

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

FACOLTÀ DI FARMACIA  
DIPARTIMENTO DI CHIMICA FARMACEUTICA E TOSSICOLOGICA

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA DEL FARMACO**

XIX Ciclo

**DATI DI AFFINITÀ PER I FOSFOLIPIDI E LORO POTENZIALITÀ PER  
LA PREDIZIONE DEL PASSAGGIO DELLA BARRIERA EMATO-  
ENCEFALICA.**

Dott.ssa Carmen Carpentiero

Supervisore:

corso:

Chiar.mo Prof.

Francesco Barbato

Coordinatore del

Chiar.mo Prof.

Enrico Abignente

## INDICE

---

|  |          |
|--|----------|
| 1. INTRODUZIONE.                       | pag. 1   |
| 2. IMPOSTAZIONE DEL LAVORO DI RICERCA. | pag. 36  |
| 3. MATERIALI E METODI.                 | pag. 60  |
| 4. RISULTATI E DISCUSSIONE.            | pag. 68  |
| 5. CONCLUSIONI.                        | pag. 110 |
| BIBIOGRAFIA.                           | pag. 113 |

## 1.INTRODUZIONE

---

Per esplicitare l'effetto terapeutico desiderato un farmaco, nella stragrande maggioranza dei casi, deve attraversare una o più barriere biologiche. Il passaggio attraverso le biomembrane coinvolge sia meccanismi di diffusione passiva che meccanismi di trasporto attivo (ATP-dipendenti). Conseguentemente, nella progettazione di un composto farmacologicamente attivo non è sufficiente focalizzare l'attenzione sulle proprietà farmacodinamiche della molecola, ma è necessario ottimizzare anche le proprietà farmacocinetiche, in particolare l'assorbimento del farmaco e la sua distribuzione.

Va sottolineato, infatti, che circa il 40 % dei fallimenti nello sviluppo di nuovi farmaci è da attribuire a problematiche farmacocinetiche [1, 2]. E' diventato, quindi, di primaria importanza che un farmaco possieda oltre all'effetto terapeutico desiderato, anche caratteristiche farmacocinetiche tali da dare la risposta attesa in vivo.

Per le ragioni sopra elencate la possibilità di ottimizzare le proprietà farmacocinetiche di una molecola, fin dai primi stadi del suo sviluppo, sta diventando un campo sempre più interessante e promettente dal punto di vista della ricerca.

Le modalità mediante le quali un farmaco può essere assorbito sono molteplici; tuttavia la più frequente è quella basata su meccanismi di trasporto passivo. Oltre all'assorbimento, anche la distribuzione stessa della molecola nell'organismo coinvolge il passaggio attraverso le membrane biologiche. Una delle barriere più selettive, che presiede alla distribuzione del farmaco

nell'organismo, è la barriera emato-encefalica (blood-brain-barrier – BBB), la quale regola in maniera altamente selettiva il passaggio nel Sistema Nervoso Centrale di tutte le sostanze chimiche presenti nel torrente circolatorio, compresi i farmaci.

La diffusione passiva di una molecola attraverso una barriera biologica dipende dalle caratteristiche strutturali del composto e da quelle della membrana coinvolta, secondo la prima legge di Fick (in forma opportunamente modificata):

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{D \times A \times K}{h} (C_{out} - C_{in}) \quad (1)$$

Nella precedente equazione il termine  $(dQ/dt)$  è la velocità di diffusione attraverso una barriera;  $D$  è il coefficiente di diffusione;  $A$  indica l'area superficiale della barriera;  $K$  è il coefficiente di ripartizione;  $h$  è lo spessore della membrana;  $(C_{out} - C_{in})$  è la differenza delle concentrazioni del soluto ai due lati della barriera.

Di questi termini, alcuni, come  $A$  ed  $h$  sono caratteristici della barriera considerata, mentre altri, come  $D$  e  $K$  variano in funzione della natura del composto in esame. In particolare,  $D$ , il coefficiente di diffusione rappresenta un termine il cui valore cala bruscamente per molecole estremamente grandi (p.m. > 400-500), mentre varia relativamente poco per molecole con peso molecolare inferiori a tali valori. In definitiva il valore di  $K$  risulta essere quasi sempre il fattore che maggiormente determina le differenze nella velocità di assorbimento dei diversi composti.

Le misure del coefficiente di ripartizione nella membrana,  $K$ , sono state oggetto di numerosi studi negli ultimi anni.

Comunque, data la difficoltà della loro misura diretta in vivo e soprattutto considerando la scarsa riproducibilità di tali misure, si sono sviluppati vari sistemi in vitro per ottenere misure rappresentative di tale fenomeno.

I tre principali sistemi-modello *in vitro* consistono in:

- ripartizione fra un solvente organico ed una fase acquosa;
- un sistema di ripartizione cromatografico che usa fasi stazionarie di ottadecilsilice (ODS);
- ripartizione in liposomi.

I sistemi di ripartizione di un soluto fra un solvente organico ed una fase acquosa sono stati usati come modello per l'interazione con le membrane biologiche sin da quando, agli inizi del 1900, Meyer [3] ed Overton [4] dimostrarono che l'attività di farmaci anestetici generali inalatori dipendeva dal loro coefficiente di ripartizione olio di oliva/acqua.

Fra i vari possibili solventi utilizzabili, il *n*-ottanolo, come riportato in letteratura, rappresenta la fase lipofila in grado di produrre i dati che mimano meglio la ripartizione nelle biomembrane; pertanto il logaritmo del coefficiente di ripartizione *n*-ottanolo/acqua ( $\log P$ ), determinato sperimentalmente con il metodo «shake flask» [5], rappresenta il parametro di riferimento per la determinazione della lipofilia. Tuttavia è ben noto che esso è un valido descrittore solo quando sono minime o assenti interazioni di natura elettrostatica fra soluto e *bilayer* fosfolipidico [6].

Inoltre, il sistema “shake flask” ha notevoli limitazioni pratiche: richiede grandi quantità di analita ed ad elevato grado di purezza; è di lunga e tediosa esecuzione; è molto difficile da

condurre per composti a lipofilia estremamente elevata o estremamente bassa. Per tali motivi è stato proposto l'utilizzo delle tecniche cromatografiche HPLC (High Performance Liquid Chromatography) di ripartizione su colonne di ottadecilsilice (ODS) come sistema alternativo per misurare il coefficiente di ripartizione di una molecola. Fino ad oggi, in realtà, non sono state pienamente sfruttate tutte le potenzialità della cromatografia liquida ad alta risoluzione, in quanto essa è spesso considerata prevalentemente una metodica utile all'identificazione, quantizzazione e separazione su scala preparativa di composti d'interesse farmaceutico. Tale visione dell'HPLC appare sicuramente riduttiva ed ignora le basi teoriche del processo cromatografico, basate sulle interazioni multiple che si stabiliscono tra soluto, fase stazionaria e fase mobile. Un altro aspetto dell'analisi HPLC, spesso trascurato, è che la cromatografia può diventare un valido strumento nello studio delle interazioni intermolecolari. Le potenzialità dell'HPLC come strumento di simulazione piuttosto che come semplice strumento separativo risiedono nella possibilità di effettuare delle analisi accurate e riproducibili, rispetto ai metodi biochimici e farmacologici in uso. Tali prospettive rendono l'HPLC utilizzabile per determinare le proprietà chimico-fisiche delle molecole ed in particolare quelle caratteristiche che sono strettamente legate all'attività farmacologica.

Lo sviluppo delle tecniche cromatografiche ha consentito l'utilizzazione di metodiche alternative più efficienti, veloci e riproducibili, in grado di fornire, con l'uso di fasi stazionarie lipofile ODS, dei parametri cromatografici che sono indici

dell'interazione *lipofilo-idrofobica*, come il fattore di ritenzione  $k'$ , misurato sperimentalmente tramite l'espressione:

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (2)$$

dove  $t_0$  è il tempo di ritenzione di un composto non trattenuto e  $t_r$  è il tempo di ritenzione della sostanza esaminata. Tra i numerosi vantaggi che tali metodiche presentano rispetto alla determinazione "classica" del coefficiente di ripartizione ricordiamo: l'assenza d'influenza, ai fini della determinazione, di eventuali impurezze e della scarsa solubilità dei composti; la possibilità di utilizzare quantità minime di prodotto e di studiare contemporaneamente numerosi composti; la possibilità di analizzare composti molto polari e/o molto lipofili, adeguando opportunamente le condizioni sperimentali; la maggiore rapidità e riproducibilità delle misure.

Va sottolineato che il fattore di ritenzione  $k'$  rappresenta una misura del coefficiente di ripartizione ( $K$ ) tra fase mobile e fase stazionaria. Infatti:

$$k' = \frac{V_s}{V_m} \cdot K \quad (3)$$

dove  $V_m$  è il volume totale di solvente all'interno della colonna HPLC e  $V_s$  è il volume dell'interfase creata dalla fase stazionaria legata [7]. Il rapporto  $V_s/V_m$  è, per una data colonna, una quantità costante e perciò non è necessario procedere alla difficoltosa misura di  $V_s$ . Quindi, poiché il rapporto  $V_s/V_m$  è una costante, il valore di  $k'$  rappresenta una misura diretta di  $K$ .

Tuttavia i metodi sperimentali finora descritti impiegano fasi ripartitive che riproducono solo in modo approssimativo la composizione chimica delle membrane biologiche. Mediante tali metodiche si riescono a misurare dei parametri lipofilo/idrofobici il cui limite principale è l'incostanza predittiva delle interazioni fra farmaci e biomembrane; tale inadeguatezza è stata rilevata soprattutto nel caso di molecole ionizzate a pH fisiologico, e quando si sono considerate classi di molecole strutturalmente non correlate.

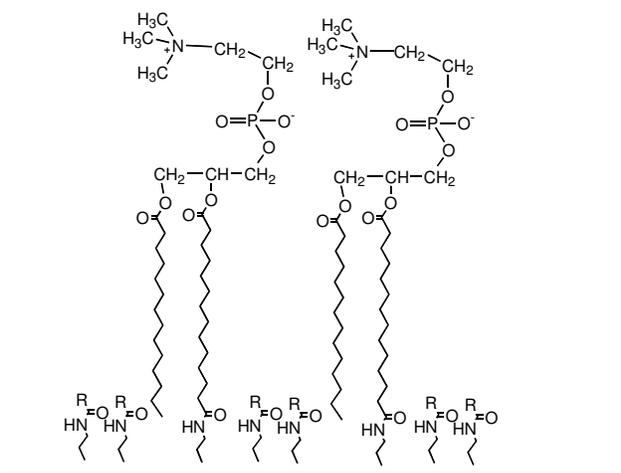
Al contrario delle fasi non polari utilizzate nelle metodiche di ripartizione “*shake flask*” o nella cromatografia su colonne ODS, i **liposomi**, vescicole costituite da fosfolipidi, mostrano maggiore similarità strutturale con il *bilayer* fosfolipidico, che costituisce la principale impalcatura delle membrane biologiche *in vivo*. E' stato ampiamente dimostrato in letteratura che i coefficienti di ripartizione di un soluto misurati in sospensioni acquose di liposomi rappresentano meglio i coefficienti di ripartizione misurati in membrane biologiche ( $K_m$ ) [8, 9]; di conseguenza i coefficienti di ripartizione in liposomi sono ritenuti essere parametri utili per studiare molte interazioni soluto-membrana [10, 11].

Tuttavia, sebbene i liposomi siano in grado di modellare adeguatamente sia le interazioni polari che quelle non polari del soluto con la membrana, questo sistema-modello ha la limitazione di essere di lunga e difficile esecuzione, e sperimentalmente laborioso. Ciò si riflette negativamente soprattutto sulla confrontabilità di dati “inter-laboratorio”.

Risulta, pertanto, di grande interesse la possibilità di unire i vantaggi costituiti dall'impiego di fasi ripartitive fosfolipidiche

con i vantaggi delle tecniche cromatografiche HPLC. Ciò è reso possibile dall'utilizzo di una "biofase stazionaria" per HPLC costituita dalle cosiddette membrane artificiali immobilizzate (IAM, Immobilized Artificial Membrane) [12]. La fase IAM è costituita da fosfolipidi, i principali costituenti delle membrane cellulari, covalentemente legati ad un supporto propilamminosiliceo.

L'utilizzo della cromatografia su fasi IAM (figura 1) per studiare le interazioni fra farmaci e membrane biologiche conserva le potenzialità descrittive della ripartizione in liposomi unite a tutti i vantaggi di una metodica cromatografica ad alta prestazione.



**Figura 1.** Tipica struttura di una fase IAM.

Tale fase permette di studiare anche le interazioni polari del soluto con le biomembrane e quindi di ottenere delle informazioni peculiari rispetto a quelle espresse dal parametro classico di lipofilia (log P). La principale motivazione dell'utilizzo della cromatografia IAM per la predizione della ripartizione dei soluti

nelle membrane biologiche, consiste nel fatto che le IAM, più di tutti gli altri sistemi-modello in vitro, presentano somiglianze strutturali con il *bilayer* fosfolipidico e sono quindi in grado di mimarlo. In realtà, la densità di superficie dei fosfolipidi è differente nei liposomi e nelle fasi IAM. L'area superficiale per ogni testa fosfolipidica è circa 62 Å nei liposomi [2, 13], mentre nelle IAM a singola catena è 85 Å fino ad arrivare a 105 Å nelle fasi stazionarie a doppia catena [2, 14] (per una spiegazione dei termini “*singola catena*” e “*doppia catena*” si rimanda alla descrizione delle fasi IAM nei paragrafi successivi di questa introduzione). Nonostante questa differenza, i risultati di Sheng e coll. [15] indicano che la porzione polare all'interfaccia della superficie IAM rappresenta in maniera ancora soddisfacente le membrane fluide. Questi risultati mostrano anche che la porzione idrocarburica della fase IAM possiede proprietà chimico-fisiche simili alle membrane fluide. Come sostenuto da Pidgeon e coll. [16], la “incapacità” nella tecnologia IAM di emulare perfettamente la dinamica dei lipidi membranari viene ampiamente compensata dall' aumento di stabilità dovuto all'utilizzo di una superficie solida che lega covalentemente i lipidi. Possiamo quindi, concludere che le IAM, con il loro monostato di fosfolipidi immobilizzato sul supporto siliceo, sono in grado di mimare efficacemente la ripartizione che avviene nel *bilayer* liposomiale [17].

Fino ad oggi, sono stati condotti numerosi studi di ripartizione nelle biomembrane utilizzando la cromatografia su colonne IAM [18 - 29].

Questi studi, sebbene a volte contrastanti nei risultati, hanno evidenziato che tali fasi di ripartizione forniscono scale di

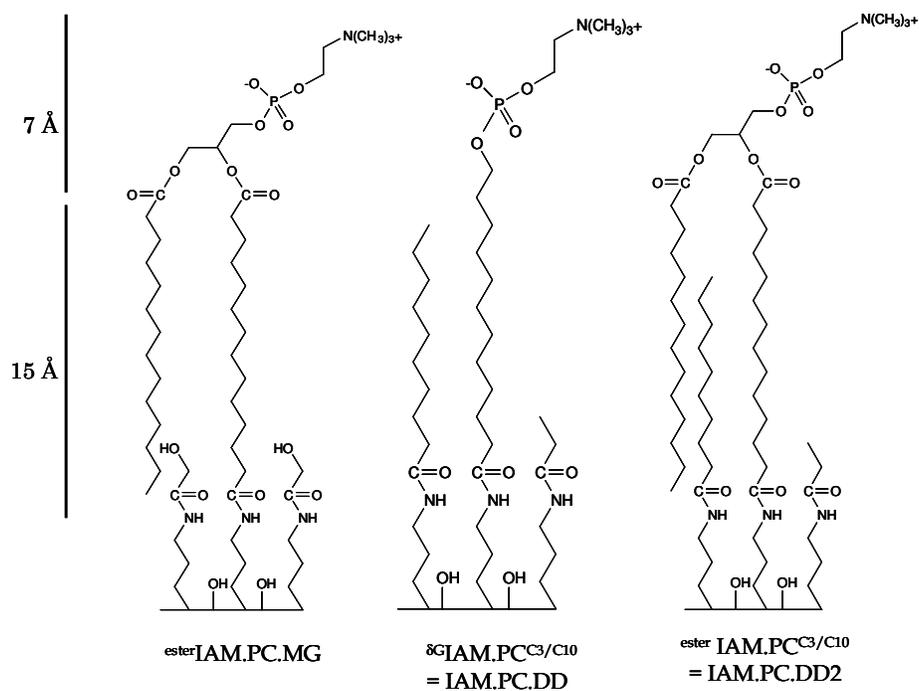
interazioni peculiari rispetto al parametro classico di lipofilia (log P). Mentre per molecole neutre, sono state trovate buone correlazioni tra i dati ottenuti sulle IAM e i log P, per composti elettricamente carichi, ed in particolar modo per le basi, sono state riscontrate discrepanze fra le due scale di interazione.

La maggior parte degli studi tesi a delucidare le peculiarità descrittive della IAM-HPLC nel caso di composti ionizzabili sono stati condotti proprio nel Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica dell'Università di Napoli.

Molti lavori sono stati condotti su fasi del tipo IAM.PC.MG, le prime ad essere state immesse in commercio, ma successivamente le indagini si sono estese allo studio delle prestazioni anche delle fasi IAM.PC.DD e IAM.PC.DD2.

Va precisato, infatti, che finora sono state commercializzate tre diverse tipologie di fasi IAM. Come si può facilmente comprendere, riferendosi alla figura 2, tutte le fasi presentano l' "end-capping" dei residui propilamminici che non hanno legato le porzioni fosfolipidiche. Nella sola fase IA.PC.MG, l' "end-capping" viene effettuato con metilglicolato formando sul letto della fase uno strato di funzioni ossidriliche libere. Nelle altre due fasi, invece, l' "end-capping" viene effettuato con residui di acidi grassi a dieci ed a tre atomi di carbonio (fasi C<sub>3</sub>/C<sub>10</sub>).

Nel nostro studio la fase IAM.PC.DD non sarà utilizzata in quanto non è più in commercio. Essa si distingue dalle altre due fasi nella composizione del fosfolipide che è privo della porzione glicerolica ed è perciò indicata come fase "monocatena" in contrapposizione alle altre due dette "a doppia catena".



**Figura 2.** Fasi IAM

I dati ottenuti dagli studi condotti precedentemente costituiscono in parte la base di partenza del presente lavoro. Vale la pena, pertanto, di riassumerne rapidamente i risultati.

Va in primo luogo sottolineato che l'esperienza maturata in questi studi aveva consentito di stabilire l'imprescindibilità dell'esigenza di ottenere dati normalizzati a condizioni di eluenti totalmente acquosi. Si era, infatti, potuto notare, in diverse occasioni, che serie di dati ottenuti, in condizioni diverse, cioè a diverse percentuali di modificatore organico, producevano scale di interazione differenti. Si decise, pertanto, di fornire tutti i dati ottenuti per IAM-HPLC come risultati di misure effettuate con eluente totalmente acquoso a pH 7,0 (tampone fosfato 0,10 M), oppure con lo stesso tampone addizionato di varie percentuali di modificatore organico (di norma acetonitrile) in modo da ricavare

per estrapolazione il dato richiesto. Va, infine, sottolineato che la scelta di impiegare tamponi a pH 7,0 invece che a pH 7,4 (pH fisiologico dell'organismo) è stata operata sulla base di precedenti esperienze con le fasi IAM, da cui emergeva che anche una variazione di sole 0,4 unità di pH era in grado di produrre un notevole accorciamento della vita della colonna con riflessi negativi sia sulla riproducibilità dei dati che sui costi.

I primi dati peculiari ottenuti presso il Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica dell'Università di Napoli derivavano da uno studio effettuato su 9 molecole a struttura diidropiridinica (DHP) ad attività bloccante i canali del calcio [30]. Di questi 9 composti, 7 hanno carattere neutro e 2 carattere basico (amlodipina e nicardipina), grazie alla presenza su questi ultimi di una funzione amminica (primaria e terziaria, rispettivamente) in catena laterale.

I valori di  $\log k_w^{\text{IAM}}$  (logaritmo del fattore di capacità cromatografico misurato su IAM) delle 7 diidropiridine neutre correlavano bene con i rispettivi valori di  $\log P$ . Il valore di  $\log k_w^{\text{IAM}}$  della nicardipina correlava anch'esso con il  $\log P$  della molecola (coefficiente di ripartizione in *n*-ottanolo/acqua della molecola in forma neutra). Già questo era un risultato per certi versi sorprendente in quanto, essendo la nicardipina ( $\text{pK}_a = 6,5$ ) protonata per il 24% al pH della misura (pH = 7,0), c'era da aspettarsi che la sua ritenzione su fase fosfolipidica correlasse meglio con il valore di  $\log D^{7,4}$ , cioè con il coefficiente di distribuzione misurato dagli stessi autori nel sistema *n*-ottanolo/tampone ad un pH molto simile a quello utilizzato in HPLC. Il coefficiente di distribuzione ( $\log D^{\text{pH}}$ ), infatti, tiene conto della ionizzazione delle molecole e quindi porta a calcolo la

ripartizione della miscela di forme neutre e ionizzate del composto in esame, ad un determinato pH.

Il fatto che il valore di  $\log k_w^{\text{IAM}}$  della nicardipina correlasse con il  $\log P$  e non con il  $\log D^{7,4}$  indicava che i fosfolipidi potevano essere in grado di non risentire della protonazione della funzione amminica, forse a causa di un effetto schermante delle teste polari (porzione fosfatidilcolinica) che sarebbero in grado di interagire in maniera efficace con la porzione ionizzata della molecola.

Per l'amlodipina i risultati erano ancora più sorprendenti in quanto il  $\log k_w^{\text{IAM}}$  misurato risultava molto più alto del valore atteso in base al  $\log P$ . Ciò indicava che l'affinità di tale molecola per i fosfolipidi era molto più alta rispetto a quella di un'ipotetica molecola neutra di pari lipofilia. Si è quindi ipotizzata l'esistenza di un'extra-interazione di tipo polare, fra l'amlodipina e le teste elettricamente cariche dei fosfolipidi, agenti in modo cooperativo con l'interazione lipofilo-idrofobica. Tale ipotesi risultava in accordo con le osservazioni di Austin e coll. [31] che avevano trovato un coefficiente di ripartizione in vescicole liposomiali per l'amlodipina molto più elevato di quanto predetto dal  $\log P$ .

E' da notare che, nello studio citato [30], veniva anche dimostrato che le particolari interazioni trovate su questa fase stazionaria non dipendevano da un meccanismo di coppia ionica.

Un successivo studio che ha fornito risultati peculiari è stato quello condotto su 17 farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS), strutturalmente non correlati fra loro [32]. Il set di composti esaminati era formato da 16 molecole acide supportanti una funzione carbossilica e dal piroxicam, una molecola anfotera.

Sebbene tutti i composti analizzati fossero completamente ionizzati al pH sperimentale (pH = 7,0), i parametri di ritenzione su IAM risultavano correlare meglio con il log P che con i coefficienti di distribuzione,  $\log D^{7.0}$ . Questi risultati confermavano l'ipotesi che l'ordine di ritenzione dei composti sulla fase IAM fosse controllato dalla lipofilia della forma neutra, nonostante la presenza di una carica elettrica sulla molecola.

La migliore correlazione ottenuta, tuttavia, non dimostrava che in assoluto la ritenzione delle molecole in esame fosse commisurata al valore di log P piuttosto che al valore di  $\log D^{7.0}$ . Tale ipotesi venne confermata grazie alla constatazione che un'unica retta di regressione (equazione 4) era in grado di esprimere la correlazione fra  $\log k_w^{IAM}$  e log P per composti neutri non congeneri strutturali. Tale relazione era basata sui dati delle 7 diidropiridine neutre del lavoro precedente e su quelli di 3 idrocarburi aromatici (benzene, toluene e naftalene):

$$\log k_w^{IAM} = 0.816 (\pm 0.035) \log P - 1.055 (\pm 0.140)$$

$$n = 10 \quad r = 0.993 \quad s = 0.111$$

(4)

In questa equazione, ed in tutte quelle che seguono, in parentesi sono riportati i limiti fiduciali al 95 %,  $n$  è il numero di composti analizzati,  $r$  è il coefficiente di correlazione e  $s$  è la deviazione standard.

Di seguito questa equazione di correlazione verrà indicata per semplicità "equazione delle neutre". La validità di questa equazione nel predire il  $\log k_w^{IAM}$  in funzione del log P è confermata dal fatto che in essa confluiscono anche i dati di 10 FANS che non hanno la funzione carbossilica direttamente legata

all'anello aromatico. Questo comportamento risulta essere peculiare rispetto alle colonne di ottadecilsilice dove, come già detto, correlazioni fra  $\log k_w^{\text{IAM}}$  e  $\log P$  sono riscontrabili solo all'interno di classi di farmaci strutturalmente omogenee.

Per i composti con funzione carbossilica direttamente legata all'anello aromatico e per l'ibuprofene, la retta di correlazione tra  $\log k_w^{\text{IAM}}$  e  $\log P$  ha la stessa pendenza dell'equazione 4, risultando, però, traslata più in basso rispetto ad essa. Ciò indica che l'interazione di questi composti (definiti "outliers") con i fosfolipidi è influenzata in misura costante per tutte le molecole da un fenomeno di tipo repulsivo. Questa particolare interazione fu messa in relazione con le caratteristiche strutturali di tali composti in quanto tutte le molecole coinvolte, ad eccezione dell'ibuprofene, supportano una funzione carbossilica legata direttamente al sistema aromatico; si ipotizzò che fosse questa particolare caratteristica strutturale a causare un disturbo nell'interazione lipofilo-idrofobica fra la porzione aromatica dell'analita ed i fosfolipidi.

Anche per tali "outliers", comunque, la fase IAM è in grado di controbilanciare, almeno parzialmente, l'influenza negativa della carica elettrica sull'interazione lipofila, poiché, se si volessero predire i loro valori di  $\log k_w^{\text{IAM}}$  dai rispettivi valori di  $\log D^{7,4}$ , si otterrebbero valori molto più bassi di quelli determinati sperimentalmente. Per l'ibuprofene non è stato possibile individuare alcuna caratteristica strutturale che potesse spiegare il suo particolare comportamento.

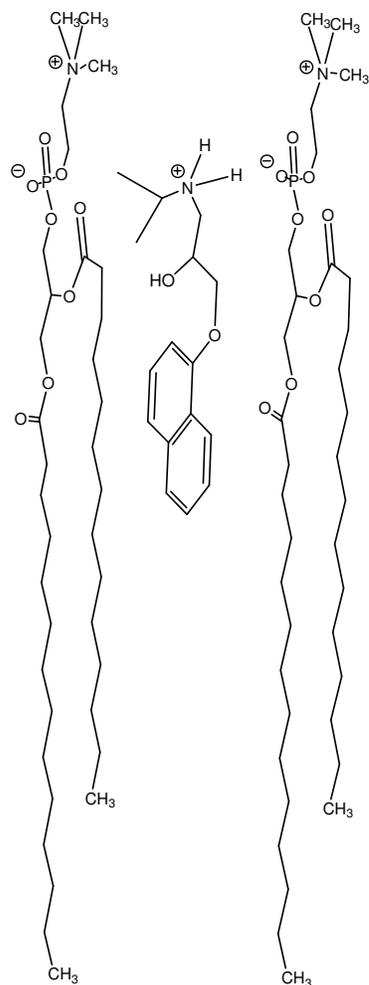
Vengono predetti dall'"equazione delle neutre" anche quasi tutti i dati di un successivo lavoro condotto su 13 anestetici locali [33]. Di questi 13 composti solo 2, la tocaïnide e la W36017,

presentano valori di  $\log k_w^{\text{IAM}}$  che non vengono ben predetti dall'equazione 4. La tocinide, infatti, mostra delle extra-interazioni additive con i fosfolipidi; è da sottolineare che essa, come l'amlodipina, è l'unica ammina primaria della serie considerata. La W36017 mostra anch'essa delle extra-interazioni di tipo additivo ma di lieve entità; la sua inclusione nella correlazione generale fra  $\log k_w^{\text{IAM}}$  e  $\log P$  peggiora solo di poco gli indici statistici di correlazione.

Da un ulteriore studio condotto su 23 ammine modello (che comprendono ammine primarie, secondarie, terziarie e con azoto endociclico) è emerso che l'ordine di eluizione delle ammine sulla fase stazionaria IAM.PC.MG correla meglio con la scala di  $\log P$  che con quella dei  $\log D^{7,0}$ , nonostante molte delle ammine considerate fossero protonate a pH 7,0 [34]. Confrontando i valori di ritenzione delle ammine con quelli precedentemente determinati per i composti neutri, è stato possibile predire mediante l'"equazione delle neutre", entro i limiti della deviazione standard, i valori sperimentali di  $\log k_w^{\text{IAM}}$  a pH 7.0 di solo 13 delle ammine considerate; per le altre 10 ammine i valori sperimentali di  $\log k_w^{\text{IAM}}$  sono risultati essere significativamente più alti di quelli calcolati dal  $\log P$  mediante l'"equazione delle neutre". In seguito a questa considerazione, le 23 ammine sono state suddivise in due sottogruppi disposti parallelamente nella relazione  $\log k_w^{\text{IAM}}$  contro  $\log P$ . Il sottogruppo degli "outliers" comprende i 10 composti i cui valori di ritenzione su fosfolipidi risultano maggiori di ipotetici composti neutri isolipofilici; tale sottogruppo comprende ammine con azoto endociclico e ammine primarie non completamente ionizzate a pH 7,0. Il sottogruppo dei "non outliers" comprende i restanti 13 composti (ammine

secondarie e terziarie, indipendentemente dal loro grado di protonazione, e ammine primarie totalmente ionizzate a pH 7,0) i cui valori di  $\log k_w^{IAM}$  sono adeguatamente predetti dall'equazione delle neutre". Il fatto che la correlazione dei  $\log k_w^{IAM}$  con i  $\log P$  sia migliore che con i  $\log D^{7,0}$  indica che a pH 7,0 i fosfolipidi sono in grado di mascherare l'effetto di una carica elettrica sulla funzione amminica, e di interagire in misura almeno uguale (se non superiore) a composti neutri di lipofilia pari a quella della forma neutra dell'ammina.

