



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE LM-13

Incremento della solubilità di due
candidati inibitori di NEK6 mediante
complessazione con ciclodestrine

Relatore:

Prof. TOMMASO CAROFIGLIO

Controrelatrice:

Prof. ssa CLAUDIA SISSI

Laureando:

LUCA DEPIERI

Anno Accademico 2025/2026

Incremento della solubilità di due candidati inibitori di NEK6 mediante complessazione con ciclodestrine

Luca Deppieri

3 Luglio 2026

Indice

1	Introduzione	6
1.1	NEK6 e Inibitori	6
1.1.1	Proteina chinasi NEK6	6
1.1.2	Candidati inibitori selettivi di NEK6: Composto 8 e Composto 21	9
1.2	Ciclodestrine	15
1.2.1	Caratteristiche funzionali delle Ciclodestrine	18
1.2.2	Ciclodestrine e farmaci antitumorali	21
1.3	Complessi di inclusione farmaco-ciclodestrina	26
1.3.1	Stechiometria e costante di stabilità	26
1.3.2	Analisi della solubilità di fase (Diagrammi di Higuchi-Connors)	27
1.3.3	Tecniche per la sintesi di complessi di inclusione allo stato solido	29
1.4	Dinamica Molecolare applicata alla Complessazione Supramolecolare	30
1.5	Analisi termo-gravimetriche (TGA)	31
1.6	Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)	33
2	Materiali e metodi	34
2.1	Sintesi dei due candidati inibitori	34
2.1.1	Sintesi e caratterizzazione C8	34
2.1.2	Sintesi e caratterizzazione C21	35
2.2	Complessazione in soluzione	36
2.2.1	Primo confronto per la selezione delle ciclodestrine più efficaci	36
2.3	Calcolo della costante di complessazione	36
2.4	Tecniche computazionali di complessazione supramolecolare	41
2.4.1	Preparazione delle molecole e Dinamica Molecolare Supervisionata (SuMD)	41
2.4.2	Analisi semi-quantitativa dell'efficienza di complessazione con SuMD	42
2.5	Produzione degli addotti host-guest per co-macinazione	45
2.5.1	Complessazione in mortaio	45
2.5.2	Complessazione in mulino a sfere	46

2.6	Strumenti analitici e utilizzo	47
2.6.1	Spettrofotometria UV-Vis	47
2.6.2	Analisi Termogravimetrica (TGA)	47
2.6.3	Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR/ATR)	48
2.7	Metodo per l'analisi semi-quantitativa dei dati termogravimetrici	48
2.7.1	Modello di deconvoluzione e strategia di vincolo	49
2.7.2	Implementazione numerica	50
2.7.3	Analisi statistica delle incertezze e dei residui	50
3	Analisi e Risultati	51
3.1	Analisi computazionale SuMD	51
3.1.1	Analisi dei profili SuMD individuali	51
3.1.2	Analisi Geometrica e Energetica di complessazione	53
3.1.3	Analisi strutturale delle pose di inclusione legate	53
3.1.4	Analisi e confronto delle dinamiche con adamantano	58
3.1.5	Analisi differenziale dei macrocicli: effetti di selettività sterica ed entalpica	59
3.2	Confronto tra ciclodestrine in acqua	60
3.2.1	Analisi del comportamento di C21	60
3.2.2	Analisi del comportamento del Composto 8 (C8)	64
3.3	Risultati nella determinazione della costante di complessazione	65
3.3.1	Considerazioni critiche sull'incertezza e sulla riproducibilità dei risultati	70
3.4	Complessazione	72
3.5	Analisi e risultati TGA	73
3.5.1	Analisi Termogravimetrica (TGA e DTG) dei Complessi allo Stato Solido	73
3.5.2	Analisi semi-quantitativa ed efficienza di complessazione allo stato solido	78
3.6	Analisi e risultati FT-IR	82
3.6.1	Sistemi con il Composto 8 (C8)	83
3.6.2	Sistemi con il Composto 21 (C21)	84
3.6.3	Confronto fra i sistemi e considerazioni	85
4	Considerazioni conclusive	89
5	Appendice	90
5.1	Grafici NMR	90
5.2	Grafici SuMD	92
5.3	Grafici deconvoluzione TGA	122
5.3.1	Sistema C8/DIMEB	122
5.3.2	Sistema C8/ β -CD	123
5.4	Spettri FT-IR: sovrapposizioni complete	125

Riassunto

La proteina chinasi NEK6 è un bersaglio di interesse in patologie oncologiche come il tumore al seno e ovarico, ma lo sviluppo di inibitori efficaci è spesso ostacolato dalla loro marcata insolubilità in acqua. Il presente lavoro indaga la complessazione di due candidati, **C8** e **C21**, con diverse ciclodestrine per migliorarne il profilo di solubilità. Uno screening preliminare ha permesso di individuare le CD con il maggior potere solubilizzante, successivamente sottoposte a studi di solubilità di fase (metodo di Higuchi-Connors) per il calcolo della costante di stabilità (K_c) del complesso di inclusione. Data l'insolubilità dei candidati in ambiente acquoso, i complessi sono stati sintetizzati allo stato solido tramite co-macinazione manuale e meccano-chimica in mulino a sfere in presenza di minime quantità di solvente. I prodotti sono stati caratterizzati mediante analisi termogravimetrica (TGA) e spettroscopia infrarossa (FT-IR), confermando la formazione di interazioni intermolecolari attraverso variazioni di stabilità termica e shift vibrazionali. Per supportare l'interpretazione dei dati sperimentali, l'indagine è stata affiancata da uno studio di Dinamica Molecolare (MD), per esplorare i meccanismi di interazione host-guest a livello molecolare e a razionalizzare le geometrie di coordinazione più probabili. L'approccio in silico, pur non fornendo una misura diretta della stabilità termodinamica, ha permesso di razionalizzare i dati sperimentali sul piano entalpico e geometrico e di identificare le pose di legame più favorevoli.

Abstract

The protein kinase NEK6 is a target of interest in oncological pathologies such as breast and ovarian cancer. The development of effective inhibitors is often hindered by their marked insolubility in water. The present work investigates the complexation of two candidates **C8** and **C21** with various cyclodextrins (CDs) to improve their solubility profile. A preliminary screening allowed for the identification of the CDs with the highest solubilizing power, which were subsequently subjected to phase solubility studies (Higuchi-Connors method) to calculate the stability constant (K_c) of the inclusion complex. Given the insolubility of the candidates in an aqueous environment, the inclusion complexes were synthesized in the solid state via kneading and ball milling with minimal amounts of solvent (Liquid-Assisted Grinding). The products were characterized by thermogravimetric analysis (TGA) and infrared spectroscopy (FT-IR), confirming the formation of intermolecular interactions through variations in thermal stability and vibrational shifts. To overcome the analytical challenges associated with the compounds' extreme hydrophobicity, the analysis was integrated with Molecular Dynamics (MD) studies to further investigate host-guest interaction mechanisms. While not providing a direct measure of the thermodynamic stability, the in silico approach allowed the experimental data to be rationalized on an enthalpic and geometric basis and enabled the identification of the most favorable binding poses.

ABBREVIAZIONI: *NEK6* NIMA-Related Kinase 6; *NEK7* NIMA-Related Kinase 7; *ATP* adenosina trifosfato; *VS* Virtual Screening; *IC₅₀* concentrazione inibitoria mediana; *MSA* Mobility Shift Assay; *PDB* Protein Data Bank; *EMBL-EBI* European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute; *UWL* unstirred water layer; **C8** Composto 8; **C21** Composto 21; *CD* ciclodestrina; *CDs* ciclodestrine; β -*CD* β -ciclodestrina; *DIMEB* Heptakis (2,6-di-O-metil)- β -ciclodestrina; *TRIMEB* Heptakis (2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodestrina; *HP- β CD* idrossipropil- β -ciclodestrina; *CM- β CD* carbossimetil- β -ciclodestrina; *TM- β CD* trimetil- β -ciclodestrina; *SBE- β CD* sulfobutiletere- β -ciclodestrina; *RAMEB* randomly methylated β -cyclodextrin; *LAG* Liquid-Assisted Grinding; *PM* miscela fisica; *TGA* analisi termogravimetrica; *DTG* termogravimetria derivata; *DSC* calorimetria a scansione differenziale; *PXRD* diffrattometria a raggi X su polveri; *FT-IR* spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier; *ATR* Attenuated Total Reflectance; *UV-Vis* ultravioletto-visibile; *NMR* risonanza magnetica nucleare; *2D-COS* spettroscopia di correlazione bidimensionale; *HPLC* cromatografia liquida ad alta prestazione; *SASA* Solvent Accessible Surface Area; *E_{tot}* energia potenziale di interazione totale; *K_c* costante di stabilità; *MD* dinamica molecolare; *DM* dinamica molecolare; *SuMD* Supervised Molecular Dynamics; *VMD* Visual Molecular Dynamics; *NAMD* Nanoscale Molecular Dynamics; *AMBER* Assisted Model Building with Energy Refinement; *GAFF* General Amber Force Field; *FF* force field; *PBC* condizioni al contorno periodiche; *NVT* ensemble canonico; *NPT* ensemble isotermico-isobarico; *CSV* Comma-Separated Values; *JSON* JavaScript Object Notation; *RMSE* scarto quadratico medio; *DMSO* dimetil-solfossido

1 Introduzione

1.1 NEK6 e Inibitori

1.1.1 Proteina chinasi NEK6

La proteina chinasi NEK6 (NIMA (Never In Mitosis Gene A)-Related Kinase 6) è una serina/treonina chinasi che svolge un ruolo essenziale nella regolazione del ciclo cellulare, nella progressione mitotica e nella risposta cellulare allo stress genotossico [1, 2]. NEK6 appartiene alla famiglia delle chinasi correlate a NIMA, la quale conta 11 membri nel genoma umano (da NEK1 a NEK11) [1]. Il sottogruppo specifico composto da NEK2, NEK6, NEK7 e NEK9 partecipa in modo coordinato all’organizzazione del fuso mitotico costituito da microtubuli [1].

L’espressione e l’attività catalitica di NEK6 non sono costitutive, ma cambiano in funzione del ciclo cellulare, mostrando un picco di espressione esclusivamente durante la fase M (Figura 1A) [2]. In condizioni fisiologiche l’attivazione della proteina avviene nella transizione dalla metafase all’anafase (Figura 1B) ed è finemente regolata a monte. Dopo gli stimoli mitotici, la chinasi NEK9 fosforila direttamente NEK6, innescando la cascata catalitica con funzioni pleiotropiche fondamentali sia a livello nucleare che citoplasmatico, riassunte schematicamente nella Figura 1 [1, 3].

La proteina NEK6 nel nucleo cellulare catalizza la fosforilazione degli istoni H1 e H3, guidando i meccanismi di condensazione della cromatina per l'allineamento equatoriale dei cromosomi (Figura 1C) [2]. Invece a livello citoplasmatico fosforila il residuo Ser1033 della chinesina Eg5 (una proteina motrice citoscheletrica), promuovendone l'accumulo presso i centrosomi (Figura 1E); questo evento biochimico fornisce la forza meccanica necessaria a guidare la separazione dei centrosomi. Alla fine del ciclo, NEK6 si posiziona sui poli del fuso mitotico interagendo con la proteina KCTD5, permettendo la conclusione della divisione cellulare modulando la citocinesi (Figura 1F,G,H). Bloccare questa chinasi arresta la cellula in metafase, inducendo anomalie strutturali del fuso e l'attivazione della via apoptotica cellulare [1, 2].

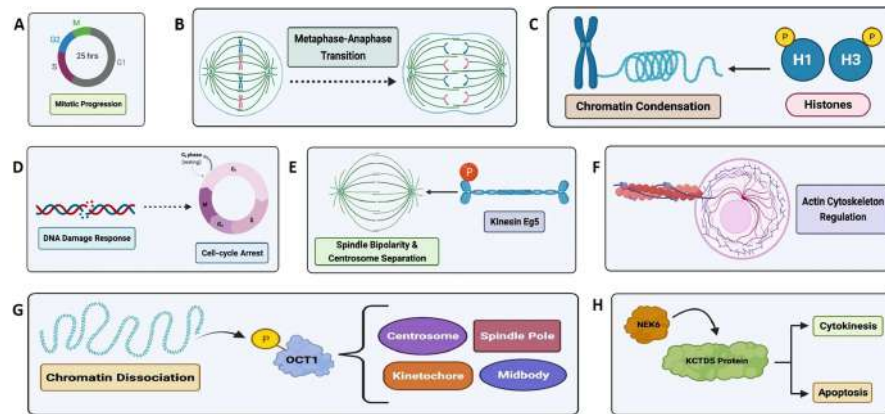


Figura 1: Ruolo di NEK6 nel processo cellulare: A) il ruolo di NEK6 nella progressione mitotica; B) transizione da metafase a anafase; C) condensazione della cromatina; D) Risposta di riparazione al danno del DNA; E) Separazione del centrosoma; F) regolazione dell'actina del citoscheletro; G) dissociazione della cromatina; H) apoptosi e citochinesi. Figura riprodotta da Panchal et al., 2023 [2].

