo chiamare "affinità idrofobica" dal momento che non avvengono interazioni elettroniche e quindi non si forma alcun legame.

Il modello molecolare per la solubilità di sostanze non-polari in acqua parte dal presupposto [1,2] che la struttura dell'acqua sia costituita da due tipi di *cluster* con strutture rispettivamente,  $W_I$  e  $W_{II}$  e da molecole di acqua isolate  $W_{III}$ .  $W_I$  forma il *bulk*,  $W_{II}$  forma la gabbia intorno alle molecole di soluto, mentre  $W_{III}$  sono le molecole di acqua libere (Figura 1). Quando una sostanza non-polare si trova in acqua si verifica il rilascio di molecole d'acqua tipo  $W_{III}$  dal *cluster* di tipo  $W_I$  con formazione del *cluster*  $W_{II}$  e creazione di una cavità per ospitare il soluto.

L'analisi termodinamica inizia con lo studio del diagramma

$$R \ln K_{sol} = -\Delta G^0 / T = f(1/T) \quad (1)$$

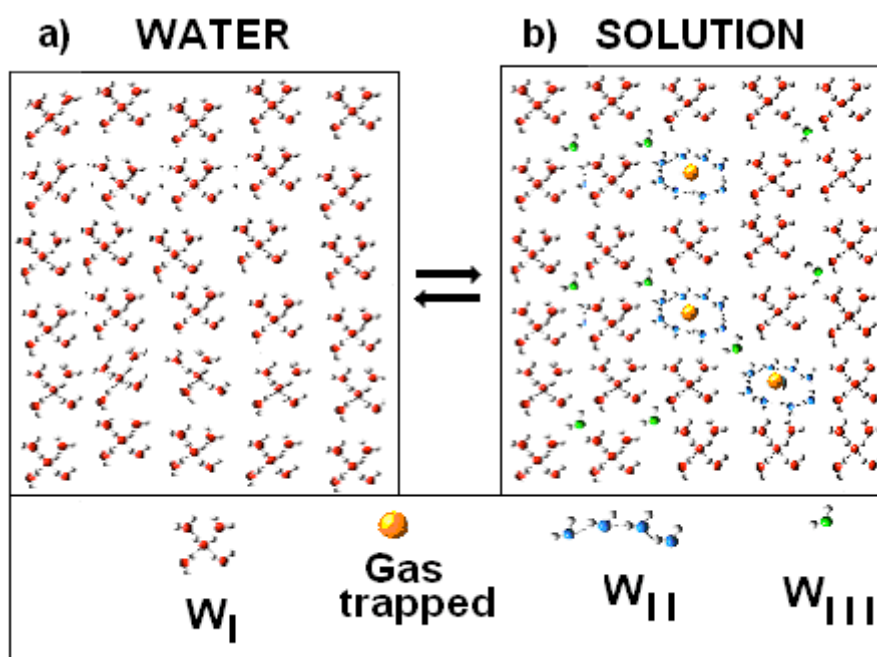


Figura 1. La struttura di a) acqua pura e b) soluzione acquosa di una sostanza idrofobica

dove  $R \ln K_{sol}$  è la costante di solubilità all'equilibrio determinata sperimentalmente. La costante di equilibrio è  $K_{sol} = x_2$ , dove  $x_2$  è la solubilità di una sostanza non polare a diverse temperature. La funzione dell'eq(1) per molti dei composti esaminati, è rappresentata da una curva con concavità verso l'alto e con un minimo

circa a temperatura ambiente. La curvatura si differenzia per ogni composto. Le tangenti a queste curve, ad ogni valore di temperatura, sono calcolate con l'equazione di van't Hoff

$$\partial(\ln K_{sol})/\partial(1/T) = -\Delta H_{app} \quad (2)$$

La variazione di entalpia per ogni composto quando è messa in grafico in funzione di  $T$  è lineare, con una pendenza positiva  $\Delta C_p$

$$\Delta H_{app} = \Delta H_0 + \Delta C_p T \quad (3)$$

dove l'entalpia estrapolata  $\Delta H_0$  e la pendenza sono differenti per ogni composto. Applicando il principio di diluizione termica equivalente (TED) [4] si può scrivere:

$$-n_w R \ln[W] = n_w C_{p,w} \ln T \quad (4)$$

essendo  $\Delta C_p = n_w C_{p,w}$ , dove  $C_{p,w} = 75.36 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  è la capacità termica isobara molare dell'acqua e  $\xi_w = |n_w|$  indica il numero di molecole  $W_{III}$  rimosse per creare la cavità.  $\Delta C_p$  e quindi  $n_w$  potrebbe essere, in altri tipi di reazioni, negativo, ed il termine  $\xi_w$ , per definizione positivo, trasferisce il cambiamento di segno, alla quantità termodinamica associata. Le pendenze, e quindi  $\xi_w$ , per composti diversi sono proporzionali alle dimensioni del soluto

$$\Delta H_{app} = \Delta H_0 + n_w C_{p,w} T \quad (5)$$

Inoltre, mettendo in grafico le entalpie estrapolate  $\Delta H_0$  in funzione di  $\xi_w$  abbiamo ottenuto ancora una funzione lineare

$$\Delta H_0 = \Delta H_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta h_w = -17.7 - 21.6 \xi_w \quad (6)$$

dove  $\Delta h_w = -21.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\xi_w^{-1}$  rappresenta il cambiamento di entalpia molare (esotermico) per la trasformazione da  $W_I$  a  $W_{II}$ , associato ad ogni molecola d'acqua  $W_{III}$  rilasciata dalla cavità; cioè l'incremento di  $W_{III}$  di una unità porta alla produzione di calore ed all'espansione della cavità. Il valore estrapolato  $\Delta H_0^{(\xi_w=0)} = -17.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , indipendentemente dalla dimensione del soluto, rappresenta l'affinità residua tra acqua e soluto. Possiamo rappresentare il cambiamento di entalpia in questi composti, includendo l'eq.(6) nell'eq.(5), con l'equazione generale

$$\Delta H_{app} = \Delta H_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta h_w + \xi_w C_{p,w} T = -17.7 - 21.6 \xi_w + \xi_w C_{p,w} T \quad (7)$$

D'altra parte, applicando la relazione

$$\Delta S_{app} = -\Delta G^0/T + \Delta H_{app}/T \quad (8)$$

si può calcolare il cambiamento di entropia. Quindi, mettendo in grafico  $\Delta S_{app}$  rispetto a  $\ln T$  si ottiene una linea retta per ogni composto esaminato

$$\Delta S_{app} = \Delta S_0 + \Delta C_p \ln T \quad (9)$$

Le pendenze  $\Delta C_p$  e quindi  $n_w = \Delta C_p / C_{p,w}$  risultano essere esattamente uguali a quelli ottenuti dal grafico dell'eq(5) nel caso dello stesso composto. Inoltre, mettendo in grafico  $\Delta S_0$ , per diversi composti non polari, rispetto a  $\xi_w = |n_w|$  si ottiene una funzione lineare

$$\Delta S_0 = \Delta S_0^{(\xi_w=0)} + \Delta s_w \xi_w = -86.4 - 445.4 \xi_w \quad (10)$$

dove  $\Delta s_w = -445.4 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ .  $\xi_w^{-1}$  è il cambiamento di entalpia (negativo) associato alla creazione della cavità. Nel caso delle sostanze gassose, il valore estrapolato  $\Delta S_0^{(\xi_w=0)} = -86.4 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  rappresenta la diminuzione di entropia configurazionale nel passaggio da stato gassoso alla gabbia in soluzione. In generale, la variazione dell'entropia per la classe dei composti gassosi può essere rappresentata, includendo l'eq. (10) nell'eq. (9), con l'equazione

$$\Delta S_{app} = \Delta S_0^{(\xi_w=0)} + \Delta s_w \xi_w + \xi_w C_{p,w} \ln T = -86.4 - 445.4 \xi_w + \xi_w C_{p,w} \ln T \quad (11)$$

I due termini, dipendenti dalla temperatura, sono positivi in entrambe le espressioni dell'eq(7) e dell'eq(11). In particolare,  $\xi_w C_{p,w} T \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  rappresenta il calore assorbito dalle molecole d'acqua rilasciate, e  $\xi_w C_{p,w} \ln T \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  rappresenta l'aumento di entropia termica delle stesse molecole.

L'eq(7) e l'eq(11) sono state applicate per evidenziare la distinzione tra la parte lavoro e la parte termica (o compensazione) sia dell'entalpia che dell'entropia, in conformità con quanto proposto da Lumry [5, 6]. Richiamiamo qui che le parti termiche di entalpia e di entropia hanno la loro origine nel guscio d'acqua che circonda la macromolecola. Vale a dire che, secondo il presente modello, la parte termica è legata al guscio di acqua  $W_{II}$  che circonda il soluto ed è una conferma della fortunata intuizione di Lumry. Nell'eq(7), i termini

$$\Delta H_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta h_w = \Delta H_w \quad (12)$$

costituisce la "parte motrice", mentre

$$\xi_w C_{p,w} T = \Delta H_{Th} \quad (13)$$

è la "parte termica" dell'entalpia. La "parte motrice"  $\Delta H_w$  comprende sia l'affinità soluto-solvente ( $\Delta H_0^{(\xi_w=0)}$ ) sia l'affinità di riarrangiamento ( $\xi_w \Delta h_w < 0$ ) delle molecole di acqua dal *cluster* di  $W_I$  al *cluster*  $W_{II}$ . D'altra parte l'entalpia termica  $\Delta H_{Th}$  è associata alla trasformazione delle molecole d'acqua libera  $W_{III}$ . Nell'eq(11), la parte motrice dell'entropia

$$\Delta S_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta s_w = \Delta S_0 \quad (14)$$

è composta dalla diminuzione di entropia di entropia configurazionale ( $\Delta S_0^{(\xi_w=0)}$ ) dalle molecole di gas e dalla diminuzione di entropia ( $\xi_w \Delta s_w < 0$ ) dovuta alla formazione della cavità, mentre il termine

$$\xi_w C_{p,w} \ln T = \Delta S_{Th} \quad (15)$$

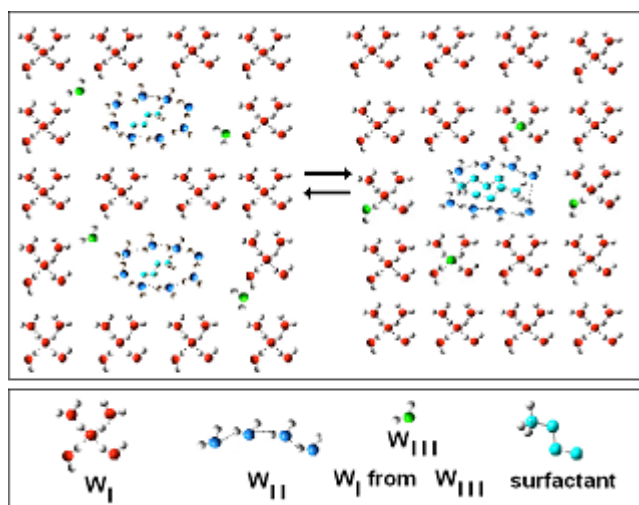
rappresenta l'entropia termica acquisita dalle molecole d'acqua libera  $W_{III}$ .

### **Formazione delle micelle e riempimento della cavità**

Anche nel caso della formazione delle micelle [1] e dei bio-complessi l'entalpia apparente è funzione di  $n_w$ , con però  $n_w < 0$ . L'entalpia apparente è data da:

$$\Delta H_{app} = \Delta H_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta h_w - \xi_w C_{p,w} T = -4.22 + 23.2 \xi_w - \xi_w C_{p,w} T \quad (16)$$

dove  $\xi_w = |n_w|$  è il numero di molecole d'acqua  $W_{III}$  della reazione. La reazione è endotermica e per ogni molecola d'acqua si ha un  $\Delta h_w = 23.2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1} \cdot \xi_w^{-1}$  e il termine  $-\xi_w C_{p,w} T \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  rappresenta il calore rilasciato dalle molecole d'acqua di tipo  $W_{III}$  quando si condensano in *cluster*  $W_I$ . La pendenza della retta  $n_w C_{p,w} = \Delta C_p$  è negativa e di conseguenza  $n_w$ , che in questo caso è legato al riempimento della cavità, è minore di zero ( $n_w < 0$ ). Questo vuol dire che, quando due porzioni separate (es. due catene alifatiche) si avvicinano l'una all'altra, si ha una diminuzione del volume della cavità che le ospita. Infatti, le cavità che circondano le due catene separate coalescono (Figura 2) e la cavità risultante, che circonda le catene associate, è più piccola della somma delle cavità che ospitavano i due componenti separati.  $\xi_w$  molecole d'acqua  $W_{III}$  ( $n_w < 0$ ) devono rientrare nella struttura di *bulk*  $W_I$  per riempire l'eccesso di cavità. L'espansione del volume del solvente (diluizione) porta all'aumento di entropia, che agisce come *driving force* dell'affinità sopramolecolare.