Un'interessante spiegazione del peculiare comportamento ripartitivo di composti ionizzabili in fasi fosfolipidiche è stata fornita dalla cosiddetta "pH piston hypothesis", recentemente formulata da Avdeef e coll. [35] per descrivere le differenze osservate nella ripartizione tra forme neutre e forme ionizzate su liposomi. Tale ipotesi razionalizza l'interazione di specie cationiche (basi) con i fosfolipidi postulando che essa si realizzi attraverso due fasi concertate: una prima fase, consistente nell'attrazione elettrostatica fra carica positiva dell'analita e carica negativa del residuo fosfato dei fosfolipidi, consentirebbe ai cationi di collocarsi in posizione ottimale per l'interazione lipofilo-idrofobica con le catene idrocarburiche di questi ultimi (seconda fase). Tale meccanismo, invece, non favorirebbe la ripartizione degli anioni (acidi), in quanto la loro interazione elettrostatica avverrebbe negli strati più esterni dei fosfolipidi, dove è situata la carica positiva della testa colinica (figura 3).



**Figura 3.** Rappresentazione schematica dell'interazione tra molecole basiche e fosfolipidi secondo la "pH piston hypothesis".

Il lavoro di ricerca di cui mi sono occupata, si inserisce nell'ambito di uno studio più ampio, che da molti anni viene condotto nel Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, sulla messa a punto e lo sviluppo di sistemi in vitro atti alla valutazione delle più rilevanti caratteristiche farmacocinetiche.

Una prima fase del progetto di ricerca ha inteso approfondire gli studi sul significato e l'utilizzo dei parametri cromatografici IAM per la previsione delle interazioni con le biomembrane. La particolare attenzione che è stata posta sui

parametri di origine cromatografica è giustificata dalla originalità descrittiva della biocromatografia rispetto alle altre metodiche in vitro, ma anche motivata dal fatto che tale metodica è particolarmente adatta alle applicazioni a livello industriale, dove la possibilità di produrre un gran numero di dati in breve tempo (*high throughput*) è requisito fondamentale.

Una seconda fase del lavoro di ricerca ha focalizzato la nostra attenzione sulla possibilità di usare i dati di ripartizione IAM, da soli o combinati con altri parametri chimico-fisici delle molecole, per fornire una possibile spiegazione sui meccanismi che determinano l'attraversamento passivo delle membrane biologiche da parte di sostanze di interesse farmaceutico ed, inoltre, al fine di evidenziare, nei composti analizzati, le caratteristiche strutturali che ne regolano tali aspetti farmacocinetici.

Non si è, infine, trascurato di indagare su metodologie alternative alla IAM-HPLC per l'ottenimento di dati di interazione con i fosfolipidi. Si è, infatti, considerata la possibilità di utilizzare a tale scopo l'elettrocromatografia capillare, tecnica che combina l'elettroforesi capillare con la cromatografia ad alta prestazione. L'esplorazione di tale tecnica per lo studio della ripartizione dei farmaci nelle membrane biologiche è stata condotta, per un periodo di circa cinque mesi, presso l'Istituto di Metodologie Chimiche del CNR di Roma, nel laboratorio diretto dal dott. Salvatore Fanali.

I composti selezionati per l'analisi biocromatografica, comprendono molte molecole attive sul Sistema Nervoso Centrale, per la maggior parte attualmente in commercio; i valori di log BB per più della metà dei composti presi in esame sono noti

dalla letteratura. Il log BB è un indice della permeazione della BBB (Blood Brain Barrier) ed è matematicamente espresso dal logaritmo del rapporto tra la concentrazione del farmaco nel SNC e la concentrazione del farmaco nel sangue ( $\log BB = \log [C_{\text{brain}}/C_{\text{blood}}]$ ).

Vale la pena sottolineare che il log BB è comunemente accettato come il parametro che meglio descrive il passaggio della barriera emato-encefalica; tuttavia la sua misura è affetta da una scarsa riproducibilità intra- ed inter-laboratorio; conseguentemente, in letteratura è possibile trovare per una stessa molecola, valori di log BB anche significativamente differenti.

Il nostro interesse per la BBB nasce da una semplice considerazione: essa è non a caso la barriera più selettiva del nostro organismo. Deve, infatti, garantire più di tutte le altre membrane biologiche la difesa per l'uomo dall'attacco di sostanze estranee (xenobi), ma allo stesso tempo consentire il passaggio di molecole "riconosciute utili" dall'organismo per il funzionamento del Sistema Nervoso Centrale. Resta in buona parte ancora da chiarire quali siano le discriminanti strutturali che determinano l'elevata selettività di questa barriera biologica.

E' apparso significativo, ai fini della nostra indagine, il fatto che la maggior parte dei farmaci attivi sul S.N.C. presenti funzioni di natura basica, che grazie alla localizzazione di cariche positive, hanno mostrato, attraverso vari studi, favorire l'interazione con le biomembrane. La loro presenza ha, infatti, determinato una scala di ripartizione ( $\log k_w^{\text{IAM}}$ ) originale e distinta rispetto alla scala classica dei log P ottenuta con il metodo "shake flask". Se alla natura di queste particolari interazioni codificate

solo dai  $\log k_w^{\text{IAM}}$  possano poi essere associati, almeno in parte, anche fenomeni di attraversamento non è ancora chiaro.

La barriera emato-encefalica, presenta un'organizzazione molto complessa, che ne determina l'alta selettività: risulta costituita da una fitta rete di capillari cerebrali il cui endotelio è "saldato" a formare una serie di giunzioni continue compatte ("*tight-junctions*" - TJ) nella quale sono assenti pori giunzionali; una serie di cellule di sostegno (astrociti) avvolge l'endotelio capillare allo scopo di separare l'encefalo e il fluido cerebro-spinale (CFS) dal sangue. Le cellule endoteliali della BBB quindi, a differenza delle altre, formando giunzioni strette precludono la diffusione paracellulare, cioè la diffusione dei soluti che potrebbe realizzarsi tra una cellula e l'altra; inoltre, posseggono poche vescicole pinocitotiche e mancano di fenestrazioni, perciò il principale meccanismo di diffusione passiva a livello della BBB è quello trans-cellulare.

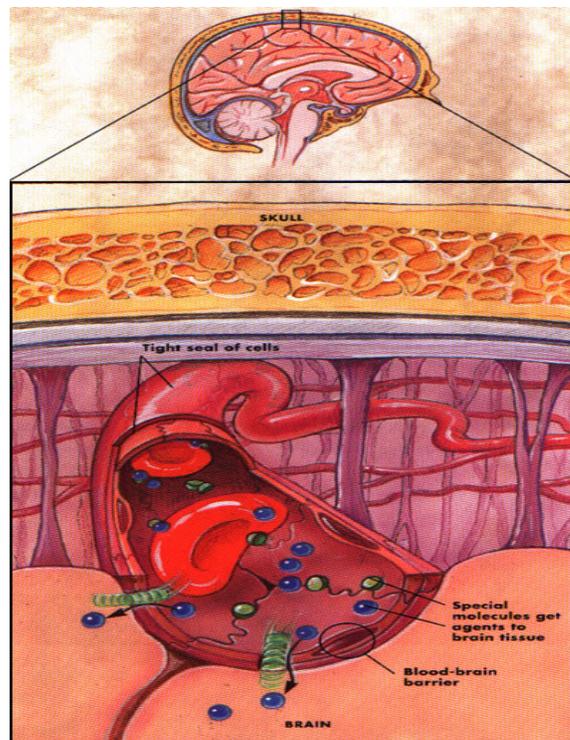
Va aggiunto che un farmaco soggetto a diffusione trans-cellulare, può essere metabolizzato da enzimi presenti all'interno della cellula stessa, oppure può essere allontanato dalla cellula mediante meccanismi di efflusso ATP-dipendenti che sfruttano la P-glicoproteina. Inoltre, contrariamente a quanto per lungo tempo generalmente accettato, la BBB sembra essere soggetta a meccanismi di regolazione endogena.

Da un punto di vista molecolare la BBB non è omogenea, presentando porzioni, contenute in un doppio strato fosfolipidico altamente anisotropo, che si sovrappongono parzialmente.

La mobilità conformazionale delle catene fosfolipidiche è relativamente bassa verso l'interfaccia acquosa (rappresentata dal

sangue) o in prossimità di essa ed aumenta notevolmente verso il centro del *bilayer*.

L'interfaccia lipide-acqua è associata ad un monostrato di molecole di acqua con proprietà di polarizzazione significativamente differenti; ciò comporta che la capacità di queste molecole di acqua di formare legami idrogeno con i farmaci è estremamente ridotta e costituisce parte del processo di desolvatazione.



**Figura 4.** BBB

Per lungo tempo si è ritenuto che composti idrofili, ed in particolare molecole ionizzate, non attraversassero le membrane biologiche; questa visione contrasta con recenti dati sperimentali che dimostrano la diffusione passiva di specie cariche [36, 37].

Premettiamo che numerosi tentativi sono stati fatti per spiegare la permeazione della BBB. Uno dei primi studi QSPR (Quantitative structure-permeability relationship) [1, 2] condotti ha indicato la lipofilia come parametro chiave per predire e spiegare la permeazione attraverso le membrane biologiche. Hansch e collaboratori [38] trovarono che il valore di lipofilia ideale per la penetrazione della BBB è circa 2 (scala dei log P). Conseguentemente, è stato formulato un principio di minima lipofilia, nel quale si afferma che farmaci attivi a livello periferico dovrebbero essere quanto più possibile idrofilici, così da non avere effetti collaterali a livello centrale. [39]

Uno studio successivo ha invece dimostrato che per il passaggio della BBB esiste un intervallo di log P ideale che va da 0,9 a 2,5; in particolare in tal lavoro è stata riscontrata una relazione parabolica tra il log BB ed il log P per le molecole esaminate. In seguito, uno studio condotto su culture di cellule di endotelio cerebrovascolare per una serie di  $\beta$ -bloccanti e farmaci antinfiammatori ha mostrato una relazione sigmoidale con il log D ma non con il log P [40]. Anche nel caso dei chinoloni, molecole anfiprotiche, si è notato che composti con  $\log D < 0$  mostravano una scarsa permeabilità, contrariamente a quanto accadeva per molecole più lipofile (log D compreso tra 0 e 2) [41].

Esistono, tuttavia, altre proprietà della molecola che possono influenzare la permeazione della BBB. Una tra queste è il peso molecolare, dal momento che quanto più è grande la molecola maggiore sarà anche il suo impedimento sterico nell'attraversare la membrana di interesse. In letteratura è riportato che i farmaci del SNC hanno un peso molecolare ridotto se paragonato a quello di altre molecole. Conseguentemente si è

ipotizzato un peso molecolare “*cut-off*” di 450, per la penetrazione della BBB. Un'altra caratteristica molecolare che spesso si è visto influenzare l' attraversamento delle membrane biologiche è la capacità dei composti di formare legami idrogeno, misurata come  $\Delta \log P$ . Esso costituisce essenzialmente una misura della capacità delle molecole di donare legami idrogeno [42]. Il  $\Delta \log P$  è la differenza tra il valore di  $\log P$  misurato nel sistema ottanolo/acqua ed il valore di  $\log P$  ottenuto in un sistema idrocarburo/acqua, dal momento che non è possibile misurare direttamente la ripartizione tra ottanolo ed idrocarburo a causa della miscibilità delle due fasi.

In uno studio condotto su venti antagonisti del recettore H<sub>2</sub> dell'istamina, il  $\Delta \log P_{\text{oct-cyc}}$  (cyc = cicloesano) è risultato essere inversamente correlato all' indice dell'attività biologica [42] a livello del SNC. La capacità di donare legami idrogeno è stata anche correlata con la permeazione del SNC di una serie di 7 oligomeri di fenilalanina esterificati sui gruppi carbossilici [43]. Gli indici di attività biologica, misurati in questo studio, sia *in vivo* che *in vitro*, correlavano molto bene con i due parametri di lipofilia considerati:  $\log P$  nel sistema eptano/etilenglicole e  $\Delta \log P$ . Inoltre, in accordo con i risultati precedentemente esposti, la permeabilità della BBB decresceva con l'aumento della capacità di formare legami idrogeno. Una possibile interpretazione dei risultati sopra esposti, risiede nel fatto che i fosfolipidi hanno delle porzioni molecolari accettrici di legami H, il che potrebbe giustificare la lenta diffusione di soluti che sono forti donatori di legami H.

L'idea di utilizzare il  $\Delta \log P$ , come parametro che esprime essenzialmente la capacità di un soluto di donare legami idrogeno,

nasce da un'ulteriore interpretazione della lipofilia, intesa come il bilancio di due tipi di interazioni intermolecolari:

Interazioni proporzionali al volume del soluto (Idrofobia).

Interazioni associate ai gruppi funzionali (Polarità)

$$\text{Log } P = a \cdot V - \Lambda \quad (5)$$

L'idrofobia di una molecola (**V**) dipende essenzialmente dal volume molecolare e quindi dal suo peso molecolare, se si considera che il volume è grossolanamente funzione del peso molecolare. La polarità (lettera "**V**" rovesciata che si legge come la lettera greca maiuscola lambda "**Λ**") dipende, invece, essenzialmente dai seguenti parametri:

**π\***, misura della polarità/polarizzabilità della molecola

**α**, misura della capacità di donare legami idrogeno da parte della molecola (H-bond donor acidity)

**β**, misura della capacità di accettare legami idrogeno da parte della molecola (H-bond acceptor basicity)

Il termini **π\***, **α**, e **β** sono stati definiti "parametri solvatocromici" e compaiono nell' equazione:

$$\log P = aV + b\pi^* + c\beta + d\alpha + e \quad (6)$$

dove a, b, c, d, ed e rappresentano costanti numeriche le quali indicano in che misura il log P dipenda dai suddetti parametri.

E' possibile determinare il log P di una sostanza servendosi di un solvente organico diverso dall'*n*-ottanolo: utilizzando un idrocarburo come l'eptano, si può ottenere un valore di

ripartizione ( $\log P_{\text{ept}}$ ) differente da quello misurato in *n*-ottanolo ( $\log P$ ). Ciò si verifica perché, a differenza del *n*-ottanolo, gli idrocarburi sono incapaci di ricevere o donare legami idrogeno e, pertanto, una molecola con una considerevole polarità, tenderà a ripartirsi nell'idrocarburo meno che in *n*-ottanolo. La dipendenza del  $\log P$  e del  $\log P_{\text{ept}}$  dai parametri solvatocromici viene espressa dalle seguenti equazioni:

$$\begin{aligned} \log P = & 5,83 (\pm 0,53) V/100 - 0,74 (\pm 0,31) \pi^* - 0,15 (\pm \\ & 0,23) \alpha - 3,51 (\pm 0,38) \beta - 0,02 (\pm 0,34) \\ n = & 78 \quad r^2 = 0,922 \quad s = 0,293 \end{aligned} \quad (7)$$

$$\begin{aligned} \log P_{\text{ept}} = & 6,78 (\pm 0,69) V/100 - 1,02 (\pm 0,39) \pi^* - 3,54 (\pm \\ & 0,30) \alpha - 5,35 (\pm 0,50) \beta - 0,06 (\pm 0,43) \\ n = & 75 \quad r^2 = 0,955 \quad s = 0,360 \end{aligned} \quad (8)$$

Da queste equazioni è facilmente osservabile come la misura di ripartizione in *n*-ottanolo ( $\log P$ ) dipenda maggiormente dai parametri  $V/100$  e  $\beta$  e come, invece, il  $\log P_{\text{ept}}$  dipenda anche da  $\pi^*$  e, soprattutto, da  $\alpha$  [42]. Ciò significa, quindi, che la tendenza a formare legami idrogeno è il maggior fattore discriminante, che può essere sfruttato per ricavare un altro parametro di riferimento, ottenuto dalla semplice differenza dei due  $\log P$ , chiamato  $\Delta \log P$ :

$$\begin{aligned} \Delta \log P = \log P_{\text{oct}} - \log P_{\text{HC}} = \log \frac{[\text{farmaco}]_{\text{oct}}}{[\text{farmaco}]_{\text{acq}}} - \log \frac{[\text{farmaco}]_{\text{HC}}}{[\text{farmaco}]_{\text{acq}}} = \\ \log \frac{[\text{farmaco}]_{\text{oct}}}{[\text{farmaco}]_{\text{acq}}} - \log \frac{[\text{farmaco}]_{\text{HC}}}{[\text{farmaco}]_{\text{acq}}} = \log \frac{[\text{farmaco}]_{\text{oct}}}{[\text{farmaco}]_{\text{HC}}} \end{aligned}$$

(9)

dove il termine  $\log P_{HC}$  indica i  $\log P$  ottenuti utilizzando un generico idrocarburo (HC).

Il  $\Delta \log P$  non è altro che il coefficiente di ripartizione *n*-ottanolo/idrocarburo che, però, non può essere ottenuto sperimentalmente data la miscibilità delle due fasi e rappresenta il potenziale “*H-bonding*” di una molecola, e più precisamente la sua capacità di donare legami idrogeno (parametro  $\alpha$ ).

E' stato osservato [44] che il grado di attraversamento della barriera emato-encefalica è inversamente proporzionale alla capacità di una molecola di formare legami idrogeno e quindi inversamente proporzionale al  $\Delta \log P$ , per cui tale parametro potrebbe essere molto affidabile nella predizione del passaggio di un soluto attraverso la BBB. A sostegno di quanto esposto sinora, vale la pena ricordare che recentemente è stata proposta una regola empirica detta “regola del 5”o di Lipinski, la quale conferma l'importanza del potenziale “*H-bonding*” di un farmaco per l' esplicazione della sua attività sul sistema nervoso centrale (SNC). Secondo questa regola per poter osservare una permeazione rilevante attraverso la BBB è necessario che sulla molecola non siano presenti più di cinque gruppi donatori di legami idrogeno né più di dieci gruppi accettori di legami idrogeno, inoltre la molecola non deve avere un peso molecolare maggiore di 500 e un  $\log P$  maggiore di cinque. Quando due di questi criteri non sono rispettati si può ragionevolmente prevedere una mancata permeazione delle barriere membranarie da parte della molecola.

E' importante sottolineare, che in tutti gli studi sopra menzionati è stato utilizzato il  $\log P$  come unico descrittore della

lipofilia di una molecola. Tuttavia, è noto che la lipofilia è un parametro che codifica sia interazioni polari che forze intermolecolari di natura idrofobica (figura 5) ed il log P è risultato poco efficace nella predizione della ripartizione di specie cariche, per le quali entrano in gioco forze di natura elettrostatica. L'assoluta necessità di non poter trascurare le forze di natura elettrostatica da parte di chiunque voglia costruire un valido modello per rappresentare la permeazione transmembranaria dei farmaci emerge con la massima evidenza da una recente stima operata sulla base dei principi attivi riportati nel World Drug Index del 2001. Essa indica che circa il 62,9 % dei farmaci conosciuti è ionizzabile e di questi il 14,5% è rappresentato da acidi, il 67,6% da basi e il 17,9% da anfotiti di vario tipo. E' per tale motivo che la predizione di qualunque proprietà farmacodinamica o farmacocinetica deve tener conto del grado di ionizzazione dei composti ed in questo contesto la biocromatografia su fasi IAM, costituisce un sistema pressoché ottimale per osservare, oltre alle interazioni farmaco/biomembrana di tipo lipofilo/idrofobico, anche quelle extra-interazioni polari di tipo ionico.

| <u>MECCANISMI DI INTERAZIONE</u>   | <u>LIPOFILIA</u>           |   |
|--|----------------------------|---|
| <p><i>Interazioni Elettrostatiche</i><br/> Trasferimento di carica ed interazioni arile/arile<br/> Legami ionici</p> | In liposomi, IAM e micelle | Nel sistema <i>n</i> -ottanolo/ acqua e RP-HPLC |
|  |                            |   |

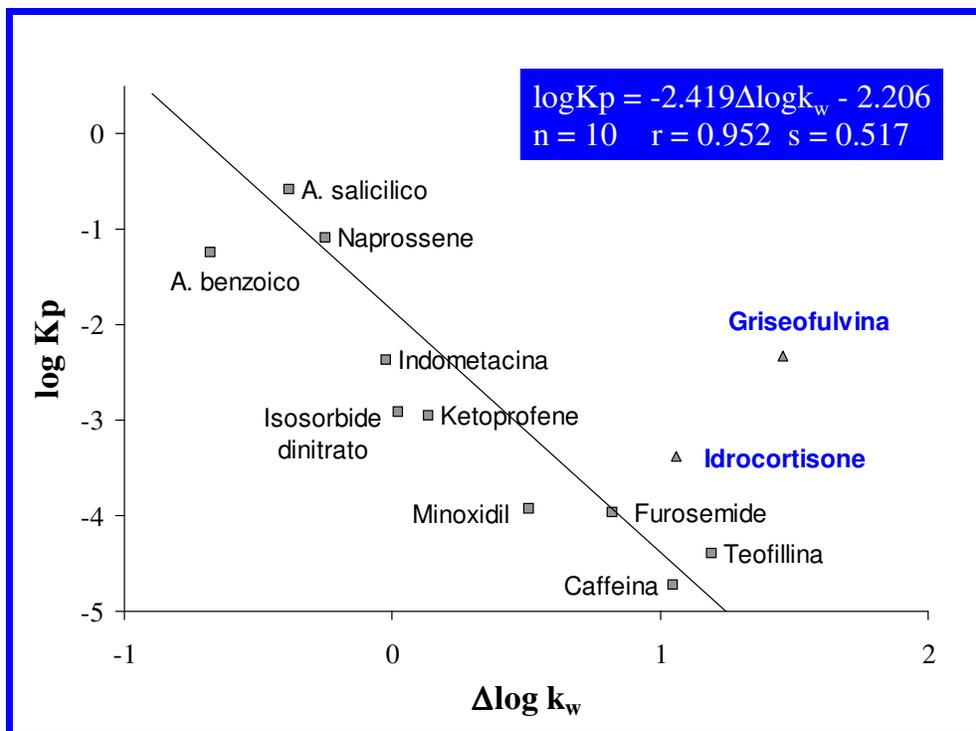
|  |   |                  |                  |
|--|---|------------------|------------------|
| Legami ione-dipolo (permanente, indotto) |   |                  |                  |
| Legami idrogeno rinforzati               |   | <i>Polarità</i>  | <i>Polarità</i>  |
| Legami idrogeno normali                  |   |                  |                  |
| Forze di Van der Waals                   | Forze di Orientazione (dipolo permanente – dipolo permanente) |                  |                  |
|  | Forze di Induzione (dipolo permanente – dipolo indotto)       |                  |                  |
|  | Forze di Dispersione (dipolo istantaneo - dipolo indotto)     | <i>Idrofobia</i> | <i>Idrofobia</i> |
|  | <i>Interazioni Idrofobiche</i>                                |                  |                  |

**Figura 5.**

E' interessante a tal proposito sottolineare che nel nostro gruppo di ricerca, già in passato, si è cercato di spiegare l'attraversamento transdermico, fenomeno complesso che coinvolge le interazioni tra molecole e fosfolipidi, proprio sfruttando gli indici di affinità per i fosfolipidi [45]. La classe di composti esaminati comprendeva dodici molecole (acidi, basi e composti non ionizzabili); per essi non era stata trovata alcuna correlazione tra la capacità di attraversamento transdermico,

misurata dal coefficiente di permeabilità ( $K_p$ ) e il  $\log P$  o il  $\log k_w^{IAM}$ ; inoltre, nessun miglioramento era stato riscontrato correggendo i valori di  $\log k_w^{IAM}$  sulla base del peso molecolare. Supportati da lavori precedentemente condotti da altri gruppi di ricerca, che avevano trovato buone correlazioni tra il  $\Delta \log P_{oct-hep}$  ed il  $K_p$ , venne calcolato un nuovo parametro il  $\Delta \log k_w^{IAM}$ , che codifica extra-interazioni essenzialmente, ma non esclusivamente di natura elettrostatica. Questo parametro, graficamente, rappresenta la distanza dei punti in esame dalla retta dei composti non ionizzabili e si ottiene dalla differenza tra i  $\log k_w^{IAM}$  misurati e i valori predetti dal  $\log P$  mediante l'equazione "delle neutre" (4).

Come si può vedere nel grafico seguente (Figura 6), la capacità delle molecole in esame di essere assorbite per via transdermica decresceva al crescere dei valori di  $\Delta \log k_w^{IAM}$ , per tutti i composti considerati, ad eccezione di griseofulvina ed idrocortisone. Questi due ultimi composti sono gli unici non ionizzabili che mostrano extra-interazioni con i fosfolipidi, probabilmente attribuibili alla formazione di legami idrogeno. I risultati ottenuti confermano l'ipotesi che molecole con valori negativi di  $\Delta \log k_w^{IAM}$  attraversano lo strato corneo più agevolmente di quelle con un  $\Delta \log k_w^{IAM}$  positivo. Una spiegazione di questo fenomeno è che le interazioni elettrostatiche attrattive comportano una diminuzione della permeabilità, mentre quelle repulsive, un aumento.



**Figura 6.** Relazione tra il log K<sub>p</sub> ed il Δlog k<sub>w</sub>

In analogia a tale osservazione, abbiamo ritenuto che il Δ log k<sub>w</sub><sup>IAM</sup>, dimostratosi efficace nella descrizione del fenomeno di passaggio transdermico, possa dimostrarsi di una qualche utilità anche nella descrizione del passaggio della BBB. Il calcolo del Δ log k<sub>w</sub><sup>IAM</sup> si basa sulla constatazione che sulle fasi IAM.PC.MG e IAM.PC.DD2 è stato possibile osservare una correlazione altamente significativa tra i valori di log P e di log k<sub>w</sub><sup>IAM</sup> per composti neutri strutturalmente non correlati [28]; ciò ha portato alla formulazione di due nuove equazioni correlative (una per fase), ottenute utilizzando in questo caso 36 molecole non ionizzabili.

$$\log k_w^{IAM.MG} = 0,792 (\pm 0,038) \log P - 0,732 (\pm 0,105)$$

$$n = 36 \quad r^2 = 0,926 \quad s = 0,247$$

(10)

$$\log k_w^{IAM.DD2} = 0,934 (\pm 0,038) \log P - 0,883 (\pm 0,104)$$

$$n = 36 \quad r^2 = 0,946 \quad s = 0,246$$

(11)

Conoscendone il log P e sfruttando queste due equazioni è possibile prevedere il comportamento di un dato composto sulle fasi IAM dette “a doppia catena”, calcolando il  $\log k_w^{IAM}$  di un ipotetico composto neutro isolipofilico. La differenza tra il  $\log k_w^{IAM}$  sperimentalmente trovato e quello teorico così calcolato costituisce il  $\Delta \log k_w^{IAM}$ , che può essere considerato una misura dell'eccesso di interazione polare, non codificato dal coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua tra farmaci e fosfolipidi: un tale parametro rappresenta soprattutto, ma non unicamente, le interazioni di tipo elettrostatico. Un valore di  $\Delta \log k_w^{IAM}$  positivo, indica che il composto in esame interagisce con i fosfolipidi in misura maggiore di quanto atteso; in questo caso sembrerebbe logico pensare che le extra-interazioni di tipo elettrostatico favoriscano la ripartizione della sostanza nel compartimento membranario. Questo è ciò che è stato osservato nel caso di composti di natura basica presenti in maniera rilevante in forma ionizzata a pH fisiologico (7,4): si ritiene che interazioni di tipo elettrostatico tra la carica positiva del composto e quella negativa del gruppo fosfato del fosfolipide stabilizzino il farmaco nella fase lipidica maggiormente di quanto ci si possa aspettare sulla base di considerazioni riguardanti unicamente la lipofilia del composto determinata dal log P. Al contrario un valore negativo del  $\Delta \log$

$k_w^{IAM}$  indica che il composto in esame interagisce in misura minore rispetto ad un composto neutro isolipofilico. Le interazioni elettrostatiche sono in questo caso repulsive: questo è quanto è stato osservato per alcune classi di acidi antinfiammatori non steroidei carichi negativamente a pH fisiologico [32].

Come esposto precedentemente, una parte del nostro studio ha riguardato l'applicazione della elettrocromatografia capillare agli studi di interazione farmaco-membrane biologiche; per tale motivo qui di seguito descriveremo brevemente i principi alla base della metodica utilizzata.

L'elettrocromatografia capillare (CEC) è una moderna tecnica analitica utilizzata per la determinazione qualitativa e/o quantitativa di specie sia neutre che cariche. Essa può essere considerata una tecnica ibrida che combina caratteristiche dell'HPLC e dell'elettroforesi capillare (CE), sia per quanto riguarda il processo di separazione, che implica più meccanismi, sia per quanto riguarda i vantaggi presentati.

La separazione avviene in capillari contenenti una fase stazionaria che può essere legata alla parete (open tubular, o-CEC), legata alla silice (packed, p-CEC) o legata a polimeri (fasi monolitiche). Come in CE, in CEC la forza principale che spinge sia la fase mobile che gli analiti verso il rivelatore è un elevato flusso elettro-osmotico (EOF). Questo viene generato dal campo elettrico applicato e dipende da vari parametri come per esempio il tipo di fase stazionaria, la natura e la composizione della fase mobile, la temperatura, e così via.

I vantaggi della CEC includono una maggiore efficienza rispetto all' HPLC, un ridotto consumo di solvente organico, la

necessità di piccoli volumi di campione, la riduzione dei tempi di analisi.

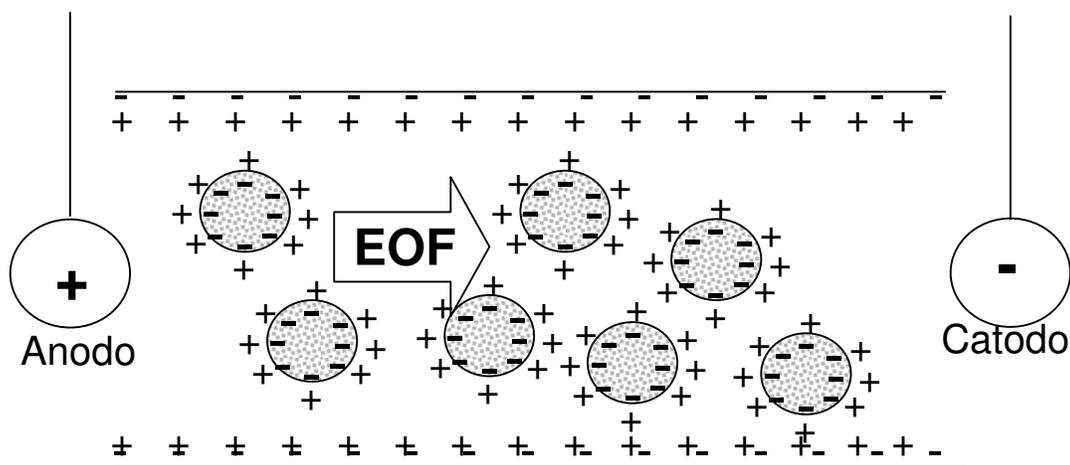
Negli ultimi anni l'interesse verso questa tecnica è cresciuto in modo considerevole. La CEC si propone come un metodo complementare ed, in alcuni casi, alternativo ad altri, come per esempio all'HPLC; tuttavia si trova ancora in fase di sviluppo e non può essere considerata una tecnica matura. Ad esempio, la maggior parte della letteratura riporta infatti l'uso di colonne "preparate in casa" ed anche in questo particolare studio il capillare utilizzato è stato impaccato in laboratorio.