Caratteristiche strutturali di NEK6:

Poiché la struttura cristallografica di NEK6 non è ancora stata risolta sperimentalmente, lo studio della sua tasca catalitica si basa su modelli computazionali per omologia (homology modeling) generati a partire dalla chinasi omologa NEK7 (codice PDB: 2WQN) oppure tramite modelli predittivi avanzati (AlphaFold, database EMBL-EBI), secondo Zardi et al.[4] viene preferito l'utilizzo del modello molecolare ottenuto per omologia rispetto alla previsione di AlphaFold per una differenza nell'alfa elica della regione Gly192 e Thr202 situata nell'angolo di legame dell'ATP (Figura 2) [1]. I modelli tridimensionali validati mostrano un'architettura bilobata, tipica delle chinasi nella loro conformazione inattiva. Il lobo N-terminale minore (caratterizzato da foglietti β e dalla α C-helix) e un lobo C-terminale maggiore (α -elicoidale) sono interconnessi da una regione flessibile che funge da "cerniera" [1]. La tasca di legame dell'ATP, che corrisponde al bersaglio di molecole inibitrici competitive, è localizzata all'interfaccia della sequenza amminoacidica della porzione con funzione di cerniera tra due lobi [1, 4]. La progettazione di inibitori selettivi per NEK6 è guidata da una differenza amminoacidica nel T-loop di attivazione enzimatica rispetto a NEK7; NEK6 presenta un residuo

di acido glutammico in posizione 200 (Glu200) al contrario di NEK7 che possiede una lisina. Questa singola sostituzione inverte localmente il potenziale elettrostatico superficiale della tasca, offrendo un pattern differenziale sfruttabile per il design molecolare [1].

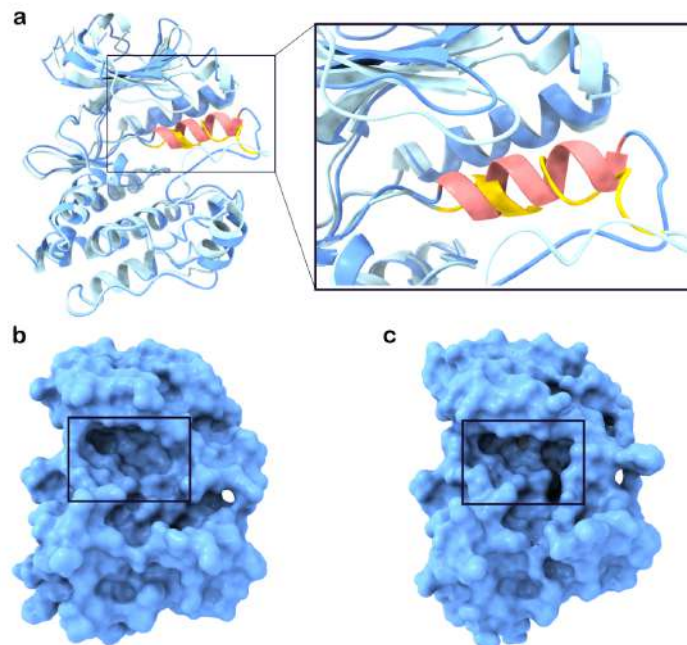


Figura 2: Confronto strutturale tra il modello per omologia sviluppato di NEK6 e il modello AlphaFold di NEK6. (a) Struttura sovrapposta (a nastri) di entrambi i modelli (modello per omologia: blu oceano; modello AlphaFold: ciano), con evidenziata la regione compresa tra Gly192 e Thr202 situata in un angolo del sito di legame dell'ATP: una piccola α -elica completamente formata nel modello per omologia (in rosso) e un' α -elica incompleta nel modello AlphaFold (in giallo). (b e c) Rappresentazioni di superficie, rispettivamente, del modello per omologia di NEK6 e del modello AlphaFold di NEK6. Un rettangolo contrassegna il loro sito di legame dell'ATP, evidenziando le differenze nella topologia della superficie della tasca tra i due modelli. Figura riprodotta da materiali supplementari di Zardi et al., 2025 [4].

Ruolo di NEK6 nell'oncogenesi:

L'interesse farmaceutico nei confronti di NEK6 è strettamente legato alla sua iperespressione in molte neoplasie solide, tra queste ci sono il carcinoma ovarico sieroso ad alto grado (SEOC), in cui la chinasi agisce come un marcatore prognostico sfavorevole indipendente [5, 1]. La sovraespressione di NEK6 è connessa alle condizioni di ipossia cellulare tipiche del tumore solido, infatti, questa condizione stabilizza il fattore di trascrizione HIF-1 α , promuovendo la trascrizione diretta del gene di NEK6 [5].

La trascrizione massiva di NEK6 indotta dall'ipossia, attiva il portale citoscheletro della resistenza ai farmaci (cytoskeletal gateway of drug resistance). NEK6 interagisce fisicamente con la GTPasi GBP-1, venendo incorporata nel citoscheletro microtubulare, così il citoscheletro scherma la chinasi dalla degradazione proteasomiale, stimolando i segnali biochimici di proliferazione, aumentando la crescita del tumore e causando chemioresistenza ai protocolli terapeutici standard a base di cisplatino e paclitaxel [5].

Questo quadro patologico è ulteriormente aggravato dall'interazione di NEK6 con i checkpoint del danno al DNA (Figura 1D). In presenza di stress genotossico la via di segnalazione ATM/ATR-Chk1/Chk2 fosforila NEK6 sul residuo della regione N-terminale (posizione 80), inibendone temporaneamente l'attività catalitica. Grazie a questa inibizione temporanea viene consentito il corretto arresto del ciclo cellulare nella fase G2/M e permettere i meccanismi di riparazione del DNA [1, 2]. Nelle cellule tumorali chemioresistenti, l'elevata concentrazione di NEK6 elude questo sistema di controllo, costringendo la cellula a progredire in modo incontrollato nella mitosi, nonostante il danno genomico presente [2]. Lo sviluppo di piccole molecole inibitrici, capaci di bloccare selettivamente la tasca dell'ATP di NEK6, rappresenta una strategia terapeutica innovativa e di primaria importanza per interrompere il circuito di iperproliferazione cellulare e ripristinare la sensibilità delle cellule tumorali ai farmaci oncologici [5, 1, 4].

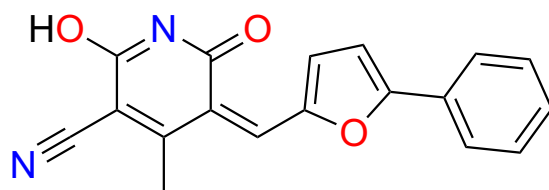
1.1.2 Candidati inibitori selettivi di NEK6: Composto **8** e Composto **21**

La ricerca di piccole molecole sintetiche, capaci di inibire selettivamente l'attività chinasi di NEK6, nel 2018 ha coordinato un approccio di screening virtuale (Virtual Screening, VS), sia basato sulla struttura (structure-based) sia basato sul ligando (ligand-based) [1]. Sono state interrogate le librerie computazionali Asinex e Maybridge sul modello per omologia di NEK6 e sono state identificate venticinque molecole, tra le quali due specifici scaffold eterociclici hanno mostrato un'attività inibitoria su scala micromolare: il composto **8** (**C8**) (derivato 2-ossopiridinico sostituito) e il composto **21** (**C21**) (derivato pirido[2,3-d]pirimidin-4(3H)-onico) [1, 4].

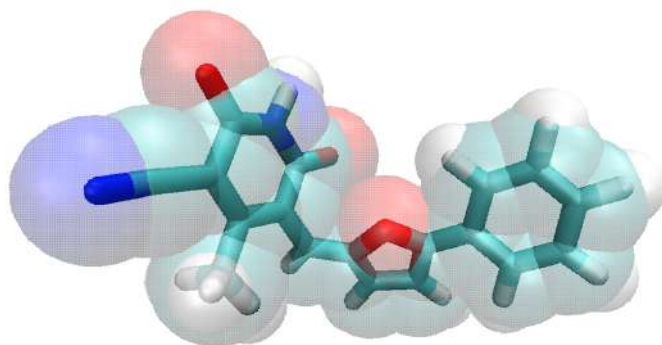
Sono stati eseguiti saggi biochimici in vitro che hanno inizialmente stimato un valore di IC_{50} pari a $3.4 \pm 1.2 \mu M$ per il composto **8** e $2.6 \pm 0.05 \mu M$ per il composto **21**. In particolare la molecola **8** ha dimostrato un risultato molto promettente per la selettività solo su NEK6. Per valutare questa caratteristica sono stati eseguiti dei saggi di mobilità elettroforetica (Off-chip Mobility Shift Assay) che hanno confermato l'inibizione selettiva di NEK6 e NEK1, senza mostrare alcuna attività cross-reattiva contro NEK2, NEK9 e, soprattutto, contro l'omologo enzima NEK7 [1]. Nonostante l'ottimo profilo farmacodinamico e l'attività antiproliferativa dimostrata su linee cellulari tumorali umane, lo sviluppo preclinico di entrambi i candidati viene ostacolato da proprietà chimico-fisiche sfavorevoli, in particolare a una marcata insolubilità acquosa e a complessi equilibri tautomerici e di idratazione in soluzione [1, 4, 3].

*Candidato inibitore **C8**:*

Il candidato inibitore **C8**, formalmente denominato (5Z)-2-idrossi-4-metil-6-osso-5-[(5-fenilfuran-2-il)metilidene]-5,6-diidropiridina-3-carbonitrile, viene sintetizzato attraverso una condensazione di Knoevenagel in acido acetico glaciale tra la 5-fenil-2-furaldeide e il 2-piridone. La molecola presenta due possibili diastereoisomeri (*E* ed *Z*), ma studi di modellizzazione computazionale e mappe NMR bidimensionali hanno dimostrato che



(a)



(b)

Figura 3: (a) rappresentazione 2D del candidato inibitore **C8**. (b) rappresentazione 3D del candidato inibitore **C8** con visualizzazione atomica di Van Der Waals in trasparenza (carbonio ciano, ossigeno rosso, azoto blu). Elaborazione grafica eseguita tramite il software VMD (versione 1.9.4a57)[6].

l'isomero *Z* è termodinamicamente favorito. La forma (*Z*) adotta una geometria planare che massimizza la delocalizzazione elettronica π lungo l'intero scheletro molecolare. Inoltre questa conformazione permette alla molecola di organizzarsi in dimeri stabili auto-assemblati tramite forti legami a idrogeno intermolecolari $NH \cdots O = C$ Figura 4 [3].

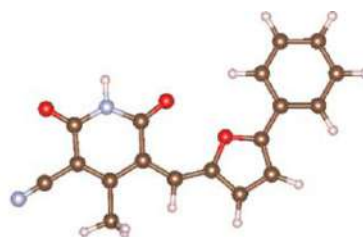
Il limite clinico principale del composto **C8** risiede nella sua estrema idrofobicità, che si traduce in una solubilità acquosa intrinseca quasi nulla, quantificata in soli $3 \mu g/mL$. Grazie agli studi di Hu et al. è stata analizzato il processo di idratazione reversibile che la molecola subisce in ambiente acquoso o idroalcolico a pH neutro e basico. Lo spettro UV-Vis di **C8** in solventi organici anidri (come il DMSO) è dominato da una transizione HOMO-LUMO intensa a circa 480 nm (Banda II), responsabile del suo colore rosso intenso, in presenza di acqua, avviene una progressiva scomparsa della Banda II a favore della comparsa di una banda a energia più elevata a 330 nm (Banda I) Figura 6 [3].

Questo fenomeno è guidato da un attacco nucleofilo dell'acqua sul sito vinilico della molecola portando alla transizione del carbonio ponte a un'ibridazione sp^3 . La formazione di questo addotto idratato (derivato 2,6-diidrossilico) interrompe la coniugazione elettronica π tra l'anello piridonico e quello furanico, giustificando la perdita delle proprietà ottiche nel visibile Figura 5 [3]. Il processo è governato da un equilibrio dinamico reversibile: l'aggiunta di minime quantità di acido (es. acido acetico) catalizza la disidratazione del sistema, ripristinando la forma planare coniugata e il caratteristico

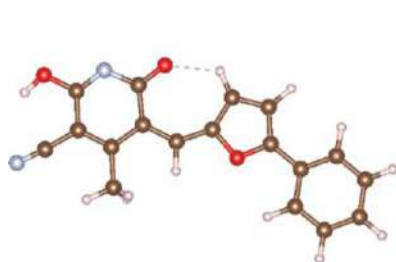
colore arancione (anche se temporanea). Sono quindi state eseguite simulazioni di dinamica molecolare (MD) e docking molecolare che hanno dimostrato che la forma idratata si lega alla proteina, che accoglie le variazioni geometriche di **C8** idratato, ma presenta una stabilità conformazionale inferiore rispetto alla forma non idratata [3].