**Figura 2.** Il volume della cavità è più piccolo (destra) della somma delle cavità che circondano le catene separate (sinistra).

Per i processi con  $n_w > 0$  è tipico ottenere grafici di  $R \ln K_{sol} = (-\Delta G^\circ/T)$  in funzione di  $1/T$  che mostrano curve con un minimo intorno alla temperatura ambiente. Il minimo nel grafico dell'eq(5)  $\Delta H_{app} = f(1/T)$  corrisponde al punto d'intersezione dell'asse delle ascisse ( $\Delta H_{app} = 0$ ). Al contrario, nei processi con  $n_w < 0$ , lo stesso grafico dovrebbe mostrare una curva con un massimo. L'esistenza di un minimo ( $n_w > 0$ ) o di un massimo ( $n_w < 0$ ) è una condizione necessaria. Infatti, l'entalpia ( $-\Delta H_{app}$ ) dall'eq(2) corrisponde alla tangente alla curva, che passa da un valore negativo ad un valore positivo, quando  $n_w > 0$  o vice versa quando  $n_w < 0$ , al variare della temperatura, passando per una temperatura in cui la reazione è adiabatica ( $\Delta H_{app} = 0$ , cf. l'eq(5)). Per valutare le funzioni termodinamiche ( $(-\Delta G^\circ/T)$ ,  $\Delta H_{app}$  e  $\Delta S_{app}$ ) di formazione delle micelle e per provare che il modello funziona, anche in questi casi abbiamo determinato il cambiamento di energia libera  $\Delta G^\circ_{mic}$  di formazione delle micelle in acqua a diverse temperature.

### **Formazione delle micelle: energia libera**

Per quanto riguarda la determinazione del cambiamento dell'energia libera standard,  $\Delta G^\circ_{mic}$ , di formazione delle micelle in acqua a diverse temperature, ricordiamo che l'eq(5) e l'eq(9) sono necessariamente correlate da  $\Delta C_p$ , cioè dagli stessi valori di  $n_w$ . Infatti, dalla derivata prima dell'energia libera otteniamo l'entalpia

$$-\partial(-\Delta G^\circ/T)/\partial(1/T) = -\partial(\Delta G^\circ)/(\partial \ln T) = \Delta H \quad (17)$$

e quindi facendo un'ulteriore derivata rispetto a  $T$  otteniamo la derivata seconda  $\Delta C_p$

$$-\partial^2(\Delta G^\circ)/(\partial \ln T \partial T) = \partial(\Delta H)/\partial T = \Delta C_p \quad (18)$$

Allo stesso tempo, possiamo ottenere la derivata prima

$$\partial(-\Delta G^\circ)/\partial T = \Delta S \quad (19)$$

e quindi la derivata seconda rispetto  $\ln T$

$$-\partial^2(\Delta G^\circ)/(\partial T \partial \ln T) = \partial(\Delta S)/\partial \ln T = \Delta C_p \quad (20)$$

L'uguaglianza tra le derivate seconde (18) e (20) spiega perchè si ottengono le stesse pendenze dall'eq(3) nel grafico in funzione di  $T$  e dall'eq(9) nel grafico in funzione di  $\ln T$ . Infatti, otteniamo l'eq(3) dall'integrazione dell'eq(18) e l'eq(9) dall'integrazione dell'eq(20) [1].

Il parametro termodinamico scelto per monitorare la reazione è la concentrazione micellare critica (*cmc*). La formazione delle micelle ha diversi tratti in comune con la formazione di una fase separata:

quando l'aggregazione ha inizio, diventa sempre più favorevole l'aggiunta di monomeri fino a quando si raggiunge un alto numero di aggregazione. La variazione di energia libera [7] delle soluzioni è

$$\Delta G = \mu^{\circ}_{\mathcal{S}(\text{micelle})} - \mu^{\circ}_{\mathcal{S}(\text{solut})} - RT \ln[\mathcal{S}] = \Delta G^{\circ}_{mic} - RT \ln[\mathcal{S}] \quad (21)$$

dove  $\mu^{\circ}_{\mathcal{S}(\text{micelle})}$  è il potenziale chimico standard del tensioattivo  $\mathcal{S}$  nella pseudofase aggregata,  $\mu^{\circ}_{\mathcal{S}(\text{solut})}$  è il potenziale chimico standard del monomero in soluzione,  $[\mathcal{S}]$  è la concentrazione del tensioattivo e  $\Delta G^{\circ}_{mic}$  è l'energia libera standard di formazione delle micelle. Nel punto in cui monomero e aggregato coesistono in equilibrio,  $\Delta G = 0$ , quindi  $[\mathcal{S}] = (cmc)$  e l'energia libera standard si ottiene da questa relazione:

$$-\Delta G^{\circ}_{mic} = RT \ln K_{mic} = -RT \ln(cmc) \quad (22)$$

con  $K_{mic} = 1/(cmc)$ .

Oppure, nel caso in cui la formazione di micelle sia vista come una reazione di equilibrio, come proposto da Zana [8], l'energia libera di micellizzazione nel caso di un tensioattivo ionico convenzionale 1:1 è data da:

$$\Delta G^{\circ}_{mic} = RT(1 + \beta) \ln(cmc) \quad (23)$$

dove  $\beta$  è il grado di legame del controione. Nel caso di tensioattivi non ionici, l'eq(23) diventa uguale all'eq(22).

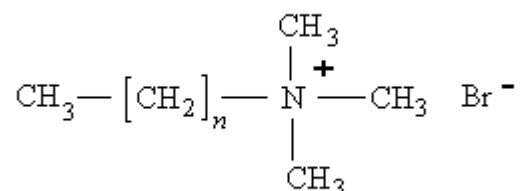
Sostanzialmente i due modelli differiscono nel concetto stesso di micelle. Nel modello di azione di massa per tensioattivi ionici, i componenti in equilibrio dell'aggregato supramolecolare che forma le micelle sono dati da un certo numero di molecole di tensioattivo considerate insieme al controione legato nello strato di Stern, nel caso di tensioattivi ionici. Nel modello di pseudo-fase invece, la pseudo fase che si forma come micelle è elettricamente neutra, poiché il doppio strato di Gouy-Chapman è considerato come parte integrante delle micelle stesse.

I parametri termodinamici possono essere calcolati con entrambi gli approcci, ma solo i dati calcolati utilizzando un modello di pseudo fase sono in accordo con i dati sperimentali.

Sono state considerate quattro molecole di tensioattivo. Le *cmc* sono state derivate sperimentalmente da curve di conducibilità elettrica vs. concentrazione.

### **Materiali**

I quattro tensioattivi cationici esaminati sono il decil-trimetil-ammonio bromuro (DeTAB), il dodecil-trimetil-ammonio bromuro (DTAB), il tetradecil-trimetil-ammonio bromuro (TTAB) e l'esadecil-trimetil-ammonio bromuro (CTAB) di formula generale



con  $n = 9, 11, 13, 15$  che corrispondono rispettivamente al decil-trimetil-ammonio bromuri (DeTAB), dodecil-trimetil-ammonio bromuro (DTAB), tetradecil-trimetil-ammonio bromuro (TTAB) e al esadecil-trimetil-ammonio bromuro (CTAB). I composti DeTAB e CTAB sono stati ottenuti dalla Fluka con purezza rispettivamente, del 98% e 96%. Il composto DTAB dalla Aldrich Chemie con purezza del 99% e il composto TTAB dalla Sigma con purezza del 99%. Le sostanze non sono state ulteriormente purificate.

## Risultati

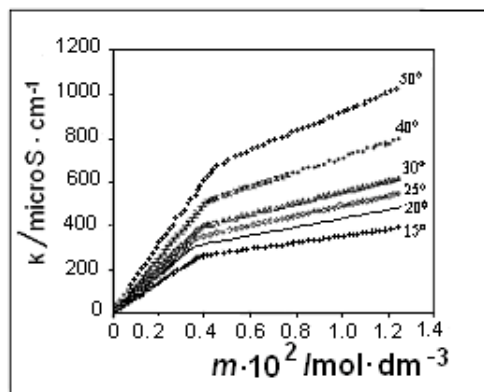
Nella Tabella 1 sono riportate le funzioni termodinamiche dei tensioattivi in studio.

**Tabella 1.**

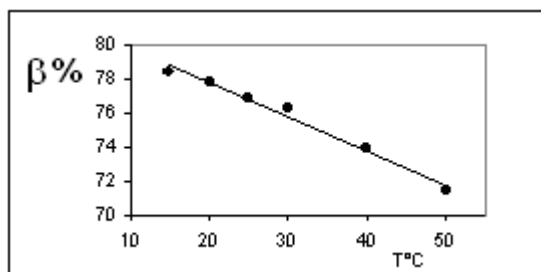
T/K	$\Delta H_{app}$ kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta C_p$ J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta G$ kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta S_{app}$ J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup>	<b>DeTAB</b>
288.16	0.10	-154.57	-6.48	22.85	
293.16	-0.66	-149.35	-6.59	20.24	$\Delta H_0 = 39.71$
298.16	-1.39	-144.38	-6.69	17.75	kJ·mol <sup>-1</sup>
303.16	-2.10	-139.66	-6.77	15.39	$n_{w(H)} = -1.83$
308.16	-2.79	-135.16	-6.84	13.14	
313.16	-3.45	-130.88	-6.90	11.00	$\Delta S_0 = 804.30$
318.16	-4.10	-126.80	-6.95	8.96	J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup>
323.16	-4.72	-122.90	-6.99	7.02	$n_{w(S)} = -1.83$
T/K	$\Delta H_{app}$ kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta C_p$ J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta G$ kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta S_{app}$ J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup>	<b>DTAB</b>
288.16	0.89	-219.29	-9.88	37.38	
293.16	-0.19	-211.87	-10.06	33.67	$\Delta H_0 = 57.07$
298.16	-1.23	-204.83	-10.22	30.14	kJ·mol <sup>-1</sup>
303.16	-2.24	-198.13	-10.36	26.79	$n_{w(H)} = -2.59$
308.16	-3.21	-191.75	-10.49	23.60	
313.16	-4.16	-185.67	-10.60	20.57	$\Delta S_0 = 1146$
318.16	-5.07	-179.88	-10.69	17.67	J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup>
323.16	-5.96	-174.36	-10.77	14.91	$n_{w(S)} = -2.60$
T/K	$\Delta H_{app}$ kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta C_p$ J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta G$ kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta S_{app}$ J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup>	<b>TTAB</b>
288.16	-0.03	-274.88	-13.43	46.50	
293.16	-1.38	-265.58	-13.65	41.86	$\Delta H_0 = 70.40$
298.16	-2.68	-256.75	-13.85	37.44	kJ·mol <sup>-1</sup>
303.16	-3.95	-248.35	-14.02	33.24	$n_{w(H)} = -3.25$
308.16	-5.17	-240.36	-14.18	29.24	
313.16	-6.35	-232.74	-14.32	25.44	$\Delta S_0 = 1436$
318.16	-7.50	-225.48	-14.44	21.81	J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup>
323.16	-8.61	-218.56	-14.54	18.34	$n_{w(S)} = -3.26$
T/K	$\Delta H_{app}$ kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta C_p$ J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta G$ kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta S_{app}$ J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup>	<b>CTAB</b>
288.16	0.48	-374.22	-16.88	60.26	
293.16	-1.36	-361.57	-17.17	53.93	$\Delta H_0 = 96.36$
298.16	-3.14	-349.54	-17.42	47.92	kJ·mol <sup>-1</sup>
303.16	-4.86	-338.11	-17.65	42.20	$n_{w(H)} = -4.42$
308.16	-6.52	-327.22	-17.85	36.76	
313.16	-8.13	-316.86	-18.02	31.58	$\Delta S_0 = 1952$
318.16	-9.69	-306.98	-18.16	26.64	J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup>
323.16	-11.20	-297.55	-18.28	21.92	$n_{w(S)} = -4.43$

Nella Figura 3 è riportato un tipico diagramma di conducibilità a diverse temperature in Figura 3, ogni curva a temperatura costante è costituita da due porzioni a diversa pendenza che convergono verso un punto di flesso.