In letteratura era già stata descritta la possibilità di utilizzare metodiche diverse rispetto all'HPLC per misurare la lipofilia delle molecole; alcuni autori avevano proposto sia la MEKC (Micellar ElectroKinetic Chromatography - cromatografia elettrocinetica capillare) che la MEEKC (Micro Emulsion ElectroKinetic Chromatography) come metodi ugualmente validi a tali scopi. La nostra idea è stata quella di mimare la ripartizione dei farmaci nelle membrane biologiche, trasladando il sistema cromatografico in un sistema elettrocromatografico per poter usufruire di tutte le potenzialità della CEC.

Quando si sceglie la CEC come tecnica di analisi e si procede all'ottimizzazione e convalida di un metodo, è necessario soffermarsi sui punti di seguito elencati [46].

L'applicazione di un campo elettrico produce un movimento di specie ioniche in base al loro rapporto carica/raggio. Si verifica così un meccanismo di selezione alternativo che va ad aggiungersi a quello che si ottiene con il solo processo cromatografico, basato sulla ripartizione.

Quest'ultimo resta comunque essenziale, in quanto rappresenta l'unico mezzo per effettuare la separazione delle sostanze neutre



**Figura 7.** Generazione dell'EOF in seguito all'applicazione di un campo elettrico.

Il meccanismo che genera il flusso elettrosmotico in CEC è simile a quello della CE. Le superfici della parete del capillare e della fase stazionaria, che riempie la colonna capillare, sono entrambe cariche negativamente a causa della presenza di gruppi silanologici di superficie. A questi strati carichi si sovrappongono cariche di segno opposto dell'elettrolita che costituisce la fase mobile, formando così un doppio strato elettrico. L'applicazione di un campo elettrico alle estremità del capillare spinge i cationi disposti alla superficie delle pareti cariche negativamente a muoversi verso il polo negativo, catodo, trascinando con sé le molecole di acqua di idratazione e generando così un flusso di eluente che prende appunto il nome di flusso elettrosmotico (figura 7).

La grandezza dell'EOF generato,  $\mu_{\text{eof}}$ , è proporzionale al potenziale  $\zeta$  sviluppato dal doppio strato di ioni ed è dato dalla seguente equazione [47] :

$$\mu_{\text{eof}} = \gamma \epsilon_0 \epsilon \zeta / \eta \quad (12)$$

dove  $\epsilon_0$  è la costante dielettrica del vuoto,  $\epsilon$  ed  $\eta$  sono rispettivamente costante dielettrica e viscosità del solvente,  $\gamma$  è un fattore dimensionale che tiene conto della porosità e della tortuosità dell'impaccamento.

Il contributo della parete del capillare alla generazione dell'EOF è minimo e quindi trascurabile, poiché l'area superficiale della fase stazionaria è molto più grande, e  $\zeta$  dipende dalla densità di carica sulla superficie  $\sigma$ , secondo la seguente equazione:

$$\zeta = \sigma \delta / (\epsilon_0 \epsilon). \quad (13)$$

dove  $\delta$  rappresenta lo spessore del doppio strato.  $\delta$  è correlato alla concentrazione dell'elettrolita in modo tale che diminuendo la forza ionica si osserva un aumento dello spessore del doppio strato e, come conseguenza, un aumento dell'EOF.

La velocità lineare dell'EOF,  $u_{\text{eo}}$ , è correlata all'intensità del campo elettrico E, come di seguito:

$$u_{\text{eo}} = \mu_{\text{eo}} \mathbf{E} = \mu_{\text{eo}} V/L \quad (14)$$

dove V è il voltaggio e L la lunghezza totale della colonna.

Di conseguenza, in CEC l'EOF può essere modificato variando la costante dielettrica e la viscosità (attraverso la scelta di un'adatta fase mobile e della temperatura), la carica

superficiale (variando il pH e la fase stazionaria), la forza ionica della fase mobile e l'intensità del campo elettrico applicato.

L'utilizzo dell'EOF come "driving force" presenta due vantaggi fondamentali:

Un profilo piatto del flusso elettrosmotico sicuramente vantaggioso per ottenere un minore allargamento della banda e quindi maggiore efficienza. Tale situazione è molto differente da quella esistente in altre tecniche basate sulla pressione, dove il flusso ha un profilo parabolico e, generalmente, vengono osservate minori efficienze.

Il flusso non dipende dalle dimensioni delle particelle e dalla geometria del materiale di impaccamento, così come risulta dalle eq. (12) e (14).

In CEC è possibile dunque ridurre il diametro delle particelle, al fine di aumentare l'efficienza, andando incontro a minori complicazioni rispetto a quanto avviene in HPLC.

Infine, in CEC così come in CE, è di massima importanza la termostatazione del sistema. Infatti, l'applicazione di un alto campo elettrico, combinata con l'alta forza ionica, implica spesso il verificarsi dell'effetto Joule con disturbi della corrente e della linea di base.

Ci sono poi determinate considerazioni da tenere di conto anche a livello pratico, che proprio in quanto tali verranno esaminate nella parte sperimentale. Esse riguardano fondamentalmente l'impaccamento del capillare, la rivelazione degli analiti e la formazione di bolle.

## 2. IMPOSTAZIONE DEL LAVORO DI RICERCA

---

Al momento dell'inizio del mio lavoro di tesi, le caratteristiche emerse circa il comportamento cromatografico su IAM potevano essere così riassunte:

Si era stabilito che composti ionizzabili interagiscono con le fasi IAM in maniera peculiare rispetto alle interazioni apprezzate nel sistema *n*-ottanolo/fase acquosa. In particolare la ritenzione su IAM confermava quanto già in parte osservato in studi di ripartizione in liposomi, e cioè che tutte le forme ionizzate conservano una capacità ripartitiva nei fosfolipidi sensibilmente superiore a quella misurabile nel *n*-ottanolo e non correlabile ad essa. Inoltre, è stato riscontrato che nel caso di molecole ionizzate, il grado di interazione con i fosfolipidi è predetto sicuramente in maniera più realistica dai valori di log P rispetto ai relativi valori di log D. Tale comportamento è estremamente importante: se i valori di log  $k_w^{IAM}$  di composti ionizzati fossero correlati al loro log D, come riportato da alcuni autori [48], si verrebbe a perdere l'originalità descrittiva della biocromatografia, in quanto ciò sarebbe indicativo di un comportamento delle fasi fosfolipidiche analogo a quello delle fasi idrocarburiche C18. Va aggiunto, inoltre, che proprio grazie alle discrepanze fra i dati IAM ed i log P sono state osservate correlazioni fra la ritenzione in fosfolipidi e la ripartizione in liposomi (anestetici locali), fra la ritenzione in fosfolipidi e la ripartizione in membrane biologiche (calcio bloccanti), fra la ritenzione in fosfolipidi e i dati di bioattività (anestetici locali).

Da tutte queste osservazioni possiamo trarre due importanti conclusioni:

1. quando le interazioni dell'analita con i fosfolipidi sono basate solo sulla lipofilia, esse sono adeguatamente predette, anche per molecole ionizzate (basiche o acide), dai valori di lipofilia relativi alle forme non ionizzate ( $\log P$ ) determinati nel sistema *n*-ottanolo/ acqua. Al contrario, il parametro  $\log D^{\text{pH}}$  non risulta essere adeguato per descrivere queste interazioni.

L'utilità dei dati IAM consiste nella loro capacità di rivelare il manifestarsi di extra-interazioni polari, sia attrattive che repulsive, correlate a varie caratteristiche strutturali e non solo ai valori di pKa dei composti (amine primarie, secondarie e terziarie si ripartiscono in misura differente nelle fasi fosfolipidiche, ma anche antinfiammatori a struttura differente).

2. Altro presupposto del nostro lavoro di ricerca è stato aver individuato un'unica correlazione, sulle colonne IAM.PC.MG e IAM.PC.DD2 (ma non sulla fase IAM.PC.DD che è l'unica fase monocatena), fra  $\log k_w^{\text{IAM}}$  e  $\log P$  per quarantasette composti neutri strutturalmente non correlati. Ciò ha permesso di utilizzare, per i nostri studi, le due nuove rette dei composti non ionizzabili sulle fasi a doppia catena, anziché le classiche "equazioni delle neutre" ottenute a partire da 10 molecole non ionizzate (sette diidropiridine e tre idrocarburi)

Le equazioni su menzionate sono state formulate grazie ad uno studio recente, condotto dal nostro gruppo di ricerca in collaborazione con l'Institut de Chimie Therapeutique dell'Università di Losanna (Svizzera) diretto dal prof. Bernard Testa, che ha considerato un campione costituito da 47 molecole neutre i cui  $\log P$  variavano da valori negativi sino a valori superiori a cinque, al fine di verificare, anche nel caso

di un così ampio numero di sostanze, la diretta proporzionalità tra il valore di lipofilia, espresso dal  $\log P$ , e quello di  $\log k_w^{IAM}$  sulle tre diverse fasi (figura 8 e 9).

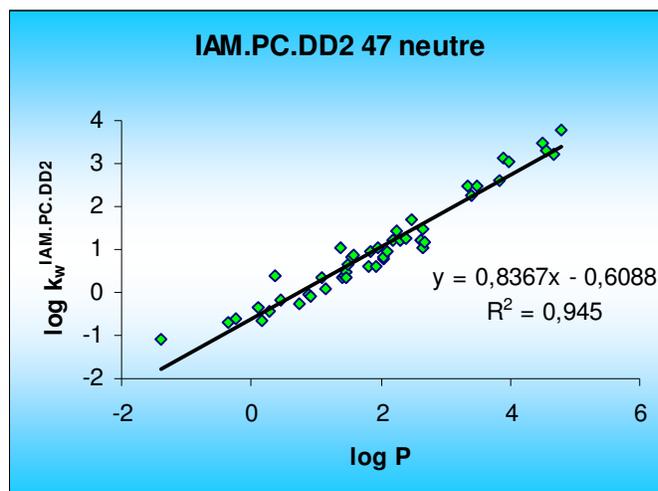


Figura 8.

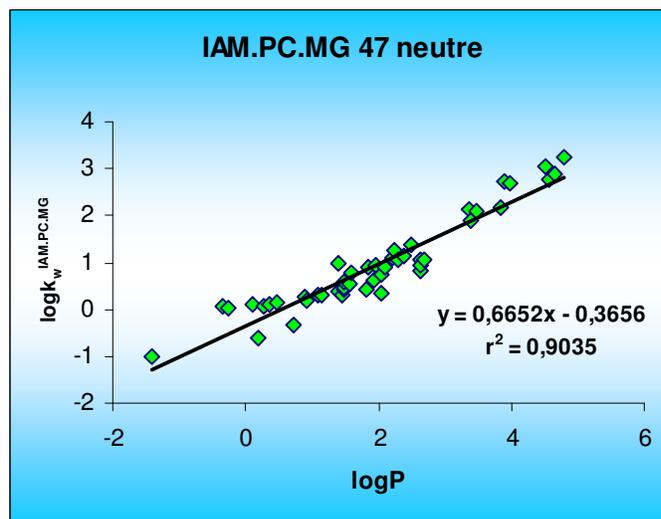


Figura 9.

$$\text{Log } k_w^{\text{IAM.DD2}} = 0,837 (\pm 0,030) \log P - 0,609 (\pm 0,072)$$

$$n = 47 \quad r^2 = 0,945 \quad s = 0,288$$

(15)

$$\log k_w^{\text{IAM.MG}} = 0,665 (\pm 0,032) \log P - 0,366 (\pm 0,078)$$

$$n = 47 \quad r^2 = 0,904 \quad s = 0,310$$

(16)

Per quanto concerne la fase IAM.PC.DD2 otteniamo una retta con un coefficiente di correlazione  $r^2 = 0,945$  ed un coefficiente angolare, che rappresenta la pendenza, pari a 0,837. Per la fase MG, invece, l' $r^2$  è 0,904, mentre la pendenza è pari a 0,665. Ciò indica che per entrambe le fasi la correlazione tra i parametri  $\log P$  e  $\log k_w^{\text{IAM}}$  è senz'altro buona. Nel caso in cui si escludano i punti con  $\log P < 0$ , le sostanze analizzate si riducono a 44:

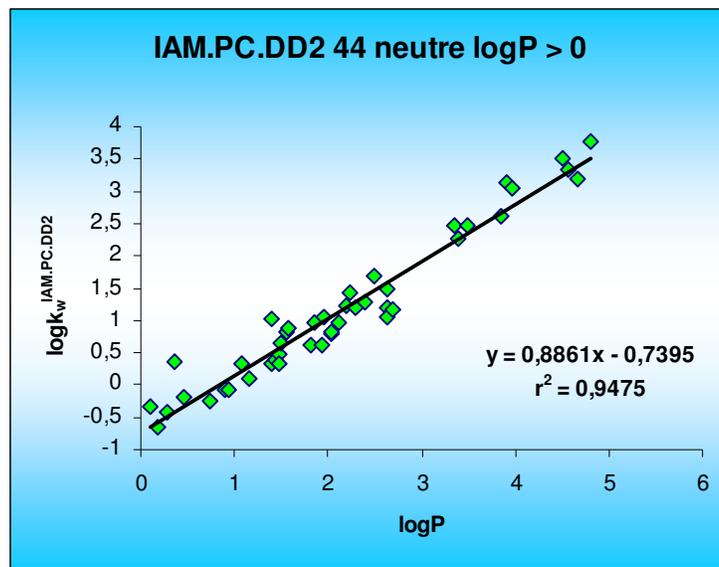


Figura 10.

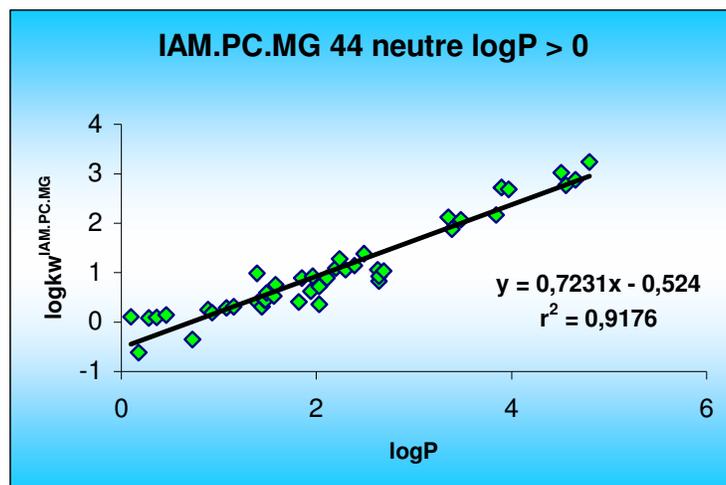


Figura 11.

$$\begin{aligned} \text{Log } k_w^{IAM.DD2} &= 0,886 (\pm 0,032) \log P - 0,740 (\pm 0,080) \\ n &= 44 \quad r^2 = 0,948 \quad s = 0,267 \end{aligned} \quad (17)$$

$$\begin{aligned} \log k_w^{IAM.MG} &= 0,723 (\pm 0,033) \log P - 0,524 (\pm 0,083) \\ n &= 44 \quad r^2 = 0,918 \quad s = 0,277 \end{aligned} \quad (18)$$

In questo caso, come è possibile notare direttamente dai grafici e dalle equazioni, per entrambe le fasi non si notano variazioni significative né del coefficiente di correlazione né della pendenza della retta. Si è pensato, in seguito, di considerare soltanto 36 composti, quelli, cioè, con  $\log P > 1$ :

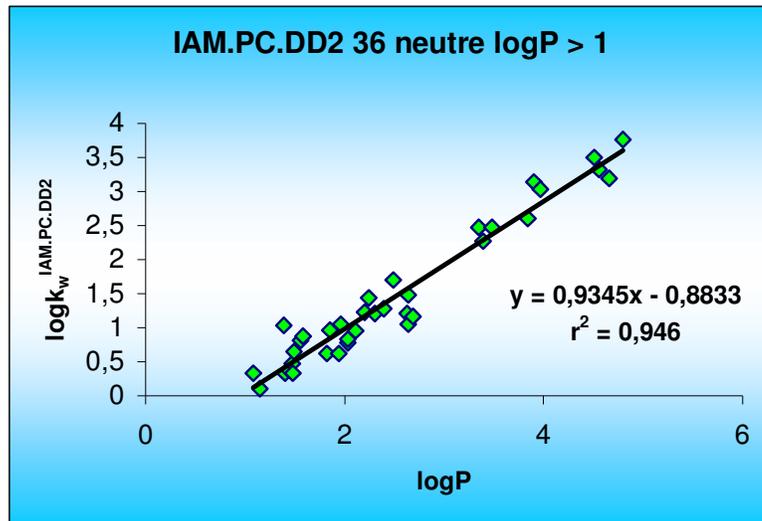


Figura 12.

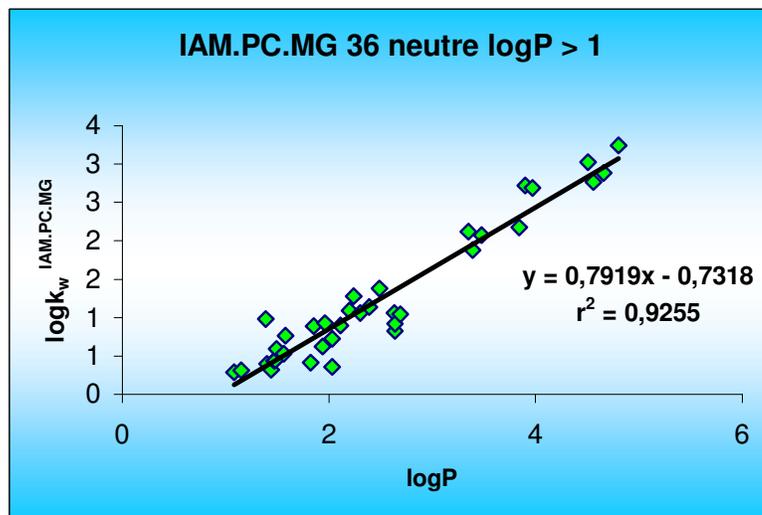


Figura 13.

$$\log k_w^{IAM.DD2} = 0,934 (\pm 0,038) \log P - 0,883 (\pm 0,104)$$

$$n = 36 \quad r^2 = 0,946 \quad s = 0,246$$

(19)

$$\log k_w^{IAM.MG} = 0,792 (\pm 0,038) \log P - 0,732 (\pm 0,105)$$

$$n = 36 \quad r^2 = 0,926 \quad s = 0,247$$

(20)

Come si può notare, diminuendo il numero dei dati e restringendo la correlazione ai composti che presentano un  $\log P \geq 1$ , il coefficiente di correlazione  $r^2$  migliora soprattutto nel caso della fase MG, mentre la deviazione standard,  $s$ , migliora per entrambe le fasi IAM. Va sottolineato che, restringendo l'intervallo di lipofilia a molecole a più elevato valore di  $\log P$ , si osserva una variazione della pendenza delle rette di correlazione che aumenta per entrambe le fasi, approssimandosi maggiormente all'unità (0,934 per la DD2 e 0,792 per la MG). Un valore di pendenza unitario, o estremamente vicino all'unità, viene riscontrato fra due fenomeni "isodiscriminativi". Sono tali quei fenomeni che risentono in ugual misura delle variazioni delle stesse proprietà chimico-fisiche degli analiti a loro volta risultanti da variazioni strutturali. Nel nostro caso, una pendenza unitaria indicherebbe che i valori di  $\log P$  e di  $\log k_w^{IAM}$  non solo sono l'espressione delle stesse forze di interazione intermolecolari, ma risentono in ugual misura delle loro variazioni quando si passa da un analita ad un altro.

E' possibile, quindi, concludere che una linearità ottimale fra dati di lipofilia in *n*-ottanolo ed in fosfolipidi per molecole neutre è osservabile su intervalli ristretti di valori di  $\log P$ , in quanto vengono riscontrate correlazioni con pendenze decrescenti al diminuire dei valori di lipofilia compresi negli intervalli considerati.

Ciò può essere razionalizzato supponendo che, contrariamente a quanto atteso, anche molecole con bassa lipofilia ( $\log P < 1$ ) mostrano una discreta affinità per le fasi stazionarie fosfolipidiche, non del tutto spiegate dal parametro classico di lipofilia ( $\log P$ ) e suggerisce che la diminuzione del valore di lipofilia non influenza in maniera significativa la ripartizione dei composti in esame nei fosfolipidi, facendo presupporre che nel legame farmaco/biomembrana intervengano anche altri tipi di interazione.

Un confronto fra le equazioni per composti neutri ottenute per 36 composti e le rispettive equazioni, sinora adoperate, ottenute su 10 composti non mostra differenze significative, se non nel valore più basso delle intercette per entrambe le fasi IAM nel caso delle sette diidropiridine e dei tre idrocarburi:

$$\log k_w^{IAM.DD2} = 0,934 (\pm 0,038) \log P - 0,883 (\pm 0,104)$$

$$n = 36 \quad r^2 = 0,946 \quad s = 0,246$$

$$\log k_w^{IAM.DD2} = 1,027 (\pm 0,071) \log P - 1,477 (\pm 0,284)$$

$$n = 10 \quad r^2 = 0,963 \quad s = 0,226$$

$$\log k_w^{IAM.MG} = 0,792 (\pm 0,038) \log P - 0,732 (\pm 0,105)$$

$$n = 36 \quad r^2 = 0,926 \quad s = 0,247$$

$$\log k_w^{IAM.MG} = 0,816 (\pm 0,035) \log P - 1,055 (\pm 0,140)$$

$$n = 10 \quad r^2 = 0,985 \quad s = 0,111$$

Le equazioni dei composti non ionizzabili sopra esposte sono state utilizzate per confrontare i punti relativi alle molecole da noi analizzate con quelli di composti neutri di pari lipofilia, ossia, come verrà ampiamente esposto in seguito, per calcolare i valori di  $\Delta \log k_w^{IAM}$  di ciascun composto.

Sulla base dei presupposti sopra esposti, l'obiettivo del lavoro di ricerca da noi condotto è stato, da un lato determinare gli indici di affinità per i fosfolipidi, mediante biocromatografia, di molecole per lo più ionizzate a pH fisiologico, dal momento che tale misura descrive in maniera realistica l'interazione con le membrane biologiche. D'altro canto, per le molecole di cui erano noti, in letteratura, i valori sperimentali di log BB si è cercato di trovare dei parametri che potessero risultare efficaci nella

descrizione delle caratteristiche strutturali necessarie per l'attraversamento delle membrane biologiche.

A tal proposito vale la pena illustrare brevemente i risultati riportati da altri autori, che hanno utilizzato la metodica biocromatografica per predire il passaggio della BBB.

Il primo studio [20] riguarda 26 farmaci, per i quali sono stati determinati gli indici di affinità per i fosfolipidi sulla fase IAM.PC.DD; per tali composti nessuna correlazione è stata riscontrata tra  $\log BB$  e  $\log P$ , ma neppure tra  $\log BB$  e  $\log \log k_w^{IAM}$ . Tuttavia l'introduzione del volume molecolare e di una variabile indicatrice che discrimina tra acidi, basi e composti non ionizzabili ha portato a discrete correlazioni sia tra  $\log BB$  e  $\log P$  che tra  $\log BB$  e  $\log k_w^{IAM}$ . E' importante sottolineare a proposito della fase monocatena IAM.PC.DD su menzionata, che uno studio condotto nel nostro gruppo di ricerca aveva dimostrato una minore originalità descrittiva di questa fase stazionaria rispetto alla fase "a doppia catena" IAM.PC.MG. [49]

- Un altro lavoro condotto questa volta sulle due fasi fosfolipidiche a doppia catena IAM.PC.MG e IAM.PC.DD2, per una serie di 1,3,5 triazine ha dimostrato che sia il  $\log P$  che il  $\log k_w^{IAM}$  sono in grado di spiegare l'attività biologica di questa classe di composti. In particolare la dipendenza del  $\log BB$  dai due descrittori della lipofilia di una molecola ( $\log P$  e  $\log k_w^{IAM}$ ) è di tipo parabolico. Al contrario si è dimostrato di scarsa utilità il  $\Delta \log P_{(cicloesano/ottanolo)}$ , nonostante esso talvolta sia stato considerato il miglior parametro per descrivere il potenziale attraversamento della BBB. [23] Tuttavia, va sottolineato che nello studio menzionato e nei successivi vengono sempre considerate classi di composti che sono omologhi strutturali.

- Uno dei primi lavori che afferma la superiorità predittiva dei  $\log k_w^{IAM}$  sia rispetto al  $\log k_w$  ottenuto su colonne  $C_{18}$ , che rispetto al  $c \log P$  (valore di  $\log P$  calcolato teoricamente) e al  $\log D^{7,4}$ , è stato condotto su sei ammine endogene, tuttavia nello stesso studio sono stati considerati anche sei steroidi, ma per essi nessuno dei parametri sopra menzionati è risultato efficace per spiegare il passaggio della BBB. [50]

In tale studio si conclude che il  $\log k_w^{IAM}$  risulta essere predittivo dell' attraversamento della BBB, solo quando si tratta di composti polari, per i quali tale parametro riflette la complessità delle forze che governano la permeazione.

- Un recente lavoro che considera otto antiinfiammatori arilpropionici ha mostrato una relazione parabolica tra la capacità di diffusione attraverso la BBB ( $\log R_{AUC}$ ) e la lipofilia espressa dai  $\log k_w^{IAM}$  ottenuti sulla fase IAM.PC.MG. [51] Inoltre l'introduzione del peso molecolare nella relazione parabolica ottenuta migliora la correlazione; lo stesso non accade se si inserisce il  $pK_a$  dei composti in esame, perché al pH fisiologico tutti i composti esaminati sono in forma completamente ionizzata. Di conseguenza l'introduzione del  $pK_a$  non migliora significativamente la correlazione. La relazione parabolica ottenuta è supportata da dati già riportati in letteratura, che descrivono relazioni non lineari tra dati di attività biologica e proprietà chimico-fisiche. Hansch per primo suggerì che le molecole si muovono in maniera casuale attraverso le membrane biologiche; in conseguenza di ciò il loro movimento attraverso una fase lipide/acqua è spiegabile da una parabola.

Nel nostro studio il primo passo è consistito nella determinazione sperimentale dei valori di  $\log k_w^{IAM}$ , su fasi IAM.PC.DD2 e IAM.PC.MG, relativi a sessanta molecole. La serie di composti in esame comprende per la maggior parte molecole attive sul sistema nervoso centrale (SNC), ma anche composti che notoriamente non attraversano la BBB, ma di cui è ugualmente noto il valore di  $\log BB$ .

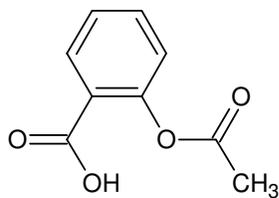
In prima analisi è stata verificata l'esistenza di una correlazione tra i valori di  $\log k_w^{IAM}$  trovati e i rispettivi valori di  $\log P$ , alcuni dei quali determinati preventivamente con il metodo "shake-flask". I valori di  $\log P$  sono stati poi portati in grafico con quelli di  $\log BB$  noti per le molecole analizzate, per verificare visivamente ed in via preliminare, l'esistenza di una correlazione anche tra questi due parametri, al fine di evidenziare il contributo della lipofilia all'attraversamento della BBB.

Sono stati portati in grafico anche i valori di  $\log k_w^{IAM}$  misurati con quelli di  $\log BB$ , al fine di verificare se intercorresse alcuna relazione tra i due parametri considerati. Inoltre, è stato introdotto un nuovo parametro che valuta l'entità delle interazioni elettrostatiche il  $\Delta \log k_w^{IAM}$  che si ottiene dalla differenza tra il valore di  $\log k_w^{IAM}$  sperimentale e quello teorico ottenuto sostituendo il valore di  $\log P$  nella equazione dei composti non ionizzabili. E' di fondamentale importanza sottolineare che considerando contemporaneamente molecole acide, basiche e non ionizzate non è stato possibile trovare alcun tipo di correlazione tra  $\log BB$  e i parametri sopra menzionati. Quindi si è proceduto cercando di analizzare, in via preliminare i composti separatamente, dividendoli in base al grado di ionizzazione

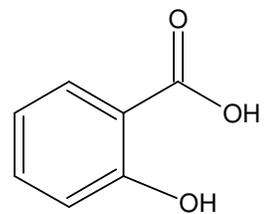
mostrato al pH di lavoro, per poi eventualmente raggrupparli in una fase successiva.

Non va trascurato che nello studio condotto solo stati inclusi, oltre a parametri cromatografici diretti ( $\log k_w^{\text{IAM}}$ ) o indiretti ( $\Delta \log k_w^{\text{IAM}}$ ), anche altre proprietà chimico-fisiche delle molecole, quale ad esempio il volume molecolare. Inoltre, come già accennato nella parte introduttiva del presente lavoro di tesi, si è proceduto, anche ad indagare l'applicazione di una metodica cromatografia (l'elettrocromatografia capillare), per valutare la possibilità di studiare la ripartizione dei farmaci nelle membrane biologiche. Tuttavia, la messa a punto del metodo analitico in CEC è stata laboriosa ed ha richiesto, in via preliminare, una serie di prove sperimentali, sulle quali ci si è basati per condurre gli studi successivi. Inoltre, in CEC è stata analizzata solo una serie ridotta di composti rispetto alla biocromatografia. Tuttavia, il gruppo di molecole in esame è rappresentativo della varietà di molecole studiate in IAM-HPLC e ci ha permesso di trarre delle importanti considerazioni sulla metodica messa a punto.

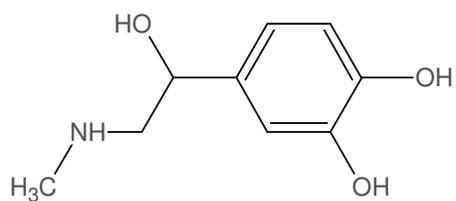
Qui di seguito, sono riportate le strutture dei composti analizzati.