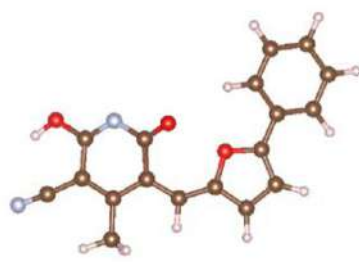
(Z)-2,6-dipyridone



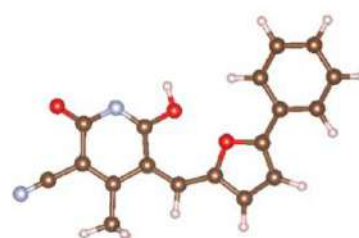
(Z)-2,6-dipyridone-c1



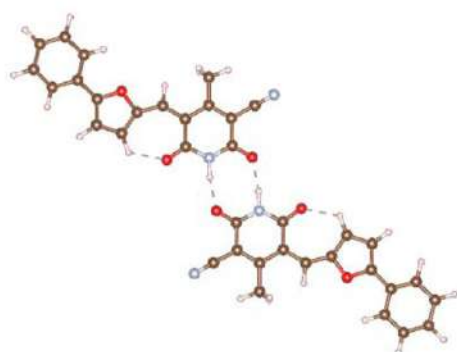
(Z)-6-pyridone



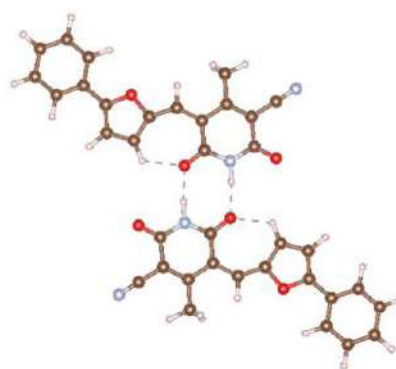
(Z)-6-pyridone-c1



(Z)-2-pyridone



(Z)-2,6-dipyridone-d1



(Z)-2,6-dipyridone-d2

Figura 4: Strutture ottimizzate alla minore energia dei tautomeri (Z), conformeri selezionati del composto **8** e due dimeri di (Z)-2,6-dipiridone. Figura riprodotta da Hu et al., 2025 [3].

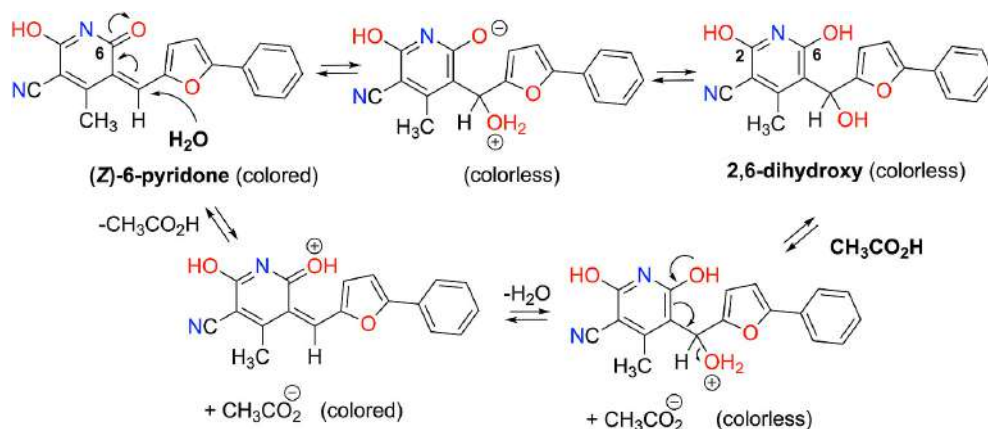


Figura 5: Schema: Idratazione del composto 8. Figura riprodotta da Hu et al., 2025 [3].

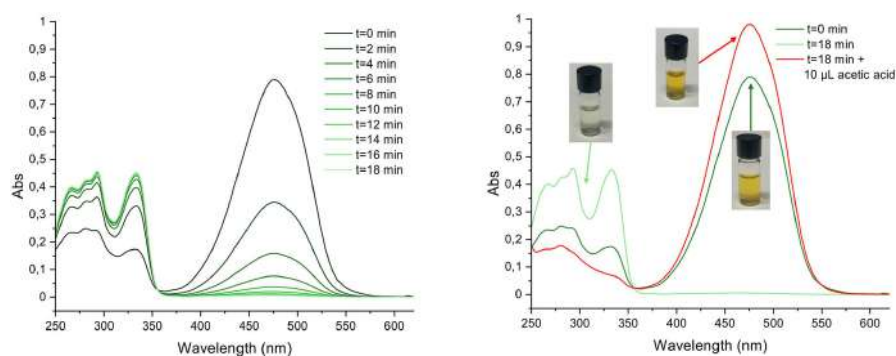


Figura 6: Spettri UV-Vis del composto 8 in CH_3OH in differenti condizioni. Il riquadro a sinistra traccia i profili rilevati subito dopo la preparazione del campione e a intervalli crescenti, illustrando l'evoluzione temporale dell'assorbimento. A destra, il confronto della medesima soluzione prima e dopo l'aggiunta di acido acetico dimostra la reversibilità delle variazioni spettrali in ambiente acido. Completa il grafico la documentazione fotografica del colore assunto dalla soluzione in ciascuno stato. Figura riprodotta da Hu et al. 2025 [3]

Candidato inibitore **C21**

Il candidato inibitore **C21**, denominato 2-ammino-5-fenil-5,11-diidro-3H-indeno[2',1':5,6]pirido[2,3-d]pirimidina-4,6-dione, è un solido di colore rosso ottenuto mediante una reazione multicomponente tra benzaldeide, indan-1,3-dione e 2,6-diamminopirimidin-4(3H)-one [4]. Nei saggi enzimatici **C21** ha mostrato la potenza inibitoria iniziale più elevata della serie di esperimenti ma, i successivi saggi MSA (Mobility Shift Assay) hanno registrato un crollo dell'attività con un valore di IC_{50} superiore ($49.8 \mu M$) [1]. Questa discrepanza analitica è stata sperimentalmente ricondotta alla ridotta solubilità acquosa apparente ($280 \mu g/mL$ in miscela $H_2O/DMSO$ 99:1) e alla forte tendenza della molecola a dare fenomeni di aggregazione aspecifica e precipitazione nel mezzo di saggio [4].

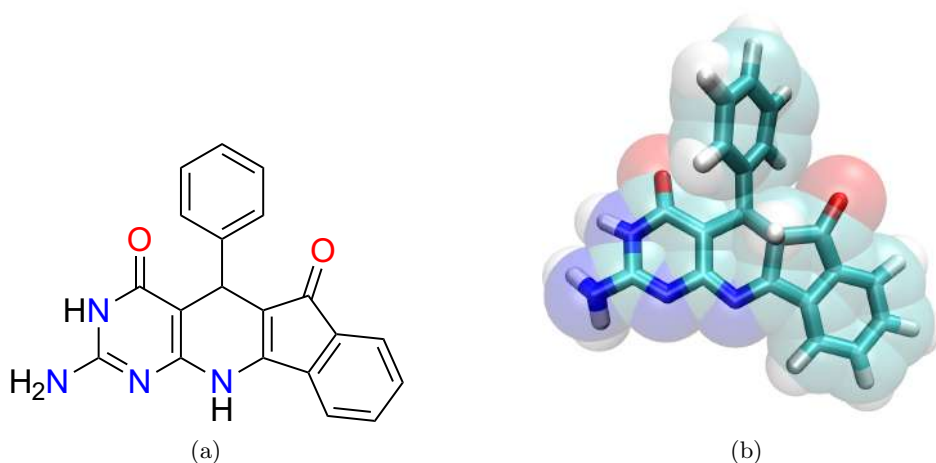


Figura 7: (a) rappresentazione 2D del candidato inibitore **C21**. (b) rappresentazione 3D del candidato inibitore **C21** con visualizzazione atomica di Van Der Waals in trasparenza (carbonio ciano, ossigeno rosso, azoto blu). Elaborazione grafica eseguita tramite il software VMD (versione 1.9.4a57)[6].

Il motivo principale dell'elevata insolubilità e lipofilia di **C21** viene ricondotto alla rigidità strutturale del nucleo eterociclico condensato, infatti, la presenza del sistema ciclico dell'indenone impone alla molecola una geometria planare e un'energia reticolare coesiva estremamente elevata, fattori che favoriscono l'impaccamento molecolare cristallino ostacolando la solvatazione in ambiente acquoso [4].

Per superare questo limite tecnologico, Zardi et al. [4] svilupparono una strategia di progettazione basata sulla rottura della planarità molecolare (disruption of molecular planarity). La sostituzione del nucleo rigido dell'indane-1,3-dione con dichetoni aciclici flessibili ha permesso di isolare diversi derivati a ciclo aperto. L'interruzione dell'impaccamento cristallino planare raddoppia la solubilità acquosa, che tocca valori compresi tra 500 e $640 \mu g/mL$. Questo intervento strutturale si ripercuote favorevolmente anche sull'attività biologica. I modelli QSAR rivelano infatti che la distorsione geometrica induce un incremento di sfericità (sphericity, SPH), parametro che correla fortemente ($R^2 > 0.8$) con la capacità di bloccare il target. All'atto pratico, i composti

a ciclo aperto 3-6 manifestano una potenza inibitoria analoga o accresciuta rispetto alla molecola di riferimento **21**.

Queste evidenze chimico-fisiche dimostrano come lo sviluppo farmaceutico di **C8** e **C21** sia limitato dalla scarsa idrofilia intrinseca e dalla tendenza a dare fenomeni di aggregazione aspecifica e precipitazione in ambiente acquoso. L'incremento della solubilità apparente e la stabilizzazione dei candidati in soluzione rappresentano quindi degli obiettivi a breve termine per poter preservare il potenziale antitumorale *in vivo*. Ciò giustifica l'esplorazione di strategie di inclusione supramolecolare mediante l'ausilio di ciclodestrine native e funzionalizzate per favorirne il trasferimento e la stabilità in fase acquosa [1, 4, 3].

1.2 Ciclodestrine

Le ciclodestrine sono oligosaccaridi ciclici non riducenti, scoperti ed estratti per la prima volta nel 1891. Queste molecole si ottengono per degradazione enzimatica dell'amido ad opera dell'enzima ciclodestrina glucosil-transferasi (CGTasi) presente in diversi batteri (*Bacillus amylobacter* e *Bacillus macerans*), questa proteina promuove la scissione e la successiva ciclizzazione intramolecolare. Da un punto di vista strutturale, questi macrocicli sono costituiti da 6-8 unità di α -D-glucopiranosio collegate tra loro con legami glicosidici α -D-(1 $\rightarrow$ 4) [7, 8].

Questi sistemi vengono suddivisi in due classi: ciclodestrine native e funzionalizzate. Le ciclodestrine native sono definite in base al numero di monomeri di glucopiranosio che compongono l'anello macrociclico, le forme α , β e γ , costituite rispettivamente da 6, 7 e 8 unità strutturali. Ognuna di esse possiede diverse proprietà chimico-fisiche e di solubilità acquosa. In particolare, la β -ciclodestrina mostra una solubilità in acqua a temperatura ambiente criticamente ridotta rispetto ai termini α e γ con una solubilità in acqua di 18.5 g/L [7, 8].

La geometria tridimensionale delle ciclodestrine è caratterizzata da una tipica conformazione a toroide o tronco di cono, la cui reattività dipende strettamente dal loro orientamento spaziale dei gruppi ossidrilici delle unità glucidiche. Ogni monomero espone 3 gruppi ossidrilici disposti verso l'ambiente esterno: gli ossidrili secondari legati ai carboni C2 e C3 sono localizzati lungo il bordo più largo del toroide (definendo la corona maggiore), mentre gli ossidrili primari legati al carbonio C6 si collocano sul bordo più stretto (corona minore) [7, 9].

L'interno della cavità macrociclica, invece, è rivestita dagli atomi di idrogeno legati ai carboni C3 e C5 e dagli ossigeni dei ponti glicosidici così da conferire all'ambiente interno della cavità un carattere marcatamente apolare e lipofilo, ideale per l'alloggiamento di molecole ospiti idrofobiche, mentre le due corone idrossiliche esterne garantiscono l'elevata idrofilia superficiale del macrociclo Figura 8 e 9 [7].