L'ascissa del punto di flesso dà la *cmc* [9]. Annotiamo: (i) la pendenza di ogni retta a bassa concentrazione è più alta di quella della corrispondente retta dopo la *cmc*, questa variazione della pendenza è legata ad una diminuzione della mobilità delle micelle ed all'associazione dei controioni con le micelle, (ii) la pendenza della porzione a basse concentrazioni aumenta con la temperatura meno di quella della corrispondente porzione ad alte concentrazioni, probabilmente in relazione alla diversa variazione della mobilità delle micelle con la temperatura rispetto ai singoli ioni e alla diminuzione di (Figura 4) di  $\beta$  con la temperatura.



**Figura 3.** Conducibilità specifica vs. *m* a diverse temperature per TTAB.



**Figura 4**  $\beta$  in funzione della temperatura per TTAB

## Discussione

Mettendo in grafico  $-\log(cmc)$  in funzione della temperatura  $T$  si osserva l'andamento tipico di un processo idrofobico (Figura 5), con un massimo attorno alla temperatura ambiente che corrisponde ad un minimo se riportiamo i dati come  $cmc$  vs.  $T$ . La presenza di un minimo intorno alla temperatura ambiente è già stata riportata in letteratura da Zielinski et al. [10] per il DTAB a 20 °C e  $T_{min}$  attorno ai 25 °C per il sodio dodecilsolfato [11] e per il dodecildimetetilammonio bromuro [12].

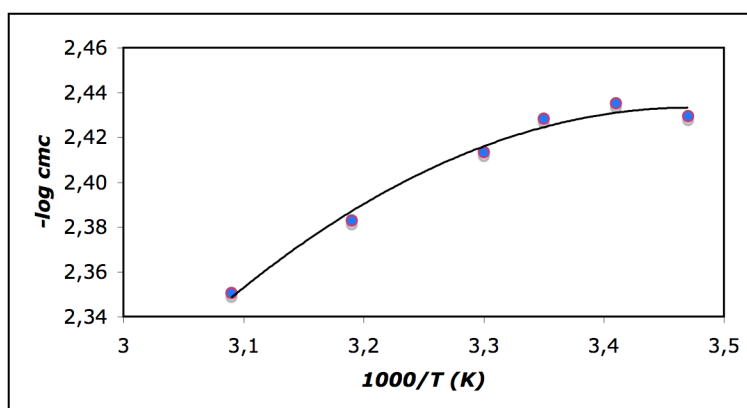


Figura 5. Diagramma  $-\log(cmc) = f(1/T) \cdot 1000$  (temperatura espressa in K) per il TTAB.

Il valore  $\Delta G_{mic}^{\circ}$  è stato calcolato sia con l'eq(22) che con l'eq(23). I valori di  $\Delta H_{app}$ , derivati dall'eq (23), sono tuttavia in disaccordo con i dati ottenuti direttamente dalle misure calorimetriche. Un fatto analogo è stato osservato da altri autori [12, 13-19].

Secondo il nostro modello, è l'affinità idrofobica che porta alla formazione delle micelle e la dipendenza di  $\Delta G_{mic}^{\circ}$  dalla temperatura si deve soprattutto al riempimento da parte delle molecole d'acqua del vuoto lasciato nella cavità dall'associazione delle catene idrofobiche ed è scarsamente influenzata dal cambiamento della sfera polare delle micelle. Inoltre, va sottolineato come nella formazione delle micelle non sono le molecole di tensioattivo, ma bensì quelle di acqua a giocare il ruolo più importante [19].

Queste sono le ragioni per le quali sono stati discussi solo i parametri termodinamici derivati dall'eq(22).

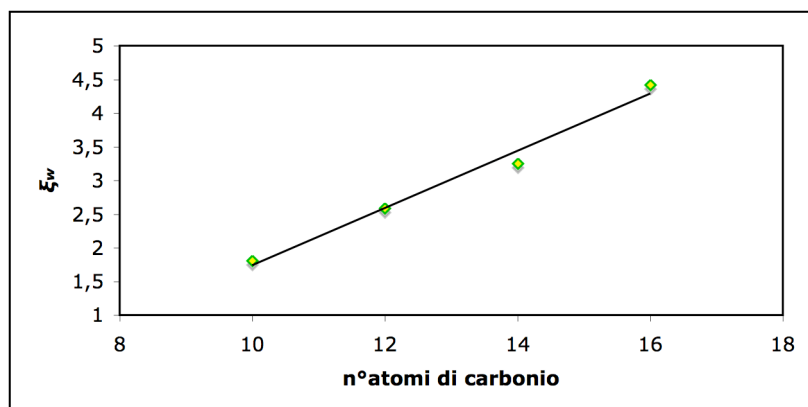
Applicando il nostro modello statistico-termodinamico abbiamo calcolato i parametri termodinamici  $\Delta G_{mic}^{\circ}$ ,  $\Delta H_{app}$ ,  $\Delta S_{app}$ , e  $\Delta C_p = n_w C_{p,w}$  (Tabella 1) partendo dal diagramma  $-\log(cmc) = f(1/T)$  (per esempio Figura 5). I punti sperimentali sono stati interpolati da una polinomiale, con uno *scattering* molto limitato dei punti attorno alla curva calcolata. Quindi dalla derivata prima della curva si ottiene  $-\Delta H_{app}$  e dalla pendenza della retta ( $-\Delta H_{app}$ ) in funzione della temperatura  $T$  il  $\Delta C_p$  da cui si può calcolare  $n_{w(H)}$  dall'eq.  $n_{w(H)} = \Delta C_p / C_{p,w}$ . (Tabella 2).

**Tabella 2.** Formazione delle micelle per ogni tipo di tensioattivo: numero  $n_w$  calcolato da entalpia ed entropia (\*)

Composti(!)	$n_{w(H)}$	$n_{w(S)}$	Ratio	$\Delta H_0$ kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta S_0$ kJ·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup>	Ref.
DeTAB	-1.83	-1.83	1.00	39.7	0.80	questo lavoro
DTAB	-2.59	-2.60	0.99	57.1	1.15	questo lavoro
TTAB	-3.25	-3.26	0.99	70.4	1.44	questo lavoro
CTAB	-4.42	-4.43	0.99	96.4	1.95	questo lavoro
1-HDPB	-4.73			101.1		22
SDS	-4.21	-4.16	1.01	106.1	1.88	21
CAF	-1.26	-1.27	0.99	14.3	0.51	23
3-nonilBS	-3.80	-3.60	1.06	85.3	1.57	24
5-decilBS	-3.35	-3.16	1.06	74.3	1.37	25
2-decilBS	-2.17	-2.18	0.99	44.6	0.91	25
1-ottilBS	-1.29	-1.30	0.99	25.2	0.52	26, 27
C8H17S	-3.47	-3.48	1.00	78.8	1.47	28
C10H21S	-3.65	-3.85	0.95	87.2	1.63	28
C12H25S	-3.99	-4.00	1.00	89.7	1.70	28
C14H29S	-4.26	-4.27	1.00	94.2	1.82	28
C12HMV	-5.56	-5.58	1.00	124.5	2.39	29
C12NMBr	-9.38	-9.41	1.00	207.0	4.01	30
C14NMBr	-2.45	-2.45	1.00	50.6	1.03	30
C16NMBr	-1.31	-1.31	1.00	22.9	0.54	30
C18NMBr	-2.70	-2.70	1.00	62.6	1.18	31

(\*)  $n_{w(H)}$  dalla pendenza di  $\Delta H = f(T)$  e  $n_{w(S)}$  dalla pendenza di  $\Delta S = f(\ln T)$

(!)Simbolo	Composto	(!)Simbolo	Composto
DeTAB	C <sub>10</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Br	DTAB	C <sub>12</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Br
TTAB	C <sub>14</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Br	CTAB	C <sub>16</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Br
1-HDPB	esadecilpiridinio bromuro	C10H21S	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> -solfonato
SDS	sodiododecil solfato	C12H25S	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> -solfonato
CAF	dimero della caffeina	C14H29S	C <sub>14</sub> H <sub>29</sub> -solfonato
3-nonilBS	3-nonilbenzensolfonato	C12HMV	(C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> ) <sub>2</sub> -metilviologeno
5-decilBS	5-decilbenzensolfonato	C12NMBr	C <sub>12</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Br
2-decilBS	2-decilbenzensolfonatoe	C14NMBr	C <sub>14</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Br
1-ottilBS	1-ottilbenzensolfonato	C16NMBr	C <sub>16</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Br
C8H17S	C8H17-solfonato	C18NMBr	C <sub>18</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Br



**Figura 6.** Il numero di  $\xi_w$  dipende dalla lunghezza della catena.

Le pendenze sono negative e uguali a quelle ottenute dall'entalpia in funzione di  $T$ . Il rapporto  $m_{(S)}/n_w$  riproduce il valore di  $C_{p,w}$ , mostrando così la stessa corrispondenza tra i grafici di entalpia ed entropia come succedeva per la solubilità di gas non polari. In altre parole,  $n_{w(H)}$  e  $n_{w(S)}$  sono anch'essi uguali e negativi ed i valori di  $\xi_w = |n_w|$  risultano essere proporzionali alla lunghezza della catena alifatica, confermando così la proporzionalità con le dimensioni del soluto.

Gli stessi calcoli sono stati quindi applicati ai dati delle *cmc* riportati da altri Autori [20-31] per ogni tipo di tensioattivo. I valori di  $n_w$  calcolati dai valori sperimentali riportati in letteratura per lo stesso composto sono, tuttavia, piuttosto diversi. Infatti, i punti sperimentali sono molto "scatterati", in alcuni casi [20-21], con un'interpolazione della curva polinomiale di ( $R^2 = 0.7-0.8$ ). In ogni caso, la linearità delle funzioni  $\Delta H_{app} = f(T)$  e  $\Delta S_{app} = f(\ln T)$  è stata confermata e la pendenza negativa ( $\Delta C_p < 0$ ) dei due tipi di diagrammi è la medesima per ogni composto (Tabella 2).

Mettendo in grafico l'entropia estrapolata  $\Delta S_0$  in funzione di  $\xi_w = |n_w|$  per tutti i dati dei composti esaminati, si ottiene una linea retta (Figura7)

$$\Delta S_0 = \Delta S_0^{(\xi_w=0)} + b \xi_w = 10.2 + 428.3 \xi_w \quad (24)$$

dove la pendenza  $\Delta S_w = + 428.3 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\xi_w^{-1}$  è il cambiamento positivo di entropia associato ad ogni molecola d'acqua  $W_{III}$  coinvolta nel processo. Poichè il meccanismo proposto per la formazione delle micelle implica una riduzione della cavità e di conseguenza un'espansione del volume del solvente, questo cambiamento corrisponde a una diluizione del soluto. Di conseguenza la variazione unitaria dell'entropia è positiva e il valore  $\Delta S_0^{(\xi_w=0)} = +10.2 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  indica che, nella formazione delle micelle, avviene un piccolo aumento dell'entropia che non dipende dalla dimensione, ma piuttosto dalla diluizione del monomero a causa dell'associazione in micelle.

Considerando le relazioni viste, l'entropia apparente può essere calcolata dalla seguente equazione:

$$\Delta S_{app} = \Delta S_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta S_w - n_w C_{p,w} \ln T = 10.2 + 428 \xi_w - \xi_w C_{p,w} \ln T \quad (25)$$

dove ancora una volta, il termine  $\xi_w$ , trasferisce il cambiamento di segno alla corrispondente quantità termodinamica molare. Abbiamo quindi ricalcolato il valore dei parametri dell'eq. (16) comprendendo i valori di  $\Delta H_0$  ottenuti:

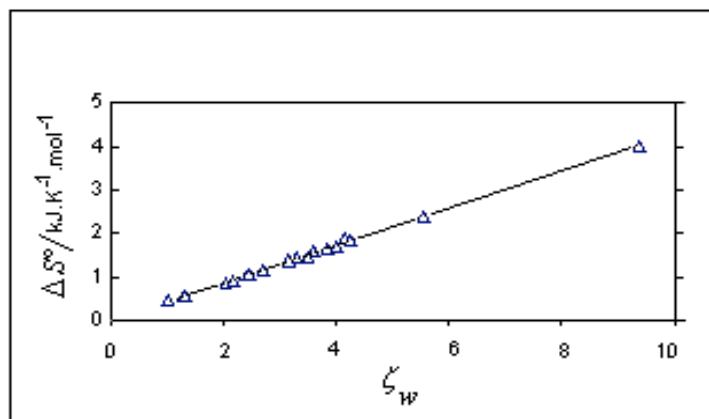


Figura 7. L'entropia estrapolata  $\Delta S_0$  è una funzione lineare di  $\xi_w$

$$\Delta H_{app} = -3.6 + 23.1 \xi_w - \xi_w C_{p,w} T \quad (26)$$

e come risultato non abbiamo visto cambiamenti significativi.