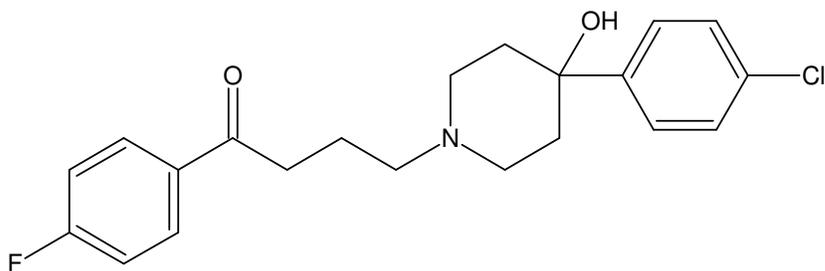
ACIDO ACETILSALICILICO



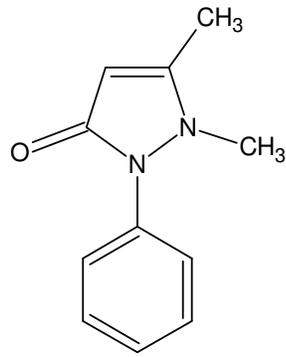
ACIDO SALICILICO



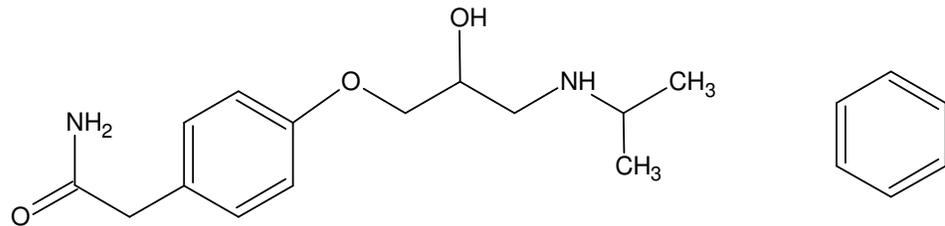
ADRENALINA



ALOPERIDOLO

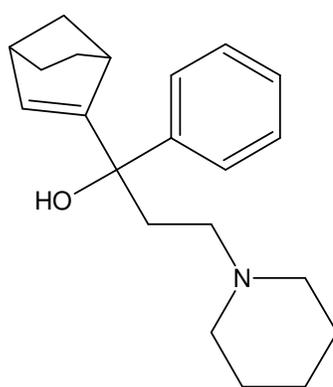


ANTIPIRINA

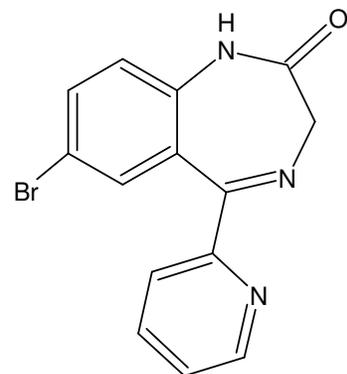


ATENOLOLO

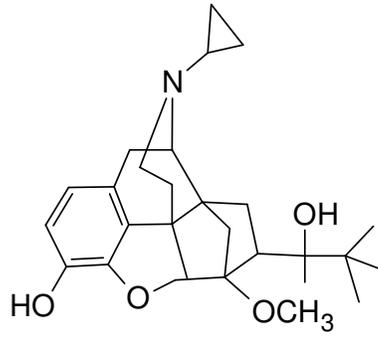
BENZENE



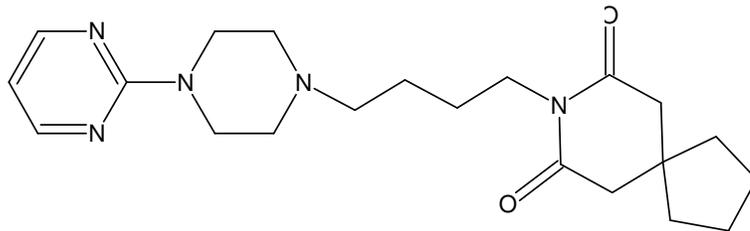
BIPERIDENE



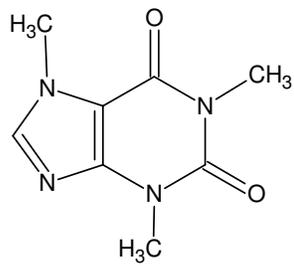
BROMAZEPAM



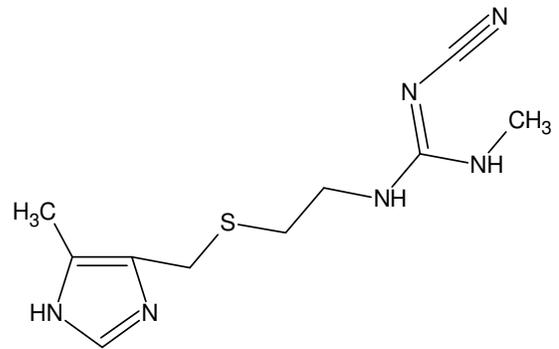
BUPRENORFINA



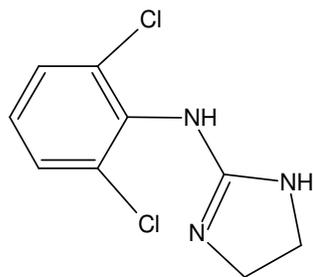
BUSPIRONE



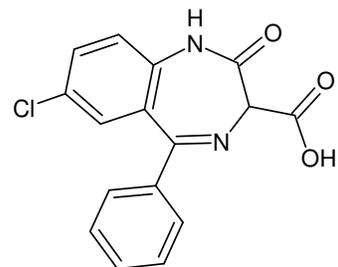
CAFFEINA



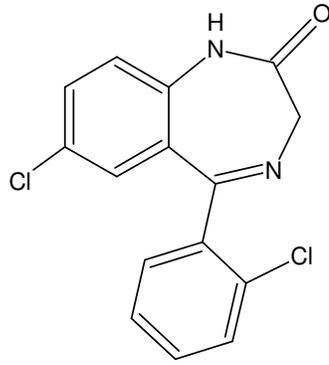
CIMETIDINA



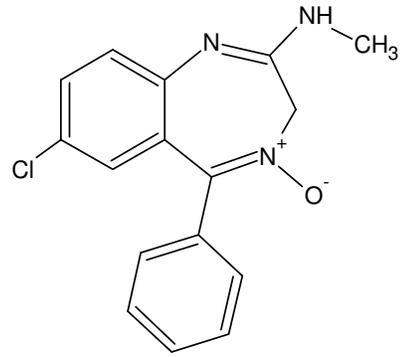
CLONIDINA



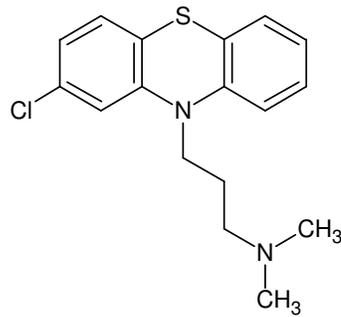
CLORAZEPATO



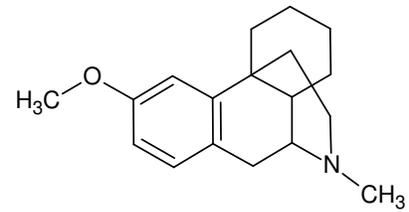
CLORDEMETILDIAZEPAM



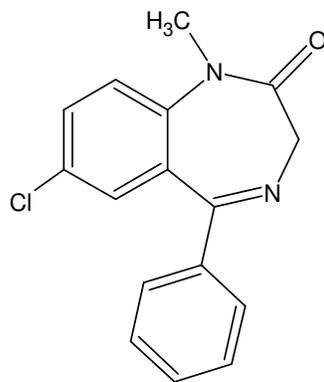
CLORDIAZEPOSSIDO



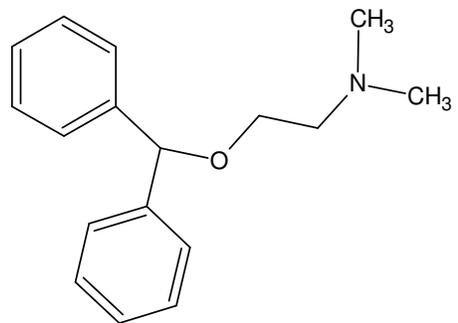
CLORPROMAZINA



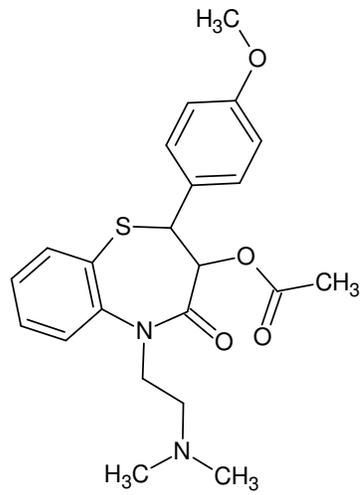
DESTROMETORFANO



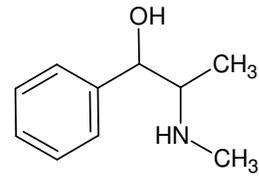
DIAZEPAM



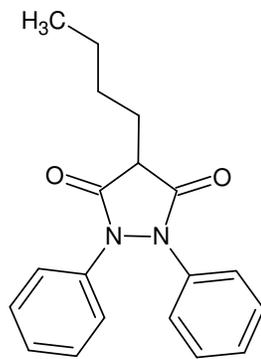
DIFENIDRAMINA



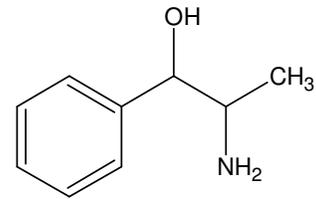
DILTIAZEM



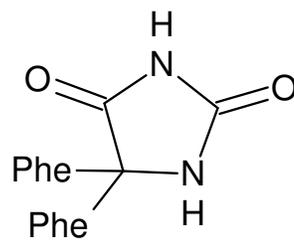
EFEDRINA



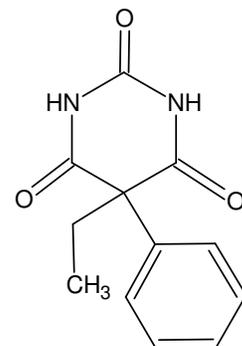
FENILBUTAZONE



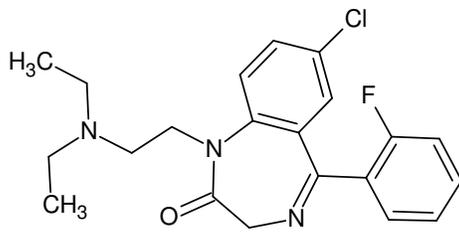
FENILPROPANOLAMINA



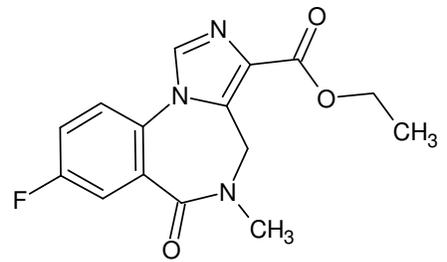
FENITOINA



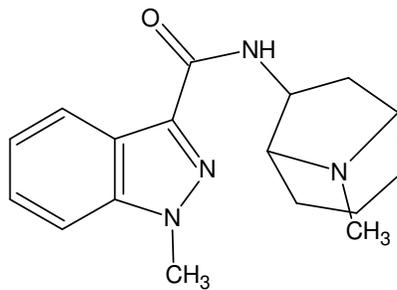
FENOBARBITAL



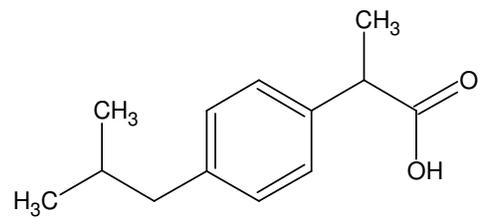
FLUMAZENIL



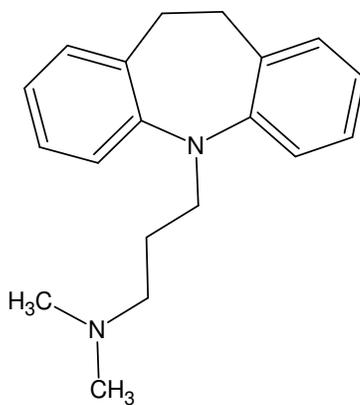
FLURAZEPAM



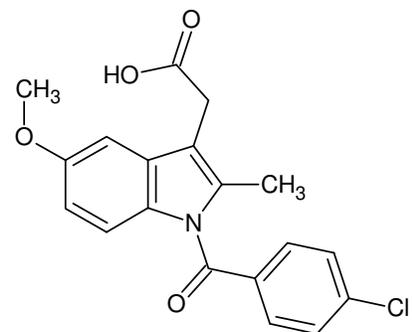
GRANISETRON



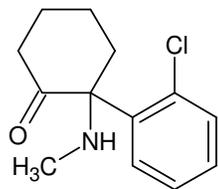
IBUPROFENE



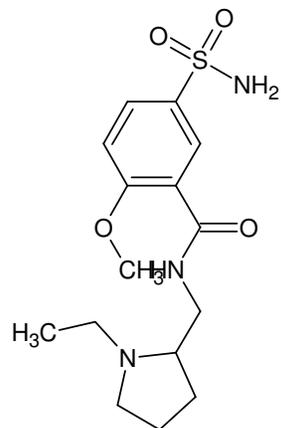
IMIPRAMINA



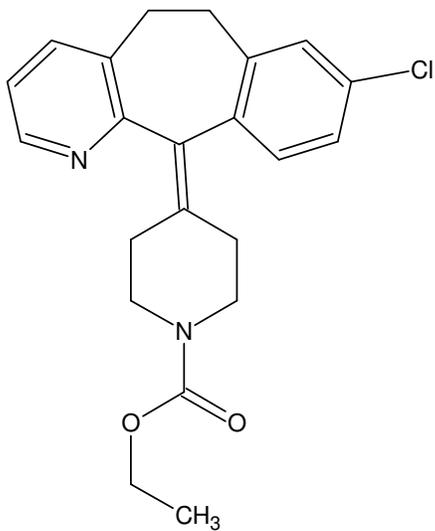
INDOMETACINA



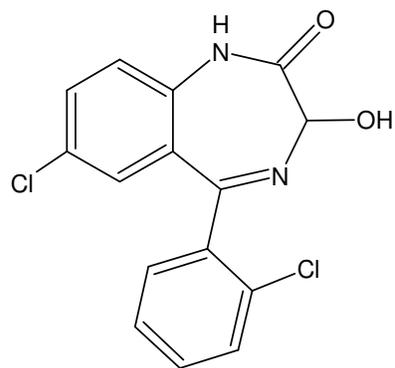
KETAMINA



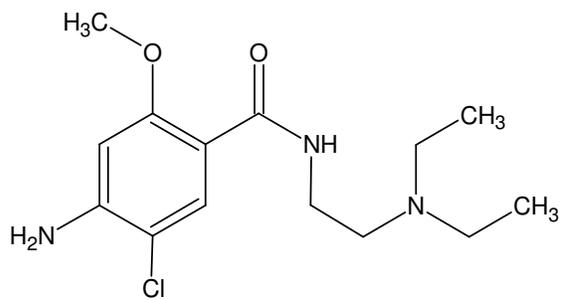
LEVOSULPIRIDE



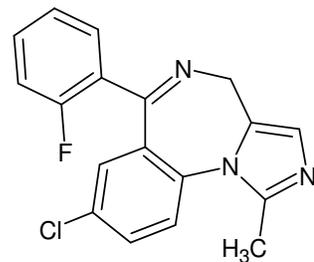
LORATIDINA



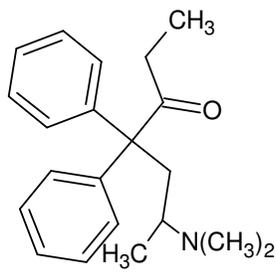
LORAZEPAM



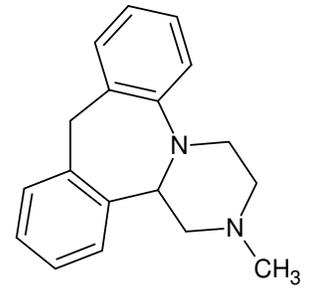
METOCLOPRAMIDE



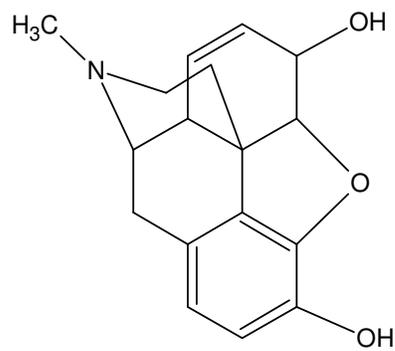
MIDAZOLAM



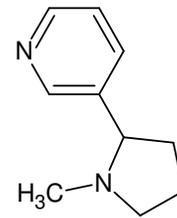
METADONE



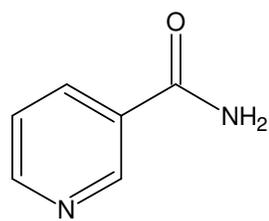
MIANSERINA



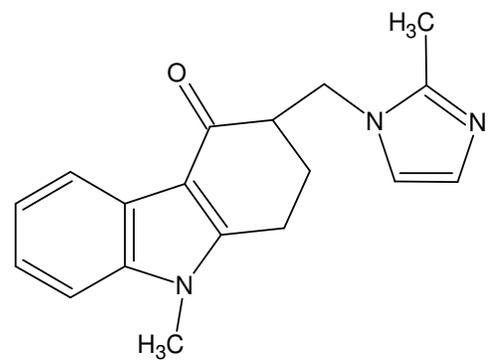
MORFINA HCL



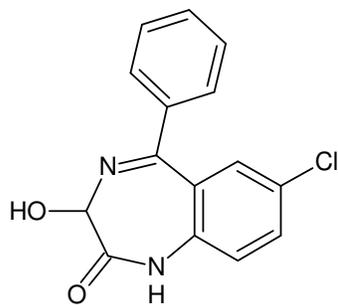
NICOTINA



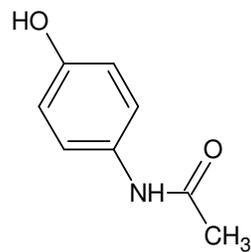
NICOTINAMMIDE



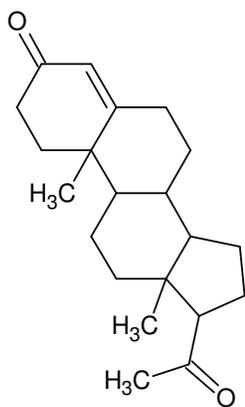
ONDANSETRON



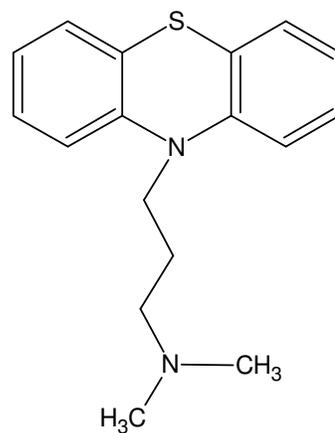
OXAZEPAM



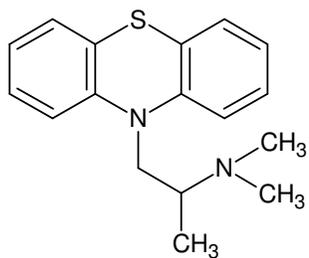
PARACETAMOLO



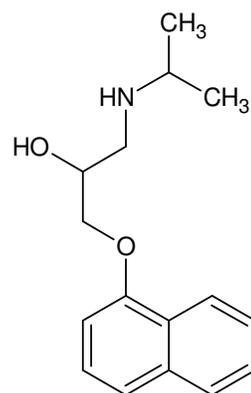
PROGESTERONE



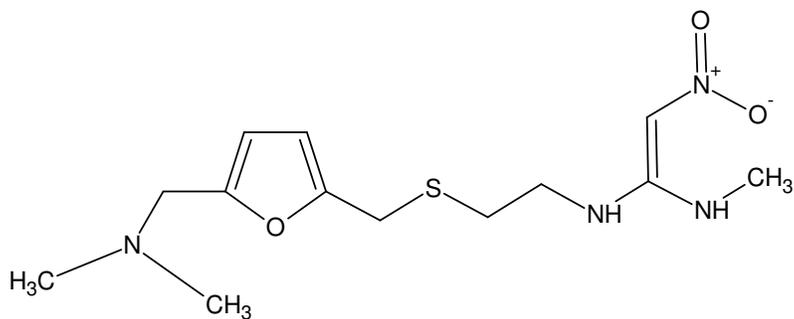
PROMAZINA



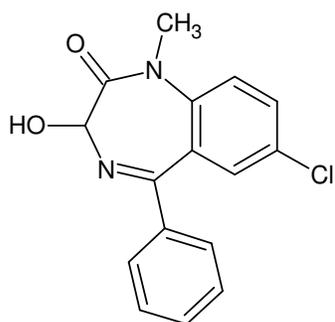
PROMETAZINA



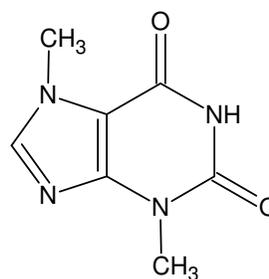
PROPRANOLOLO



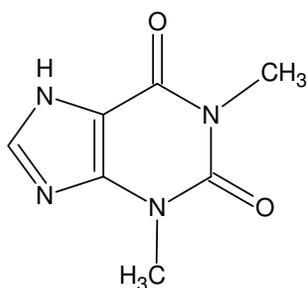
RANITIDINA



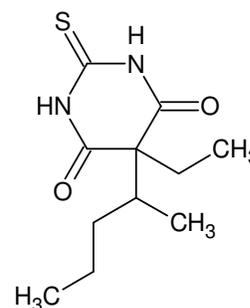
TEMAZEPAM



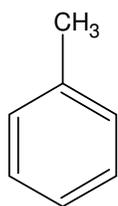
TEOBROMINA



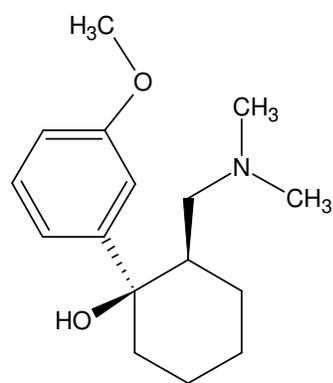
TEOFILLINA



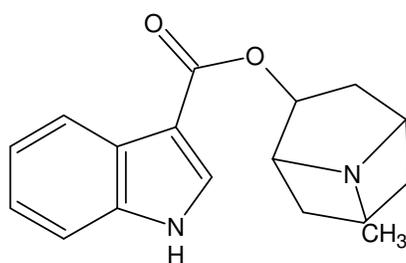
TIOPENTALE



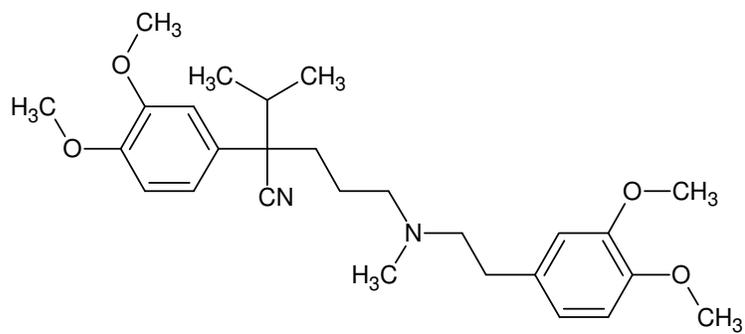
TOLUENE



TRAMADOLO



TROPISETRON



VERAPAMILE

### 3. MATERIALI E METODI

---

**Caratteristiche generali** - Tutti i composti utilizzati nel lavoro di tesi svolto avevano purezza “reagent grade” o equivalente e sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni; gli eluenti erano di purezza HPLC.

**Sistema cromatografico** - È stato utilizzato sia un cromatografo Waters Associates modello 600E che uno Shimadzu, modello LC-10AD, entrambi dotati di una valvola di iniezione Rheodyne con un loop da 20 µl. Poiché i composti analizzati assorbivano all’UV (254 nm) sono stati usati due rivelatori UV (Waters modello 486 e Shimadzu SPD-10AV) regolati alla lunghezza d’onda di massimo assorbimento di ciascuna molecola analizzata. I dati ottenuti dal sistema Waters 600 sono stati elaborati con un integratore Data Module 746 della Millipore, mentre quelli ottenuti dal sistema Shimadzu sono stati elaborati dal programma Cromatoplus.

**Fasi stazionarie** – sono state impiegate le seguenti colonne IAM della Regis Chemical Company (Morton Grove, IL-USA):

- **IAM.PC.DD2 (4,6 x 100 mm)**
- **IAM.PC.MG (4,6 x 150 mm)**

**Condizioni cromatografiche** - Gli eluenti sono stati miscele in diversa percentuale di acetonitrile e di tampone fosfato (PBS) 0,1 M a pH 7,0. Il tampone a pH 7,00 è stato preparato per addizione goccia a goccia di una soluzione 0,1 M di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ad una soluzione 0,1 M di NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Il pH di tale

soluzione è stato controllato con un pHmetro Crison micropH 2002, precedentemente tarato. Si è poi proceduto alla filtrazione del tampone.

La velocità di flusso è stata di 1.0, 2.0 oppure 3.0 ml/min.

Ogni composto è stato solubilizzato in tampone fosfato 0,1 M pH=7,00 o in metanolo, in funzione della sua solubilità in tali solventi, preparando soluzioni di concentrazione  $\approx 10^{-2}$  M; di tali soluzioni ne sono stati iniettati 60  $\mu$ l (tre volte il volume del loop) per ottenere un campionamento riproducibile di 20  $\mu$ l.

Tutte le analisi sono state condotte a temperatura ambiente.

I parametri cromatografici ottenuti sono stati espressi come logaritmo del coefficiente di capacità cromatografica, definito come  $\log k' = \log (t_r - t_0)/t_0$  dove  $t_0$  è il tempo di ritenzione di un composto non trattenuto (acido citrico) e  $t_r$  è il tempo di ritenzione del composto esaminato. I valori di capacità cromatografica riportati nel presente studio sono tutti riferiti ad eluenti completamente acquosi. Essi sono stati misurati direttamente con eluenti completamente acquosi per tutti i composti che eluivano entro 20 minuti (corrispondenti ad un  $\log k' = 1,0$ ). Per tutti gli altri composti è stato necessario procedere all'eluizione con fasi mobili contenenti acetonitrile in percentuali variabili ( $\phi$ ). Nell'intervallo di composizione per gli eluenti esaminato, comunque, sono state trovate relazioni lineari fra  $\log k'_{IAM}$  e  $\phi$  per tutti i composti considerati. E' stato così possibile determinare il valore di  $\log k'_{IAM}$  al 100% di fase acquosa per estrapolazione lineare. Va, infatti, ricordato che in precedenti lavori era stato dimostrato che si osservano differenti ordini di eluizione a percentuali diverse di modificatore organico. Tale procedura, la normalizzazione dei dati al 100% di fase acquosa, risulta quindi indispensabile per evitare di produrre scale di interazione fittizie. Tutti i valori di  $\log k'$  riportati sono la media di almeno tre misure; i limiti di fiducia al 95% non hanno mai superato il valore di  $\pm 0,04$  per ciascun valore di  $\log k'$ .

**Analisi statistica** – Per l'analisi di regressione lineare è stato usato il programma di statistica per personal computer Microsoft Excel.

## **Elettrocromatografia capillare(CEC) - Elettroforesi Capillare (CE)**

### **1. Preparazione delle soluzioni dei campioni e della fase mobile elettroforetica (background elettroforetico - BGE)**

In CEC sono state preparate soluzioni stock degli analiti in metanolo (1 mg/mL) e conservate a 4 °C; queste soluzioni sono state diluite quotidianamente con metanolo fino alla concentrazione desiderata ( 0,1 mg/mL) e quindi iniettate per le analisi. Analogamente, anche in elettroforesi capillare (CE) le soluzioni da iniettare sono state preparate da una soluzione madre di 1 mg/mL in metanolo ma esse sono state diluite sino ad una concentrazione di  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  mg/mL.

Il tampone utilizzato nelle analisi di CEC e di CE è stato il Tris (tridrossimetil- amminometano). La soluzione stock di Tris (100 mM) è stata preparata diluendo in acqua l'appropriata quantità di sale e titolando con HCl 10 M fino al pH desiderato 7,0. In CEC la fase mobile usata per gli esperimenti è stata preparata giornalmente mescolando gli appropriati volumi della soluzione stock di tampone, acqua ed acetonitrile in modo da ottenere una concentrazione finale di tampone pari a 10 mM. In CE il BGE (background elettroforetico) utilizzato è stato solo tampone tris a pH 7,0 10 mM.

La sospensione di fase stazionaria utilizzata per impaccare il capillare per la CEC, in gergo “slurry”, è stata preparata sospendendo fase IAM.PC.DD2 e silice (nelle proporzioni 3:1) in acetone.

## **2. Strumentazione**

Soluzioni e “slurries” sono stati sonicati con un bagno a ultrasuoni FS 100b (Decon, Hove, UK) mentre un pHmetro MicropH 2001 (Crison, Barcellona, Spagna) è stato usato per misurare il pH.

Gli esperimenti di CEC e di CE sono stati effettuati in automatico con il sistema <sup>3D</sup>CE della Agilent Technologies (Waldbronn, Germania) equipaggiato con un rivelatore a serie di diodi UV-visibile, con lunghezza d'onda di lettura a 254 nm. Per raccogliere e trattare i dati è stato impiegato il software <sup>3D</sup>CE Chemstation (Rev. A.09.01, Agilent Technologies, Waldbronn, Germania). La differenza esistente nei due strumenti utilizzati consiste in un supporto esterno per la pressione (bombola d'azoto) presente solo nello strumento con il quale sono stati effettuati gli esperimenti di CEC. Tale supporto esterno crea una pressione di 10-12 bar all'ingresso e all'uscita del capillare, al fine di evitare la formazione di bolle all'interno del capillare stesso. Inoltre, la pressione di 10-12 bar è necessaria anche per effettuare l'iniezione “idrodinamica” dei campioni. Negli esperimenti di CE si sfrutta, invece, un sistema di pressione interno allo strumento che può raggiungere al massimo la pressione di 1 bar.

Il capillare di silice fusa (100 µm ID), è stato acquistato dalla Composite Metal Services (Hallow, UK) ed impaccato usando una pompa Series 10 HPLC (Perkin Elmer, Palo Alto, CA, USA).