Al fine di modulare le proprietà chimico-fisiche e superare i limiti di solubilità della β -ciclodestrina nativa, sono stati sviluppati molti derivati sintetici attraverso la funzionalizzazione chimica degli ossidrili [7]. Questa derivatizzazione chimica è governata dalla differente reattività nucleofila e acidità degli idrossili presenti. Gli ossidrili primari in posizione C-6 situati sulla corona minore, sono più nucleofili e accessibili

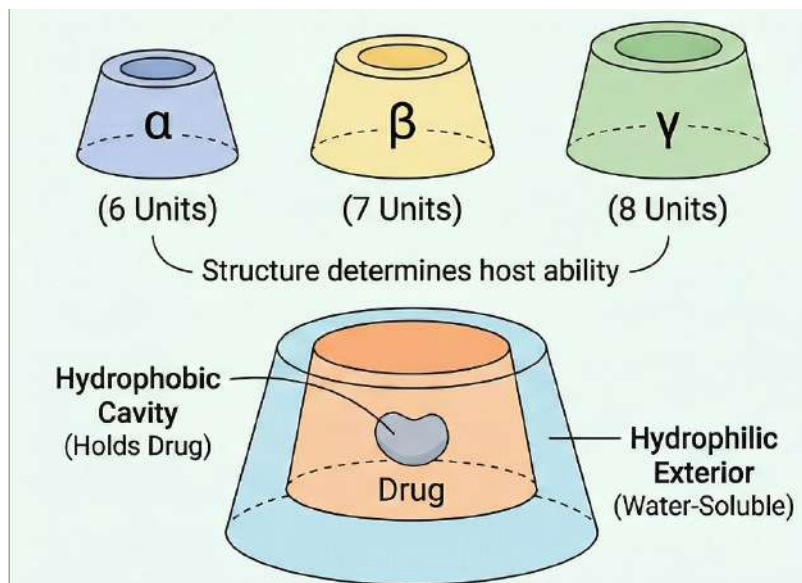


Figura 8: Rappresentazione schematica delle ciclodestrine native (α , β e γ) in base al numero di unità glucidiche (in alto) e del meccanismo di complessazione *host-guest* (in basso). Schema rielaborato sulla base dei modelli termodinamici di Loftsson e Brewster [7].

essendo liberi da ingombro sterico. Essi sono i primi a subire modificazioni e sono quindi il bersaglio principale delle reazioni di monosostituzione. Al contrario, l'idrossile secondario in posizione C-2 è il più acido, mentre la posizione C-3 è la più inaccessibile a causa dell'ingombro sterico, richiedendo spesso strategie di mascheramento con gruppi protettivi o l'orientamento intra-cavità del reagente per poter essere selettivamente modificata [10]. Sfruttando queste differenze tra diversi ossidrili reattivi, è possibile ottenere ciclodestrine con sostituzioni selettive per singoli ossidrili di ogni subunità glucopiranosidica isolando forme quali la 2,6-heptakis-O-dimetil- β -ciclodestrina o la 2,3,6-heptakis-O-trimetil- β -ciclodestrina.

Tra i principali gruppi funzionali introdotti per via sintetica sulle posizioni ossidriliche delle ciclodestrine si possono citare diversi derivati; metilici, carbossimetilici, idrossipropilici e solfobutileteri [7, 10]. È importante sottolineare che la maggior parte dei derivati disponibili in commercio non è costituita da singoli isomeri chimicamente puri o uniformemente sostituiti infatti non presentano nella nomenclatura il prefisso specifico *heptakis* (il quale richiederebbe l'occupazione di esattamente 7 gruppi idrossilici disposti simmetricamente sul macrociclo della β -CD) [8, 10].

Infatti tali prodotti si presentano come miscele polidisperse di vari isomeri, il cui profilo di solubilità e biocompatibilità è definito da un valore medio detto grado di sostituzione (*Degree of Substitution*, DS) [7, 10]. Un esempio è la *Random Methylated β -cyclodextrin* (RAMEB), un derivato parzialmente metilato in posizioni casuali che, grazie alle sue elevate proprietà solubilizzanti, si è ampiamente consolidato insieme alla solfobutileter- β -ciclodestrina (SBE- β -CD) nel mondo farmaceutico [7, 10].

Nonostante questo, la β -ciclodestrina nativa conserva un ruolo rilevante nelle formulazioni solide per via orale o topica grazie alla sua bassa tossicità intrinseca e ai

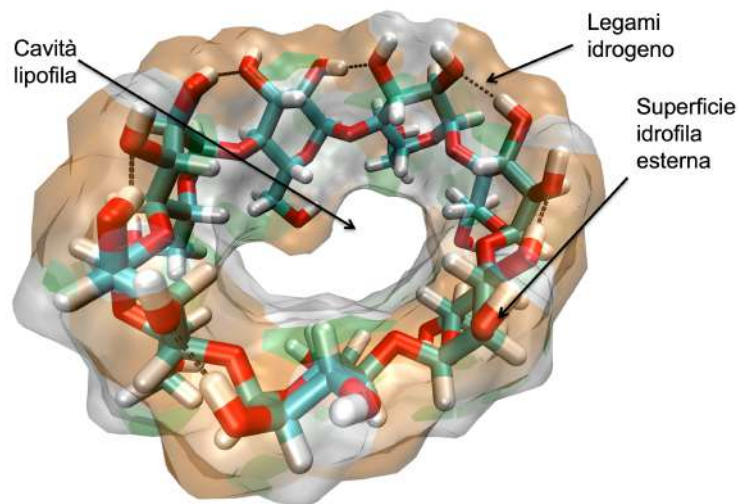


Figura 9: Rappresentazione tridimensionale della β -ciclodestrina. Lo scheletro molecolare è visualizzato in modalità licorice (atomi di carbonio in ciano, ossigeno in rosso e idrogeno in bianco). Legami idrogeno indicati con linea nera tratteggiata. In sovrapposizione, è mostrata in trasparenza la superficie di esclusione del solvente (superficie di Connolly), colorata in base alla lipofilia superficiale: l'arancione evidenzia le regioni idrofile (corone dei gruppi ossidrilici esterni), il bianco indica le zone neutre e il verde le zone altamente lipofila. Elaborazione grafica eseguita tramite il software VMD (versione 1.9.4a57) [6].

costi contenuti. La somministrazione parenterale sistemica è fortemente preclusa a causa di una marcata nefrotossicità, dovuta alla sua limitata solubilità e alla tendenza a precipitare sotto forma di complessi insolubili nei tubuli renali [7]. Lo sviluppo dei derivati sintetici idrofili, in particolare della HP- β -CD e della SBE- β -CD, risponde proprio a questa stringente necessità tossicologica, garantendo un'altissima solubilità acquosa e un eccellente profilo di sicurezza e biocompatibilità per via endovenosa [7].

Nell'ambito della ricerca preclinica e nelle fasi iniziali di caratterizzazione di nuovi sistemi di *drug delivery*, i derivati metilati rivestono invece un ruolo fondamentale [9, 10]. Grazie alla marcata idrofobicità impressa alla cavità dall'introduzione dei gruppi metilici, questi eccipienti mostrano capacità solubilizzanti straordinarie nei test *in vitro* e *in vivo*, spesso superiori a quelle dei derivati idrofili classici [9]. Il loro impiego nella ricerca preclinica è ampiamente consolidato e standardizzato, in quanto fungono da eccellenti modelli di riferimento analitico e supramolecolare per valutare la massima affinità di inclusione teorica di candidati farmaceutici ad elevata lipofilia, giustificando lo screening e lo studio comparativo nelle prime fasi di sviluppo formulativo [9, 10].

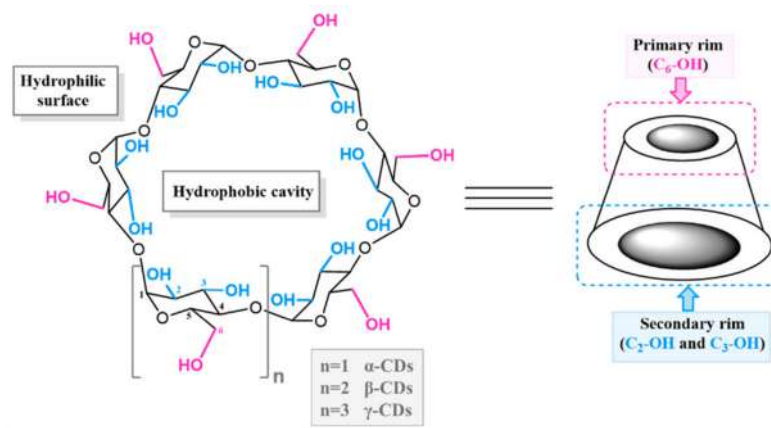


Figura 10: Rappresentazione strutturale e conformazionale delle ciclodestrine. Il modello a tronco di cono (a destra) evidenzia la differenziazione topologica dei gruppi ossidrilici: la corona primaria (in rosa, gruppi $-OH$ in C_6) e la corona secondaria (in azzurro, gruppi $-OH$ in C_2 e C_3). Tale orientamento conferisce alla molecola una superficie esterna idrofila e una cavità interna idrofobica, idonea ad ospitare molecole lipofile. Figura riprodotta da Musuc et al., 2024 [9].

1.2.1 Caratteristiche funzionali delle Ciclodestrine

Grazie alla capacità di formare complessi di inclusione stabili, le ciclodestrine trovano applicazione in numerosi comparti industriali, tra cui il settore alimentare, tessile, cosmetico, dell'igiene personale, agrario e biomedicale [8, 9]. Nel contesto delle scienze farmaceutiche, l'utilizzo primario di questi macrocicli risiede nell'incremento della solubilità acquosa apparente e della velocità di dissoluzione di principi attivi scarsamente solubili, migliorandone significativamente la biodisponibilità sistemica [7].

Inoltre, negli anni la complessazione di molecole con ciclodestrine ha permesso di stabilizzare composti chimicamente labili contro i processi di ossidazione, fotolisi o idrolisi, ridurre l'evaporazione di sostanze volatili, mascherare odori o sapori sgradevoli e convertire liquidi oleosi in solidi amorfi o cristallini facilmente lavorabili per esempio nella formulazione di diverse forme farmaceutiche [9, 7].

L'efficacia e la versatilità formulativa delle ciclodestrine sono comprovate da molteplici specialità medicinali approvate e capillarmente diffuse sul mercato internazionale, i cui alcuni esempi sono raccolti in Tabella 1.

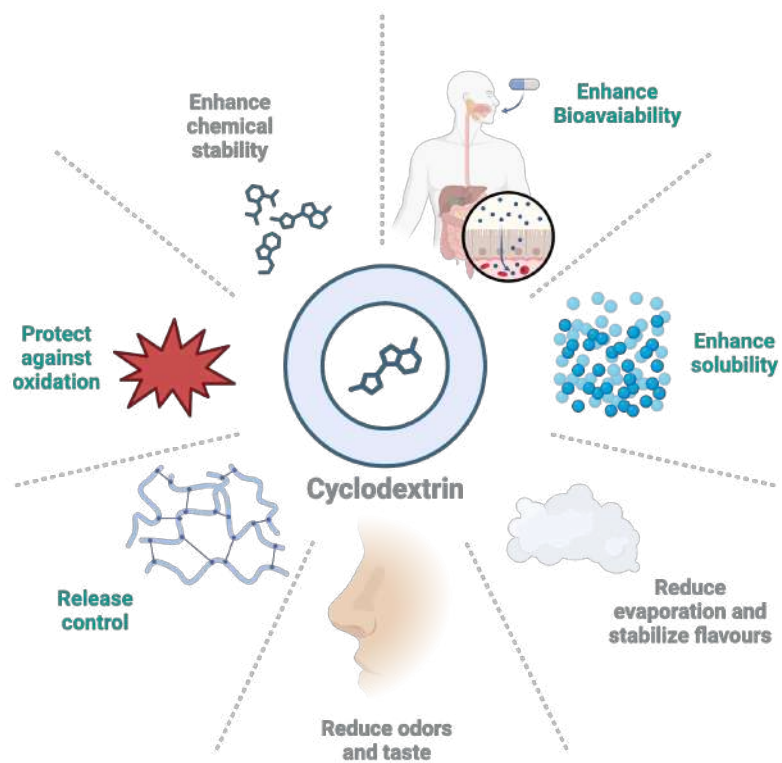


Figura 11: Principali funzioni delle ciclodestrine.

Tabella 1: Elenco dei principali derivati di Ciclodestrine farmaceutici commerciali, tratti da [7].