### Confronto tra la formazione delle micelle e la dissoluzione dei gas

Se confrontiamo i dati termodinamici del processo di formazione delle micelle e della dissoluzione dei gas (Figura8), si vede che sono strettamente correlati, sono esattamente l'opposto l'uno dell'altro. Per iniziare, il grafico di  $\ln K_{sol}$  in funzione di  $1/T$  per i gas mostra una curva con un minimo (convessità verso il basso). Questo significa che, (ricordiamo che dall'eq(2) la tangente alla curva identifica  $-\Delta H_{app}/R$ ), il valore dell'entalpia è positivo (endotermico) ad alte temperature (piccolo  $1/T$ ) e negativo (esotermico) a basse temperature (grande  $1/T$ ). Al contrario, durante la formazione delle micelle il grafico di  $-\ln(cmc)$  su  $1/T$  mostra un massimo (convessità verso l'alto) e quindi il comportamento dell'entalpia apparente ad alte e basse temperature è opposto a quello che si osserva per la dissoluzione di un gas. Ogni termine di energia libera

$$\Delta G_{app} = \Delta H_{app} - T \Delta S_{app} \quad (27)$$

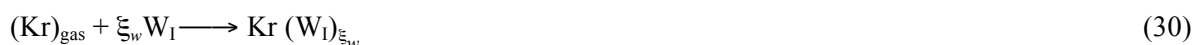
con  $\Delta H_{app}$  espresso come nell'eq(16) o nell'eq(7) e  $\Delta S_{app}$  come nell'eq(11) o nell'eq(25), è correlato per le due classi. Infatti, ogni termine delle espressioni per  $\Delta H_{app}$  e  $\Delta S_{app}$  sia per la solubilità dei gas che per la formazione di micelle può essere associato ad un particolare passaggio della reazione chimica. Se ci riferiamo al processo di dissoluzione possiamo esprimere l'entalpia apparente come

$$\Delta H_{app} = \Delta H_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta h_w + \xi_w C_{p,w} T \quad (28)$$

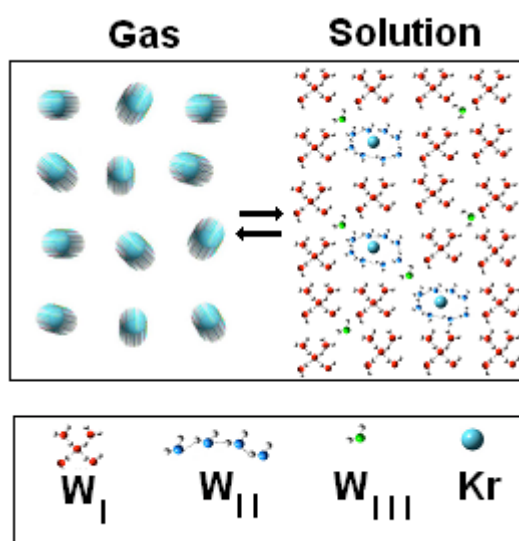
Qui,  $\Delta H_{app}$  corrisponde alla reazione totale



dove  $(\text{Kr}(\text{W}_{\text{II}})_{\xi})$  rappresenta un complesso formato da un guscio d'acqua  $\text{W}_{\text{II}}$  che circonda le molecole di gas e  $\xi_w W_{\text{III}}$  sono le molecole di acqua libera che si muovono nello spazio interstiziale. La reazione totale può essere suddivisa in differenti reazioni *stepwise*. Il contatto tra gas e acqua si può esprimere come



e si riferisce a  $\Delta H_0^{(\xi_w=0)} = -17.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , che rappresenta l'affinità tra gas e acqua, ed è indipendente dalle dimensioni del soluto.



**Figura 8.** Solubilità di sostanze non polari in acqua. La diminuzione dell'entropia configurazionale dovuta alle molecole di gas, che passano dallo stato gassoso ad essere intrappolate in soluzione, è  $\Delta S_0^{(\xi_w=0)} = -86.4 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$

Il passaggio successivo è la trasformazione del complesso di contatto  $\text{Kr}(\text{W}_{\text{I}})_{\xi}$  nella gabbia  $\text{Kr}(\text{W}_{\text{II}})_{\xi}$  con cavità proporzionale a  $\xi_w W_{\text{III}}$  molecole d'acqua:



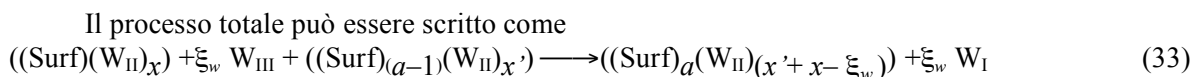
Questo processo implica una variazione di entalpia  $\Delta h_w \xi_w = -21.6 \xi_w / \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  che misura la stabilizzazione relativa di energia dei due tipi ( $\text{W}_{\text{I}} \rightarrow \text{W}_{\text{II}}$ ) di *cluster* che circondano la molecola di soluto. Questa stabilizzazione dell'energia, che implica contatti più stretti Kr-acqua, è proporzionale, attraverso  $\xi_w$ , alla dimensione della cavità. Infine, il termine  $\xi_w C_{p,w} T$  corrisponde al calore assorbito dalle molecole  $\xi_w W_{\text{III}}$  rilasciate dalla cavità. Questa energia è necessaria alle molecole di acqua libera  $\text{W}_{\text{III}}$  per acquisire l'energia termica appropriata alla temperatura  $T$ .

In parallelo, possiamo analizzare l'espressione per l'entropia

$$\Delta S_{app} = \Delta S_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta s_w + \xi_w C_{p,w} \ln T \quad (32)$$

L'entropia  $\Delta S_{app}$  si riferisce alla reazione totale descritta dall'eq(29). Il passaggio della reazione dell'eq (30) corrisponde a  $\Delta S_0^{(\xi_w=0)} = -86.4/\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  che misura la diminuzione dell'entropia configurazionale dovuta al gas quando viene intrappolato nella gabbia liquida. Il valore di questa diminuzione è uguale alla perdita di entropia  $\Delta S_{condens} = -86.9 \pm 1.4 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  che dà la costante di Trouton [32] che si riferisce al passaggio da vapore a liquido. Quindi il termine  $\xi_w \Delta s_w = -445 \xi_w/\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  corrisponde all'eq(31) che indica la diminuzione di entropia necessaria per creare una cavità il cui volume è proporzionale alle molecole di acqua  $\xi W_{III}$ . In ultimo, il termine  $\xi_w C_{p,w} \ln T$  indica l'entropia termica guadagnata dalle molecole di acqua  $\xi W_{III}$  rilasciate dalla cavità.

Un'analogia procedura può essere seguita per analizzare la reazione di formazione delle micelle. L'unità monomerica, (Surf) è stata precedentemente dissolta in acqua (con espulsione di un certo numero di molecole di acqua  $W_{III}$  e con la formazione di una cavità) e circondata da un guscio di  $x$  molecole di acqua  $W_{II}$ , in modo simile ai gas non polari. Indichiamo simbolicamente questa unità monomerica circondata da acqua  $W_{II}$  con ((Surf)( $W_{II}$ ) $_x$ ) e la micella con ((Surf) $_a$ ( $W_{II}$ ) $_{(x'+x-\xi_w)}$ ) dove  $a$  indica il numero di monomeri già aggregati. Secondo questo approccio, il processo si riferisce ad ognuna delle unità di monomero  $a$  e alla coalescenza delle cavità che avviene tra la micella ( $a-1$ ), con  $x'$  unità di acqua  $W_{II}$  circondata dalla sua cavità, e un monomero aggiunto con la sua propria cavità. Il numero  $\xi_w$ , quindi, si riferisce all'aggiunta dell'ultimo monomero qualunque sia il numero di aggregazione  $a$ .



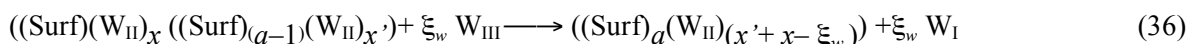
e corrisponde all'entalpia apparente  $\Delta H_{app}$

$$\Delta H_{app} = \Delta H_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta h_w - \xi_w C_{p,w} T \quad (34)$$

Il contatto iniziale



corrisponde a  $\Delta H_0^{(\xi_w=0)} = -3.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Questa variazione di entalpia molto bassa indica l'affinità monomero-monomero, che dovrebbe essere molto bassa. La successiva reazione "stepwise" è



che corrisponde a  $\Delta h_w = +23.1/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\xi_w^{-1}$ , che a sua volta indica il calore (endotermico) necessario a trasformare  $W_{II}$  in  $W_I$  per il ricollocamento di ogni molecola  $\xi_w W_{III}$  nel bulk per riempire l'eccesso di cavità. Infine, l'entalpia  $n_w C_{p,w} T = -\xi_w C_{p,w} T$  indica la quantità di calore rilasciata dalle molecole di acqua  $\xi_w W_{III}$  quando si risistemano nel *bulk*. Questo rilascio di calore è analogo ad una sorta di cristallizzazione o condensazione di calore [1].

Ancora, l'entropia può essere rappresentata come già mostrato nell'eq(17) da

$$\Delta S_{app} = \Delta S_0^{(\xi_w=0)} + \xi_w \Delta s_w - \xi_w C_{p,w} \ln T \quad (37)$$

dove  $\Delta S_{app}$  corrisponde alla reazione totale dell'eq(25). Il termine  $\Delta S_0^{(\xi_w=0)} = +10.2 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  corrisponde alla reazione parziale dell'eq(35) ed indica il guadagno di entropia (diluizione) del ligando (Surf) quando si lega al recettore (Surf)<sub>(a-1)</sub>, indipendente dalle dimensioni del ligando. Il termine  $\Delta s_w = +428/\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\xi_w^{-1}$ , che corrisponde all'eq(36) indica l'espansione (riempimento) di volume del solvente quando una molecola di acqua  $W_{III}$  si ricolloca come *bulk*  $W_I$ . Questo guadagno di entropia  $+428\xi_w/\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  è molto grande ed è la quantità termodinamica chiave che guida la reazione. Infine, l'entropia  $-\xi_w C_{p,w} \ln T$  indica l'"entropia termica" persa delle molecole di acqua  $\xi_w W_{III}$  quando tornano nella struttura  $W_I$ .

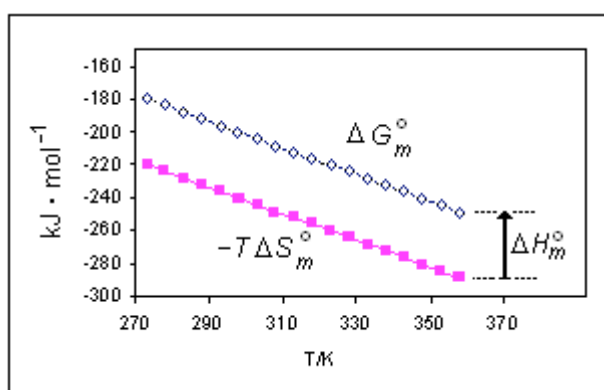
La corrispondenza tra gli *step* della dissoluzione di un gas in acqua e gli *step* inversi nella formazione delle micelle è perfetta, ma l'analisi quantitativa è perfino sorprendente. Infatti, le quantità *per molecola di acqua*, rispettivamente, dell'entalpia,  $\Delta h_w$  e dell'entropia  $\Delta s_w$ , sono praticamente uguali per le due classi, ad eccezione del segno, che è certamente opposto. Infatti, abbiamo trovato per i processi esaminati i valori riportati nella tabella sottostante.

Processo	Acqua	$\Delta h_w/\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\xi_w^{-1}$	$\Delta s_w/\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\xi_w^{-1}$
Gas dissol.	$\rightarrow W_{III} \text{ out } W_I$	-21.6	-445 (cavity)
Micelle	$\rightarrow W_{III} \text{ into } W_I$	+23.1	+428 (filling)

L'auto-consistenza di questi dati dà ulteriore supporto alla robustezza del modello.