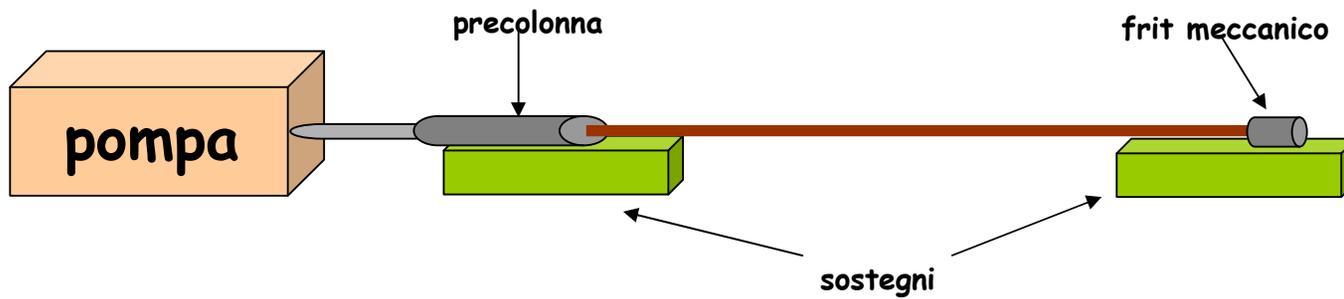
## **3. Procedura di impaccamento del capillare con la fase IAM.PC.DD2**

La fase stazionaria utilizzata per impaccare il capillare è stata la fase IAM.PC.DD2, avente particelle di 12 µm.

## Preparazione del capillare “short” impaccato con la fase DD2

- Un'estremità del capillare (ID= 100  $\mu\text{m}$ , lunghezza circa 55 cm) è stata connessa ad un “frit” meccanico temporaneo (costituito da un setto poroso) per trattenere la fase da impaccare, mentre l'altra estremità è stata connessa ad una precolonna HPLC usata come serbatoio per lo “slurry” e connessa alla pompa HPLC (figura 14).
- In primo luogo è stato preparato lo “slurry” sospendendo la fase stazionaria IAM.PC.DD2 in acetone.
- La precolonna è stata riempita con lo “slurry” ed il capillare è stato impaccato per almeno 10 cm, ad una pressione di circa 60 MPa.
- Recuperato lo “slurry” rimasto, la precolonna è stata riempita con NaCl 5 mM; questa soluzione è stata fatta passare nel capillare per almeno 10 min alla pressione di 60 MPa al fine di eliminare l' acetone residuo.
- Il primo frit è stato preparato surriscaldando con un filamento di Ni-Cr ad una temperatura di circa 600 °C per 8 s (condizioni tali da permettere la sinterizzazione della silice) l'estremità del capillare collegata al “frit” meccanico, dopo essersi assicurati che la pressione della pompa fosse al massimo (60 MPa).
- Il “frit” meccanico è stato poi allontanato e l' integrità del “frit” appena fatto sul capillare è stata controllata al microscopio elettronico. Ci si è, inoltre, assicurati, che la soluzione salina di NaCl riesca a fuoriuscire dall'estremità del capillare, indice di una sufficiente porosità del frit.
- Con la pompa al massimo della pressione è stato preparato il secondo “frit” nelle medesime condizioni usate per il primo.
- Controllata l'integrità del secondo “frit”, è stato montato il capillare nel verso opposto e tenuto sotto flusso prima con acqua e poi con acetone per eliminare la fase in eccesso, con velocità di flusso (0.1 mL/min) e pressione ridotti (20 MPa).

- Rimuovendo la poliammide (rivestimento del capillare) ad una distanza di 8,4 cm dal primo “frit”, è stata ottenuta una finestra di lettura per la rivelazione UV; essa, pertanto, è stata ricavata sulla parte non impaccata del capillare, dal momento che la silice assorbe alle lunghezze d’onda utilizzate per la rivelazione degli analiti, impedendo una corretta lettura al loro passaggio.
- Il secondo “frit” è stato protetto sulla superficie esterna per mezzo di una resina epossidica fatta seccare per almeno un’ora.
- Il capillare è stato tagliato in modo da ottenere una lunghezza totale di 33 cm.
- Prima dell’uso il capillare è stato condizionato con la fase mobile per circa 30 minuti ad una pressione di circa 15 MPa.



**Figura 14.** Schema della strumentazione utilizzata per l'impaccamento del capillare.

#### 4. Condizioni analitiche

- Le condizioni di lavoro in CEC sono state modellate sulla base delle condizioni analitiche usate in biocromatografia, compatibilmente con le condizioni di analisi proprie della CEC. Quotidianamente, il capillare è stato condizionato con il BGE (background elettroforetico, ossia l'equivalente della fase mobile in cromatografia), prima dello svolgimento delle analisi, applicando prima una pressione di 12 bar dall'estremità connessa al catodo (convenzionalmente indicato come "outlet" e nel nostro caso, ingresso del capillare per gli analiti e per il BGE) per circa trenta minuti, poi una pressione di 10 bar ad ambedue le estremità e un voltaggio via via crescente fino a 10 kV, al fine di ottenere una corrente stabile ed una buona linea di base. Durante le analisi effettuate con questa tecnica il voltaggio applicato è stato 10 kV ed entrambe le estremità del capillare sono state pressurizzate a 10 bar per evitare la formazione di bolle. Il capillare è stato termostato a circa 20 °C. L'iniezione è stata fatta per pressione (iniezione idrodinamica) a 12 bar per un tempo di 0,2 minuti dall'outlet, seguita da un flusso di fase mobile ("plug") a 12 bar per 0.1 min sempre dall'outlet, allo scopo di compattare la banda degli analiti.

## 4.RISULTATI E DISCUSSIONE

---

### *Studi di Biocromatografia*

Le misure effettuate sulle fasi stazionarie IAM.PC.MG e IAM.PC.DD2, determinate direttamente o per estrapolazione al 100% di tampone acquoso, hanno prodotto valori fortemente collineari. L'indice di affinità per i fosfolipidi, per ciascun composto, è stato misurato su entrambe le fasi IAM su menzionate, al fine di fornire un maggior supporto statistico ai dati ottenuti e confermare la validità descrittiva della tecnica biocromatografica (tabella 1).

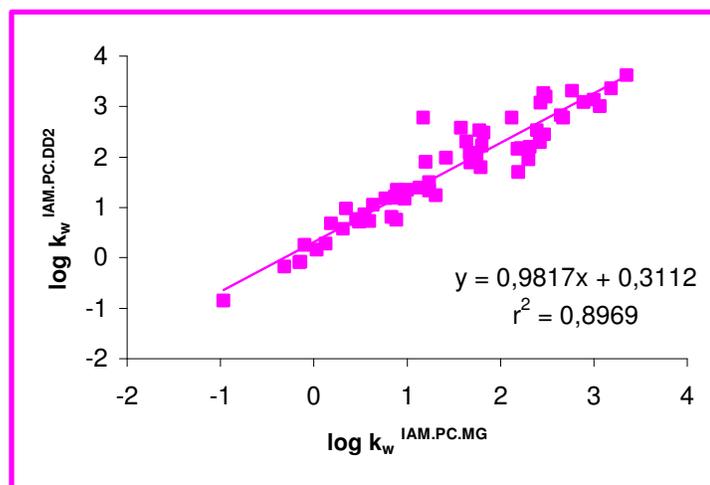
La forte correlazione esistente tra i due parametri cromatografici  $\log k_w^{\text{IAM.DD2}}$  e  $\log k_w^{\text{IAM.MG}}$  ( $r^2 = 0,897$ ) limita fortemente la possibilità che i dati acquisiti possano derivare da artefatti del metodo (figura 15).

Va osservato che, per quasi tutti i composti in esame, i valori di ritenzione più alti venivano ottenuti sulla fase IAM.PC.DD2; tale risultato deriva dal fatto che la suddetta fase è caratterizzata da una maggiore densità di catene idrocarburiche che la rendono più "lipofila" rispetto alla fase IAM.PC.MG. Le differenze strutturali tra le due fasi, infatti, consistono nella diversa tipologia di "end-capping" dei residui propilamminici: nella fase IAM.PC.DD2 l'*end-capping* è ottenuto legando residui di acidi carbossilici a 3 e 10 atomi di carbonio, mentre nella fase IAM.PC.MG esso è realizzato legando residui di metilglicolato.

| <b>Composto</b>        | <b>log P</b> | <b>Log D<sup>7,0</sup></b> | <b>log k<sub>w</sub><sup>IAM.MG</sup></b> | <b>log k<sub>w</sub><sup>IAM.DD2</sup></b> |
|------------------------|--------------|----------------------------|---|--|
| Acido acetilsalicilico | 1,19         | -2,31                      | -0,965                                    | -0,850                                     |
| Acido salicilico       | 2,26         | -1,74                      | -0,143                                    | -0,075                                     |
| Adrenalina             | -0,68*       | -2,59                      | -0,098                                    | 0,250                                      |
| Aloperidolo            | 3,23         | 1,91                       | 2,670                                     | 2,780                                      |
| Antipirina             | 0,38         | 0,38                       | 0,599                                     | 0,729                                      |
| Atenololo              | 0,16         | -2,44                      | 0,458                                     | 0,765                                      |
| Benzene                | 2,13         | 2,13                       | 0,488                                     | 0,720                                      |
| Biperidene             | 4,25         | 1,45                       | 3,187                                     | 3,354                                      |
| Bromazepam             | 1,69         | 1,69                       | 1,234                                     | 1,503                                      |
| Buprenorfina           | 3,29         | 1,85                       | 2,485                                     | 3,190                                      |
| Buspirone              | 2,63         | 2,63                       | 1,742                                     | 1,986                                      |
| Caffeina               | -0,07        | -0,07                      | 0,185                                     | 0,680                                      |
| Cimetidina             | 0,40         | 0,19                       | 0,633                                     | 1,048                                      |
| Clonidina              | 1,57         | 0,25                       | 0,948                                     | 1,316                                      |
| Clorazepato            | 2,05         | -3,52                      | 0,884                                     | 0,750                                      |
| Clordemetildiazepam    | 3,15         | 3,15                       | 2,471                                     | 2,441                                      |
| Clordiazepossido       | 2,44         | 2,44                       | 1,682                                     | 1,884                                      |
| Clorpromazina          | 5,19         | 2,89                       | 1,799                                     | 2,225                                      |
| Destrometorfano        | 3,98*        | 2,66                       | 1,578                                     | 2,579                                      |
| Diazepam               | 2,49         | 2,49                       | 2,314                                     | 2,198                                      |
| Difenidramina          | 3,27         | 1,17                       | 2,219                                     | 2,170                                      |
| Diltiazem              | 2,80         | 2,02                       | 2,121                                     | 2,780                                      |
| Efedrina               | 0,93         | -1,67                      | 0,347                                     | 0,973                                      |
| Fenilbutazone          | 3,16         | 0,46                       | 1,305                                     | 1,232                                      |
| Fenilpropanolamina     | 0,67         | -1,73                      | 0,313                                     | 0,579                                      |
| Fenitoina              | 2,47         | 2,45                       | 1,787                                     | 1,789                                      |
| Fenobarbital           | 1,47         | 1,32                       | 0,546                                     | 0,853                                      |
| Flumazenil             | 1,06*        | 1,06                       | 1,137                                     | 1,389                                      |
| Flurazepam             | 4,16*        | 2,93                       | 2,392                                     | 2,532                                      |
| Granisetron            | 1,79         | -3,61                      | 1,417                                     | 1,979                                      |
| Ibuprofene             | 3,50         | 1,69                       | 0,972                                     | 1,170                                      |
| Imipramina             | 4,80         | 2,30                       | 3,064                                     | 3,008                                      |
| Indometacina           | 4,27         | 1,77                       | 1,674                                     | 2,080                                      |
| Ketamina               | 2,18         | 2,07                       | 1,002                                     | 1,339                                      |
| Levosulpiride          | 1,11*        | -0,89                      | 1,175                                     | 2,780                                      |
| Loratadina             | 5,20         | 5,20                       | 3,354                                     | 3,623                                      |
| Lorazepam              | 2,51         | 2,51                       | 2,422                                     | 2,293                                      |
| Metoclopramide         | 2,62         | -0,03                      | 1,199                                     | 1,902                                      |
| Midazolam              | 3,27         | 3,25                       | 2,302                                     | 1,948                                      |
| Metadone               | 3,93         | 2,61                       | 2,646                                     | 2,828                                      |
| Mianserina             | 4,41*        | 3,13                       | 3,003                                     | 3,131                                      |
| Morfina                | 0,76         | -0,52                      | 0,767                                     | 1,180                                      |
| Nicotina               | 1,17         | 0,13                       | 0,844                                     | 1,184                                      |
| Nicotinammide          | -0,37        | -0,37                      | 0,315                                     | -0,179                                     |
| Ondansetron            | 2,64         | 2,02                       | 1,633                                     | 2,308                                      |
| Ossazepam              | 2,24         | 2,24                       | 2,189                                     | 2,163                                      |

|              |       |       |        |        |
|--------------|-------|-------|--------|--------|
| Paracetamolo | 0,51  | 0,51  | 0,126  | 0,280  |
| Progesterone | 3,87  | 3,87  | 2,769  | 3,317  |
| Promazina    | 4,55  | 2,15  | 2,462  | 3,260  |
| Prometazina  | 4,81  | 2,71  | 2,432  | 3,075  |
| Propranololo | 2,98  | 0,48  | 1,821  | 2,480  |
| Ranitidina   | 0,27  | -1,15 | 0,834  | 0,812  |
| Temazepam    | 2,19  | 2,19  | 2,190  | 1,697  |
| Teobromina   | -0,72 | -0,72 | -0,156 | -0,088 |
| Teofillina   | -0,02 | -0,03 | 0,033  | 0,153  |
| Tiopentale   | 2,85  | 2,75  | 1,238  | 1,328  |
| Toluene      | 2,73  | 2,73  | 0,872  | 1,210  |
| Tramadolo    | 2,63  | 1,31  | 0,893  | 1,347  |
| Tropisetron  | 2,34* | 1,51  | 1,778  | 2,531  |
| Verapamile   | 3,79  | 1,88  | 2,892  | 3,085  |

**Tabella 1.** Valori di lipofilia delle molecole in forma non ionizzata ( $\log P$ ) ed in forma ionizzata ( $\log D$ ); valori di ritenzione dei composti sulle due fasi IAM.PC.MG e IAM.PC.DD2. I valori di  $\log P$  indicati con l'asterisco sono calcolati con il programma CLOGP [52].



**Figura 15.** Correlazione tra  $\log k_w^{\text{IAM.DD2}}$  e  $\log k_w^{\text{IAM.MG}}$

I valori di lipofilia ( $\log P$ ) riportati per adrenalina, destrometorfano, flumazenil, flurazepam, levosulpiride, mianserina, ondansetron e tropisetron, sono teorici. Essi, infatti, sono stati calcolati mediante il programma CLOGP [52]; per tutti gli altri composti i  $\log P$  riportati sono stati determinati

sperimentalmente con il metodo di ripartizione in bocce (“*shake-flask*”).

I valori di  $\log D^{7,0}$  per i composti di natura basica sono stati calcolati a partire dai rispettivi valori di  $\log P$ , mediante l’equazione seguente:

$$\log D^{7,0} = \log P - \log (1 + 10^{pK_a - 7,0}) \quad (21)$$

Per i composti acidi il  $\log D^{7,0}$  è stato calcolato mediante l’equazione:

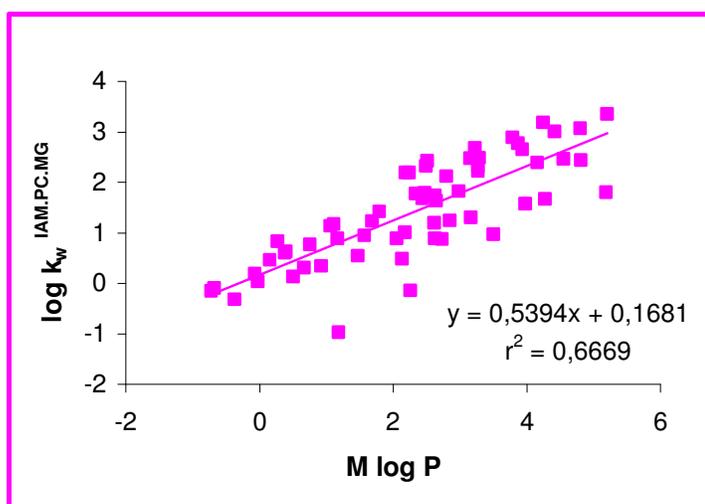
$$\log D^{7,0} = \log P - \log (1 + 10^{7,0 - pK_a}) \quad (22)$$

Ovviamente, per composti neutri (benzene, toluene) o non ionizzati a pH 7,0 (quali, ad esempio, bromazepam, buspirone, clordesmetildiazepam) i valori di  $\log P$  e di  $\log D^{7,0}$  coincidono. Per tutte le altre molecole, sia acide che basiche, i valori di  $\log D^{7,0}$  sono più bassi dei rispettivi valori di  $\log P$ , il che riflette la minore lipofilia in ottanolo delle specie ionizzate.

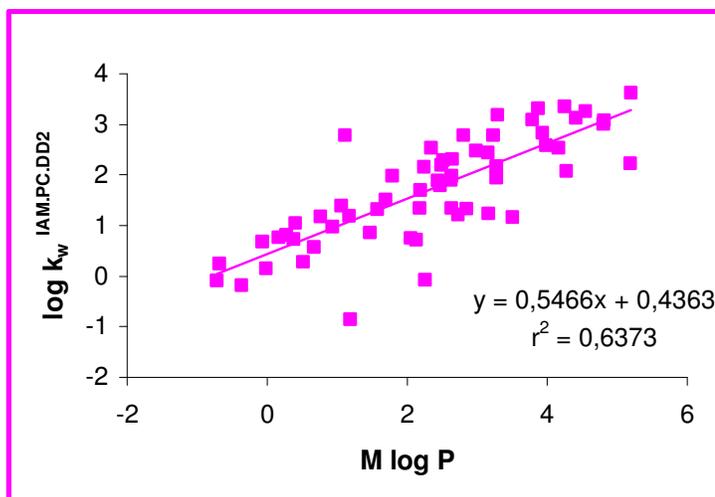
Mettendo in relazione i valori di  $\log k_w^{IAM.MG}$  e  $\log k_w^{IAM.DD2}$  con i rispettivi valori di  $\log P$  è possibile osservare una notevole dispersione dei punti sul grafico (figura 16 e 17).

Questa osservazione indica che, per la classe di composti analizzati, i dati di ripartizione in fosfolipidi, ottenuti con la metodica biocromatografica, contengono informazioni originali rispetto a quelle codificate dai dati di ripartizione nel *n*-ottanolo. Tale originalità descrittiva risulta particolarmente evidente nel caso dei farmaci ionizzabili.

Le sostanze esaminate, infatti, includono composti per la maggior parte acidi e basici per i quali è noto, come risulta da molteplici studi precedenti, che il  $\log P$  non rappresenta un'attendibile stima della loro interazione con i fosfolipidi. Si può quindi concludere che, anche nel caso della classe di composti considerati nel presente studio, l'affinità per i fosfolipidi non è funzione della sola lipofilia, ma dipende anche da altri fattori quantizzati esclusivamente dal  $\log k_w^{IAM}$  e di cui discuteremo ampiamente in seguito.



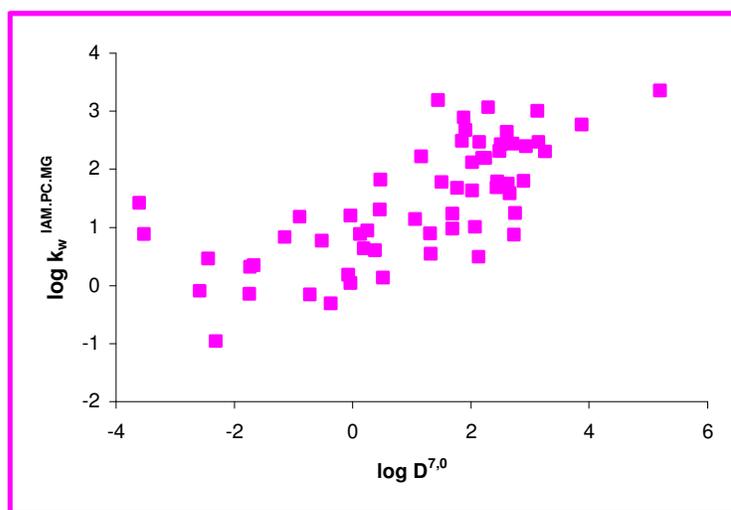
**Figura 16.** Relazione tra la ritenzione sulla fase IAM.PC.MG ed il  $\log P$ .



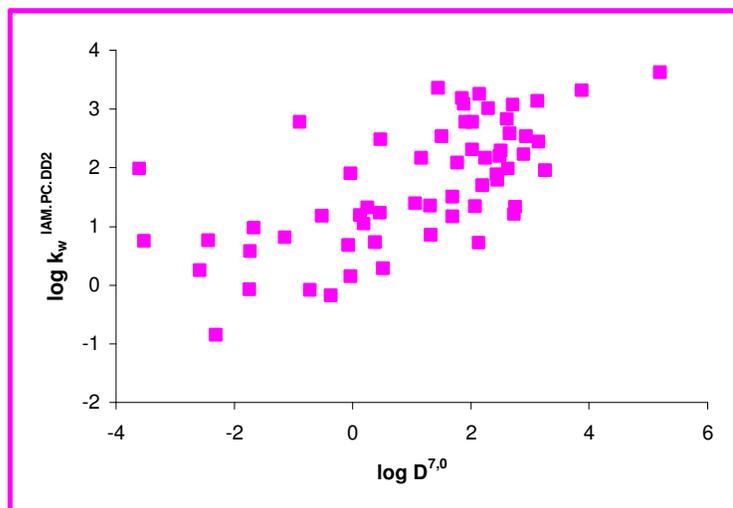
**Figura 17.** Relazione tra la ritenzione sulla fase IAM.PC.DD2 ed il log P.

Inoltre, per tutte le molecole analizzate mediante biocromatografia, sono stati anche calcolati i valori teorici di  $\log D^{7,0}$  al fine di individuare un'eventuale correlazione tra questi valori (che misurano la lipofilia apparente di una molecola, ossia tengono conto della sua ionizzazione al pH fisiologico) e gli indici di affinità per i fosfolipidi ( tabella 1).

Dai grafici seguenti (figura 18 e 19) si intuisce che la correlazione fra i due parametri ( $\log k_w^{IAM}$  vs  $\log D^{7,0}$ ) è meno soddisfacente rispetto a quanto osservato nelle figure 16 e 17 ( $\log k_w^{IAM}$  vs  $\log P$ ). Tale risultato non è inatteso, in quanto è ben noto che la ripartizione nei fosfolipidi dipende, anche per molecole ionizzate al pH fisiologico, dalla lipofilia intrinseca della molecola, piuttosto che da quella apparente.



**Figura 18.** Relazione tra la ritenzione sulla fase IAM.PC.MG ed il  $\log D^{7,0}$ .



**Figura 19.** Relazione tra la ritenzione sulla fase IAM.PC.DD2 ed il  $\log D^{7.0}$ .

Una stima del tipo di interazione esistente fra i composti in esame ed i fosfolipidi può essere effettuata solo confrontando i punti relativi alle nostre molecole con quelli concernenti i 36 composti neutri da cui è stata generata la retta dei composti non ionizzati nel grafico  $\log k_w^{\text{IAM}}$  vs  $\log P$ . Ricordiamo, che le 36 molecole non ionizzate, come già esposto precedentemente, sono state utilizzate per costruire una retta definita per semplicità “retta delle neutre” che conferma ulteriormente l’esistenza di un’elevata collinearità tra coefficiente di ripartizione in ottanolo e misure di affinità per i fosfolipidi per composti non ionizzabili. Tale retta costituisce un utile strumento di analisi per verificare per quali composti esistono delle differenze tra la ripartizione predetta dal parametro classico  $\log P$  e quella misurata mediante gli indici di affinità per i fosfolipidi.

Come si può notare dai grafici che seguono (figura 20 e 21) molti dei punti relativi ai nostri composti si pongono al di sopra della retta in quanto i  $\log k_w^{\text{IAM}}$  determinati sia sulla fase IAM.PC.MG che sulla fase IAM.PC.DD2 risultano essere più alti di quanto atteso per un composto non ionizzabile isolipofilico.

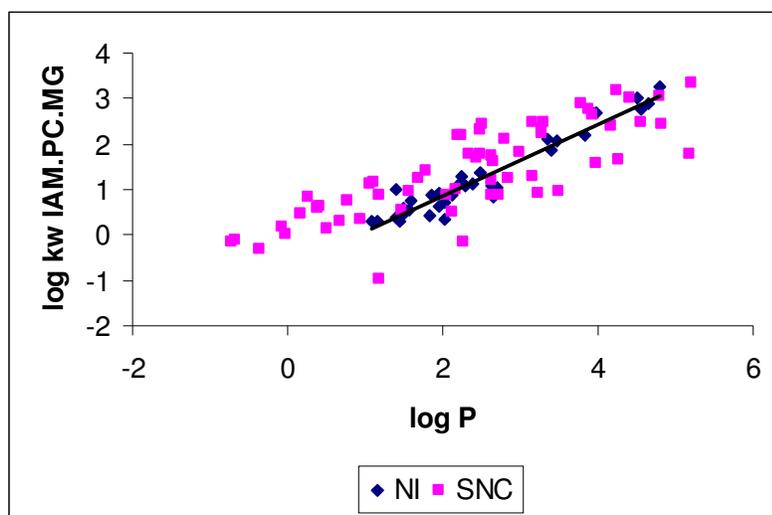
Tali punti si riferiscono in larga parte a molecole di natura basica. Ciò costituisce una ulteriore conferma della “pH piston hypothesis” formulata da Avdeef [35], secondo la quale la carica positiva acquistata dalle ammine a pH fisiologico, interagendo con la carica negativa del gruppo fosfato del fosfolipide, sarebbe responsabile di extra-interazioni attrattive non codificate dal log P misurato in n-ottanolo. La loro interazione con i fosfolipidi quindi sarà maggiore rispetto a composti neutri isolipofilici.

Tuttavia, le ammine terziarie aloperidolo, difenidramina, imipramina, loratadina, metadone, promazina, prometazina e tramadolo non presentano tale tipo di extra- interazione elettrostatica: i punti corrispondenti a tali molecole, infatti, si pongono sulla retta, analogamente a quelli relativi a molecole neutre o debolmente acide e non ionizzate al pH sperimentale, quali benzene, toluene, acido clorazepico, fenobarbital e flurazepam.

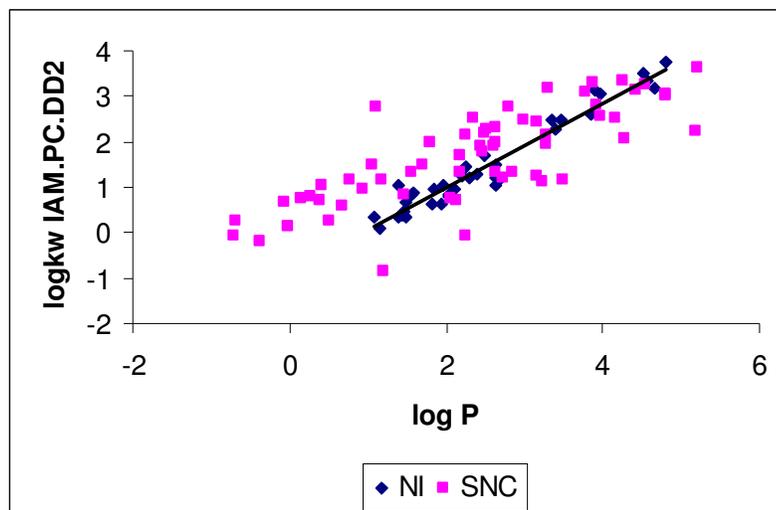
E’ stato in realtà dimostrato [49] che le ammine terziarie interagiscono con le biomembrane soprattutto in virtù della loro componente lipofila (log P), non mostrando extra-interazioni attrattive.

Tuttavia, nel nostro campione di molecole, si pone inaspettatamente sulla retta di riferimento anche il punto relativo alla metoclopramide, un’ammina primaria. Sempre in accordo con precedenti esperimenti [33], i punti al di sotto della retta di regressione corrispondono a molecole di natura acida (ac. acetilsalicilico, ac. salicilico, fenilbutazone, ibuprofene, indometacina), le quali notoriamente interagiscono con i fosfolipidi in misura minore o, al massimo, uguale rispetto a molecole neutre di pari lipofilia.

Esistono, tuttavia, delle piccole differenze tra le due fasi stazionarie utilizzate. Il destrometorfano (amina terziaria), infatti, si pone sulla retta dei composti non ionizzabili sulla fase IAM.PC.DD2 e al di sotto di essa sulla fase IAM.PC.MG. La levosulpiride (amina secondaria) si pone al di sopra della retta dei composti neutri sia sulla fase IAM.PC.DD2 che sulla fase IAM.PC.MG, ma la sua distanza dalla retta è significativamente maggiore sulla prima fase stazionaria.



**Figura 20.** Confronto tra i punti relativi alle molecole in esame (SNC) ed i punti relativi alle 36 molecole non ionizzabili (NI) sulla fase IAM.PC.MG.



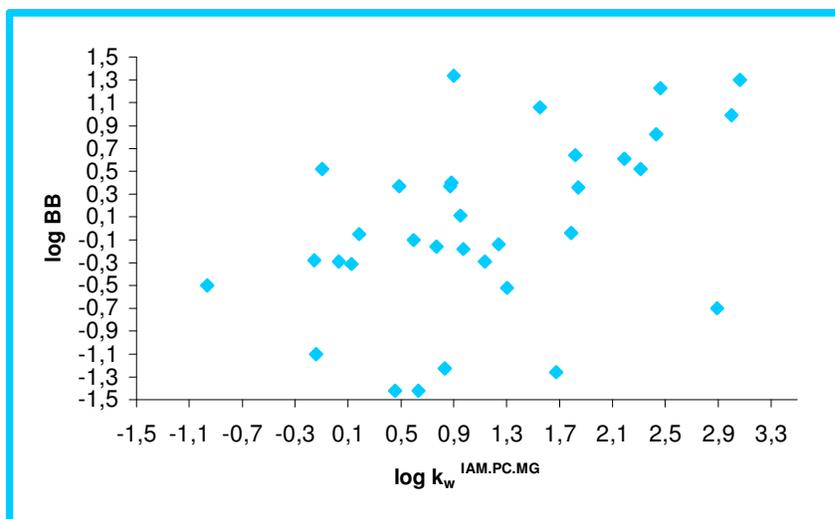
**Figura 21.** Confronto tra i punti relativi alle molecole in esame (SNC) ed i punti relativi alle 36 molecole non ionizzabili (NI) sulla fase IAM.PC.DD2.