Farmaco/ciclodestrina	Nome commerciale	Formulazione	Azienda (paese)
<i>α-Ciclodestrina (αCD)</i>			
Alprostadiil	Caverject Dual	Soluzione endovenosa	Pfizer (Europa)
Cefotiam-esetile HCl	Pansporin T	Compresa	Takeda (Giappone)
Limaprost	Opalmon	Compresa	Ono (Giappone)
PGE1	Prostavastin	Soluzione parenterale	Ono (Giappone); Schwarz (Europa)
<i>β-Ciclodestrina (βCD)</i>			
Benexato HCl	Ulgut, Lonmiel	Capsula	Teikoku (Giappone); Shionogi (Giappone)
Cefalosporina	Meiact	Compresa	Meiji Seika (Giappone)
Cetirizina	Cetrizin	Compresa masticabile	Losan Pharma (Germania)
Clordiazepossido	Transillium	Compresa	Gador (Argentina)
Desametasone	Glymesason	Unguento, compresa	Fujinaga (Giappone)
Destrometorfano	Rynathisol		Synthelabo (Europa)
Difenidramina e clorteofillina	Stada-Travel	Compresa masticabile	Stada (Europa)
Etinilestradiolo e drospirenone	Yaz	Compresa	Bayer (Europa, USA)
Iodio	Mena-Gargle	Soluzione	Kyushin (Giappone)
Meloxicam	Mobitil	Compresa e supposta	Medical Union (Egitto)
Nicotina	Nicorette	Compresa sublinguale	Pfizer (Europa)
Nimesulide	Nimedex	Compresse	Novartis (Europa)
Nitroglicerina	Nitropen	Compresa sublinguale	Nihon Kayaku (Giappone)
Omeprazolo	Omebeta	Compresa	Betafarm (Europa)
PGE2	Prostarmon E	Compresa sublinguale	Ono (Giappone)
Piroxicam	Brexin, Flogene, Cicladon	Compresa, supposta	Chiesi (Europa); Aché (Brasile)
Acido tiaprofenico	Surgamyl	Compresa	Roussel-Maestrelli (Europa)
<i>2-Idrossipropil-β-ciclodestrina (HPβCD)</i>			
Cisapride	Propulsid	Supposta	Janssen (Europa)
Indometacina	Indocid	Collirio	Chauvin (Europa)
Itraconazolo	Sporanox	Soluzione orale ed endovenosa	Janssen (Europa, USA)
Mitomicina	MitoExtra, Mitozytrex	Infusione endovenosa	Novartis (Europa)
<i>Sulfobutiletere β-ciclodestrina sale sodico (SBEβCD)</i>			
Aripiprazolo	Abilify	Soluzione intramuscolare	Bristol-Myers Squibb (USA); Otsuka Pharm. (USA)
Maropitant	Cerenia	Soluzione parenterale	Pfizer Animal Health (USA)
Voriconazolo	Vfend	Soluzione endovenosa	Pfizer (USA, Europa, Giappone)
Ziprasidone mesilato	Geodon, Zeldox	Soluzione intramuscolare	Pfizer (USA, Europa)
<i>β-ciclodestrina metilata casualmente (RMβCD)</i>			
17 β -Estradiolo	Aerodiol	Spray nasale	Servier (Europa)
Cloramfenicolo	Clorocil	Collirio	Oftalder (Europa)
<i>γ-Ciclodestrina (γCD)</i>			
Tc-99 Teborossima ^a	CardioTec	Soluzione endovenosa	Squibb Diagnostics (USA)
<i>2-Idrossipropil-γ-ciclodestrina (HPγCD)</i>			
Diclofenac sodico	Voltaren Ophtha	Collirio	Novartis (Europa)
Tc-99 Teborossima ^a	CardioTec	Soluzione endovenosa	Bracco (USA)

^aUn prodotto precedente conteneva γCD ma è stato sostituito da HP γCD nel prodotto attuale.

1.2.2 Ciclodestrine e farmaci antitumorali

Nel panorama dello sviluppo farmaceutico oncologico contemporaneo, la formulazione delle nuove entità chimiche rappresenta una sfida tecnologica di primaria importanza: si stima infatti che circa il 90% dei candidati chemioterapici e degli inibitori enzimatici emergenti sia caratterizzato da un'estrema idrofobicità e da una solubilità acquosa intrinseca insufficiente, elementi clinici critici che ne compromettono l'assorbimento e la biodisponibilità sistemica [7, 11]. L'impiego di ciclodestrine chimicamente modificate e altamente biocompatibili per via endovenosa, come la HP- β -CD e la SBE- β -CD, si è rivelato un approccio fondamentale per l'allestimento di preparazioni parenterali stabili, evitando il ricorso a cosolventi organici o tensioattivi industriali potenzialmente tossici o responsabili di gravi reazioni anafilattiche in utilizzi clinici [7].

A differenza dei sistemi basati su modifiche covalenti o sullo sviluppo di complessi coniugati, la strategia d'elezione per preservare l'integrità chimica originaria del principio attivo consiste nella formazione di complessi supramolecolari [7, 11]. Infatti, grazie all'incapsulamento molecolare, il farmaco o una sua porzione lipofila viene ospitata all'interno della cavità apolare del macrociclo attraverso a interazioni molecolari, quali forze di van der Waals, legami a idrogeno e interazioni a bassa intensità di dipolo, lasciando inalterata la struttura e quindi la farmacodinamica della molecola complessata [7].

Una volta allestito in soluzione acquosa e somministrato, il complesso di inclusione (*host-guest*) si trova in un costante equilibrio dinamico di associazione e dissociazione con la frazione di farmaco libero, regolato dalla costante di stabilità o formazione (K_c) [7, 11]. Nell'atto dell'immissione nel torrente circolatorio, la massiccia diluizione fisiologica costituisce il fattore principale di rilascio del principio attivo [7]. A questo processo concorrono anche il legame competitivo con le proteine plasmatiche e la ripartizione del farmaco verso i tessuti lipofili [7].

Questo rilascio spontaneo e immediato rende la frazione di farmaco libero prontamente disponibile per superare la resistenza dello strato acquoso stazionario (*unstirred water layer*, UWL) che riveste le membrane biologiche [7]. Le ciclodestrine agiscono incrementando la permeabilità attraverso questo strato acquoso, fungendo da *carrier* molecolari che mantengono un elevato gradiente di concentrazione all'interfaccia con la membrana cellulare [7]. Una volta raggiunta l'interfaccia cellulare, il farmaco può quindi ripartirsi e diffondere passivamente verso il proprio bersaglio.

Oltre alle formulazioni in soluzione per infusione sistemica, la versatilità delle ciclodestrine ne permette l'integrazione in sistemi avanzati per il trattamento localizzato di tumori solidi, come idrogel iniettabili auto-assemblanti e scaffold tridimensionali impiantabili [12, 13]. Nel contesto di tumori solidi sottoposti a resezione chirurgica, come nel carcinoma mammario, l'impiego di scaffold polimerici bio-riassorbibili (es. a base di gelatin-metacrilato e pectina) caricati con complessi di ciclodestrina permettono il rilascio costante di farmaco su cellule rimaste in loco che potrebbero causare una nuova insorgenza della malattia [12].

Le modalità per il drug delivery con strategie supramolecolari costituiscono una base per l'utilizzo di ciclodestrine in ambito biofarmaceutico per candidati farmaci

fortemente lipofili, riuscendo ad evitare il ricorso a modifiche covalenti che potrebbero compromettere la loro attività farmacodinamica [11]. Le potenzialità cliniche di questi approcci sono testimoniate da diverse specialità medicinali iniettabili e sistemi in fase avanzata di sperimentazione basati su derivati ciclodestrinici (Tabella 2).

Tabella 2: Tabella riassuntiva dei sistemi di rilascio di farmaci basati su CD discussi correlati ai tipi di tumore bersaglio. Tratti da [11].

Nanocarrier basato su CD	Agente/i antitumorale/i	Tipo/i di tumore
Permetil- β -CD legata con ponte disolfuro	Camptotecina	Tumore al polmone
α -CD, β -CD e (2-idrossipropil)- β -CD	Inibitore di Porcupine LGK974	Tumore al polmone
β -CD rivestita con PLGA	Erlotinib	Tumore al polmone
Sulfobutiletere- β -CD	Resveratrolo	Tumore al polmone
Sulfobutiletere- β -CD	Celastrolo	Tumore al polmone
Copolimeri a blocchi di β -CD e policaprolattone coniugati con acido folico	Metformina	Tumore al polmone
γ -CD, α -CD e β -CD	Propoli neozelandese	Adenocarcinoma del colon-retto, tumore al colon, tumore gastrico, carcinoma a cellule squamose dell'esofago
Idrossipropil- β -CD	Clausenidina	Tumore al colon
β -CD/phillipsite	Oxaliplatino	Tumore del colon-retto
Metil- β -CD con aggiunta di folato	Acido ialuronico innestato con adamantano	Tumore del colon-retto
Polimeri cationici di CD	5-fluorouracile e Interleuchina-2	Tumore del colon-retto
CD anfifilica modificata con polietilenglicole mirata ai recettori dei folati	Ginsenoside Rg3 e quercetina	Tumore del colon-retto
CD cationica anfifilica modificata con polietilenglicole mirata ai recettori dei folati	Docetaxel e siRNA	Tumore del colon-retto
CD anfifiliche rivestite con polietilenimina o chitosano	Camptotecina	Tumore del colon-retto
Poli(β -CD)	Profarmaco del platino (IV) [Pt(IV)-ADA2]	Tumore del colon-retto
Acido folico-polietilenglicole- β -CD	Doxorubicina	Tumore al fegato

Continua nella pagina successiva...

Tabella 2 – Continua dalla pagina precedente

Nanocarrier basato su CD	Agente antitumorale	Tipo di tumore
β -CD modificata con acido lattobionico accoppiata a polietilenglicole	Doxorubicina	Tumore al fegato
Nanoparticelle di silice mesoporosa con gate di β -CD funzionalizzate con un polimero innestato con azobenzene/galattosio	Doxorubicina	Tumore al fegato
Acido folico-polietilenglicole- β -CD	Doxorubicina	Tumore al seno
Polimero di β -CD	DNAzima che scinde l'RNA mirato al gene c-Myc	Tumore al seno
Nanoparticelle magnetiche di ossido di grafene dendrimerico funzionalizzate con β -CD	Doxorubicina	Tumore al seno
β -CD modificata con D- α -tocoferolo polietilenglicole 1000 succinato	Genisteina	Tumore al seno
Acido folico-polietilenglicole- β -CD	Coniugato di adamantano e fluoroforescente nel vicino infrarosso	Tumore al seno
Permetil- β -CD	Meso-tetrafenilporfirina e meso-tetra(m-idrossifenil)porfirina	Tumore al seno
β -CD e poli(2-etil-2-ossazolina) incorporate con nanoparticelle di ossido di ferro	Doxorubicina cloridrato	Tumore al seno
Composito β -CD-chitosano	L-asparaginasi	Tumore alla prostata
β -CD	Carvacrolo	Tumore alla prostata
β -CD caricata in micelle stereocomplesse di polilattide	Doxorubicina	Tumore della cervice
CD caricate in liposomi pegilati	Inibitore di Pin1	Tumore ovarico
β -CD	Ticlopidina cloridrato	Tumore al rene

Continua nella pagina successiva...

Tabella 2 – Continua dalla pagina precedente

Nanocarrier basato su CD	Agente antitumorale	Tipo di tumore
Idrossipropil- β -CD	Taccalonolide A	Tumore al rene
Polimeri a base di CD	Camptotecina	Tumore al cervello
CD caricate in liposomi	Butilideneftalide	Tumore al cervello
Idrossipropil- β -CD	Disulfiram	Tumore al cervello
Nanoparticelle magnetiche rivestite di CD cationica	Metotrexato	Tumore osseo
β -CD magnetica iper-ramificata	Doxorubicina	Tumore osseo
Coniugati ternari polietilenimmina-bisfosfonato-CD	Doxorubicina	Tumore osseo
Idrossipropil- β -CD	Saikosaponina-d	Tumore della pelle
β -CD, γ -CD e γ -CD funzionalizzate con gruppi arginina-glicina-acido aspartico o arginina	Doxorubicina e oxaliplatino	Tumore al polmone, tumore al fegato
β -CD	Acetilshiconina	Tumore del colon-retto, adenocarcinoma mammario

1.3 Complessi di inclusione farmaco-ciclodestrina

La formazione di complessi di inclusione rappresenta il meccanismo chimico-fisico primario attraverso il quale le ciclodestrine esercitano la loro azione solubilizzante nei confronti di molecole ospiti lipofile e scarsamente idrosolubili. In ambiente acquoso questo fenomeno è governato da un equilibrio dinamico di tipo reversibile e non covalente [14]. Durante il processo, l'intera molecola ospite (*guest*), o una sua porzione lipofila si inserisce all'interno della cavità apolare della ciclodestrina (*host*), senza che si verifichi la formazione o la rottura di legami chimici covalenti [15].

La forza motrice termodinamica alla base della complessazione è di natura multifattoriale, dominata principalmente da un contributo entalpico favorevole e da fenomeni di compensazione entalpico-entropica correlati alla ristrutturazione del solvente [14]. Il processo avviene anche grazie alla destabilizzazione e il successivo rilascio delle molecole d'acqua originariamente confinate all'interno della cavità della ciclodestrina. L'ingresso della molecola ospite idrofobica determina l'uscita di queste molecole d'acqua nel *bulk* della soluzione, mentre il complesso viene ulteriormente stabilizzato a corto raggio da forze di Van der Waals, interazioni a bassa intensità di dipolo, legami a idrogeno e interazioni elettrostatiche Figura 12 [14].