Un ulteriore elemento di connessione tra i due processi, è la possibilità di applicare la distinzione tra parte motrice e parte termica sia dell'entalpia che dell'entropia (cfr. eq(4-7)), proposta da Lumry [5,6], anche alla formazione delle micelle.

Le parti termiche dell'entalpia e dell'entropia sono prodotte dalle trasformazioni di fase dell'acqua  $W_{III}$  e non dalla reazione.



**Figura 9.** Energia libera "lavoro"  $\Delta G_m^\circ$  e termine dell'entropia motrice  $-T\Delta S_m^\circ$  per le micelle di DeTAB. L'entalpia motrice ha un valore costante  $\Delta H_m^\circ = +39.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ . La formazione della micelle in acqua è chiaramente guidata dall'entropia.

Considerando valida l'idea di Lumry, assumiamo che queste parti termiche non contribuiscano al cambiamento di energia libera attuale di formazione delle micelle come rappresentato dalle reazioni

dell'eq(35) e dell'eq(36). Abbiamo, quindi, calcolato l'energia libera lavoro  $\Delta G_m^\circ$  a diverse temperature per i quattro composti DeTAB, DTAB, TTAB, e CTAB, considerando solamente le parti lavoro delle funzioni termodinamiche. L'energia libera lavoro è rappresentata dall'equazione generale di Helmholtz-Gibbs

$$\Delta G_m^\circ = \Delta H_m^\circ - T \Delta S_m^\circ \quad (38)$$

i valori di  $\Delta H_m^\circ$  e  $\Delta S_m^\circ$  sono riportati in Tabella 3 per ogni composto. Da un'analisi di questi dati si ottiene una chiara indicazione del fatto che le reazioni di formazione delle micelle siano guidate dall'entropia poiché (Figura 9), contro una variazione di entalpia positiva costante ( $\Delta H_m^\circ > 0$ ), il contributo del termine entropico  $-T \Delta S_m^\circ$  è essenziale per ottenere un valore negativo di  $\Delta G_m^\circ$ , perlomeno fino alla temperatura  $T_{\Delta G_m^\circ=0}$  a cui l'energia libera lavoro è zero. Si noti che (Tabella 3) la temperatura  $T_{\Delta G_m^\circ=0} = 49.3$  K (comune per tutti i composti) è ben al di sotto del punto di congelamento del solvente (acqua) e quindi fuori dall'intervallo di temperature a cui può realmente avvenire la formazione delle micelle.

**Tabella 3.** Valori delle parti lavoro delle funzioni termodinamiche nelle micelle

Composto	$\Delta H_m^\circ$ kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta S_m^\circ$ kJ·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup>	$T_{\Delta G_m^\circ=0}$ (*) K
DeTAB	+39.8	0.807	49.4
DTAB	+56.4	1.143	49.3
TTAB	+70.7	1.436	49.3
CTAB	+96.2	1.953	49.3

DeTAB	C <sub>10</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Br	DTAB	C <sub>12</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Br
TTAB	C <sub>14</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Br	CTAB	C <sub>16</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Br

(\*)  $T_{\Delta G_m^\circ=0}$  è la temperatura a cui l'energia libera  $\Delta G_m^\circ$  sarebbe zero.

### Classi di processi idrofobici

La dissoluzione dei gas e l'associazione delle micelle sono esempi rappresentativi di due classi di processi correlati ma opposti (Tabella 4). La classe A include processi per i quali  $n_w$  è positivo ( $n_w > 0$ ) e un numero  $\xi_w$  di molecole di acqua  $W_{III}$  sono rilasciate dalla struttura  $W_I$  per formare una cavità. La classe B include processi per i quali  $n_w$  è negativo ( $n_w < 0$ ) con un numero  $\xi_w$  di molecole di acqua  $W_{III}$  che si risistemano nella struttura  $W_I$  dell'acqua per riempire l'eccesso di cavità.

**Tabella 4.** Classi di processi idrofobiciClasse A: con  $\xi_w$  acqua  $W_{III}$  da acqua  $W_I$  ( $n_w > 0$ )

N	Processo	Range di $\xi_w$	Rif.
1	dissoluzione di gas in acqua	1.4-11	2
2	dissoluzione di idrocarburi liquidi in acqua	2.7-5.8	2
3	denaturazione delle proteine	65-280	2
4	effetto di un sostituyente non-polare	0.3-1.3	2
5	protonazione dell'acido carbossilico	2.1	33

Classe B: con  $\xi_w$  acqua  $W_{III}$  in acqua  $W_I$  ( $n_w < 0$ )

N	Processo	Range di $\xi_w$	Rif.
1	associazione delle micelle	4-19	2
2	complessazione delle proteine	19-189	2
3	<i>refolding</i> delle proteine	65-280	2
4	effetto di un sostituyente polare	0.4-2.1	2
5	carica negativa	2.1	33

E' interessante confrontare i valori ottenuti per  $\Delta S_0^{(\xi_w=0)}$  nelle diverse classi di reazione esaminate (Tabella 5, A). La classificazione è in rapporto con i gruppi (gas non-polari, idrocarburi liquidi, denaturazione delle proteine) trovati da Murphy, Privalov e Gill [34] dall'estrapolazione di  $\Delta S = f(\Delta C_p)$  a 25 C° con  $\Delta C_p = 0$ . Per la solubilità di gas non polari (Tabella 5, A, a), l'entropia  $\Delta S_0^{(\xi_w=0)} = -86.4 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  indica, come già detto, la diminuzione della molteplicità configurazionale da parte di una molecola di gas quando viene intrappolata in una gabbia liquida. Questa diminuzione di entropia è praticamente la stessa (Tabella 5, A, b) del valore  $\Delta S_{condens} = -86.9 \pm 1.4 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  che si riferisce al passaggio da vapore a liquido (costante di Trouton) [32]. Un'ulteriore prova indiretta di questa interpretazione è il fatto (Tabella 5, A, d) che il valore dell'entropia estrapolata per la dissoluzione di liquidi [34], in cui le molecole sono già condensate prima della dissoluzione, è praticamente nullo,  $\Delta S_0^{(\xi_w=0)} = -0.5 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Nella formazione di bio-complessi (Tabella 5, c), il valore  $\Delta S_0^{(\xi_w=0)} = +262 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  indica un contributo entropico favorevole positivo poiché, in conseguenza alla combinazione tra recettore e ligando, parte del ligando è sottratto dalla soluzione e quindi diluito. D'altra parte, nella formazione delle micelle (Tabella 5, A, e) il valore  $\Delta S_0^{(\xi_w=0)} = +10.2 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$  indica che in questo caso avviene anche una diluizione delle unità monomeriche.

Consideriamo ora (Tabella 5, B) i valori dell'entalpia estrapolata  $\Delta H_0^{(\xi_w=0)}$ , che sono ben definiti per i diversi processi. L'entalpia estrapolata (in ogni caso  $\Delta H_0^{(\xi_w=0)} < 0$ ) è molto bassa per la formazione di micelle, abbastanza alta per gas non-polari e molto alta per i bio-complessi.

I complessi [1] formati da ligandi o substrati con proteine mostrano interessanti proprietà che li collegano con le proprietà di formazione delle micelle. Nei complessi proteici, tuttavia, l'affinità chimica dei componenti aggiunta al guadagno entropico causato dal riempimento del volume, sono maggiori che nella formazione delle micelle, sia come entalpia che come entropia.

**Tabella 5.** Analisi dell'entropia ed entalpia residue in diverse classi

<i>A) Entropia</i>		
Processo	$\Delta S_0^{(\xi_w=0)}$ J·K <sup>-1</sup> ·mol <sup>-1</sup>	Rif.
a) solubilizzazione di gas non polari	-86.4	1
b) condens. vapore - liquido (Trouton)	-86.9±1.4	32
c) formazione bio-complessi	+262	1
d) solubil. di liquidi non-polari	-0.5	34
e) formazione delle micelle	+10.2	Questo lavoro

<i>B) Entalpia</i>		
Processo	$\Delta H_0^{(\xi_w=0)}$ kJ·mol <sup>-1</sup>	Ref.
a) solubilizzazione di gas non polari	-17.7	1
b) formazione bio-complessi	-120.9	1
c) formazione delle micelle	-3.6	Questo lavoro

### *Insiemi supramolecolari*

L'affinità di associazione dei componenti delle micelle è stata molto spesso classificata come "legame idrofobico". Ci siamo domandati se la parola 'legame' fosse appropriata in questi casi dal momento che la formazione di un legame dà origine ad una nuova molecola ed in termini di proprietà elettroniche si ha una fusione delle due nuvole elettroniche che può essere descritta da nuovi orbitali molecolari. I risultati della nostra ricerca mostrano che nelle micelle i due componenti si avvicinano tra loro, anche se non ad una distanza inferiore alla somma dei raggi di non legame. Può non esserci una sovrapposizione e una fusione delle nuvole elettroniche. La cavità che circonda le due unità associate è ora maggiore della somma delle cavità precedentemente separate, di conseguenza, possiamo parlare di una sovrapposizione delle cavità ma non di un nuovo orbitale molecolare. La produzione di entropia positiva ( $\Delta S_w = +428/\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\xi_w^{-1}$ ) dovuta al riempimento di parte della cavità e uguale all'incremento del volume del solvente, risulta essere la *driving force* dell'interazione idrofobica ed è abbastanza grande da superare un'eventuale potenziale repulsione tra le sfere hard delle porzioni non-polari che danno l'associazione.

E' importante, inoltre, sottolineare che la produzione di entropia positiva è stata in passato attribuita alle molecole di acqua "rimosse e disordinate" dell'interfaccia molecola-molecola. Nel presente modello, al contrario, è la "riduzione di cavità" a questa interfaccia con la ristrutturazione delle molecole di acqua e l'espansione del volume di solvente, che è responsabile della produzione positiva di entropia. Per metter in chiaro che non si sono formati corti legami intermolecolari proponiamo di sostituire il termine "legame idrofobico" con "affinità idrofobica". Le associazioni di molecole tenute insieme dall'affinità idrofobica possono essere classificate come esempi di aggregati supramolecolari.

## Conclusioni

La determinazione della (*cmc*) a diverse temperature per una serie di tensioattivi cationici ha reso possibile il calcolo delle funzioni termodinamiche ( $(-\Delta G_{mic}^0/T)$ ,  $\Delta H_{app}$ , and  $\Delta S_{app}$ ) di micellizzazione: i dati si adattano al modello molecolare già proposto per interpretare la solubilità in acqua di sostanze non-polari. Il modello, basato sull'esistenza di tre strutture dell'acqua, ovvero  $W_I$ ,  $W_{II}$ , e  $W_{III}$ , può essere impiegato per spiegare il processo di formazione delle micelle, per ogni tipo di tensioattivo.

I calcoli dell'entalpia e dell'entropia di micellizzazione sono stati confrontati con le corrispondenti funzioni termodinamiche del processo di solubilizzazione di sostanze non-polari. Il confronto ha dimostrato che i due processi sono simili ma opposti e per ogni *step* della reazione di solubilizzazione c'è un corrispondente *step* opposto nella formazione delle micelle. La trasformazione dell'acqua [ $W_I \longrightarrow W_{II} + W_{III} + \text{formazione della cavità}$ ] avviene nel processo di solubilizzazione, mentre il processo opposto [ $W_{II} + W_{III} + \text{riempimento della cavità} \longrightarrow W_I$ ] ha luogo nella formazione delle micelle. Inoltre, quantitativamente le funzioni termodinamiche di ogni *step* corrispondono le une alle altre, con segno opposto.