Per i 34 composti riportati in tabella 2 sono noti dalla letteratura i valori di  $\log BB$ , (logaritmo del rapporto tra concentrazione del farmaco nel SNC e concentrazione del farmaco nel sangue).

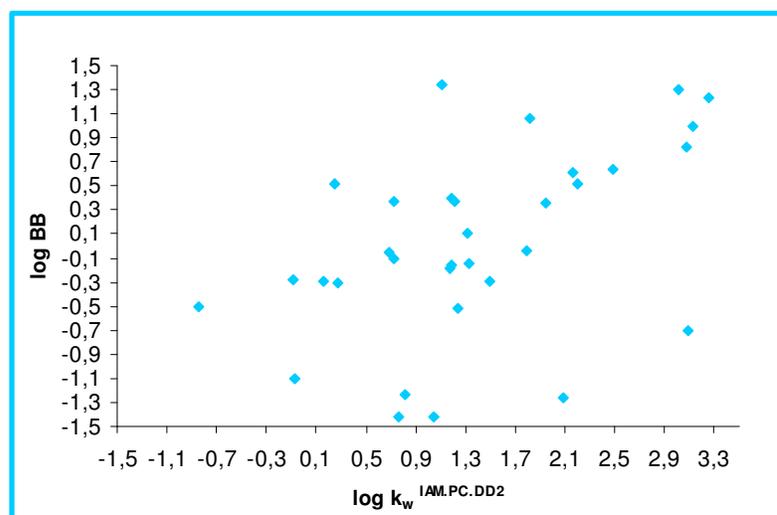
Mettendo in relazione i valori di  $\log BB$  con quelli di  $\log k_w^{IAM.MG}$  e  $\log k_w^{IAM.DD2}$  si osserva una dispersione casuale dei punti (figura 22 e 23), analogamente a quanto è possibile osservare mettendo in relazione i valori di  $\log BB$  dei composti in esame con il rispettivo valore di  $\log P$  (figura 24).

| Composto               | log P  | log $k_w^{IAM.MG}$ | log $k_w^{IAM.DD2}$ | Log BB |
|------------------------|--------|--------------------|---------------------|--------|
| Acido acetilsalicilico | 1,19   | -0,965             | -0,850              | -0,500 |
| Acido salicilico       | 2,26   | -0,143             | -0,0750             | -1,100 |
| Adrenalina             | -0,68* | -0,098             | 0,250               | 0,520  |
| Aloperidolo            | 3,23   | 2,670              | 2,780               | 1,340  |
| Antipirina             | 0,38   | 0,599              | 0,729               | -0,100 |
| Atenololo              | 0,16   | 0,458              | 0,765               | -1,420 |
| Benzene                | 2,13   | 0,418              | 0,720               | 0,370  |
| Caffeina               | -0,07  | 0,185              | 0,538               | -0,050 |
| Cimetidina             | 0,40   | 0,633              | 0,940               | -1,420 |
| Clonidina              | 1,57   | 0,948              | 1,316               | 0,110  |
| Clorpromazina          | 5,19   | 1,799              | 2,225               | 1,060  |
| Diazepam               | 2,49   | 2,314              | 2,198               | 0,520  |
| Fenilbutazone          | 3,16   | 1,305              | 1,232               | -0,520 |
| Fenitoina              | 2,47   | 1,787              | 1,789               | -0,040 |
| Flumazenil             | 1,06*  | 1,137              | 1,389               | -0,290 |
| Ibuprofene             | 3,50   | 0,972              | 1,170               | -0,180 |
| Imipramina             | 4,80   | 3,064              | 3,008               | 1,300  |
| Indometacina           | 4,27   | 1,674              | 2,080               | -1,260 |
| Midazolam              | 3,27   | 2,302              | 1,948               | 0,360  |
| Mianserina             | 4,41*  | 3,003              | 3,131               | 0,990  |
| Morfina                | 0,76   | 0,767              | 1,180               | -0,160 |
| Nicotina               | 1,17   | 0,844              | 1,184               | 0,401  |
| Ossazepam              | 2,24   | 2,189              | 2,163               | 0,610  |
| Paracetamolo           | 0,51   | 0,126              | 0,280               | -0,310 |
| Progesterone           | 3,87   | 2,769              | 3,317               | 1,950  |
| Promazina              | 4,55   | 2,462              | 3,260               | 1,230  |
| Prometazina            | 4,81   | 2,432              | 3,075               | 0,824  |
| Propranololo           | 2,98   | 2,480              | 1,821               | 0,640  |
| Ranitidina             | 0,27   | 0,834              | 0,812               | -1,230 |
| Teobromina             | -0,72  | -0,156             | -0,088              | -0,280 |
| Teofillina             | -0,02  | 0,033              | 0,153               | -0,290 |
| Tiopentale             | 2,85   | 1,238              | 1,328               | -0,140 |
| Toluene                | 2,73   | 0,872              | 1,210               | 0,370  |
| Verapamile             | 3,79   | 2,892              | 3,085               | -0,700 |

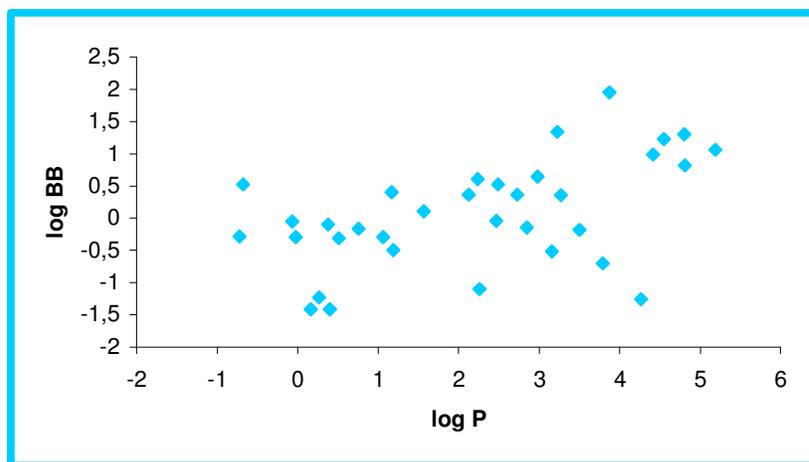
**Tabella2.** Composti di cui è noto dalla letteratura il valore di log BB.



**Figura 22.** Relazione tra la ritenzione sulla fase IAM.PC.MG ed il log BB.



**Figura 23.** Relazione tra la ritenzione sulla fase IAM.PC.DD2 ed il log BB



**Figura 24.** Relazione tra la ritenzione il log P ed il log BB

Da questi grafici è possibile notare come molte molecole, non necessariamente congeneri strutturali, che presentano valori di log BB sostanzialmente uguale, siano caratterizzate da valori di lipofilia notevolmente differenti (ad es., acido acetilsalicilico, adrenalina, antipirina, atenololo caffeina, cimetidina, flumazenil, morfina, paracetamolo, ranitidina, teobromina, teofillina). Si può, pertanto, concludere che né il log P né i  $\log k_w^{IAM}$ , considerati come unica variabile indipendente, siano in grado di predire in modo efficace la permeazione della BBB.

Sulla base di precedenti lavori che avevano evidenziato la dipendenza inversa della permeazione nel SNC da parametri di polarità, quale la capacità di formare legami idrogeno [45], si è ritenuto utile calcolare i valori di  $\Delta \log k_w^{IAM}$  per i composti in esame.

Sono stati calcolati i valori di  $\Delta \log k_w^{IAM}$  per entrambe le fasi stazionarie; questo parametro è una misura delle interazioni, principalmente ma non esclusivamente di natura elettrostatica, che si instaurano tra molecole e fosfolipidi. Tali interazioni possono essere attrattive, in tal caso il valore di  $\Delta \log k_w^{IAM}$  sarà positivo,

oppure possono essere di tipo repulsivo in tal caso il  $\Delta \log k_w^{IAM}$  assumerà un valore negativo.

Da un punto di vista matematico il  $\Delta \log k_w^{IAM}$  è calcolato come differenza tra il valore di  $\log k_w^{IAM}$  che si misura sperimentalmente per ciascuna molecola e quello teorico ottenuto sostituendo nell' "equazione delle neutre", il rispettivo valore di  $\log P$ .

Quindi :

$$\Delta \log k_w^{IAM} = \log k_w^{IAM} \text{ misurato} - \log k_w^{IAM} \text{ calcolato} \quad (23)$$

Qui di seguito riportiamo le equazioni dei 36 composti non ionizzabili:

$$\begin{aligned} \log k_w^{IAM.MG} &= 0,792 (\pm 0,038) \log P - 0,732 (\pm 0,105) \\ n &= 36 \quad r_2 = 0,926 \quad s = 0,247 \end{aligned} \quad (24)$$

$$\begin{aligned} \log k_w^{IAM.DD2} &= 0,934 (\pm 0,038) \log P - 0,883 (\pm 0,104) \\ n &= 36 \quad r_2 = 0,946 \quad s = 0,246 \end{aligned} \quad (25)$$

Mettendo in grafico il  $\log BB$  ed il  $\Delta \log k_w^{IAM}$  per entrambe le fasi stazionarie non esiste alcuna correlazione. Si è pensato di sostituire nell'equazione dei composti non ionizzabili al valore del  $\log P$  quello del  $\log D^{7,0}$ , in quanto esso è una misura di come sono distribuite per una molecola la specie non ionizzata e quella ionizzata al pH fisiologico. A parità di lipofilia intrinseca due molecole possono mostrare anche valori di  $\log D^{7,0}$  molto diversi

e conseguentemente  $\Delta' \log k_w^{IAM}$  significativamente differenti. È stato ipotizzato che il  $\Delta' \log k_w^{IAM}$  potesse essere un utile parametro per spiegare la permeazione della BBB. Tuttavia, anche in questo caso, il differenziale ottenuto non consentiva di ottenere correlazioni con i dati di attraversamento della barriera emato-encefalica. Si è pensato quindi, in via preliminare, di suddividere il gruppo di composti in esame in tre sottoclassi (molecole acide, basiche e non ionizzabili) tenendo presente il loro grado di ionizzazione al pH di lavoro, ossia 7,0. L'idea è nata dalla constatazione che correlazioni significative tra lipofilia e log BB sono state riscontrate da altri autori solo quando venivano considerate classi di molecole omogenee (ad es antinfiammatori, 1,2,3 triazine, steroidi, ammine endogene ecc..) per le quali caratteristiche chimico-fisiche salienti ( $pK_a$ , volume molecolare, capacità di formare legami idrogeno) erano molto simili all'interno della stessa serie.

Per quanto concerne i composti basici, solo quelli che hanno un  $pK_a > 5$  sono ionizzati a pH 7,0 mentre tutti gli altri possono essere considerati non ionizzati e quindi rientreranno nel gruppo delle molecole neutre; d'altro canto, molecole acide con  $pK_a > 9$  non saranno ionizzate a pH fisiologico, invece acidi con  $pK_a < 9$  risultano essere ionizzati e quindi il loro valore di  $\log D^{7,0}$  sarà inferiore rispetto a quello di  $\log P$ .

### ***Molecole basiche***

Le molecole basiche parzialmente o totalmente protonate a pH 7,0 sono sedici. Si è ritenuto opportuno, tuttavia, escludere due molecole dall'analisi dei dati: adrenalina e verapamile.

Il valore di log BB riportato in letteratura per l'adrenalina risulta essere inaspettatamente elevato, se si considera la scarsa permeazione della BBB da parte di tutti gli agonisti adrenergici diretti. L'incapacità di tali molecole di attraversare la BBB ne preclude, come è ben noto, l'impiego terapeutico a livello del SNC. Una possibile spiegazione dell'elevato valore di log BB trovato in letteratura per l'adrenalina potrebbe essere la presenza di adrenalina endogena a livello del SNC.

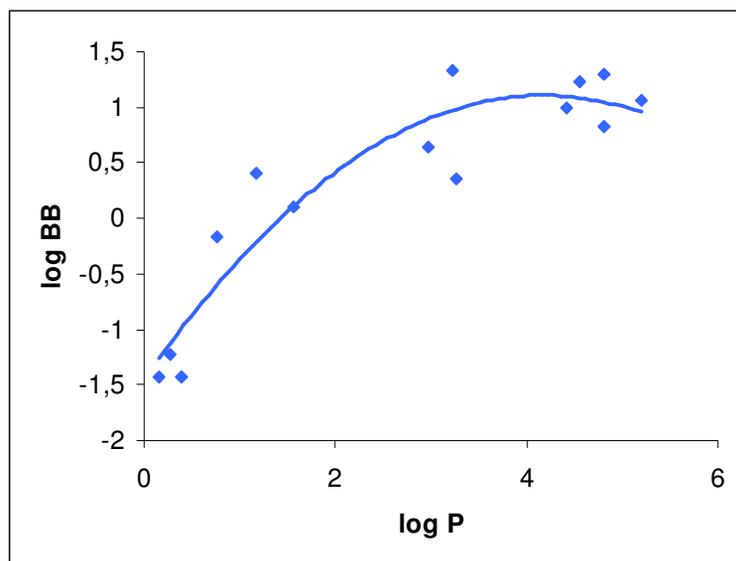
Per il verapamil, il bassissimo valore di log BB riportato in letteratura potrebbe derivare dal fatto che questo farmaco è substrato della P-glicoproteina di riferimento; Ciò comporterebbe che la concentrazione misurata a livello del SNC non riflette le sue reali capacità permeative, in quanto gran parte del farmaco verrebbe reimmesso nel circolo ematico generale dalla P-glicoproteina. Inoltre, nel intero set di molecole analizzato è il composto con più alto peso molecolare, supponiamo quindi che anche il suo notevole ingombro sterico renda difficile l'attraversamento della barriera emato-encefalica.

Per quanto concerne la P-glicoproteina è il più importante sistema d'efflusso; fa parte della superfamiglia dei trasportatori ATP-dipendenti e fisiologicamente ha un'espressione strategica sulle superfici luminali di organi deputati all'assorbimento, distribuzione ed eliminazione dei farmaci, quali la membrana canalicolare degli epatociti, le membrane ad orletto a spazzola degli enterociti dell'intestino tenue e delle cellule dei tubuli renali prossimali, le cellule endoteliali e gli astrociti della barriera ematoencefalica, la barriera ematotesticolare, il lato materno della placenta e le ghiandole surrenali. Oggi è chiaro che la sua funzione principale è quella di proteggere i tessuti normali dalle

tossine esogene o endogene, impedendone l'assorbimento intestinale e favorendone l'eliminazione sistemica.

La nostra discussione, quindi riguarderà 14 basi.

La relazione fra i valori di log BB relativi alle basi in esame ed i rispettivi valori di log P fornisce il grafico riportato in figura 25.



**Figura 25.** Relazione tra il log P ed il log BB

La variazione del log BB in funzione del log P è evidentemente di tipo non lineare. Una discreta correlazione viene trovata se si suppone l'esistenza di un andamento parabolico del log BB in funzione del log P. Esso è espresso dall'equazione seguente:

$$\text{Log BB} = 1,229 (\pm 0,252) \text{ log P} - 0,147 (\pm 0,047) (\text{log P})^2 - 1,453 (\pm 0,240)$$

$$n = 14$$

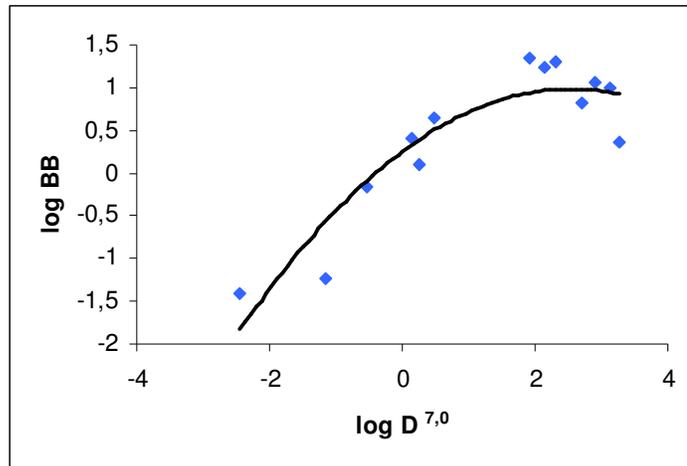
$$r = 0,938$$

$$s = 0,376$$

(26)

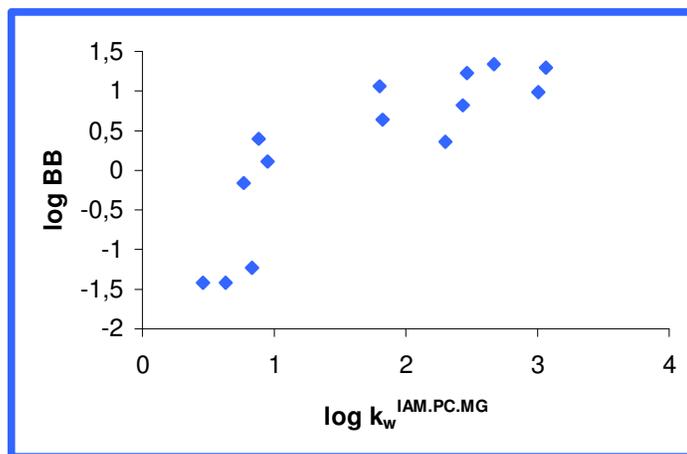
Questo tipo di andamento indica che composti con  $\log P$  inferiori a 2 mostrano una scarsa capacità di attraversamento della BBB, al contrario l'indice di attività biologica aumenta per composti con  $\log P$  compresi tra 2 e 4. Esisterebbe, dunque, un intervallo di  $\log P$  ideale che permette ad alcune molecole di attraversare selettivamente la BBB, ciò è in accordo sia con dati sperimentali ottenuti da altri autori, sia con una recente regola empirica formulata da Lipinski che pone un limite massimo di  $\log P$  pari a 5 per un composto che debba permeare la BBB.

Sapendo che il comportamento dei composti ionizzati a livello delle biomembrane è il risultato di un bilancio tra specie neutre e specie ionizzate, si è provato a mettere in correlazione il  $\log BB$  con il  $\log D^{7,0}$ . Quest'ultimo parametro è espressione dell'equilibrio tra forme cariche e non ionizzate esistente per le molecole esaminate a pH 7,0. Anche in questo grafico (figura 26) l'andamento è parabolico, ma il coefficiente di correlazione peggiora notevolmente ( $r = 0,828$ ). In realtà, il punto che risulta essere un forte outlier è quello relativo alla cimetidina. Essa, già in uno studio condotto da altri autori [20] che consideravano una classe di molecole strutturalmente non correlate ed utilizzavano la fase IAM.PC.DD, risultò essere un outlier insieme ad altri composti. La correlazione migliora sensibilmente, quindi, con l'esclusione della cimetidina ( $r = 0,925$ ).

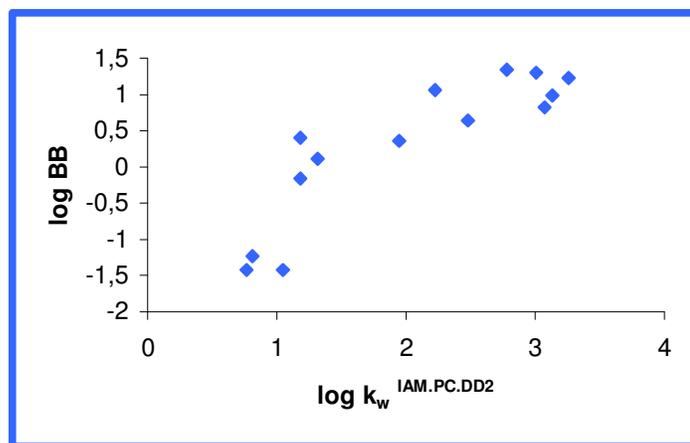


**Figura 26.** Relazione tra il  $\log D^{7,0}$  ed il  $\log BB$

Si è, inoltre, provato a correlare gli indici di affinità per i fosfolipidi per le 14 molecole basiche in esame con i rispettivi valori di  $\log BB$ , si è ottenuto un andamento vagamente parabolico, come è possibile notare nei grafici seguenti (figura 27 e 28).



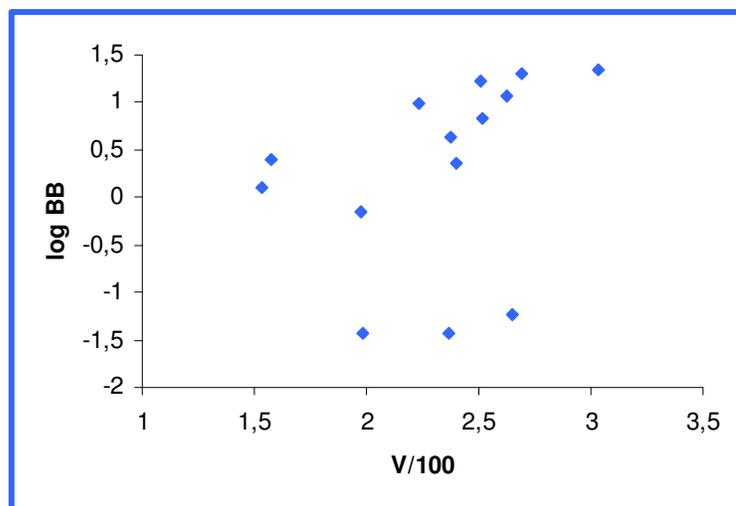
**Figura 27.** Relazione tra la ritenzione sulla fase IAM.PC.MG ed il  $\log BB$



**Figura 28.** Relazione tra la ritenzione sulla fase IAM.PC.DD2 ed il log BB

Tuttavia, tali correlazioni risultavano meno significative di quella ottenuta con il log P, per cui non sono state ulteriormente prese in considerazione (equazioni non riportate).

Nel nostro studio inoltre, non è stata trascurata la valutazione di altri parametri chimico-fisici che in passato, sono stati ritenuti utili per spiegare l'attraversamento delle barriere biologiche. Uno tra questi è il volume molecolare o il peso molecolare (se si considera che il volume è grossolanamente funzione del peso molecolare), che è un parametro chiave per la permeazione. Proprio nello studio su menzionato il log BB era stato correlato inizialmente solo al log  $k_w^{IAM.DD}$  ottenendo una correlazione scarsamente significativa; in seguito l'introduzione del volume molecolare e di una variabile indicatrice, discriminante tra acidi e basi, aveva portato ad un miglioramento significativo della correlazione. Alla luce di ciò, abbiamo ritenuto opportuno indagare sulle eventuali relazioni esistenti, per le molecole oggetto del nostro studio, tra log BB e volume molecolare ( $V_m$ ) (figura 29)



**Figura 29.** Relazione tra il volume molecolare ed il log BB.

Osserviamo che nel grafico è stato riportato il volume molecolare diviso 100, semplicemente al fine di uniformare le scale per entrambi gli assi cartesiani. Analizzando la relazione riportata in grafico si nota che tre punti sono forti outlier; essi corrispondono ad atenololo, cimetidina e ranitidina. Ad esclusione di essi sembrerebbe esserci un andamento lineare crescente, ossia all' aumentare del volume molecolare aumenterebbe il log BB ( $r = 0,791$ ). Questo dato non ci sorprende, in quanto il volume molecolare rappresenta essenzialmente la idrofobia di una molecola e quindi la sua propensione ad abbondare la fase acquosa per ripartirsi in una fase meno polare, con un guadagno anche in termini di entropia del sistema.

Nessun decremento di permeazione in funzione dell'incremento dell'ingombro sterico viene osservato, probabilmente perchè nessuna delle molecole in esame raggiunge valori critici dimensionali che ne possano ostacolare la permeazione membranaria.

Ricordiamo, come già esposto precedentemente, che per quanto possa sembrare sorprendente, il confronto di studi sul passaggio transdermico con quelli sull'attraversamento passivo della barriera emato-encefalica, ha dimostrato che entrambi i fenomeni non sono efficacemente descritti dai soli valori di lipofilia ( $\log P$ ); mentre le correlazioni miglioravano significativamente considerando il  $\Delta \log P$ . A ciò va aggiunto che studi recenti hanno sottolineato la superiorità predittiva degli indici di affinità per i fosfolipidi rispetto al parametro classico di lipofilia.

Alla luce delle considerazioni fatte e supportate dai risultati di un lavoro condotto dal nostro gruppo di ricerca sull'attraversamento transdermico, abbiamo calcolato i valori di  $\Delta \log k_w^{IAM}$  al fine di verificare se, anche in questo caso, il differenziale calcolato da solo o in combinazione con altri parametri chimico-fisici, potesse risultare di una qualche utilità per spiegare la permeazione.

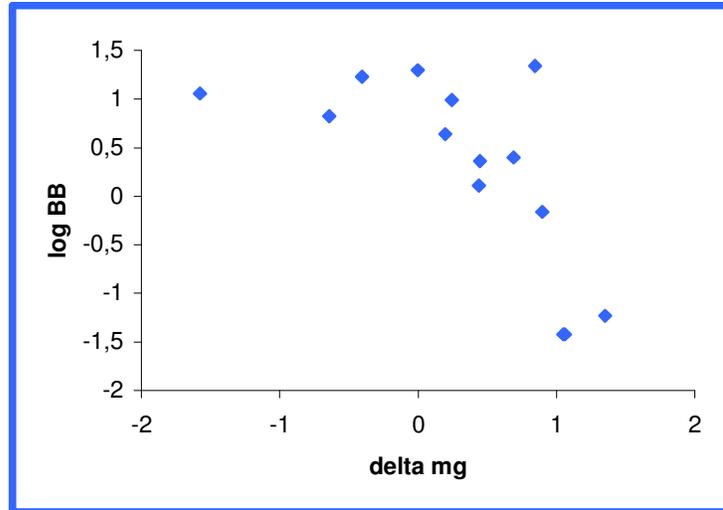
A tale scopo sono stati calcolati, attraverso le equazioni (24) e (25), i valori del  $\Delta \log k_w^{IAM}$  per le sostanze in esame, su entrambe le fasi IAM, (tabella 3).

| Composto      | log BB | $\Delta \log k_w^{IAM.MG}$ | $\Delta \log k_w^{IAM.DD2}$ |
|---------------|--------|----------------------------|-----------------------------|
| aloperidolo   | 1,340  | 0,847                      | 0,646                       |
| atenololo     | -1,420 | 1,063                      | 1,499                       |
| cimetidina    | -1,420 | 1,049                      | 1,557                       |
| clonidina     | 0,110  | 0,438                      | 0,733                       |
| clorpromazina | 1,060  | -1,574                     | -1,739                      |
| imipramina    | 1,300  | -0,001                     | -0,592                      |
| mianserina    | 0,990  | 0,244                      | -0,108                      |
| midazolam     | 0,360  | 0,447                      | -0,223                      |
| morfina       | -0,160 | 0,898                      | 1,353                       |
| nicotina      | 0,401  | 0,691                      | 0,974                       |
| promazina     | 1,230  | -0,405                     | -0,107                      |
| prometazina   | 0,824  | -0,641                     | -0,535                      |
| propranololo  | 0,640  | 0,196                      | 0,580                       |
| ranitidina    | -1,230 | 1,352                      | 1,443                       |

**Tabella 3.** Valori di  $\Delta \log k_w^{IAM}$  sulle due fasi stazionarie e rispettivi log BB.

Mettiamo quindi in correlazione i  $\Delta \log k_w^{IAM}$  con il log BB al fine di valutare che ruolo giocano le extrainterazioni positive di natura elettrostatica sull' attraversamento della BBB; come si può notare dal grafico seguente a valori di  $\Delta \log k_w^{IAM}$  negativi o uguali a zero (repulsione elettrostatica o assenza di interazione elettrostatica) corrispondono valori di log BB più alti, mentre per valori positivi di  $\Delta \log k_w^{IAM}$  (presenza di attrazione elettrostatica tra molecole e fosfolipidi) il passaggio della BBB diminuisce. Ciò fa supporre che forze attrattive siano d'ostacolo alla permeazione.

Lo stesso andamento decrescente lineare è osservato nel caso dei  $\Delta \log k_w^{IAM}$  sulla fase IAM.PC.DD2, come mostrato in figura 30.



**Figura 30.** Relazione tra il  $\Delta \log k_w^{IAM.MG}$  ed il log BB.

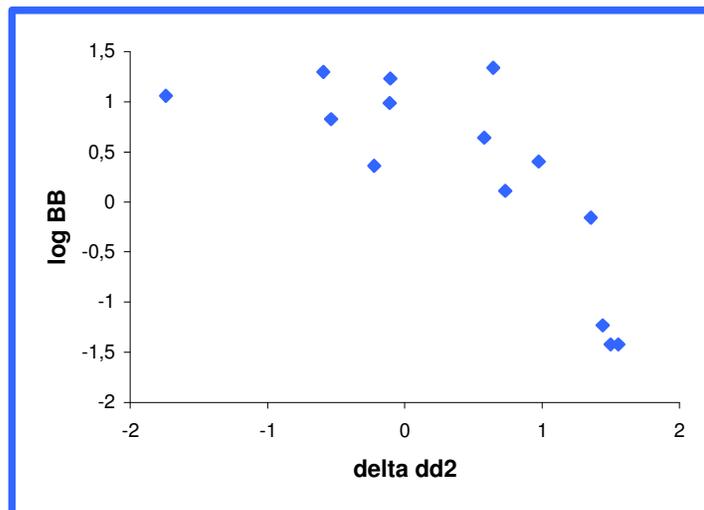
$$\text{Log BB} = -0,949 (\pm 0,206) \Delta \log k_w^{IAM.MG} + 0,480 (\pm 0,171)$$

$$n = 14$$

$$r = 0,800$$

$$s = 0,622$$

(27)



**Figura 31.** Relazione tra il  $\Delta \log k_w^{IAM.DD2}$  ed il log BB.

$$\text{Log BB} = - 0,800 (\pm 0,150) \Delta \log k_w^{IAM.DD2} + 0,505 (\pm 0,156)$$

$$n = 14 \qquad r = 0,838 \qquad s = 0,565 \qquad (28)$$

Dai risultati sopra ottenuti con l'impiego di un singolo parametro chimico-fisico per volta, si è passati alla formulazione di equazioni multiparametriche correlando il log BB simultaneamente con il log P e con il  $\Delta \log k_w^{IAM}$ . Considerando che la dipendenza del log BB dal log P è di tipo parabolico sono stati calcolati i quadrati dei log P; mentre dal momento che la dipendenza del log BB dal  $\Delta \log k_w^{IAM}$  è di tipo lineare decrescente per valori di  $\Delta \log k_w^{IAM}$  positivi, mentre non è influenzato da valori di  $\Delta \log k_w^{IAM}$  negativi, questi ultimi sono stati posti uguali a zero ricavando le seguenti equazioni:

$$\text{Log BB} = 0,621 (\pm 0,421) \log P - 0,084 (\pm 0,057) (\log P)^2 - 1,203 (\pm 0,697) \Delta \log k_w^{IAM.MG} + 0,058 (\pm 0,902)$$

$$N = 14 \qquad r = 0,952 \qquad s = 0,346 \qquad (29)$$

$$\text{Log BB} = 1,191 (\pm 0,637) \log P - 0,144 (\pm 0,077) (\log P)^2 - 0,054 (\pm 0,828) \Delta \log k_w^{IAM.DD2} - 1,360 (\pm 1,439)$$

$$N = 14 \qquad r = 0,938 \qquad s = 0,394 \qquad (30)$$

Va aggiunto che considerando la funzione esponenziale del  $\Delta \log k_w^{IAM}$ , non è necessario porre uguale a zero i valori negativi

di  $\Delta \log k_w^{IAM}$ ; anche in questo caso si ottengono delle correlazioni discrete tra  $\log BB$  e  $\log P$  insieme ad  $e^{\Delta \log k_w^{IAM}}$ .

$$\text{Log BB} = 0,841(\pm 0,350) \log P - 0,107 (\pm 0,052) (\log P)^2 - 0,352 (\pm 0,233) e^{\Delta \log k_w^{IAM.MG}} - 0,269 (\pm 0,814)$$

$$N = 14 \qquad r = 0,950 \qquad s = 0,356$$

(31)

$$\text{Log BB} = 0,610 (\pm 0,553) \log P - 0,081 (\pm 0,070) (\log P)^2 - 0,328 (\pm 0,263) e^{\Delta \log k_w^{IAM.DD2}} + 0,161 (\pm 1,313)$$

$$N = 14 \qquad r = 0,946 \qquad s = 0,367$$

(32)

### ***Molecole Acide***

Tutte le correlazioni mostrate di seguito e relative alla sottoclasse dei composti acidi sono state ottenute escludendo dal calcolo l'indometacina. La presenza di tale molecola nel sottogruppo impediva di ottenere qualunque correlazione significativa. Non è stato possibile razionalizzare l'esclusione di questo composto su basi strutturali. In realtà il suo valore di  $\log BB$  appariva sempre inspiegabilmente basso, qualunque fosse la caratteristica chimico-fisica presa in considerazione. L'unica ipotesi che si può avanzare, peraltro non supportata da alcuna evidenza sperimentale o di letteratura, è che il valore riportato in letteratura di  $\log BB$  sia sottostimato rispetto al valore reale.