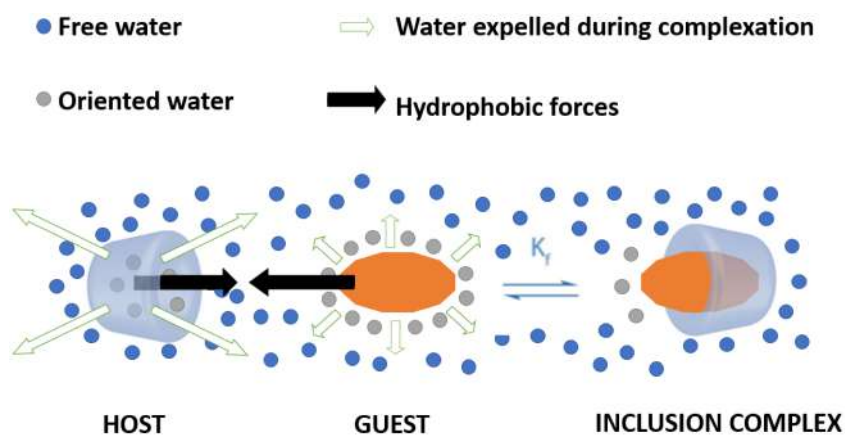


Figura 12: Rappresentazione schematica della formazione del complesso di inclusione tra CD (host) e guest. Figura riprodotta da Puăduraru et al., 2022 [11]

1.3.1 Stechiometria e costante di stabilità

L'equilibrio termodinamico che regola la formazione di un complesso di inclusione con stechiometria classica 1 : 1 può essere descritto come:



dove CD indica la concentrazione di ciclodestrina libera, D rappresenta il farmaco (*drug*) in forma libera, e $CD \cdot D$ definisce il complesso formato in soluzione [14]. L'affinità e la stabilità termodinamica del sistema vengono quantificate mediante la costante di stabilità apparente ($K_{1:1}$), ricavata applicando la legge dell'azione di massa

all'equilibrio:

$$K_{1:1} = \frac{[CD \cdot D]}{[CD][D]} \quad (2)$$

Per i sistemi di interesse farmaceutico, i valori di $K_{1:1}$ oscillano generalmente tra 50 e 2000 M^{-1} . Costanti troppo basse ($K_{1:1} < 50 M^{-1}$) indicano interazioni deboli con incrementi di solubilità trascurabili. Al contrario, valori troppo elevati ($K_{1:1} > 2000 M^{-1}$) descrivono un legame forte con la ciclodestrina, tanto da limitare il farmaco libero in soluzione e quindi diminuire l'attività del farmaco in quanto sequestrato dalla ciclodestrina [14]. Il rapporto stechiometrico 1 : 1 è il più comune ma la geometria molecolare del principio attivo può favorire stechiometrie superiori, quali complessi 1 : 2 o 2 : 1.

1.3.2 Analisi della solubilità di fase (Diagrammi di Higuchi-Connors)

Il modello teorico e sperimentale cardine per la determinazione quantitativa delle costanti di equilibrio e della stechiometria dei complessi è l'analisi della solubilità di fase, introdotta da Higuchi e Connors [16]. Il metodo prevede lo studio della solubilità totale del farmaco in presenza di concentrazioni molari crescenti di ciclodestrina a temperatura costante. I diagrammi risultanti si suddividono in due macro-classi: Tipo A (complessi solubili) e Tipo B (complessi a solubilità limitata) Figura 13 [14].

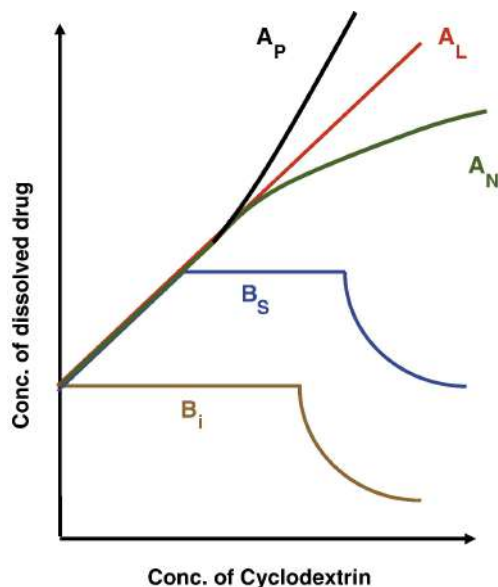


Figura 13: Rappresentazione grafica dei profili fase-solubilità A e B con sottotipi applicabili (A_P , A_L , A_N e B_S , B_i). Figura riprodotta da Brewster et al., 2007 [14]

Diagrammi di Tipo A. All'aumentare della concentrazione del legante si osserva un incremento della solubilità del principio attivo. Questa categoria si suddivide in tre profili:

- **Tipo A_L (Lineare):** La solubilità aumenta in modo linearmente proporzionale alla concentrazione di ciclodestrina, indicando la formazione di complessi solubili

a stechiometria unitaria (1 : 1). In questo scenario, la costante $K_{1:1}$ si calcola a partire dalla pendenza della retta e dalla solubilità intrinseca del farmaco (S_0), mediante la relazione [14]:

$$K_{1:1} = \frac{\text{pendenza}}{S_0 \cdot (1 - \text{pendenza})} \quad (3)$$

- **Tipo A_P (Positivo):** Il profilo mostra una deviazione positiva dalla linearità, suggerendo la formazione di complessi di ordine superiore (es. stechiometria 1 : 2) [14].
- **Tipo A_N (Negativo):** Presenta una deviazione negativa, attribuibile a variazioni delle proprietà del solvente indotte dal macrociclo o a fenomeni di auto-associazione del legante, con una conseguente minore efficienza di solubilizzazione per il farmaco [14].

Diagrammi di Tipo B. I diagrammi di Tipo B sono indicativi della formazione di complessi caratterizzati da una solubilità limitata in acqua.

- **Tipo B_S :** presenta un iniziale incremento lineare della solubilità del farmaco fino al raggiungimento di un plateau, che indica la saturazione del sistema e quindi la concomitante precipitazione del complesso solido. Durante questa fase, l'introduzione di ulteriore legante converte il farmaco solubilizzato in complesso solido, questo permette al farmaco indissolto di solubilizzarsi in acqua, fino al completo esaurimento del corpo di fondo in eccesso.
- **Tipo B_I :** descrive uno scenario in cui il complesso d'inclusione risulta insolubile già dalle prime fasi, determinando un'immediata precipitazione del sistema senza alcun incremento apprezzabile della concentrazione di farmaco in soluzione.

[14].

Deviazioni del metodo di Higuchi-Connor Sebbene l'approccio classico di Higuchi-Connors interpreti la solubilizzazione assumendo la presenza esclusiva di specie monodisperse isolate, la moderna ricerca farmaceutica ha dimostrato che le ciclodestrine e i loro complessi esibiscono comportamenti cooperativi più complessi. Le molecole di ciclodestrina tendono infatti spontaneamente ad auto-associarsi in ambiente acquoso mediante interazioni transienti esterne legame-legame, portando alla formazione di aggregati supramolecolari organizzati sotto forma di nano- e microparticelle polidisperse [14, 17].

Questi aggregati molecolari modificano l'assunto teorico della pura inclusione: la solubilizzazione dei farmaci lipofili è aiutata anche da meccanismi non-inclusivi o di tipo *cluster*, in cui il farmaco viene adsorbito sulla superficie esterna degli aggregati o intrappolato negli spazi interstiziali del reticolo particellare [14]. Questa attitudine all'auto-associazione spiega le frequenti deviazioni non lineari osservate e sottolinea come la scelta della tecnica estrattiva o preparatoria allo stato solido possa essere

valida per la sintesi di complessi di inclusioni con un elevato profilo biofarmaceutico [18, 19].

1.3.3 Tecniche per la sintesi di complessi di inclusione allo stato solido

La formazione di complessi di inclusione allo stato solido richiede l'impiego di metodologie mirate a ottimizzare l'interazione molecolare tra *host* e *guest*. Le tecniche principali documentate in letteratura includono la co-precipitazione da soluzione satura (evaporazione del solvente), l'impastamento meccanico (*kneading*), la co-macinazione energetica (*co-grinding* o *ball milling*), la liofilizzazione (*freeze-drying*) e lo *spray-drying* [19, 18].

La liofilizzazione e la co-precipitazione consentono di isolare strutture altamente porose partendo da equilibri stechiometrici precisi in soluzione. I metodi basati sull'energia meccanica, come il *kneading* o la co-macinazione (*ball milling*), sfruttano i principi dell'attivazione mecano-chimica indotta da impulsi cinetici ripetuti. Questo processo fornisce molta energia al sistema determinando una riduzione granulometrica e una progressiva amorfizzazione dei solidi [20]. Questa condizione di stress energetico favorisce la diffusione molecolare allo stato solido favorendo così la transizione del sistema verso una dispersione solida amorfa o verso il complesso d'inclusione. In questo contesto, l'aggiunta di una quantità minima e substechiometrica di solvente, co-macinazione assistita da liquidi (*liquid-assisted grinding*), agisce da promotore cinetico, incrementando la mobilità e la dispersione molecolare all'interfaccia per favorire una formazione più rapida ed efficiente del complesso rispetto alla macinazione a secco Figura 14[20, 14, 19].

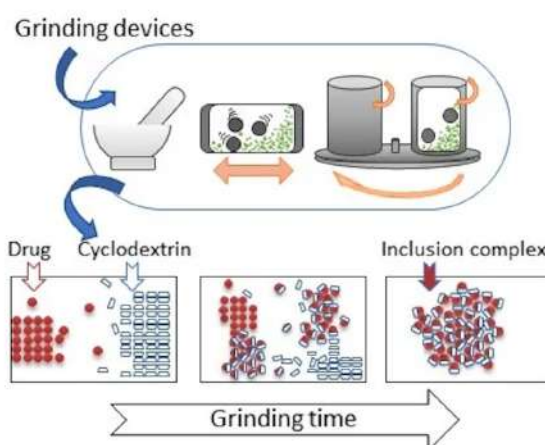


Figura 14: Rappresentazione schematica del processo di formazione del complesso di inclusione in stato solido tramite macinazione. Figura riprodotta da Jug et al., 2018 [20]

1.4 Dinamica Molecolare applicata alla Complessazione Supramolecolare

La caratterizzazione a livello atomico dei meccanismi di riconoscimento *host-guest* rappresenta un elemento cardine per la razionalizzazione e la progettazione di sistemi supramolecolari basati su cicloestrine. Negli ultimi decenni, la Dinamica Molecolare (MD) classica si è affermata come uno strumento computazionale indispensabile per investigare la stabilità e le preferenze conformazionali di questi complessi in soluzione. Nonostante questo, lo studio dei processi cinetici spontanei di associazione (*binding*) mediante MD convenzionale presenta limitazioni intrinseche dovute a tempi di campionamento proibitivi e richieste di risorse computazionali elevate. La complessazione di un ligando all'interno della cavità macrociclica è un evento raro che richiede spesso tempi di simulazione nell'ordine dei microsecondi o dei millisecondi per poter essere osservato spontaneamente, comportando richieste di calcolo computazionale estremamente elevate [21].

Nelle simulazioni convenzionali, gran parte del tempo di calcolo computazionale viene speso improduttivamente nel movimento del ligando (*guest*) all'interno del bulk del solvente, dove la molecola tende ad allontanarsi dal sito di legame ritardando il *binding* supramolecolare. Di conseguenza, la MD classica viene frequentemente confinata alla sola ottimizzazione di pose pre-formate o ottenute tramite docking molecolare, senza riuscire a descrivere l'intero cammino di associazione.

L'impiego di approcci classici di *enhanced sampling*, come la metadinamica o la *steered molecular dynamics*, si scontra spesso con la necessità di definire coordinate di reazione predefinite lungo le quali applicare forze artificiali o *bias* energetici. Nel caso di sistemi supramolecolari complessi, tale forzatura geometrica aumenta il rischio di intrappolare il sistema in stati non fisici, forzando orientamenti del *guest* chimicamente improbabili. Inoltre, l'introduzione di un *bias* energetico complica notevolmente la quantificazione termodinamica del sistema, richiedendo complessi algoritmi di campionamento per risalire alle reali proprietà energetiche del processo [22].

In questo scenario, la Dinamica Molecolare Supervisionata (SuMD) si propone come un'efficace alternativa capace di accelerare l'osservazione degli eventi di riconoscimento molecolare, riducendo i tempi di simulazione fino a tre ordini di grandezza rispetto alla MD classica e senza l'introduzione di alcun *bias* energetico al sistema. L'algoritmo SuMD agisce esclusivamente attraverso una supervisione geometrica, valutando l'approccio tra le molecole in finestre temporali definite (*e.g.*, 300 ps). Il protocollo procede attraverso una serie di brevi simulazioni consecutive di dinamica molecolare convenzionale e non supervisionata [23]. Al termine di ciascuno step, viene calcolata la distanza tra i centri di massa dell'*host* e del *guest* per ogni frame registrato. I dati geometrici così ottenuti vengono sottoposti a un'interpolazione lineare: se la retta risultante mostra una pendenza (*slope*) negativa, indicando l'efficace avvicinamento del *guest* alla cavità dell'*host*, lo step viene considerato produttivo e la simulazione prosegue regolarmente [23]. Al contrario, qualora si registri una pendenza positiva, e quindi un allontanamento tra le due molecole, lo step viene scartato. In questo caso, la simulazione viene riavviata a partire dalle coordinate finali dell'ultimo step produttivo,

procedendo alla riassegnazione casuale delle velocità atomiche secondo la distribuzione di Boltzmann mediante l'algoritmo del termostato di Langevin [23]. Questa strategia costringe il sistema a esplorare porzioni differenti dello spazio conformazionale, azzerando i tempi morti computazionali ma preservando il corretto campionamento statistico nell'ensemble canonico (NVT), in cui il numero di particelle, il volume del box e la temperatura del sistema sono rigorosamente mantenuti costanti Figura 15.