Il meccanismo di associazione dei monomeri per formare una micella con condensazione di  $\xi_w$  molecole di acqua  $W_{III}$  per monomero per riempire l'eccesso di cavità permette di rinominare il così detto "legame idrofobico" con un termine migliore, ovvero, "affinità idrofobica", nel senso che nessuna interazione elettronica è coinvolta e nessun legame formato.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Fiscaro, E., Compari, C., Duce, E., Braibanti, A., *J. Solut. Chem.*, in press
- [2] Fiscaro, E., Compari, C., Braibanti, A., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2004, 6, 4156
- [3] Fiscaro, E., Compari, C., Braibanti, A., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2005, 7, 1324
- [4] Braibanti, A., Fiscaro, E., Compari, C., *Journal of Physical Chemistry B*, 1998, 102, 8357
- [5] Lumry, R., *Biophysical Chemistry* 2003, 105, 545
- [6] Lumry, R., in: A. Braibanti (Ed.), *Bioenergetics and thermodynamics: model systems*, Reidel, Dordrecht, 1980, p.405
- [7] Evans, D.F., Wennerström, H., in *Colloidal Domain Where Physics, Chemistry, Biology and Technology Meet*, ch. 4, VCH Publisher, New York, USA, 1994, p 137.
- [8] Zana, R., *Langmuir*, 1996, 12, 1208
- [9] Carpena, P., Aguiar, J., Bernaola-Galvan, P., Ruiz, C. Carnero, *Langmuir*, 2002, 18, 6054
- [10] Zielinski, R., Ikeda, S., Nomura, H., and Kato, S., *J. Coll. Int. Sci.*, 1989, 129, 175
- [11] Goddard, E.D., Benson, G.C., *Can. J. Chem.*, 1957, 35, 986
- [12] Galan, J.J., González-Pérez, A., Rodríguez, J.R., *J. Therm. Anal. Cal.* 2003, 72, 465
- [13] van Os, N.M., Haak, J.R., Rupert, L.A.M., in: *Physico-Chemical Properties of Selected Anionic, Cationic and Nonionic Surfactant*, Elsevier, Amsterdam, 1993
- [14] De Lisi, R., Milioto, S., Castagnolo, M., Inglese, A., *J. Sol. Chem.* 1987, 16, 373
- [15] Basu Ray, G., Chakraborty, I., Ghosh, S., Moulik, S.P., Palepu, R., *Langmuir* 2005, 21, 10958
- [16] Basu Ray, G., Chakraborty, I., Ghosh, S., Moulik, S.P., *Journal of Colloid and Interface Science*, 2007, 307, 543
- [17] Mehrian, T., de Keizer, A., Korteweg, A., Lyklema, J., *Colloid and Surfaces A*, 1993, 71, 255
- [18] Muller, N., *Langmuir*, 1993, 9, 96
- [19] Sugihara, G., Hisatomi, M., *J. Coll. Int. Sci.*, 1999, 219, 31
- [20] Gonzalez-Perez, A., del Castillo, J. L., Czapkiewicz, J., Rodriguez, J. R., *J. Phys. Chem. B*, 2001, 105, 1720
- [21] Lumry, R., Battistel, E, Jolicoeur, C., *Farad. Symp. Chem. Soc.* 1982, 17, 93
- [22] Abraham, M. H., *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, 102, 5910
- [23] Singh, H. N., Saleem, S. M., Singh, R. P., Birdi, K. S., *J. Phys. Chem.*, 1980, 84, 2191
- [24] Jalali, F., Shamsipur, M., Alizadeh, N., *J. Chem. Thermodyn.*, 2000, 32, 755
- [25] Origlia-Luster, M. L., Patterson, B. A., Woolley, E. M., *J. Chem. Thermodyn.*, 2002, 34, 1909.
- [26] Van Os, N. M., Daane, G. J., Bolsman, T. A. B. M., *J. Colloid & Interf. Sci.*, 1988, 123, 267
- [27] Van Os, N. M., Daane, M. G. J., Bolsman, T. A. B. M., *J. Colloid & Interf. Sci.*, 1987, 115, 402
- [28] Rouviere, J., Faucompre, B., Lindheimer, M., Partyka, S., Brun, B., *J. Chimie Phys. Physico-Chimie Biol.*, 1983, 80, 309

- [29] Kamenka, N., Chorro, M., Fabre, H., Lindman, B., Rouviere, J., Cabos, C., *Coll. & Polymer Sci.*, 1979, 257, 757
- [30] Moroi, Y., Nishikido, N., Uehara, H., Matuura, R., *J. Colloid & Interf. Sci.*, 1975, 50, 254
- [31] Moroi, Y., Sugii, R., Akine, C., Matuura, R., *J. Colloid & Interf. Sci.*, 1985, 108, 180
- [32] Atkins, P. W, *Elem. of Physical Chemistry*, Oxford Press, Oxford, 1992, p.90
- [33] Braibanti, A., Fisicaro, E., Dallavalle, F., Lamb, J.D., Oscarson, J.L., Ughi, F.X., *J. Phys. Chem.*, 1993, 97, 8071
- [34] Murphy, K. P., Privalov, P. L., Gill, S. J., *Science*, 1990, 247, 559

**CAPITOLO 4**  
**ALTRE MOLECOLE BIOATTIVE**

## INIBITORI DELL'INTEGRASI DI TIPO 1 DEL VIRUS DI IMMUNODEFICIENZA UMANA: COMPLESSI METALLICI DI $\beta$ -DICHETO ACIDI

L'HIV-1 integrasi (IN) è un interessante “*target*” per lo sviluppo di nuovi farmaci antiretrovirali. Con l'inserimento di un inibitore IN nell'attuale terapia antiretrovirale, dato il suo ruolo vitale nel ciclo di replicazione virale e la mancanza del corrispettivo enzima umano, ci si attende un miglioramento nell'efficacia della terapia stessa, attraverso un potenziale sinergismo e senza un aumento della tossicità tissutale.

L'HIV-1 integrasi (IN) appartiene ad un'ampia famiglia di transferasi polinucleotidiche che comprende le transposasi e le polimerasi ed è composta di una singola catena polipeptidica di 288 aa che si ripiega in tre domini funzionali. Il core del dominio catalitico comprende i residui 51-212 e contiene il motivo “D,D(35)E”, due aspartati (D64 e D116) ed un glutamato (E152), che è essenziale per l'attività enzimatica. Questi residui aminoacidici coordinano due ioni metallici divalenti come  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ , con un meccanismo “*two-metal-ion*” simile a quello delle altre polimerasi polinucleotidiche; sembra che non sia necessario che entrambi gli ioni metallici siano presenti nel sito attivo dell'IN durante l'intera reazione enzimatica, il primo ione metallico, legato ai due aspartati, giocherebbe un ruolo maggiore nella reazione di *3'-processing*, mentre il secondo, legato prevalentemente al glutamato, potrebbe essere più rilevante durante la reazione *strand transfer*.

I composti aventi una porzione costituita da un  $\beta$ -diceto acido/estere sono una promettente classe di inibitori dell'HIV-1 integrasi (IN). Quindi, per identificare alcuni dei complessi ipotizzati in soluzione, è stata eseguita una serie di misure potenziometriche per due diceto acidi [(2Z)-2-idrossi-4-osso-4-fenilbut-2-enoico acido,  $H_2L^1$ , e (2Z)-4-[1-(4-fluorobenzil)-1H-pirrol-2-il]-2-idrossi-4-ossobut-2-enoico acido,  $H_2L^3$  ed i corrispettivi metil esteri ( $HL^2$ , e  $HL^4$ ) in presenza di ioni magnesio in diverse condizioni sperimentali.

### Parte Sperimentale

#### *Composti*

L'acido [(2Z)-2-idrossi-4-osso-4-fenilbut-2-enoico],  $H_2L^1$ , e l'acido (2Z)-4-[1-(4-fluorobenzil)-1H-pirrol-2-il]-2-idrossi-4-ossobut-2-enoico,  $H_2L^3$  ed i corrispettivi metil esteri ( $HL^2$ , e  $HL^4$ ) sono stati sintetizzati presso il Dipartimento Farmaco Chimico Tossicologico dell'Università di Sassari.

#### *Misure potenziometriche*

Le costanti di equilibrio per le reazioni di protonazione e complessazione sono state determinate attraverso misure potenziometriche, condotte in una soluzione metanolo/acqua 9:1 (v/v) ad una forza ionica di KCl 0.1 M e a  $25 \pm 0.1$  °C, nel range di pH 2.5-11, sotto  $N_2$ . La temperatura è stata controllata a  $\pm 0.1$  °C con l'uso di un bagno ad acqua circolante termostata (Isco GTR 2000 IIX). Adeguate quantità della soluzione di ligando, preparate per pesata, sono state titolate con KOH standard (metanolo/acqua = 9:1 (v/v),  $I = 0.1$  M KCl) con e senza ioni  $Mg^{2+}$ . Durante tutta la misura è stata applicata un'agitazione magnetica a

velocità costante. In tutte le misure sono stati usati metanolo bollito da poco ed acqua bidistillata, mantenuti sotto  $N_2$ . La procedura sperimentale per la determinazione di costanti di equilibrio accurate in questo solvente è stata descritta in dettaglio [1]. Le costanti di protonazione dei ligandi sono state ottenute titolando 20-50 mL di campione per ciascun ligando (da  $5 \times 10^{-3}$  a  $7 \times 10^{-3}$  M). Per le costanti di formazione del complesso, le titolazioni sono state condotte con diversi rapporti ligando/metallo (da 1 fino a 4). Per ciascun sistema sono state eseguite almeno due misure (circa 80 punti sperimentali ciascuna). Le titolazioni potenziometriche sono state condotte per mezzo di un apparato pienamente automatizzato dotato di un voltmetro digitale Crison GLP 21-22 (risoluzione 0.1 mV) e di una buretta automatica Metrohm Dosimat 655 da 5 mL, entrambi controllati da un nostro software, scritto in BASIC, funzionante su un computer IBM. La catena elettroica (elettrodo a vetro Crison 5250 e elettrodo a calomelano KCl 0.1 M in metanolo/acqua 9:1 (v/v) Radiometer 401) è stata calibrata in termini di  $[H^+]$  per mezzo di una titolazione acido forte – base forte, con il metodo di Gran, [2] consentendo la determinazione del potenziale standard,  $E_o$  ( $373.7 \pm 0.1$  mV) e del prodotto ionico dell'acqua,  $K_w$  ( $pK_w = 14.38 \pm 0.01$ ) nelle condizioni sperimentali usate. Il software HYPERQUAD [3] è stato utilizzato per valutare le costanti di protonazione e complessazione dai dati di efm.

## Risultati e Discussione

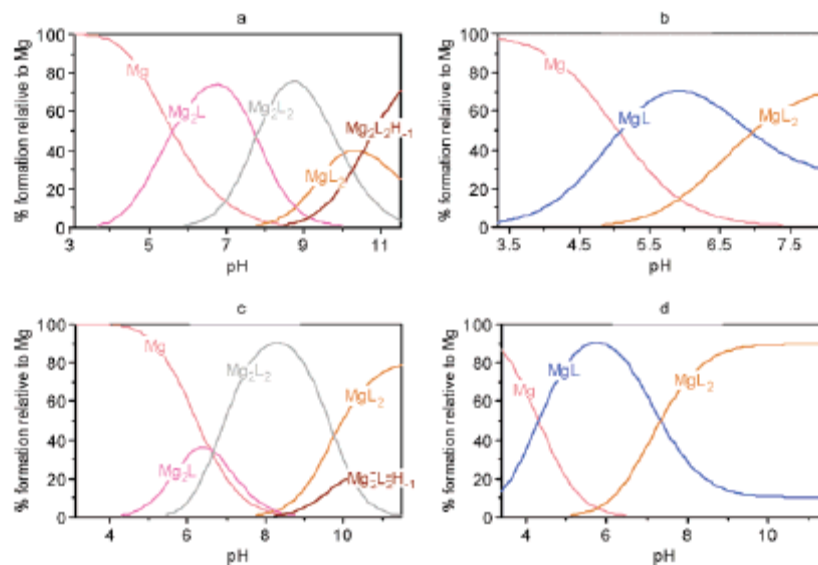
Le costanti di equilibrio dei ligandi  $H_2L^1$ ,  $HL^2$ ,  $H_2L^3$  e  $HL^4$  e i modelli di speciazione per i complessi con  $Mg^{2+}$  sono state studiate attraverso titolazioni potenziometriche; i risultati sono riportati in Tabella 1 e Figura 1. Per risolvere i problemi di solubilità, tutte le titolazioni sono state effettuate in metanolo/acqua = 9/1 (v/v), dove le specie sono solubili. Solo il sistema  $HL^2/Mg^{2+}$  dà, ad alti pH, un precipitato bianco che, dopo qualche tempo, si dissolve. Questo precipitato è un complesso di magnesio che successivamente si dissolve per l'idrolisi basica del gruppo estereo del ligando. Dapprima sono state determinate le costanti di protonazione dei ligandi:  $H_2L^1$  è più acido di  $H_2L^3$  [ $pK_{a1} = 3.81(4)$  e  $pK_{a2} = 9.89(3)$ ;  $pK_{a1} = 4.25(5)$  e  $pK_{a2} = 11.66(3)$ , rispettivamente per  $H_2L^1$  e  $H_2L^3$ ]; gli stessi risultati per gli esteri  $HL^2$  e  $HL^4$  [rispettivamente  $pK_a = 7.64(3)$  e  $8.94(6)$ ]. Quindi sono state determinate la stechiometria dei complessi del magnesio(II) e le loro costanti di formazione. Nelle soluzioni con  $H_2L^1$  o  $H_2L^3$  e  $Mg^{2+}$ , i migliori parametri statistici per il fit sono stati ottenuti con l'uso dello stesso set di specie,  $MgL_2^{2-}$ ,  $Mg_2L^{2+}$ ,  $Mg_2L_2$ , e, a  $pH > 11$ ,  $Mg_2L_2(OH)^-$ , ma le costanti cumulative di formazione differiscono significativamente (Tabella 1). In particolare, a pH fisiologico la specie  $Mg_2L^{2+}$  è predominante con  $H_2L^1$  (Figura 1a), mentre con  $H_2L^3$  questa specie è solo del 10% e  $Mg_2L^2$  è la più abbondante (Figura 1c).