Non è superfluo sottolineare che tutti i valori di  $\log BB$  per gli 11 acidi da noi riportati, sono negativi; anzi raggruppando tutte

le 34 molecole in esame, essi risultano avere i valori di log BB più bassi in assoluto.

In uno studio recente su antinfiammatori a struttura arilpropionica è stata spiegata la difficoltà da parte di molecole cariche negativamente nell' attraversare la BBB sulla base della diversità strutturale delle cellule che costituiscono questa barriera membranaria. Il confronto tra cellule della BBB e quelle di altre membrane biologiche ha, infatti, evidenziato una maggiore densità di carica negativa sulla loro superficie, comportando, conseguentemente una maggiore repulsione elettrostatica per tali composti.

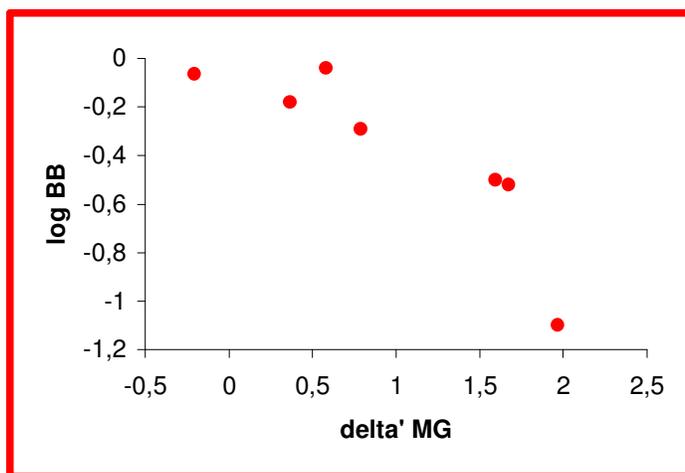
Come nel caso delle molecole basiche si è tentato in via preliminare di confrontare i valori di log P,  $\log D^{7,0}$  e dei  $\log k_w^{IAM}$  con i valori di log BB, ma il risultato è stato sempre una dispersione casuale dei punti.

Al contrario è stata trovata una proporzionalità inversa tra il log BB e l' esponente in base e del  $\Delta' \log k_w^{IAM}$  (figura 17 e 18). Il  $\Delta' \log k_w^{IAM}$  è stato calcolato sostituendo nell' equazione correlativa relativa alle molecole neutre, e su ambedue le fasi IAM, il valore del  $\log D^{7,0}$  relativo a ciascun composto (tabella 4). E' interessante sottolineare che in tal caso, i valori teorici attesi di  $\log k_w^{IAM}$  per gli acidi esaminati sono nettamente inferiori rispetto allo stesso tipo di predizione effettuato con il log P. Conseguentemente i  $\Delta' \log k_w^{IAM}$  sono quasi tutti positivi mentre i  $\Delta \log k_w^{IAM}$  risultano quasi tutti negativi, segno che il valore di interazione con i fosfolipidi predetto è sempre maggiore del valore misurato.

Sappiamo che gli acidi interagiscono in misura minore o al massimo uguale rispetto a composti neutri isolipofilici; è, quindi, logico attendersi che i log D predicano in maniera più realistica la ripartizione in fosfolipidi.

| Composto               | Log BB | $\Delta' \log k_w^{\text{IAM.MG}}$ | $\Delta' \log k_w^{\text{IAM.DD2}}$ |
|------------------------|--------|------------------------------------|-------------------------------------|
| acido acetilsalicilico | -0,500 | 1,594                              | 2,191                               |
| acido salicilico       | -1,100 | 1,965                              | 2,433                               |
| fenilbutazone          | -0,520 | 1,674                              | 1,686                               |
| fenitoina              | -0,040 | 0,581                              | 0,384                               |
| ibuprofene             | -0,180 | 0,365                              | 0,472                               |
| teofillina             | -0,290 | 0,790                              | 1,065                               |
| tiopentale             | -0,140 | -0,207                             | -0,360                              |

**Tabella 4.** Valori di  $\Delta' \log k_w^{\text{IAM}}$  sulle due fasi stazionarie e rispettivi log BB.



**Figura 32.** Dipendenza del log BB dal  $\Delta' \log k_w^{\text{IAM.MG}}$ .

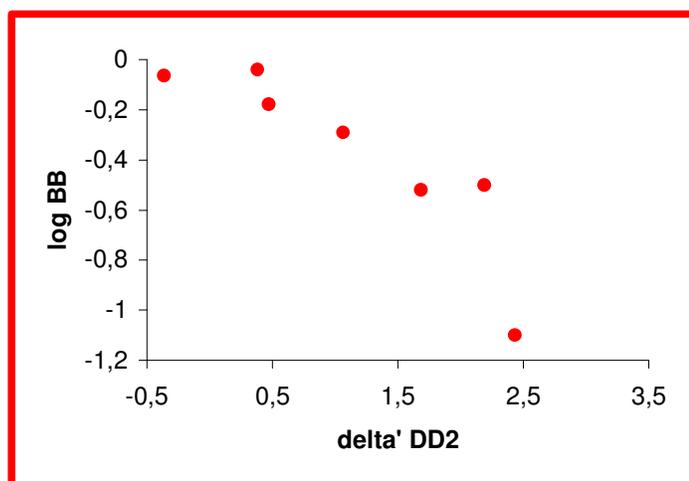
$$\text{Log BB} = -0,145 (\pm 0,023) e^{\Delta' \log k_w^{\text{IAM.MG}}} + 0,104 (\pm 0,092)$$

$$n = 7$$

$$r = 0,943$$

$$s = 0,134$$

(33)



**Figura 33.** Dipendenza del log BB dal  $\Delta' \log k_w^{IAM.DD2}$ .

$$\text{Log BB} = -0,084 (\pm 0,014) e^{\Delta' \log k_w^{IAM.DD2}} + 0,002 (\pm 0,083)$$

$$n = 7 \quad r = 0,937 \quad s = 0,141$$

(34)

E' facile notare come all'aumentare delle interazioni “extra-lipofile” con i fosfolipidi (espresse appunto dal parametro  $\Delta' \log k_w^{IAM}$ ) diminuisca la permeazione come già osservato nel caso di molecole basiche, facendo supporre quindi che un' “eccessiva” interazione “extra-lipofila” costituisca una “forza negativa” per la permeazione.

Anche nel caso dei composti acidi si è voluto constatare la dipendenza tra il log BB ed il volume molecolare ( $V_m/100$ ); anche se la relazione tra i due parametri sembrerebbe essere di tipo parabolico, gli indici statistici indicano che la correlazione è molto scarsa.

### *Molecole non ionizzabili*

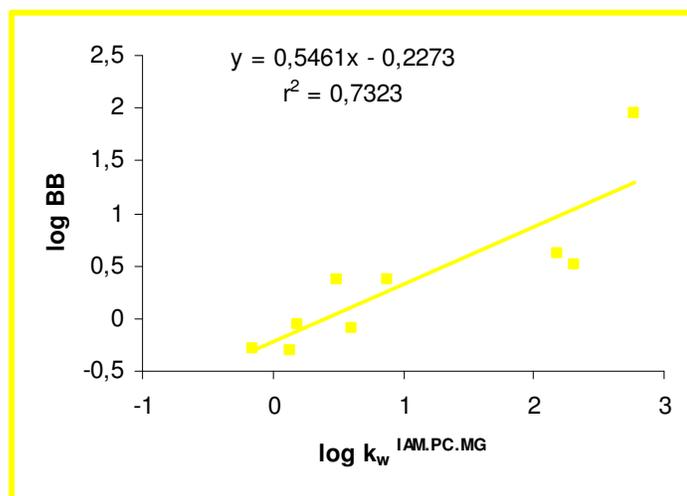
Tutte le correlazioni mostrate di seguito e relative alla sottoclasse dei composti non ionizzati al pH 7,0 sono state ottenute escludendo dal calcolo il flumazenil. La presenza di tale molecola nel sottogruppo impediva di ottenere qualunque correlazione significativa. Non è stato possibile razionalizzare l'esclusione di questo composto su basi strutturali. In realtà il suo valore di log BB appariva sempre inspiegabilmente basso, qualunque fosse la caratteristica chimico-fisica presa in considerazione. L'unica ipotesi che si può avanzare, peraltro non supportata da alcuna evidenza sperimentale o di letteratura, è che il valore riportato in letteratura di log BB sia sottostimato rispetto al valore reale.[53] Infatti, essendo un'antagonista del recettore delle benzodiazepine, in caso di sovradosaggio da benzodiazepine, dovrebbe spiazzarle dal sito recettoriale; in realtà il valore di log BB ritrovato in letteratura risulta essere più basso dei log BB relativi ad alcune benzodiazepine stesse (agonisti sul recettore GABA<sub>A</sub>).

Nella seguente tabella sono riportati gli indici di affinità per i fosfolipidi ottenuti sulle due fasi IAM per le dieci molecole non ionizzate considerate; due di esse (benzene e toluene) sono molecole neutre che hanno funzioni ionizzabili, tutte le altre invece non sono cariche al valore di pH considerato.

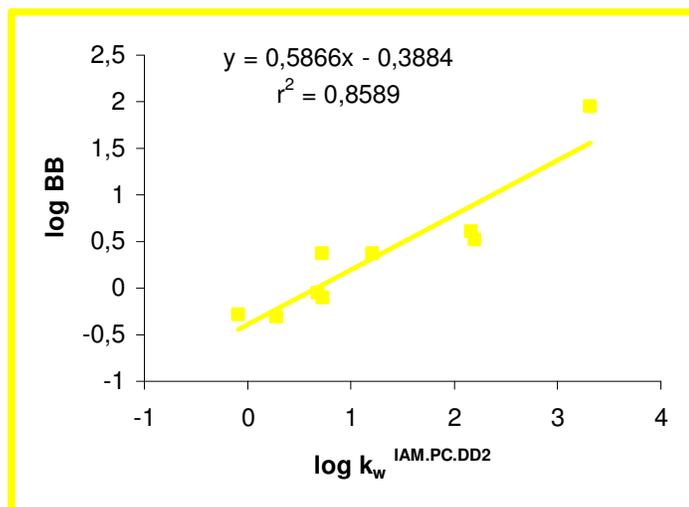
| COMPOSTO     | Log BB | $\log k_w^{IAM.MG}$ | $\log k_w^{IAM.DD2}$ |
|--------------|--------|---------------------|----------------------|
| antipirina   | -0,100 | 0,599               | 0,729                |
| benzene      | 0,370  | 0,488               | 0,720                |
| caffeina     | -0,050 | 0,185               | 0,680                |
| diazepam     | 0,520  | 2,314               | 2,198                |
| flumazenil   | -0,290 | 1,137               | 1,389                |
| ossazepam    | 0,610  | 2,189               | 2,163                |
| paracetamolo | -0,310 | 0,126               | 0,280                |
| progesterone | 1,950  | 2,769               | 3,317                |
| teobromina   | -0,280 | -0,156              | -0,088               |
| toluene      | 0,370  | 0,872               | 1,210                |

**Tabella 5.** Valori di ritenzione sulle fasi IAM.PC.MG e IAM.PC.DD2 per i composti non ionizzati e loro rispettivi valori di log BB.

Il confronto tra il log BB e i  $\log k_w^{IAM}$  sulle fasi IAM.PC.MG e IAM.PC.DD2 mostra un andamento lineare, sempre escludendo il flumazenil (figura 34 e 35).

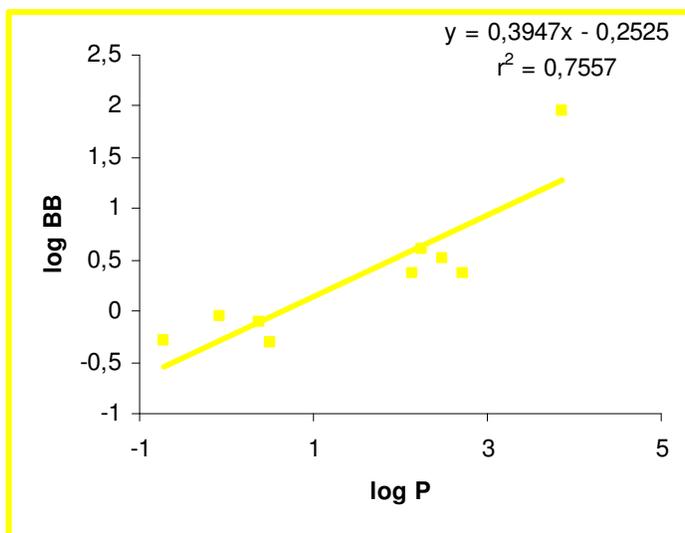


**Figura 34.** Dipendenza del log BB dal  $\log k_w^{\text{IAM.MG}}$ .



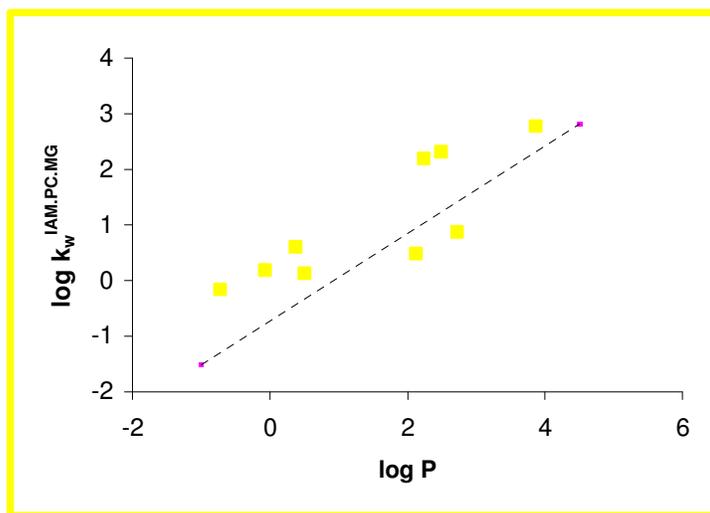
**Figura 35.** Dipendenza del log BB dal  $\log k_w^{\text{IAM.DD2}}$ .

Sembrebbe, quindi, che l'interazione con i fosfolipidi, per composti non ionizzabili, sia una forza che contribuisce positivamente alla permeazione, in quanto seppure il set di molecole analizzato è ristretto si nota che all'aumentare dell'interazione con i fosfolipidi aumenta l'attraversamento della barriera emato-encefalica. Nella figura seguente, invece, è mostrato il confronto tra il log BB ed il log P, come è facilmente desumibile dal grafico, nel caso di molecole non ionizzate al pH fisiologico anche il parametro classico di lipofilia (log P), sembra descrivere discretamente la permeazione dei composti esaminati.

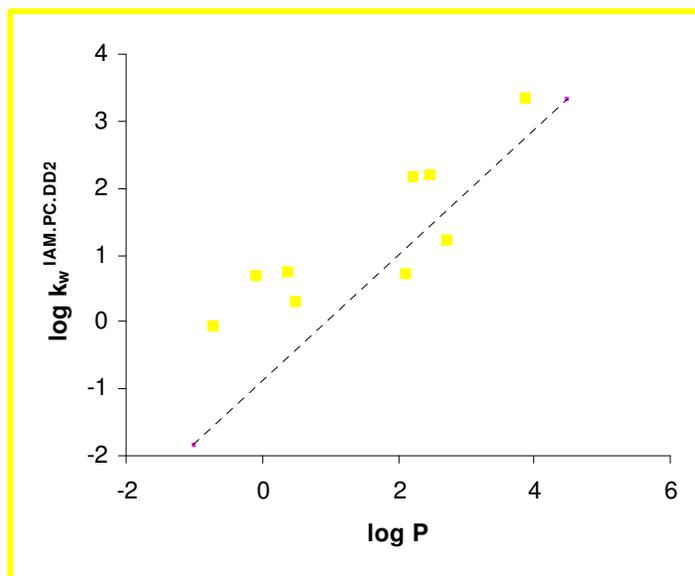


**Figura 36.** Dipendenza del  $\log BB$  dal  $\log P$ .

Inoltre, il confronto tra i punti relativi alle nove molecole non ionizzabili con i 36 punti di molecole neutre con le quali è stata costruita la retta delle neutre, mostra che i punti delle molecole in esame si pongono poco al di sopra o poco al di sotto della suddetta retta non mostrando quindi extra-interazioni di natura elettrostatica come nel caso di composti ionizzati (figura 37 e 38).



**Figura 37.** Dipendenza del  $\log k_w^{\text{IAM.MG}}$  dal  $\log P$  e confronto con la retta dei 36 composti non ionizzabili.



**Figura 38.** Dipendenza dal  $\log k_w^{\text{IAM.DD2}}$  dal  $\log P$  e confronto con la retta dei 36 composti non ionizzabili.

### *Studi di Elettrocromatografia Capillare ed Elettroforesi Capillare.*

La prima fase del lavoro di ricerca svolto presso l'Istituto di Metodologie Chimiche del CNR di Roma è stata caratterizzata da una serie di osservazioni empiriche che ci ha condotti alla scelta di tutte le condizioni sperimentali in seguito applicate. Va sottolineato infatti, che in letteratura non sono stati ritrovati studi di ripartizione di farmaci mediante elettrocromatografia capillare, per cui la metodica messa a punto risulta essere del tutto innovativa. Inizialmente, sulla base delle esperienze del gruppo di ricerca presso il quale ho svolto gli studi di elettroforesi, si è utilizzato un capillare di silice da 320  $\mu\text{m}$  di diametro interno, impaccato con la fase IAM.PC.DD2 (una delle fasi stazionarie da

noi utilizzate in biocromatografia) per 23 cm di lunghezza. La scelta di un diametro del capillare inusuale per la CEC (normalmente i capillari utilizzati hanno un diametro di 50 - 100  $\mu\text{m}$ ), era dettata dal diametro particolarmente grande delle particelle della fase di interesse (12  $\mu\text{m}$ ) rispetto alle particelle delle fasi stazionarie normalmente utilizzate per impaccare i capillari i cui diametri sono di 3  $\mu\text{m}$  oppure di 5  $\mu\text{m}$ . Inoltre, riportando le medesime condizioni della biocromatografia, il tampone utilizzato era stato inizialmente un tampone fosfato 1 mM a pH 7,0; tuttavia l' utilizzo di questo tipo di BGE (background elettroforetico) non consentiva di ottenere buoni risultati per due motivi:

Se si sceglieva di lavorare applicando una differenza di potenziale di 5 Kv, (voltaggio considerato basso per un capillare da 320  $\mu\text{m}$ ), i composti in esame eluivano in tempi molto lunghi, andando così a vanificare uno dei vantaggi della CEC, ossia i ridotti tempi di analisi.

Se si decideva di aumentare il voltaggio arrivando a 10 Kv, la corrente inaspettatamente aumentava in maniera non proporzionale alla differenza di potenziale applicata, diventando poco significative le differenze tra i tempi di eluizione delle molecole oggetto del nostro studio. Si è creduto opportuno cambiare il BGE, dal momento che in letteratura sono riportati pochissimi esempi di CEC, in cui venga usato un tampone fosfato. Ricordiamo come già esposto precedentemente, che la scelta del BGE in CEC, analogamente a quella della fase mobile in cromatografia, è uno dei requisiti fondamentali per la riuscita ottimale dell'analisi stessa. Infatti, il flusso elettrosmotico, generato all'interno del capillare, sostanzialmente dallo

spostamento del BGE dal catodo verso l'anodo, dipende in misura diretta dal tipo di tampone usato, dalla sua concentrazione e forza ionica, nonché dalla viscosità e dalla costante dielettrica del mezzo. Abbiamo, dunque, preferito utilizzare un tampone TRIS (tridrossimetilaminometano); in questo modo è stata ottenuta una diretta proporzionalità tra la differenza di potenziale applicata agli estremi del capillare e la corrente misurata, consentendo eventualmente di aumentare il voltaggio applicato. Tuttavia, anche in queste condizioni sperimentali, i tempi di analisi risultavano essere decisamente lunghi. Si è supposto che sia il capillare utilizzato (I.D. 320  $\mu\text{m}$ ) che la lunghezza stessa dell'impaccamento ritardavano i tempi di eluizione. Si è ritenuto opportuno, quindi, provare ad impaccare un capillare di 100  $\mu\text{m}$  per 7 cm al fine di abbreviare i tempi di analisi e contemporaneamente avere la possibilità di aumentare, se necessario, il voltaggio applicato. Tale strategia metodologica era già stata utilizzata con successo dal gruppo di ricerca presso il quale ho svolto gli studi di CEC.

Premettiamo che un capillare può essere impaccato con una fase stazionaria a densità di carica positiva o negativa; nel caso della fase IAM.PC.DD2 la carica superficiale è prevalentemente negativa, ciò genera un flusso elettrosmotico dall'anodo al catodo (polarità positiva).

Se la superficie del capillare ha prevalentemente una carica positiva, gli ioni della fase mobile attratti dalla superficie del capillare saranno negativi; il flusso elettrosmotico sarà diretto dal catodo verso l'anodo (polarità negativa).

Va sottolineato che, nella cassetta, in cui è disposto il capillare, la finestra di rivelazione (detector) è posta sempre dalla

parte del catodo (corrispondente all'outlet) (figura 39). Lavorare in polarità negativa significa, in termini pratici, invertire la polarità sullo strumento e quindi le posizioni corrispondenti ad anodo e catodo.

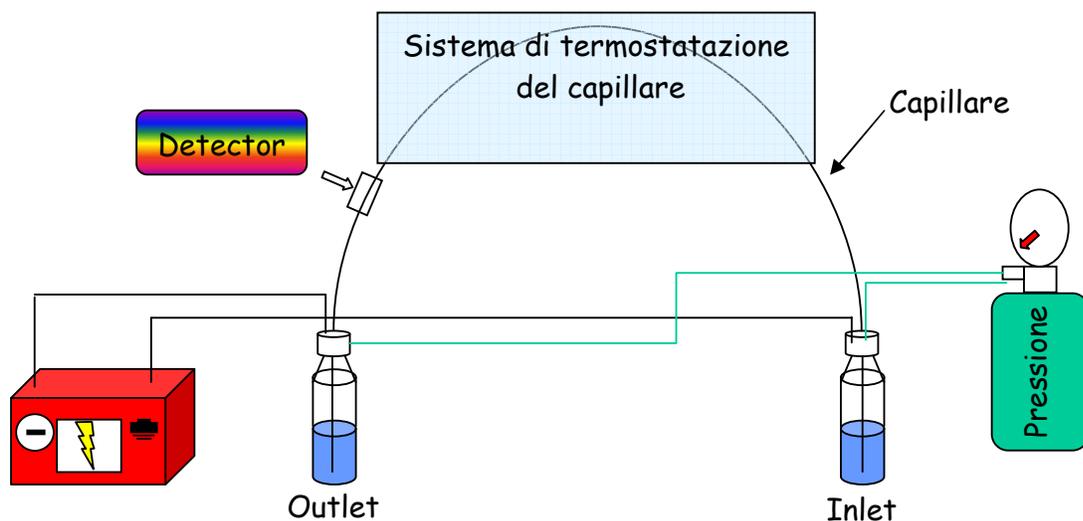
Nel nostro caso, dovendo impaccare un capillare per soli 7 cm, avremmo potuto scegliere di impaccarlo:

1. dalla parte dell'anodo (inlet) con un'inevitabile perdita di efficienza causata dal passaggio degli analiti in un tratto vuoto di capillare. (figura 40 b)
2. oppure dalla parte dall'outlet dove si trova il catodo (in condizioni di polarità positiva) e dove, nel caso in esame, è stata fatta avvenire l'iniezione (figure 39-40).

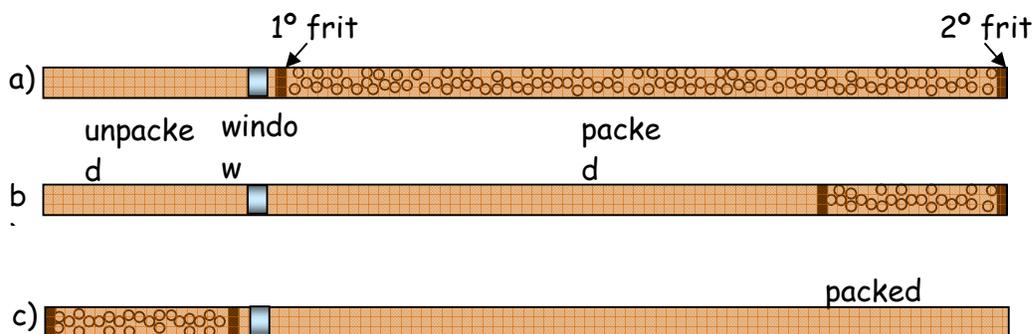
Questa operazione ha consentito che la distanza tra il secondo "frit" e la finestra, dove avviene la rivelazione, risultasse minima evitando, quindi, la perdita di efficienza sopra prospettata. Applicando in queste condizioni un voltaggio positivo, i composti, attratti dal catodo (posto all'altra estremità del capillare), sono costretti a passare attraverso la fase stazionaria rendendo possibile la interazione con la fase stazionaria IAM.PC.DD2 (figura 41).

Dopo aver effettuato delle prove preliminari di ripetibilità con una serie di composti test per verificare la funzionalità del capillare, si è proceduto all'ottimizzazione del metodo analitico CEC, studiando l'effetto di determinati parametri sulle prestazioni del metodo stesso, soprattutto in termini di fattori di ritenzione, ma anche in termini di risoluzione ed efficienza. Sono stati valutati sia parametri strumentali (voltaggio, temperatura), sia parametri riguardanti la composizione della fase mobile (concentrazione del tampone e percentuale di acetonitrile

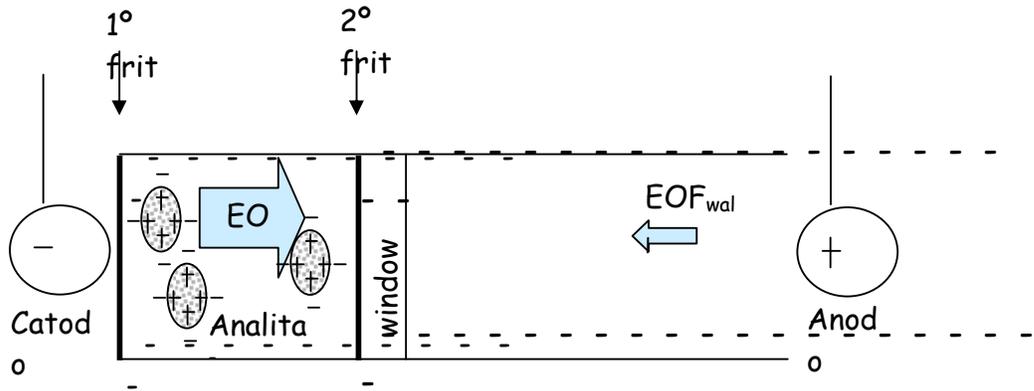
utilizzata). L'acetonitrile è stato l'unico modificatore organico utilizzato nel nostro studio in quanto è l'unico solvente apolare usato in biocromatografia.



**Figura 39.** Rappresentazione schematica della strumentazione usata per le analisi di CEC. La stessa strumentazione è stata impiegata per le analisi di CE, applicando solo un adeguato voltaggio all'estremità del capillare corrispondente all' "outlet".



**Figura 40.** Scelta della parte di capillare da impaccare. a) capillare impaccato sino a ridosso della finestra dove avviene la rivelazione degli analiti; b) capillare impaccato per una lunghezza più piccola, con parte vuota tra 2° frit e finestra; c) capillare impaccato nella zona che nello strumento corrisponde alla sezione che parte dall'outlet.



**Figura 41.** Inversione dell'EOF dovuta all'inversione di polarità

Come esposto precedentemente, il nostro obiettivo è stato trovare una metodica alternativa ed altrettanto valida a quella IAM-HPLC, per studiare le interazioni tra i fosfolipidi rappresentati dalla fase stazionaria IAM.PC.DD2 e le molecole in esame.