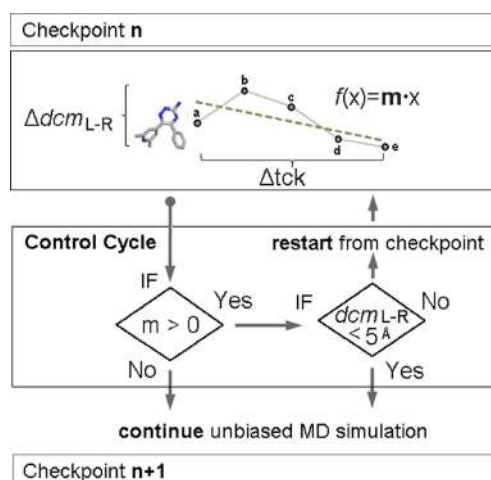


Figura 15: Schema del vettore di distanza ligando-recettore (dcm_{L-R}) algoritmo di supervisione implementato nella tecnica di Dinamica Molecolare Supervisionata (SuMD)[24]

Il software SuMD presenta un'elevata versatilità, consentendo di monitorare sia il centro di massa globale delle molecole sia specifiche porzioni o atomi chiave definiti dall'utente [22]. Questo ottimizza il campionamento della traiettoria lungo il cammino di inclusione, risultando cruciale per orientare correttamente le molecole in base alla loro natura chimica. Questa tecnica permette quindi di ricostruire i meccanismi di coordinazione supramolecolare su scale temporali dei nanosecondi anziché dei microsecondi, conservando la piena flessibilità termodinamica e conformazionale di tutti i componenti del sistema e permettendo l'identificazione di stati intermedi di legame che anticipano l'inclusione finale [22].

1.5 Analisi termo-gravimetriche (TGA)

L'analisi termogravimetrica (TGA) rappresenta una tecnica analitica di fondamentale importanza nella caratterizzazione chimico-fisica dei sistemi supramolecolari allo stato solido [25, 26]. Questa metodologia consente di monitorare le variazioni di massa di un campione in funzione della temperatura (o del tempo) in condizioni di un'atmosfera controllata, fornendo informazioni sui processi cinetici ed energetici associati alla perdita di solventi, alla volatilizzazione o alla degradazione termica dei composti [25, 26].

Per riuscire a valutare l'efficacia della strategia di complessazione nello stato solido, è necessario il confronto tra i profili TGA/DTG dei singoli componenti, della corri-

spondente miscela fisica e dei prodotti ottenuti per co-macinazione, per discriminare una reale transizione di fase supramolecolare da una dispersione solida. [26].

Nel contesto dello studio delle ciclodestrine native (come la β -ciclodestrina) e dei loro derivati modificati, il profilo termogravimetrico classico è generalmente caratterizzato da un andamento a stadi [25, 26]:

- **Un primo stadio di disidratazione (fino a $\sim 105\text{--}110\text{ }^{\circ}\text{C}$):** associato alla perdita delle molecole di acqua di idratazione [25, 26] che stabilizzano la struttura della ciclodestrina nel loro stato cristallino. La percentuale di perdita di massa in questa regione varia in base al tipo di ciclodestrina (pari a $\sim 13.1\%$ per la β -CD nativa e a valori inferiori per i derivati funzionalizzati) [25].
- **Un plateau di stabilità termica (generalmente compreso tra $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $270\text{ }^{\circ}\text{C}$):** in cui il macrociclo anidro non registra variazioni significative di peso [25].
- **Un secondo stadio di decomposizione pirolitica (oltre i $300\text{ }^{\circ}\text{C}$):** corrispondente alla progressiva degradazione termica dell’anello oligosaccaridico [25, 26].

Quando si valuta la formazione di un sistema supramolecolare, la TGA offre un contributo analitico prettamente qualitativo, che viene associato ad altre tecniche, come la calorimetria a scansione differenziale (DSC) e la diffrazione a raggi X su polveri (PXRD) [25, 26]. Il primo indizio di un’avvenuta interazione nello stato solido si osserva grazie alla variazione del profilo di disidratazione del macrociclo [25, 26]. Durante il processo di complessazione, si verifica lo spostamento delle molecole d’acqua dalla cavità ciclodestrinica, ad opera della molecola ospite (*guest*), secondo il modello noto come “*guest-in, water-out*” [25, 27].

Tramite l’analisi di questo fenomeno può essere possibile determinare quantitativamente un eventuale formazione del complesso. Spesso però l’analisi quantitativa di questo primo picco presenta notevoli complessità sperimentali; lo scambio e la ritenzione di umidità risentono drasticamente delle condizioni termo-igrometriche ambientali e delle condizioni di processo sperimentale e di manipolazione dei campioni prima dell’analisi. A temperature superiori si analizza la variazione del profilo di stabilità termica dei singoli componenti, che varia nel caso in cui vi siano interazioni supramolecolari, per esempio spesso la cavità macrociclica esercita un effetto schermante e protettivo nei confronti della molecola ospite, aumentandone la stabilità termica e ritardando la decomposizione pirolitica [25, 26].

Un’altra variazione dello spettro si può verificare per una transizione da un arrangiamento cristallino ordinato a una fase amorfa, questa comporta la rottura del reticolo cristallino originario [26]. La rottura del reticolo cristallino aumenta la suscettibilità termica del solido a causa della minore energia reticolare coesiva, che si traduce sperimentalmente in un’anticipazione dei processi degradativi e in una conseguente diminuzione della temperatura di inizio decomposizione (T_{onset}) e di conseguenza, dei picchi della derivata termogravimetrica (DTG) [26].

1.6 Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier misura le transizioni vibrazionali dei legami molecolari. Una molecola assorbe radiazione infrarossa solo quando la vibrazione coinvolta modula il momento di dipolo, condizione che lega ogni banda di assorbimento a uno specifico gruppo funzionale [28]. Lo spettro risultante delinea un'impronta univoca del campione. A combinazioni atomiche differenti corrispondono infatti profili di assorbimento specifici. La posizione e l'intensità delle bande consentono così di identificare la precisa struttura chimica del composto [28]. La trasformata di Fourier ricostruisce l'intero spettro da un singolo interferogramma, garantendo elevato rapporto segnale-rumore e tempi di acquisizione ridotti.

La modalità a riflettanza totale attenuata (ATR) supera i vincoli della trasmissione classica eliminando la preparazione delle pastiglie di KBr. Questa semplificazione azzerava l'indeterminazione legata al cammino ottico del campione. Lo spessore del materiale non incide più sulla qualità del dato, garantendo una riproducibilità geometrica costante e indipendente dall'operatore. Il nucleo della misura risiede nelle proprietà ottiche del cristallo di campionamento caratterizzato da un alto indice di rifrazione. Questo elemento induce la riflessione totale interna del fascio infrarosso proprio sulla superficie interfacciale. La riflessione totale interna del fascio sull'interfaccia cristallo-campione genera un'onda evanescente, che penetra per pochi micrometri nel materiale a contatto, registrandone l'assorbimento in modo diretto e altamente riproducibile [28]. La geometria a riflessione singola consente di analizzare polveri e solidi direttamente sul cristallo, riducendo le interferenze e standardizzando il cammino ottico [28].

Nello studio dei complessi di inclusione con ciclodestrine la tecnica individua le interazioni host-guest attraverso lo spostamento, l'attenuazione o la scomparsa delle bande caratteristiche del guest rispetto alla miscela fisica dei componenti. L'incapsulamento nella cavità ciclodestrinica limita la libertà vibrazionale dei gruppi molecolari segregati. Da questa restrizione sterica consegue la perturbazione netta delle vibrazioni dei gruppi funzionali coinvolti nei legami idrogeno. Per esempio, nei complessi tra catechina e β -CD lo spostamento dello *stretching* O-H verso numeri d'onda inferiori rivela la stabilizzazione del guest tramite interazioni intracavitarie [29]. Nel caso invece di antiossidanti fenolici, la contrazione dell'intensità del segnale ossidrilico e lo smorzamento delle bande del nucleo aromatico confermano l'avvenuto inserimento nel macrociclo [30]. Il confronto sistematico con la miscela fisica permette di isolare la reale perturbazione legata al processo di inclusione. Questo approccio esclude i contributi spettrali generati dalla presenza dei due componenti nel campione. La strategia cancella simultaneamente gli artefatti derivanti dallo stress meccanico della co-macinazione, che potrebbero modificare i profili indipendentemente dall'effettiva interazione host-guest [31].

2 Materiali e metodi

2.1 Sintesi dei due candidati inibitori

2.1.1 Sintesi e caratterizzazione C8

Note generali e strumentazione:

I reagenti chimici sono stati acquistati da Merck e utilizzati senza ulteriore purificazione. Il solvente deuterato DMSO- d_6 è stato acquistato da Sigma-Aldrich e impiegato tal quale. Gli spettri NMR sono stati registrati utilizzando uno spettrometro Varian 400 MHz (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 101 MHz). I valori di chemical shift (δ) sono espressi in parti per milione (ppm) a temperatura ambiente, prendendo come riferimento le impurezze protiche residue del solvente (^1H : DMSO a 2.50 ppm). Le molteplicità dei segnali sono indicate come: s (singoletto), d (doppietto), m (multipletto).

Protocollo di sintesi di C8:

Il candidato inibitore **C8**, formalmente denominato (5Z)-2-idrossi-4-metil-6-osso-5-[(5-fenilfuran-2-il)metilidene]-5,6-diidropiridina-3-carbonitrile, è stato ottenuto mediante una condensazione di Knoevenagel tra la 5-fenil-2-furaldeide e il 2-piridone Figura 16 [3].

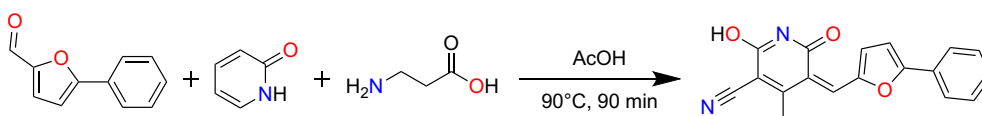


Figura 16: Sintesi del candidato inibitore **C8** mediante condensazione di Knoevenagel tra la 5-fenil-2-furaldeide e il 2-piridone. Condizioni di reazione: β -alanina, AcOH glaciale, 90 °C, 90 min.

In un pallone da 25 mL con refrigerante a refluxo e sistema di agitazione magnetica, sono stati disciolti la 5-fenil-2-furaldeide (310,8 mg, 1,805 mmol, 1,0 eq), il 2-piridone (542,0 mg, 3,610 mmol, 2,0 eq.) e la β -alanina (acido 3-ammino propanoico) (321,6 mg, 3,610 mmol, 2,0 eq.) in acido acetico glaciale (7,0 mL). La miscela di reazione è stata riscaldata a 90 °C e mantenuta sotto costante agitazione per 90 minuti. Durante il tempo della reazione si è osservata la progressiva formazione di un precipitato massivo intensamente colorato in viola-rosso.

Al termine del tempo di reazione, la miscela è stata raffreddata a temperatura ambiente ed è stata addizionata acqua deionizzata direttamente all'interno del pallone per favorire il completamento della precipitazione. Il solido grezzo è stato isolato mediante filtrazione sottovuoto su imbuto Büchner e lavato ripetutamente sul filtro con acqua deionizzata. Il prodotto è stato infine essiccato a temperatura ambiente per un giorno, fornendo il composto **C8** come un solido viola (513,0 mg, resa: 93,4%) [3].

Caratterizzazione chimico-fisica di **C8**:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.71 (s, 1H, NH/OH), 8.63 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.99 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, Ar-H), 7.87 (s, 1H, =CH-), 7.59–7.47 (m, 4H, Ar-H), 2.62 (s, 3H, CH₃) Figura 53 e 54.

2.1.2 Sintesi e caratterizzazione **C21**

Protocollo di sintesi di **C21**:

Il candidato inibitore **C21**, denominato formalmente come 2-ammino-5-fenil-5,11-diidro-3H-indeno[2',1':5,6]pirido[2,3-d]pirimidina-4,6-dione, è stato ottenuto mediante una reazione di condensazione multicomponente a tre componenti tra la benzaldeide, l'indan-1,3-dione e la 2,6-diamminopirimidin-4(3H)-one, operando in atmosfera inerte Figura 17 [4].