La ragione potrebbe in parte essere correlata al maggiore ingombro sterico del residuo arilico in  $H_2L^3$ , che sfavorisce l'interazione simultanea di due ioni metallici con la stessa molecola di ligando. Per verificare la formazione del composto polimetallico  $M_2L_2$  in soluzione, abbiamo eseguito titolazioni con il solito rapporto ligando:metallo ma a diverse concentrazioni. La mancata sovrapposizione delle curve di titolazione supporta l'ipotesi della presenza di complessi polimetallici [4].

Specie complesse con il ligando monoprotonato  $HL^-$  sono state scartate durante l'affinamento. Le costanti di formazione del monomero  $MgL$  e del dimero  $Mg_2L_2$  non possono essere affinate insieme, probabilmente a causa dell'elevata correlazione matematica tra le due specie. Attraverso le sole misure potenziometriche, non è possibile scartare completamente l'ipotesi della formazione di specie monomeriche, dal momento che il modello con  $ML$  al posto di  $M_2L_2$  è solo leggermente sfavorito. La preferenza per  $Mg_2L_2$  rispetto a  $MgL$ , oltre ai migliori valori statistici, è stata discussa con la caratterizzazione spettroscopica dei complessi sintetizzati (vedi sotto) [5].

**Tabella 1.** Logaritmi della costanti <sup>a</sup> di protonazione e di formazione del complesso con Mg(II).

	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>r</i>	$H_2L^1$ (1)	$H_2L^3$ (3)	$HL^2$ (2)	$HL^4$ (4)
$L + H \rightleftharpoons LH$	0	1	1	9.89 (0.02)	11.66 (0.03)	7.64 (0.03)	8.94 (0.06)
$L + 2H \rightleftharpoons LH_2$	0	1	2	13.70 (0.04)	15.91 (0.06)		
$Mg + L \rightleftharpoons MgL$	1	1	0			5.11 (0.02)	7.16 (0.10)
$Mg + 2L \rightleftharpoons MgL_2$	1	2	0	8.81 (0.30)	12.45 (0.26)	8.86 (0.08)	11.77 (0.40)
$2Mg + L \rightleftharpoons Mg_2L$	2	1	0	9.43 (0.17)	10.46 (0.16)		
$Mg + 2L \rightleftharpoons Mg_2Cl_2$	2	2	-0	14.14 (0.25)	17.99 (0.10)		
$2Mg + 2L + OH \rightleftharpoons Mg_2L_2(OH)$	2	2	-1	3.89 (0.18)	7.80 (0.10)		



**Figura 1.** Diagrammi di distribuzione per i sistemi in studio nel rapporto L:Mg 2:1 (la concentrazione del ligando è 4 mM): (a)  $L = H_2L^1$ , (b)  $L = HL^2$ , (c)  $L = H_2L^3$ , e (d)  $L = HL^4$ .

Per quanto riguarda gli equilibri tra gli esteri  $HL^2$  e  $HL^4$  e gli ioni magnesio, l'insieme delle specie che danno il miglior *fit* è formato da  $MgL^+$  e  $MgL_2$ . A pH fisiologico, i due complessi sono presenti all'incirca in rapporto equimolare. Un diagramma di distribuzione per entrambi i ligandi è riportato in Figura 1b,d per il rapporto ligando-metallo di 2:1.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Fisicaro, E.; Braibanti, A. Potentiometric titrations in methanol/water medium: Intertitration variability. *Talanta* 1988, 35, 769-774.
- [2] Gran, G. Determination of the equivalence point in potentiometric titrations. Part II. *Analyst* 1952, 77, 661.
- [3] Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. *Talanta* 1996, 43, 1739-1753.
- [4] Brecker, L.; Pogorevc, M.; Griengl, H., Steiner, W.; Kappe, T.; Ribbons, D, W. Synthesis of 2,4-diketoacids and their aqueous solution structures. *New J. Chem.* 1999, 23, 437-446.
- [5] Sechi, Mario; Bacchi, Alessia; Carcelli, Mauro; Compari, Carlotta; Duce, Elenia; Fisicaro, Emilia; Rogolino, Dominga; Gates, Paul; Derudas, Marco; Al-Mawsawi, Laith Q.; Neamati, Nouri. From Ligand to Complexes: Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase by  $\beta$  -Diketo Acid Metal Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry* (2006), 49(14), 4248-4260.

## **CONCLUSIONI**

Il lavoro di ricerca svolto durante periodo di Dottorato ha riguardato la progettazione, la sintesi di nuove molecole biologicamente attive, principalmente di tensioattivi cationici che sono dei potenziali vettori non virali per il *gene delivery*, e la caratterizzazione biologica, chimico-fisica, morfologica e funzionale delle loro soluzioni. L'approccio multidisciplinare è necessario per ottenere un modello bio-fisico del processo di trasfezione e del riconoscimento recettore-ligando e per stabilire relazioni struttura-attività utili per progettare nuovi vettori non-virali o nuovi ligandi più efficienti e specifici.

I tensioattivi che sono stati studiati appartengono principalmente alle seguenti classi:

- 1) tensioattivi gemini con teste polari di tipo ammonio quaternario:
  - a) La valutazione delle entalpie molari apparenti e parziali a 298K di soluzioni acquose dei tensioattivi cationici *gemini* bromuro di propandiil- $\alpha,\omega$ -bis(ottildimetilammonio) e bromuro di propandiil- $\alpha,\omega$ -bis(dodecildimetilammonio) in funzione della concentrazione, ha permesso la determinazione del cambiamento di entalpia associato alla transizione “*sphere-to-rod*” in fase micellare. I cambiamenti nelle entalpie al di sopra della micellizzazione e per la transizione da micelle sferiche ad allungate sono stati ottenuti dai dati sperimentali usando un modello di transizione di pseudo-fase. La transizione “*sphere-to-rod*” sembra essere un processo esotermico e la quantità di calore implicata aumenta all'aumentare della lunghezza della catena.  $\Delta H_{s \rightarrow r}$  risulta  $-1.5 \text{ kJ mol}^{-1}$  per 8-3-8 e  $-3.9 \text{ kJ mol}^{-1}$  per 12-3-12.
  - b) E' sorprendente l'efficienza di trasfezione dei tensioattivi cationici bis- $C_n$ -BEC studiati, quando coformulati con il DOPE, malgrado la semplicità della loro struttura, che risulta superiore di quella dei reagenti commerciali standard di trasfezione. Questo risultato conferma il fatto che i tensioattivi gemini possano essere utilizzati come vettori non virali e il passo successivo nella ricerca sarà quello di effettuare misure AFM per avere un riscontro strutturale del loro comportamento e successivamente di testarli *in vivo*.
- 2) Tensioattivi gemini con teste polari di tipo piridinio e catene lipofile parzialmente fluorurate (la fluorurazione dovrebbe ridurre la tossicità):
  - a) una serie di tensioattivi gemini dipiridinici fluorurati è stata preparata per quaternarizzazione di  $\alpha,\omega$ -(2-piridil)alcani. La reazione è stata eseguita usando l'alchil trifluorometansolfonato come agente quaternarizzante, ottenendo rese molto buone. I tensioattivi sono stati caratterizzati da misure di conducibilità e di tensione superficiale che evidenziano la tendenza di queste molecole a dare uno strato adsorbito più compatto con il controione metansolfonato, piuttosto che con il cloruro.

Le cmc diminuiscono con la lunghezza dello *spacer*, ma una minore dipendenza è stata trovata rispetto ai corrispondenti tensioattivi gemini alchil piridinici. Questo risultato è stato interpretato come un'evidenza della difficoltà che gli *spacer* alchilici lunghi hanno ad avvolgersi intorno alle catene fluorurate. Un risultato peculiare è la differenza tra le cmc ricavate da misure di tensione superficiale rispetto a quelle ricavate con misure di conducibilità. Questa differenza potrebbe essere causata dalla formazione di aggregati pre-micellari.

Questa famiglia di composti è attualmente sotto studio per testarne la capacità trasfettiva e per meglio spiegarne il processo di aggregazione.

3) Tensioattivi monomerici glucocationici, contenenti gruppi ammonici quaternari e carboidrati ad essi legati covalentemente, anch'essi di nuova sintesi, recanti uno zucchero legato alla testa polare, nella prospettiva di ottenere tensioattivi marcati in grado di essere riconosciuti da quelle cellule che presentano recettori per lo zucchero.

a) La caratterizzazione di una nuova serie di tensioattivi, appartenenti alla classe glucocationica è stata effettuata attraverso misure di conducibilità e di tensione superficiale. Le misure di conducibilità sono state utili per valutare la cmc dei tensioattivi ed hanno anche mostrato il comportamento peculiare di tali tensioattivi nell'intervallo delle concentrazioni premicellari. Infatti, è stata evidenziata sia la formazione di coppie ioniche strette che di aggregati premicellari, la cui formazione in generale è favorita dall'aumento dell'idrofobicità.

Sono state riportate le proprietà biologiche e chimico-fisiche delle soluzioni acquose del C<sub>12</sub>DGCB e del C<sub>16</sub>DGCB. Il confronto del C<sub>12</sub>DGCB e del C<sub>16</sub>DGCB con i corrispondenti composti acetilati C<sub>12</sub>AGCB e C<sub>16</sub>AGCB ci ha permesso di quantificare il ruolo giocato nel processo di micellizzazione dall'acetilazione della porzione glucosidica.

Nessun composto interagisce fortemente con il DNA né è in grado di compattarlo, come si evince dai saggi EMSA e dalle immagini AFM. Solamente il C<sub>16</sub>AGCB è in grado di rilasciare un po' di DNA all'interno delle cellule quando coformulato con il DOPE. Questo conferma i dati presenti in letteratura che prevedono la necessità della presenza di più di una carica positiva sul vettore affinché sia in grado di compattare il DNA e di perpetrare un'efficiente trasfezione.

E' stato previsto uno studio futuro per la sintesi e la caratterizzazione dei corrispettivi tensioattivi gemini che dovrebbero possedere le caratteristiche necessarie per essere dei buoni vettori.

Si è inoltre approfondito, attraverso l'impiego di un modello termodinamico-statistico, lo studio del legame idrofobico, punto essenziale per l'interpretazione dei meccanismi coinvolti nella formazione di strutture supramolecolari coinvolte in tutti i processi biologici, compresi quelli da noi studiati.

Inoltre, sono state prese in considerazione altre molecole bioattive tra cui le più importanti:

1) Una classe di  $\beta$ -dicheto acidi ed i corrispettivi esteri che sono promettenti inibitori dell'HIV-1 integrasi, di cui è stato effettuato lo studio di equilibri in soluzione attraverso la determinazione delle costanti di protonazione e di complessazione in presenza di ioni magnesio per mezzo di misure potenziometriche.

Il bilancio lipofilo dei complessi potrebbe giocare un ruolo chiave nella potenza antivirale. Gli studi effettuati indicano che la formazione di questi complessi potrebbe rappresentare una nuova strategia nella scoperta di nuovi prototipi degli inibitori dell'IN. Inoltre, è di grande interesse definire il ruolo dei dicheto acidi nella loro selettività verso la reazione catalitica di *strand transfer*.