In CEC le due forze trainanti sono il flusso elettrosmotico e la pressione. Il parametro che misura la ripartizione delle molecole nella fase stazionaria è come in HPLC il fattore di ritenzione  $((t_r - t_0)/t_0)$ . Tuttavia, come riportato da vari autori, per ottenere una misura del fattore di ritenzione teorico HPLC è necessario scorporare la componente cromatografia da quella elettroforetica. A tale scopo è stato essenziale, nelle medesime condizioni sperimentali, misurare da un lato gli indici di affinità per i fosfolipidi in CEC (capillare impaccato con la fase stazionaria) e dall'altro misurare la mobilità elettroforetica dei composti in esame in CE (elettroforesi capillare), tecnica nella quale il capillare utilizzato non è impaccato. In quest'ultimo caso l'unica forza trainante è quella generata dal campo elettrico

applicato alle estremità del capillare. I composti studiati sia in CE che in CEC sono stati 14, quindi, solo una serie ridotta di molecole rispetto a quelle analizzate in biocromatografia. Tuttavia, il campione è stato scelto in modo da rappresentare la varietà di molecole analizzate in biocromatografia: composti con differente lipofilia; molecole basiche e neutre in misura maggiore (il tiopentale è l'unico acido presente); composti con peso molecolare significativamente differente. Qui di seguito sono elencate le molecole, il loro  $pK_a$  e il loro peso molecolare (PM), dal momento che queste caratteristiche chimico-fisiche sono le due discriminanti fondamentali nelle metodiche utilizzate (CE e CEC).

| <b>COMPOSTO</b>     | <b><math>pK_a</math></b> | <b>PM</b> |
|---------------------|--------------------------|-----------|
| ADRENALINA          | 8,90                     | 183,20    |
| BENZENE             | neutro                   | 78,11     |
| DIFENIDRAMINA       | 9,10                     | 255,36    |
| EFEDRINA            | 9,60                     | 165,22    |
| FENILPROPANOLAMMINA | 9,40                     | 151,22    |
| KETAMINA            | 6,46                     | 237,45    |
| LORAZEPAM           | non ionizzato            | 321,16    |
| OSSAZEPAM           | non ionizzato            | 286,74    |
| RANITIDINA          | 8,40                     | 314,42    |
| TEMAZEPAM           | non ionizzato            | 300,74    |
| TIOPENTALE          | 7,60                     | 264,33    |
| TOLUENE             | neutro                   | 92,13     |
| TRAMADOLO           | 8,30                     | 263,40    |
| VERAPAMILE          | 8,90                     | 454,62    |

**Tabella 6.** Composti analizzati in CEC e rispettivi valori di  $pK_a$  e peso molecolare

Per quanto concerne l'elettrocromatografia capillare, avendo impaccato il capillare dal lato corto, "formalmente" si è lavorato in polarità negativa; in realtà il flusso elettrosmotico si muoveva sempre dall'anodo al catodo come se si stesse lavorando in polarità positiva. In polarità positiva, a parità di massa le molecole rilevate per prime sono le basi, attratte in misura maggiore dal polo negativo (catodo), seguite dai composti anionici e dalle molecole non ionizzate al pH di lavoro, per le quali l'unica forza trainante è il flusso elettrosmotico.

In elettroforesi capillare è stato utilizzato un capillare di silice (diametro interno 100  $\mu\text{m}$ ), non impaccato e con lunghezza effettiva di 23 cm. E' stato possibile utilizzare un capillare con diametro diverso rispetto a quello usato in CEC, poichè la mobilità elettroforetica dei composti in CE dipende solo dal rapporto carica/massa ed è indipendente dalle caratteristiche del capillare (lunghezza, diametro). Si è lavorato, quindi, in polarità positiva rilevando conseguentemente prima gli analiti carichi positivamente, poi i composti neutri per i quali il tempo di migrazione era prossimo al tempo morto, ossia al tempo di migrazione del marker utilizzato (alcool benzilico) ed infine è stato rivelato il tiopentale, unico composto acido della serie in esame.

Analogamente a quanto normalmente fatto in biocromatografia le misure effettuate in CEC sulla fase stazionaria IAM.PC.DD2, sono state determinate direttamente o per estrapolazione al 100% di tampone acquoso. Soltanto per 4 dei 14 composti analizzati ( difenidramina, lorazepam, tramadolo e verapamile) è stato necessario procedere all' estrapolazione del

dato al 100% di fase acquosa. In CE, invece, tutti i dati sperimentali sono stati ottenuti con BGE totalmente acquoso.

Nella seguente tabella sono riportati per ciascun composto i valori dei fattori di ritenzione ottenuti in CEC ( $k'_{CEC}$ ) e quelli delle rispettive mobilità elettroforetiche effettive ( $\mu_{\text{effettiva}}$ ) calcolate sulla base dei  $t_m$  dei composti misurati in CE. A tal proposito va ricordato che la mobilità apparente di un composto in CE è stata calcolata secondo la seguente equazione:

$$\mu_{\text{apparente}} = (L_d \cdot L) / (V \cdot t_m) \quad (35)$$

dove  $L_d$  rappresenta la lunghezza del capillare fino al detector (24,5 cm);  $L$  la lunghezza totale del capillare (33 cm);  $V$  la differenza di potenziale applicata espressa in volts (nel nostro caso 10000 volts);  $t_m$  è il tempo di migrazione espresso in secondi, per cui il tempo misurato sperimentalmente in minuti è stato convertito in secondi.

Sia la mobilità apparente del composto che quella dell'EOF dipendono, quindi, in maniera direttamente proporzionale dalla lunghezza totale del capillare ( $L$ ) e dalla sua lunghezza fino al detector ( $L_d$ ) ed in maniera inversamente proporzionale dal voltaggio applicato ( $V$ ) e dal tempo di migrazione ( $t_m$ ) che viene misurato sperimentalmente (equazione 35). La mobilità elettroforetica effettiva di un composto ( $\mu_{\text{effettiva}}$ ), invece, è data dalla differenza tra la sua mobilità apparente e la mobilità del flusso elettrosmotico come si evince dalla seguente equazione:

$$\mu_{\text{effettiva}} = \mu_{\text{apparente}} - \mu_{\text{eof}} \quad (36)$$

| <b>Composto</b>    | <b>k'<sub>CEC</sub></b> | <b>μ<sub>effettiva</sub></b> |
|--------------------|-------------------------|------------------------------|
| adrenalina         | 4,193                   | 3,154                        |
| benzene            | 0,418                   | -0,119                       |
| difenidramina      | 141,254                 | 3,092                        |
| efedrina           | 2,651                   | 2,684                        |
| fenilpropanolamina | 2,248                   | 2,453                        |
| ketamina           | 8,783                   | 1,339                        |
| lorazepam          | 1241,652                | -0,409                       |
| ossazepam          | 12,640                  | 0,623                        |
| ranitidina         | 5,915                   | 1,163                        |
| temazepam          | 10,718                  | 0,571                        |
| tiopentale         | 1,332                   | -0,608                       |
| toluene            | 1,913                   | -0,345                       |
| tramadolo          | 44,157                  | 2,141                        |
| verapamil          | 301,995                 | 1,832                        |

**Tabella 7.** Fattori di capacità cromatografia in CEC e mobilità elettroforetiche effettive dei composti in esame.

E' stato indispensabile calcolare le mobilità elettroforetiche effettive dei composti in esame, al fine di ottenere il fattore di capacità teorico HPLC [54], secondo la seguente equazione:

$$k'_{\text{HPLC}} = (k^* + P) / (1 - P)$$

(37)

| COMPOSTO            | log P  | log $k_w^{IAM.DD2}$ | log $k'_{HPLC}$ |
|---------------------|--------|---------------------|-----------------|
| ADRENALINA          | -0,68* | 0,250               | 0,486           |
| BENZENE             | 2,13   | 0,720               | -0,037          |
| DIFENIDRAMINA       | 3,27   | 2,170               | 2,147           |
| EFEDRINA            | 0,93   | 0,973               | 0,227           |
| FENILPROPANOLAMMINA | 0,67   | 0,579               | 0,136           |
| KETAMINA            | 2,18   | 1,339               | 0,919           |
| LORAZEPAM           | 2,51   | 2,293               | 3,094           |
| OSSAZEPAM           | 2,24   | 2,163               | 1,094           |
| RANITIDINA          | 0,27   | 0,812               | 0,740           |
| TEMAZEPAM           | 2,19   | 1,697               | 1,022           |
| TIOPENTALE          | 2,85   | 1,328               | 0,190           |
| TOLUENE             | 2,73   | 1,210               | 0,309           |
| TRAMADOLO           | 2,63   | 1,347               | 1,637           |
| VERAPAMILE          | 3,79   | 3,085               | 2,479           |

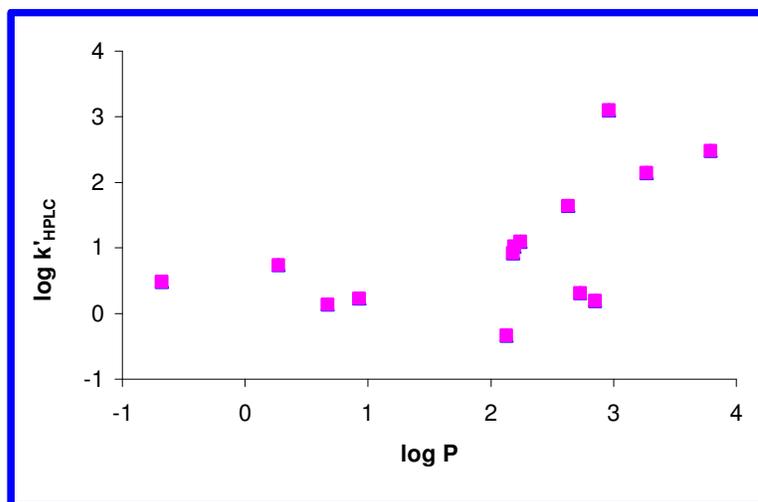
**Tabella 8.** Confronto tra  $\log k_w^{IAM.DD2}$  e  $\log K'_{HPLC}$ .

Nella precedente relazione,  $k^*$  è il fattore di ritenzione CEC misurato sperimentalmente e P è dato dal rapporto tra la mobilità elettroforetica effettiva del composto in esame e quella del flusso elettrosmotico.

In questo modo è stato possibile ottenere il fattore di ritenzione teorico HPLC per i composti in esame come mostrato in tabella. Nella stessa tabella sono riportati i valori di  $M \log P$  dei

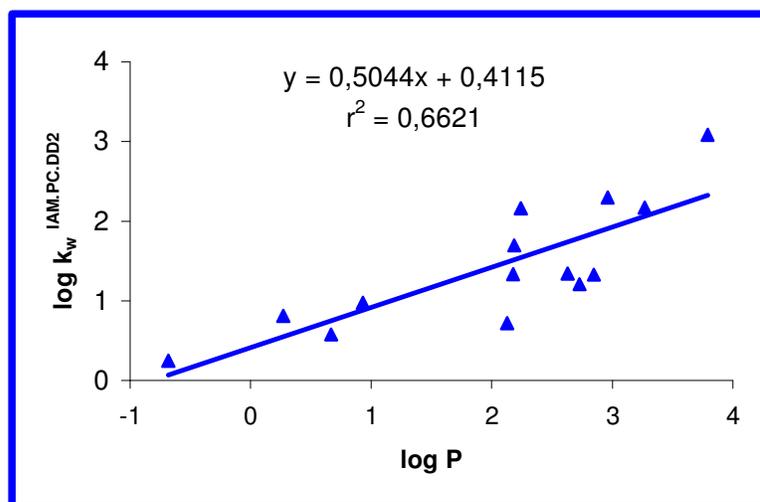
composti in esame insieme a quelli di  $\log k_w^{IAM.DD2}$  ottenuti in biocromatografia.

Il confronto tra i  $\log P$  delle sostanze esaminate ed i rispettivi  $\log k'_{HPLC}$  teorici è fondamentale per stabilire, se, come in biocromatografia, all'aumentare della lipofilia delle molecole predetta dal  $\log P$  aumenta proporzionalmente la ripartizione nella fase IAM.PC.DD2, utilizzata per impaccare il capillare. Dal grafico è possibile notare che esiste un andamento lineare crescente con l'eccezione di alcune molecole che risultano essere dei forti outliers (adrenalina, benzene, lorazepam, ranitidina tiopentale e toluene), ciò indica che in CEC non si è persa la capacità delle molecole di interagire con i fosfolipidi soprattutto in funzione della loro lipofilia.



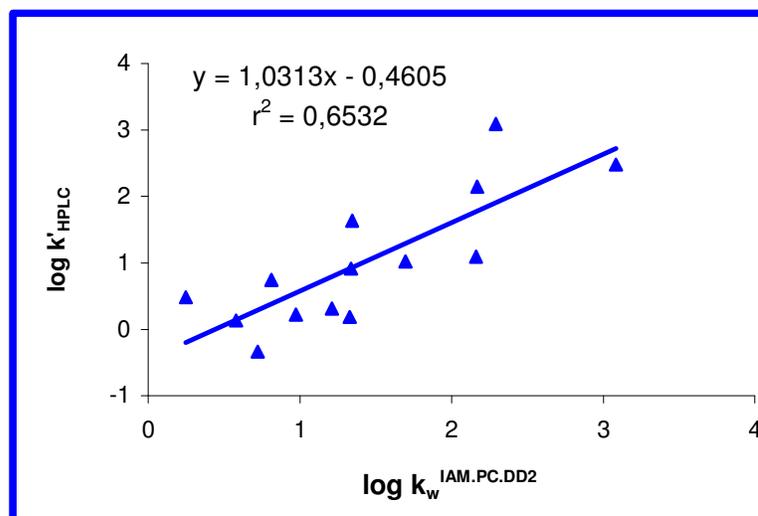
**Figura 42.** Correlazione tra il  $\log k'_{HPLC}$  ed il  $\log P$

Il confronto tra il  $\log P$  e il  $\log k_w^{IAM.DD2}$  indica che, come atteso, esistono delle differenze significative tra  $\log P$  e  $\log k_w^{IAM.DD2}$  in biocromatografia (figura 43).



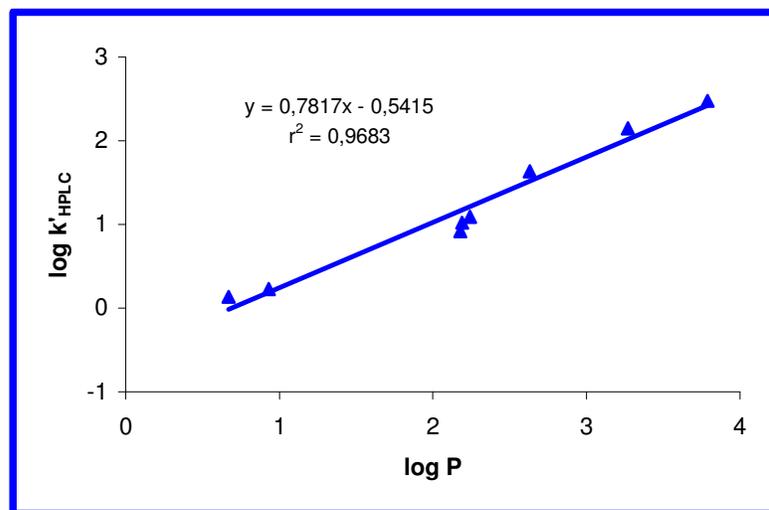
**Figura 43.** Confronto tra il  $\log k_w^{IAM.DD2}$  ed il  $\log P$ .

Molto più interessante risulta, invece, il confronto tra  $\log k_w^{IAM.DD2}$  e  $\log k'_{HPLC}$  teorico, al fine di comprendere quanto il valore teorico predetto utilizzando l'equazione tot, si avvicina a quello sperimentalmente determinato mediante metodica IAM-HPLC (figura 44).



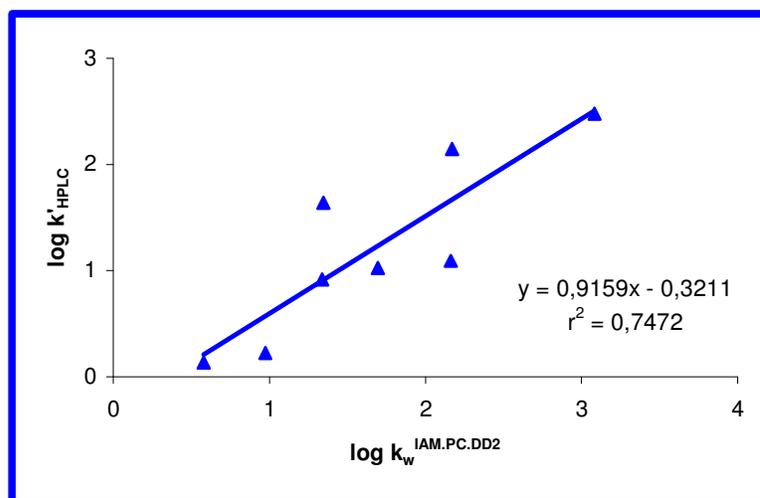
**Figura 44.** Confronto tra il  $\log k_w^{IAM.DD2}$  ed il  $\log K'_{HPLC}$ .

L'esclusione dei punti relativi ad adrenalina, benzene, lorazepam, ranitidina, tiopentale e toluene porta ad un aumento significativo della correlazione ( $r = 0,984$ ) tra il  $\log P$  delle molecole in esame ed il rispettivo valore di  $\log k'_{\text{HPLC}}$ . Tuttavia è ancora da chiarire il motivo per cui tali composti risultano essere dei forti outliers, ciò che si può affermare con certezza è che alcuni di loro risultano essere outliers anche nella correlazione tra  $\log k_w^{\text{IAM.DD2}}$  e  $\log P$ , ad esempio benzene toluene e tiopentale. Il grafico in cui sono messi in correlazione i  $\log k_w^{\text{IAM.DD2}}$  con il  $\log P$ , ottenuto escludendo gli stessi punti del grafico  $\log k'_{\text{HPLC}}$  vs  $\log P$ , non viene riportato, in quanto in tal caso la correlazione non migliora in maniera significativa ( $r = 0,893$ ). Riportiamo, invece, il grafico ottenuto con l'esclusione dei punti relativi ad adrenalina, benzene, lorazepam, ranitidina, tiopentale e toluene, in cui la correlazione è migliorata in maniera significativa ( $r = 0,984$ ) (figura 45)



**Figura 45.** Correlazione tra il  $\log k'_{\text{HPLC}}$  ed il  $\log P$

Significativo appare, anche, il confronto tra i due diversi valori che esprimono la ripartizione nei fosfolipidi ottenuti con le metodiche cromatografiche utilizzate nel presente studio: IAM-HPLC e CEC. Come è possibile notare dal grafico x la correlazione tra  $\log k_w^{IAM.DD2}$  e  $\log k'_{HPLC}$  è buona, quindi alla luce dei pochi dati da noi ottenuti e discussi la metodica messa a punto potrebbe essere una valida alternativa alla biocromatografia. Tuttavia, restano ancora da approfondire alcuni aspetti relativi al meccanismo che regola la ripartizione degli analiti in CEC che potrebbero, in futuro, essere utili sia per spiegare alcune delle peculiarità riscontrate in CEC sia per migliorare la metodica stessa.



**Figura 46.** Confronto tra il  $\log k_w^{IAM.DD2}$  ed il  $\log k'_{HPLC}$ .

## 5.CONCLUSIONI

---

Nel presente lavoro di tesi di Dottorato è stata ulteriormente confermata l'originalità descrittiva della metodica IAM-HPLC rispetto ad altre metodiche *in vitro*. La capacità di ripartirsi di molecole cariche, infatti, è risultata sempre maggiore rispetto a quanto predetto dalle caratteristiche di lipofilia, misurate col sistema *n*-ottanolo/fase acquosa. Solo l'impiego di fasi ripartitive fosfolipidiche ha consentito di rivelare fenomeni di extra-interazioni di natura elettrostatica tra molecole e fosfolipidi che favoriscono la ripartizione nel bilayer fosfolipidico.

Inoltre, sono state acquisite nuove ed originali informazioni su alcune delle possibili discriminanti strutturali che governano l'attraversamento da parte dei farmaci delle membrane biologiche. Infatti, nonostante il set di composti analizzati, di cui erano noti i valori di log BB, sia relativamente ristretto (34 farmaci), i risultati ottenuti sembrano essere promettenti. E' bene ricordare che le molecole sono state suddivise in tre classi di composti; molecole basiche, acide e non ionizzabili. All'interno di ciascun sottogruppo l'indice di affinità per i fosfolipidi è risultato essere sempre un parametro chiave per spiegare la permeazione della BBB. Per le molecole non ionizzabili il log BB ha mostrato una correlazione lineare vs il log P ma anche vs il  $\log k_w^{IAM.MG}$  e  $\log k_w^{IAM.DD2}$ . Ciò dimostra che gli indici di affinità per i fosfolipidi per composti non ionizzabili descrivono in maniera simile al parametro classico di lipofilia (log P) la permeazione della BBB. Per quanto concerne le molecole basiche è stato ottenuto un andamento parabolico tra log BB e log P ed anche tra log BB e  $\log D^{7,0}$ . L'andamento è sempre parabolico, ma la correlazione peggiora se si considera il log BB vs il  $\log k_w^{IAM.MG}$  e  $\log k_w^{IAM.DD2}$ . Tuttavia, se viene preso in esame il  $\Delta \log k_w^{IAM}$

(parametro che codifica essenzialmente le extra-interazioni di natura elettrostatica tra molecole e fosfolipidi) si ha un andamento esponenziale decrescente tra  $\log BB$  e  $\Delta \log k_w^{IAM}$  per entrambe le fasi stazionarie utilizzate. Tale andamento indica che all'aumentare delle interazioni elettrostatiche attrattive che favoriscono la ripartizione di una molecola nei fosfolipidi, decresce la capacità permeativa della BBB. Nel caso di molecole basiche, quindi, il  $\Delta \log k_w^{IAM}$  dà un'informazione originale rispetto a quella fornita dal  $\log P$  e dal  $\log D^{7,0}$ . Infine, è stata formulata un'equazione multiparametrica utilizzando sia il  $\log P$  che il  $\log k_w^{IAM}$  con un miglioramento significativo della correlazione tra il  $\log BB$  e le due variabili indipendenti considerate ( $\log P$  e  $\log k_w^{IAM}$ ). Per le molecole acide i valori di  $\log BB$  ritrovati in letteratura sono i più bassi in assoluto, indice del fatto che probabilmente l'attraversamento della BBB da parte di composti carichi negativamente è particolarmente difficile, come già riscontrato da altri autori. Nel caso dei sette composti acidi esaminati l'unico parametro che correla, in maniera inversamente proporzionale con il  $\log BB$  è il  $\Delta' \log k_w^{IAM}$ , (ricordiamo che per il calcolo del  $\Delta' \log k_w^{IAM}$  nell'equazione delle 36 molecole non ionizzabili si è sostituito al valore del  $\log P$  il valore del  $\log D^{7,0}$ ) dei composti in esame. Prendendo in considerazione il  $\Delta' \log k_w^{IAM}$ , come nel caso delle molecole basiche, all'aumentare dell'interazione elettrostatica diminuisce la capacità di attraversare la BBB.

In tutti i casi esaminati, inoltre, l'introduzione di un'ulteriore variabile che tiene conto del volume molecolare non ha contribuito a chiarire le discriminanti strutturali che determinano il passaggio selettivo dei farmaci attraverso la barriera emato-encefalica.

Nel presente studio infine, è stata messa a punto una metodica alternativa alla biocromatografia per lo studio della ripartizione dei farmaci nelle biomembrane: l'elettrocromatografia

capillare I risultati ottenuti con la metodica su menzionata sono incoraggianti, tuttavia restano ancora da approfondire alcuni aspetti relativi al meccanismo che regola la ripartizione degli analiti in CEC che potrebbero, in futuro, essere utili per migliorare la metodica stessa.

## BIBLIOGRAFIA

---

- [1] van de waterbeemd H., Testa B., In *Advances in Drug Research*. 16, 87-227, 1987
- [2] Camenish G., Folkers G., van de Waterbeemd H., *Pharm. Acta Helv.*, 71, 309-327, 1996.
- [3] Meyer H., *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 42, 110, 1899.
- [4] Overton E., *Studien uber die narkose*, Fisher, Jena, Germany, 1901.
- [5] Leo A. J., Hansch C., Elkins D., *Chem. Rev.*, 71, 525, 1971.
- [6] Rogers J. A., Wong A., *Int. J. Pharm.*, 6, 339-348, 1980.
- [7] Snyder L. R., Kirkland J. J., *Introduction to modern liquid chromatography*, Wiley & Sons, New York, 1979.
- [8] Katz Y., Diamond J. M., *J. Membr. Biol.*, 17, 69-86, 1974.
- [9] Diamond J. M., Katz Y., *J. Membr. Biol.*, 17, 101-120, 1974.
- [10] Jacobs R. E., White S. H., *Biochemistry*, 28, 3421-3437, 1989.
- [11] De Young L., Dill K. A., *Biochemistry*, 27, 5281-5289, 1988.

[12] Turnhofer H., Schnabel J., Betz M., Lipka G., Pidgeon C., Hauser H., *Biochem. Biophys. Acta*, 275, 1064, 1991.

[13] Rand R., Parsegian V.A., *Biochem. Biophys. Acta*, 988, 351- 376, 1989.

[14] Ong S., Liu H., Pidgeon C., *J. Chromatgr. A*, 728, 113-128, 1996.

[15] Sheng Q., Schulten K., Pidgeon C., *J. Phys. Chem.*, 99, 11018-11027, 1995.

[16] Pidgeon C., Marcus C., Alvarez F., in *Application of Enzyme Biotechnology*, Kelly J. W., Baldwin T.O., Eds. Plenum Press, New York, pp 201-244, 1991.

[17] Ong S., Liu H., Qiu X., Bhat G., Pidgeon C., *Anal. Chem.*, 67, 755-762, 1995.

[18] Pidgeon C., Ong S., Liu H., Qiu X., Pidgeon M., Dantzig A. H., Munroe J., Hornback W. J., Kasher J. S., Glunz L., Szczerba T., *J. Med Chem.*, 38, 590-594, 1995

[19] Ong S., Liu H., Pidgeon C., *J. Chromatogr. A* 728, 113-128, 1996.

[20] Salminen T., Pulli A., Taskinen J., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15, 469-477, 1997.

- [21] Caldwell G. W., Masucci J. A., Evangelisto M., White R.,  
J. Chromatogr. A, 800, 161-169, 1998.
- [22] Stewart B. H., Chan O. H., J. Pharm. Sci., 87, 1471-1478,  
1998.
- [23] Ducarme A., Neuwels M., Goldstein S., Massingham R.,  
Eur. J. Med. Chem, 33, 215-223, 1998.
- [24] Stewart B. H., Chung F. Y., Tait B., John C., Chan O. E.,  
Pharm. Res., 15, 1401-1406, 1998.
- [25] Ottiger C., Wunderli-Allenspach H., Pharm. Res., 16, 643,  
1999.
- [26] Genty M., Gonzalez G., Clere C., Desangle-Gouty V.,  
Legendre J. Y., Eur. J. Pharm. Sci., 12, 223-229, 2001.
- [27] Taillardat-Bertschinger A., Galland A., Carrupt P. A.,  
Testa B., J. Chromatogr. A, 953, 39-53, 2002.
- [28] Taillardat-Bertschinger A., Barbato F., Quercia M. T.,  
Carrupt P. A., Reist M., La Rotonda M. I., Testa B., Helv.  
Chim. Acta, 85, 519-532, 2002.
- [29] Taillardat-Bertschinger A., A Marca-Martinet C., Carrupt  
P.A., Reist M., Caron G., Fruttero R., Testa B., Pharm. Res.,  
19, 729-737, 2002.

- [30] Barbato F., La Rotonda M. I., Quaglia F., *Eur. J. Med. Chem.*, 31, 311-318, 1996.
- [31] Austin R. P., Davis A. M., Manners C. N., *J. Pharm. Sci.*, 84, 1180-1183, 1995.
- [32] Barbato F., La Rotonda M. I., Quaglia F., *J. Pharm. Sci.*, 86, 225-229, 1997.
- [33] Barbato F., La Rotonda M. I., Quaglia F., *Pharm. Res.*, 14, 1699-1705, 1997.
- [34] Amato M., Barbato F., Morrica P., Quaglia F., La Rotonda M.I., *Helv. Chim. Acta*, 83, 2836, 2000.
- [35] Avdeef A., Box K. J., Comer J. E. A., Hibert C., Tam K. Y., *Pharm. Res.*, 15, 209-215, 1998.
- [36] Aasmunstad T.A; Morland J.; Paulsen R. E. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 275, 435-441, 1995.
- [37] Kramer S. D.; Braun A.; *Pharm. Res.*15, 739-744, 1998.
- [38] Hansch C. and Clayton J.M.; *J. Pharm. Sci.* 62, 1, 1973
- [39] Hansch C. Leo A.; *J. Pharm. Sci.* 76, 663, 1987

- [40] van Bree J.B.M.M.; de Boer, A.G.; *J. Pharmacol Exp. Ther.* 247, 1233, 1988.
- [41] Jaehde U.; Goto T.; *Eur.J. Pharm. Sci.* 1, 49, 1993.
- [42] Caron G.; Reymond F.; *Pharm. Sci. Technol. Today* 2, 327, 1999.
- [42] Pliška V., Testa B., van de Waterbeemd H. (eds) *Methods and Principles in Medicinal Chemistry, Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*, 4, 48-71, 233-251, 1996
- [43] Chikhale E.G.; *Pharm. Res.* 11, 412, 1994
- [44] Abraham M., Chadha H., Mitchell R.C., *J. Pharm. Sci.*, 83, 1257-1268, 1994
- [45] Barbato F., Cappello B., Miro A., La Rotonda M.I., Quaglia F., *Il Farmaco.* 53, 655-661, 1998
- [46] *Methods in Molecular Biology*, Vol. 52, "Capillary Electrophoresis Guidebook", 1996, Edited by K.D. Altria, Humana Press, Totowa, New Jersey
- [47] K.D. Altria, *J. Chromatogr. A*, 735 43-56, 1996.
- [48] Demare S., Roy D., Legendre J.Y., *J. Liq. Chromatogr.*, 22, 2675, **1999**

- [49] Barbato F., Di Martino G., Grumetto L., La Rotonda M.I.,  
Eur. J. Pharm. Sci., 22 (4), 261-269, 2004
- [50] Reichel A., Begley D.J., Pharmaceutical Research, 15 (8),  
1998
- [51] Péhourcq F., Matoga M., Bannwarth B.; Fundamental  
Clinical Pharmacology. 18, 65-70, 2004
- [52] ClogP [computer program]. Windows Version 2.0.0b. Claremont (CA):  
BioByte Corp, **1998**
- [53] Mandema J.W.; Kuck M. T.; Danhof M. J. Pharmacol 105, 164, 1992
- [54] Colon L.A.; Guo Y.; Fermier A.; Analytical Chemistry News and Features,  
August 1, 1997