## ELENCO PUBBLICAZIONI

- [1] Emilia Fiscaro, Carlotta Compari, Elenia Duce, Guido Viscardi, Pierluigi Quagliotto: First Evaluation of Thermodynamic Properties for Spheres to Elongated Micelles Transition of Some Propanediyl- $\alpha$ ,  $\omega$ -bis(dimethylalkylammonium bromide) Surfactants in Aqueous Solutions. *Journal of Physical Chemistry B* (2005), vol. 109(5), pp. 1744-1749.
- [2] Emilia Fiscaro, Carlotta Compari, Elenia Duce, Gaetano Donofrio, Bożenna Różycka-Roszak and Edyta Woźniak: Biologically active Bisquaternary ammonium chlorides: Physicochemical Properties of long chain amphiphiles and their evaluation as non-viral vectors for gene delivery. *Biochemical and Biophysical Acta - General Subjects* (2005), vol. 1722(2), pp. 224-233.
- [3] Pierluigi Quagliotto, Guido Viscardi, Claudia Barolo, Domenico D'Angelo, Ermanno Barni, Carlotta Compari, Elenia Duce, Emilia Fiscaro: Synthesis, and properties of new gluco-cationic surfactants: model structures for marking cationic surfactants with carbohydrates. *Journal of Organic Chemistry*, (2005) 70(24), 9857-9866.
- [4] Sechi Mario; Bacchi Alessia; Carcelli Mauro; Compari Carlotta; Duce Elenia; Fiscaro Emilia; Rogolino Dominga; Gates Paul; Derudas Marco; Al-Mawsawi Laith Q.; Neamati Nouri: From Ligand to Complexes: Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase by  $\beta$ -Diketo Acid Metal Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry* (2006), 49(14), 4248-4260.
- [5] Emilia Fiscaro, Mariano Biemmi, Carlotta Compari, Elenia Duce and Monica Peroni: Thermodynamics of aqueous solutions of dodecyldimethylethylammonium bromide *Journal of Colloid and Interface Science*, (2007), 305 (2), 301-307.
- [6] Alessio Amadasi, Pietro Cozzini, Matteo Incerti, Elenia Duce, Emilia Fiscaro, Paola Vicini: Molecular modeling of binding between aminobenzisothiazoles, with antidegenerative activity on cartilage, and matrix metalloproteinase-3, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (2007), 15 (3), 1420-1429.
- [7] Emilia Fiscaro, Mariano Biemmi, Carlotta Compari, Elenia Duce, Monica Peroni, Guido Viscardi and Pierluigi Quagliotto: Thermodynamics of aqueous solutions of some new acetylated gluco-cationic surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, (2007), 301 (1-3), 129-13.
- [8] E. Fiscaro, C. Compari, E. Duce and A. Braibanti: Entropy Changes in Aqueous Solutions of non-polar Substances and in Bio-Complex Formation, *Journal of Solution Chemistry* (2007), *in press*.
- [9] E. Fiscaro, C. Compari, E. Duce, M. Biemmi, M. Peroni, and A. Braibanti Thermodynamics of Micelle Formation in Water, Hydrophobic Processes and Supramolecular Assemblies. *Submitted*.

## ELENCO COMUNICAZIONI A SCUOLE E CONGRESSI:

- [1] Emilia Fiscaro, Carlotta Compari, Elenia Duce, Guido Viscardi, Pierluigi Quagliotto: Non viral vectors in gene therapy: molecular and functional study of new cationic surfactants and of their interaction with the DNA. Second National School in Multiscale Computational Simulation Applied on Material Sciences. Modena (ITALY), February 16-20, 2004.

- [2] Emilia Fiscaro, Carlotta Compari, Elenia Duce, Guido Viscardi, Pierluigi Quagliotto: Non viral vectors in gene therapy. Molecular Medicine, Tri-Conference. San Francisco, California (USA), March 23-26, 2004.
- [3] Emilia Fiscaro, Carlotta Compari, Elenia Duce, Rita Zappatore and Cristina Contestabili: Studies of equilibria between amphiphilic derivatives of salicylic acid and transition metal ions. SIMEC 2004, Metal Bound to Biomolecules: Metallomics. Huelva (SPAIN), June 23<sup>rd</sup>-25<sup>th</sup>, 2004.
- [4] Emilia Fiscaro, Carlotta Compari, Elenia Duce, Rita Zappatore and Cristina Contestabili: Thermodynamics of the equilibria in aqueous solutions between some 2-(Methylpyridyl)benz-X-azoles and transition metal ions. SIMEC 2004, Metal Bound to Biomolecules: Metallomics. Huelva (SPAIN), June 23<sup>rd</sup>-25<sup>th</sup>, 2004
- [5] E. Fiscaro, C. Compari, E. Duce and A. Braibanti: Analysis of Entropy Change in Solutions of Hydrophobic Substances. ISMEC 2005, XIV Italian-Spanish Congress on the “Thermodynamics of Metal Complexes”, Udine (ITALY), June 21-25, 2005, OC 10.
- [6] E. Duce, E. Fiscaro, M. Peroni, C. Compari: Cationic surfactants as non viral vectors for “gene delivery”. First National School of Chemical-Physical Methodologies to the study of biological systems, Martina Franca (TA) (ITALY), September 4-9, 2005, P57.
- [7] E. Fiscaro, C. Compari, E. Duce and A. Braibanti: Entropy Change in Aqueous Solutions of non-polar Substances, Micelle Formation and Supramolecular Assemblies. SIMEC 2006, XVII Spanish-Italian Congress on the “Thermodynamics of Metal Complexes”, Sevilla (SPAIN), June 5-9, 2006, OC 14.
- [8] Sechi Mario; Bacchi Alessia; Carcelli Mauro; Compari Carlotta; Duce Elenia; Fiscaro Emilia; Rogolino Dominga; Gates Paul; Derudas Marco; Al-Mawsawi Laith Q.; Neamati Nouri. From Ligand to Complexes: Inhibition of HIV-1 Integrase by  $\beta$  -Diketo Acid Metal Complexes. SIMEC 2006, XVII Spanish-Italian Congress on the “Thermodynamics of Metal Complexes”, Sevilla (SPAIN), June 5-9, 2006, P 1.
- [9] Antonio Braibanti, Alessia Bacchi, Mariano Biemmi, Mauro Carcelli, Carlotta Compari, Elenia Duce, Emilia Fiscaro, Monica Peroni, Dominga Rogolino, Mario Sechi: Ca(II), Mg(II), Mn(II)/ $\beta$ -diketo acids complexes for inhibition of HIV-1 integrase, XVIII Italian-Spanish congress on thermodynamic of metal complexes, Cagliari June 5<sup>th</sup>-9<sup>th</sup> 2007.
- [10] E. Fiscaro, C. Compari, E. Duce, M. Biemmi, M. Peroni, A. Braibanti: Thermodynamics of Micelle Formation in Water and Supramolecular Assemblies XVIII Italian-Spanish congress on thermodynamic of metal complexes, Cagliari June 5<sup>th</sup>-9<sup>th</sup> 2007.
- [11] Elenia Duce, Mariano Biemmi, Carlotta Compari, Emilia Fiscaro, Monica Peroni: Potential vectors for gene delivery: chemico-physical properties of gemini dipyridinium cationic surfactants with 16 atoms carbons hydrophobic chain 8<sup>Th</sup> ULLA Summer school 29 June 2007 - 7 July 2007- Leiden, The Netherlands -P31.

- [14] Monica Peroni, Elenia Duce, Mariano Biemmi, Carlotta Compari, Emilia Fiscaro: Chimico-physical and biological properties of newly synthesised glucocationic surfactants 8<sup>Th</sup> ULLA Summer school 29 June 2007 - 7 July 2007- Leiden, The Netherlands -P80.
- [15] Mariano Biemmi, Mauro Carcelli, Carlotta Compari, Elenia Duce, Emilia Fiscaro, Monica Peroni, Dominga Rogolino, Mario Sechi: inhibition of HIV-1 integrase by Ca(II), Mg(II), Mn(II)/ $\beta$  Diketo acids complexes 8<sup>Th</sup> ULLA Summer school 29 June 2007 - 7 July 2007- Leiden, The Netherlands -P10.
- [16] M. Biemmi, E. Fiscaro, C. Compari, E. Duce, M. Peroni, F. Sansone: Chemico-Physical Properties of Gemini Dipyrindinium Cationic Surfactants with 16 Carbons Hydrophobic Chain as Potential Non-Viral Vectors for Gene Delivery VIII Congresso Nazionale di Chimica Supramolecolare Trieste 19-22 Settembre 2007 –P12.
- [17] M. Biemmi, E. Fiscaro, C. Compari, E. Duce, M. Peroni: Chemico-Physical Properties of Gemini Dipyrindinium Cationic Surfactants with 16 Carbons Hydrophobic Chain as Potential Non-Viral Vectors for Gene Delivery “8th Mediterranean Conference on Calorimetry and Thermal Analysis - MEDICTA 2007” Palermo 25 - 29 Settembre 2007-P76.

## **PARTECIPAZIONE A SCUOLE E CONGRESSI:**

First National School of Chemical-Physical Methodologies to the Study of Biological systems, Martina Franca (TA) (ITALY), September 4-9, 2005.

ISMEC 2005, XIV Italian-Spanish Congress on the “THERMODYNAMICS of METAL COMPLEXES”, Udine (ITALY), June 21-25, 2005.

“Composite Materials: from Molecular Sciences to Nanotechnology” School of Physical Chemistry Division, Villa Gualino, Turin (ITALY), September 3-8, 2006

International Visions on Blood Substitutes, Parma (ITALY), September 17-20, 2006.

School of Computational Chemistry, “Introduction Exercises of computer use in Organic and Biological Chemistry”. Siena (ITALY), September 25-29, 2006.

8<sup>th</sup> ULLA Summer school 29 June 2007 - 7 July 2007- Leiden, The Netherlands

## **ESPERIENZE ALL'ESTERO**

Un mese presso il Dipartimento di Fisica e Biofisica dell'Agriculture University di Wroclaw (Polonia)  
Scientific advisor: Prof.ssa Bożenna Różycka- Roszak, (14.09.2005-14.10.2005).

Tre mesi presso il Department of Chemical and Biological Engineering della Northwestern University, Evanston IL, USA. Scientific advisor: Professor Lonnie Shea. (16.07.2007-16.10.2007).

## INDICE

<b>Schema della ricerca</b>	1
<b>Introduzione</b>	3
<b>Stato dell'arte</b>	4
<i>Bibliografia</i>	8
<b>Relazione struttura-attività nella trasfezione genica mediata da lipidi cationici</b>	9
<i>Vettori</i>	9
<i>Parametri chimico-fisici dei lipidi cationici e dei liposomi</i>	12
<i>Ottimizzazione dei lipidi cationici</i>	17
<i>Variabili che influenzano l'efficienza della lipofezione</i>	18
<i>Studi relazione struttura-attività di lipidi cationici per gene delivery</i>	26
<i>Bibliografia</i>	56
<b>Capitolo 1: Metodi sperimentali utilizzati ed elaborazione dati</b>	64
<i>Bibliografia</i>	74
<b>Capitolo 2: Tensioattivi cationici</b>	76
<i>Proprietà termodinamiche e biologiche dei tensioattivi gemini</i>	77
<i>Evidenza termodinamica per la transizione "speres to rod" delle micelle di alcuni bromuri di propandiil-<math>\alpha,\omega</math>-bis(alchilidimetilammonio) in soluzione acquosa</i>	80
<i>Bibliografia</i>	97
<i>Cloruri di ammonio bisquaternario biologicamente attivi: proprietà chimico-fisiche di anfifili a lunga catena e loro valutazione come vettori non-virali per "gene delivery"</i>	101
<i>Bibliografia</i>	113
<i>Tensioattivi gemini piridinici: sintesi e studio conduttometrico e tensidico di anfifili piridinici parzialmente fluorurati</i>	117
<i>Bibliografia</i>	137
<i>Proprietà chimico-fisiche e biologiche di nuovi tensioattivi gluco-cationici</i>	141
<i>Bibliografia</i>	199
<b>Capitolo 3: Processi idrofobici</b>	204
<i>Termodinamica dei processi idrofobici: solubilizzazione di sostanze non polari, formazione delle micelle in acqua e di bio-complessi</i>	205
<i>Bibliografia</i>	226
<b>Capitolo 4: Altre molecole bioattive</b>	227
<i>Inibitori dell'integrasi di tipo 1 del virus di immunodeficienza umana: complessi metallici di <math>\beta</math>-dicetico acidi</i>	228
<i>Bibliografia</i>	232
<b>Conclusioni</b>	233
<b>Elenco delle Pubblicazioni</b>	236