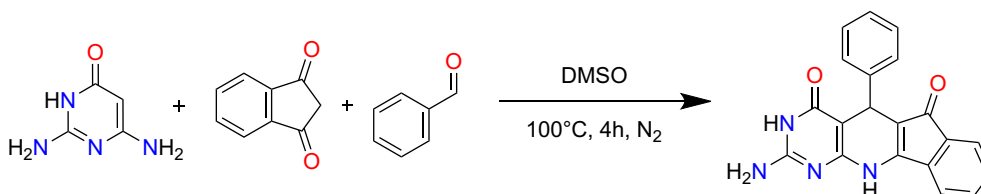


Figura 17: Sintesi del candidato inibitore **C21** mediante condensazione multicomponente in atmosfera inerte di azoto. Condizioni di reazione: DMSO, N_2 , 100 °C, 4 h.

In due vial separate sono state preparate due soluzioni, sciogliendo in DMSO i due reagenti: l'indan-1,3-dione (137,7 mg, 0,942 mmol, 1,0 eq.) in un'aliquota di solvente e la 2,6-diamminopirimidin-4(3H)-one (118,8 mg, 0,942 mmol, 1,0 eq.) nell'altra. Entrambe le soluzioni sono state sottoposte a degasamento in flusso di azoto. Separatamente, in un pallone di reazione da 10 mL, con ancorotta magnetica, è stata inserita la benzaldeide (100,6 mg, 0,948 mmol, 1,0 eq.). Il pallone di reazione è stato sigillato con un setto in gomma e saturato con azoto per eliminare l'ossigeno atmosferico.

Sono stati prelevati con siringa, 1,5 mL della soluzione di indan-1,3-dione e 1,5 mL della soluzione pirimidinica, aggiungendo sequenzialmente i due reagenti nel pallone di reazione attraverso il setto. La miscela risultante è stata riscaldata a 100 °C sotto costante agitazione magnetica per 4 ore [32].

Successivamente, la miscela di reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente e diluita con 50 mL di etile acetato in imbuto separatore. La soluzione è stata lavata per tre volte con acqua deionizzata (3×30 mL). Durante le operazioni di lavaggio, si è osservata la formazione di un precipitato solido localizzato all'interfaccia tra la fase acquosa e la fase organica. Il solido grezzo è stato isolato mediante filtrazione sottovuoto su imbuto Büchner; la polvere è stata successivamente lavata sul filtro con metanolo. Il prodotto è stato infine essiccato a temperatura ambiente, fornendo il

composto **C21** come un solido rosso (256 mg, resa: 79.4%).

Caratterizzazione chimico-fisica di C21:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) 10.73 (s, 1H, NH), 10.61 (s, 1H, NH), 7.78–7.75 (d, 1H, ar), 7.45–7.10 (m, 8H, ar), 6.45 (s, 2H, NH₂), 4.74 (s, 1H, HC–fen) Figura 55 e 56.

2.2 Complessazione in soluzione

2.2.1 Primo confronto per la selezione delle ciclodestrine più efficaci

Una prima selezione di ciclodestrine è stata effettuata tramite l'analisi di diversi campioni contenenti ciclodestrina e candidati inibitori, a tale scopo, sono state preparate diverse soluzioni di 5 mL al 5% *v/v* di DMSO e 13,2 mM di diverse ciclodestrine, tra cui α CD, β CD, γ CD, DIMEB, TRIMEB, HP- β CD e CM- β CD poste in rispettive vial. La concentrazione di CDs è stata scelta perché simile solubilità di β CD che è di 18 mg/mL. La percentuale di DMSO utilizzata è stata scelta in accordo con la letteratura scientifica per favorire la solubilizzazione di **C8** e **C21**, senza alterare in modo significativo la complessazione con le ciclodestrine [33]. Ad ogni soluzione di ciclodestrina è stato aggiunto un eccesso di **C8** e **C21**. Il sistema è stato lasciato in agitazione su agitatore orbitale per 48h ad una frequenza di 160 rpm termostato a 25°C. Le varie soluzioni sono state successivamente filtrate con filtri da siringa in PTFE 0.22 μ m. Per la prima serie di esperimenti effettuata su **C21** è stato utilizzato il seguente metodo: le soluzioni limpide sono state liofilizzate e ridissolte in 1 mL di DMSO per favorire la decomplessazione. Per la seconda serie di esperimenti effettuate su **C8** è stato utilizzato il seguente metodo più diretto: le soluzioni limpide sono state diluite fino al 60% *v/v* di DMSO per favorire la decomplessazione in soluzione, è stata scelta la percentuale di DMSO tale per cui la quantità di solvente organico interferisse con la complessazione [34]. Le soluzioni sono state infine analizzate tramite spettrofotometro UV-Vis eseguendo opportune diluizioni per ottenere un valore di assorbanza tra 0,2 e 1. I risultati di assorbanza sono stati successivamente confrontati con le rette di calibrazione ottenute in DMSO per **C21** e acqua e DMSO 60% *v/v* per la quantificazione di queste molecole Tabella 3.

2.3 Calcolo della costante di complessazione

Metodo di Higuchi-Connor:

La determinazione sperimentale della costante di associazione apparente (K_a) tra i candidati inibitori (**C8** e **C21**) e i macrocicli ospitanti è stata condotta applicando il metodo della solubilità di fase, secondo il protocollo teorico-sperimentale Higuchi e Connors [16]. Sulla base di uno screening preliminare volto a individuare i derivati ciclodestrinici con la miglior capacità solubilizzante, l'indagine in ambiente puramente acquoso è stata focalizzata sull'impiego di β CD DIMEB per **C8** e DIMEB e TRIMEB per **C21**. Successivamente, negli studi in sistema idro-organico, il piano sperimentale è

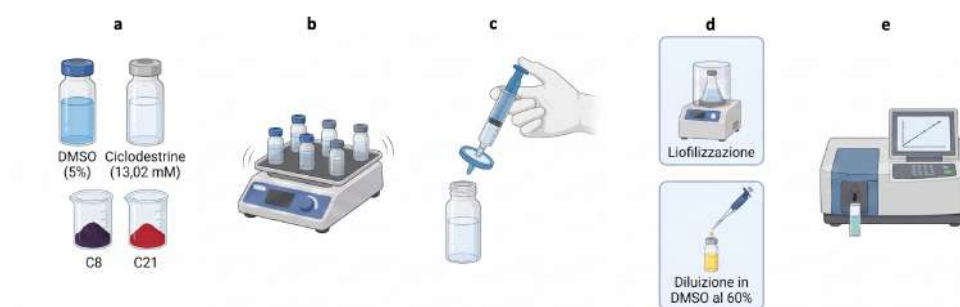


Figura 18: **Schema procedurale per la selezione delle ciclodestrine.** (a) Preparazione delle soluzioni contenenti diverse ciclodestrine ed un eccesso dei candidati inibitori **C8** o **C21**. (b) Fase di equilibrizzazione del sistema su agitatore orbitale. (c) Filtrazione delle soluzioni con filtri da siringa. (d) Metodi di decomplessazione: liofilizzazione e ridissoluzione DMSO per i campioni con **C21**, oppure diluizione diretta fino al 60% v/v di DMSO per i campioni con **C8**. (e) Analisi quantitativa delle soluzioni mediante spettrofotometria UV-Vis per il confronto con le rette di calibrazione.

Tabella 3: Composizione delle soluzioni di ciclodestrine preparate per gli studi di solubilizzazione dei candidati inibitori **C21** e **C8**. Per ogni ciclodestrina sono riportati il peso molecolare, la solubilità in acqua, la massa pesata per ottenere un volume finale di 5 mL (in solvente H₂O/DMSO 5% v/v) e la concentrazione effettiva risultante, identica per entrambi i set di esperimenti.

Ciclodestrina	PM (g/mol)	Solubilità H ₂ O (mg/mL)	Massa pesata (mg)	Conc. (mM)
α -CD	972.84	145	64.3	13.2
β -CD	1134.98	18	75.0	13.2
γ -CD	1297.12	232	85.7	13.2
DIMEB	1331.36	50	88.0	13.2
TRIMEB	1429.54	50	94.5	13.2
HP- β -CD	1540.00	180	101.8	13.2
CM- β -CD	1541.24	18.5	101.9	13.2

Nota: ad ogni vial è stato aggiunto un eccesso del rispettivo candidato inibitore in forma solida: circa 1 mg per le prove con **C21** e circa 1.5 mg per le prove con **C8**.

stato focalizzato sull'utilizzo di DIMEB per entrambi i candidati inibitori. Per ciascun diagramma di solubilità, sono state allestite 8 provette di tipo Eppendorf da 2 mL. In ogni contenitore è stata pesata in bilancia analitica un'aliquota di guest solido in netto eccesso rispetto alla sua solubilità intrinseca (circa 1–2 mg), al fine di garantire costantemente la saturazione della soluzione e la persistenza del corpo di fondo per tutta la durata dell'esperimento. Successivamente, sono stati addizionati volumi calcolati di soluzioni madri a concentrazione nota di ciclodestrina, e i campioni sono stati portati al volume finale specifico previsto per ciascuna serie mediante diluizione con acqua Milli-Q, secondo gli schemi di campionamento dettagliati in Tabella 5 e 6.

Tabella 4: Parametri di preparazione delle soluzioni madri di ciclodestrina utilizzate negli studi di solubilità di fase in ambiente puramente acquoso.

Candidato	Macrocielo	Mezzo di dissoluzione	Massa CD (mg)	Conc. (mM)
C21	DIMEB	H ₂ O MilliQ	36.45	5.48
C21	TRIMEB	H ₂ O MilliQ	52.19	7.30
C8	DIMEB	H ₂ O MilliQ	41.02	6.16
C8	β -CD	H ₂ O MilliQ	34.96	6.16

Tabella 5: Schema di campionamento e piano di diluizione per lo studio di solubilità di fase in ambiente acquoso del candidato **C21** (Volume finale: 1.0 mL).

Campione N°	V Sol. Madre CD (mL)	V H ₂ O (mL)	Conc. Fin. DIMEB (mM)	Conc. Fin. TRIMEB (mM)
S_0	0.00	1.00	0.00	0.00
1	0.10	0.90	0.55	0.73
2	0.20	0.80	1.10	1.46
3	0.30	0.70	1.64	2.19
4	0.40	0.60	2.19	2.92
5	0.50	0.50	2.74	3.65
6	0.60	0.40	3.29	4.38
7	0.70	0.30	3.83	5.11

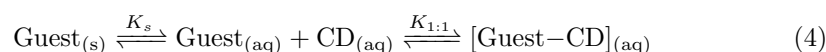
Tabella 6: Schema di campionamento e piano di diluizione per lo studio di solubilità di fase in ambiente acquoso del candidato **C8** (Volume finale: 1.0 mL).

Campione N°	V Sol. Madre CD (mL)	V H ₂ O (mL)	Conc. Finale CD* (mM)
S_0	0.00	1.00	0.00
0.5	0.05	0.95	0.31
1	0.10	0.90	0.62
2	0.20	0.80	1.23
3	0.30	0.70	1.85
5	0.50	0.50	3.08
7	0.70	0.30	4.31
8	0.80	0.20	4.93

Nota: *La colonna indica la concentrazione finale sia per i saggi con DIMEB sia con β -CD, essendo le rispettive soluzioni madri preparate alla medesima concentrazione equimolare (6.16 mM).

Al fine di assicurare il completo raggiungimento dell'equilibrio termodinamico di complessazione, le provette sono state poste in agitatore orbitale impostato a 160 rpm per un periodo minimo di 72 ore, mantenendo una temperatura controllata di circa 25 °C.

Al termine del periodo di incubazione, le sospensioni sono state filtrate mediante filtri da siringa monouso in PTFE con porosità di 0.22 μm , consentendo l'efficace separazione del solido indissolto e l'isolamento della fase liquida limpida contenente il complesso di inclusione solubilizzato. Per favorire la decomplessazione quantitativa del guest dalla cavità macrociclica e assicurarne la stabilità in soluzione durante le successive fasi analitiche [34], un'aliquota di ciascun filtrato è stata opportunamente diluita con dimetilsolfossido (DMSO) fino a raggiungere una concentrazione finale di solvente organico pari o superiore al 60% v/v . La concentrazione totale di guest presente in ogni campione è stata successivamente quantificata mediante spettrofotometria UV-Vis. I diagrammi di solubilità di fase sono stati ottenuti riportando in grafico la concentrazione molare totale del guest in funzione della concentrazione molare della ciclodestrina. Il sistema termodinamico all'equilibrio può essere descritto attraverso gli equilibri consecutivi di solubilizzazione del solido e successiva complessazione in fase acquosa, illustrati nello Schema 4:



In accordo con questo modello e la formazione di complessi con stechiometria 1:1, la costante di associazione apparente ($K_{1:1}$) è stata calcolata a partire dalla pendenza (slope) della retta di regressione lineare e dalla solubilità intrinseca del farmaco in assenza di macrociclo (S_0), applicando la seguente equazione [16, 15]:

$$K_{1:1} = \frac{\text{Slope}}{S_0 \cdot (1 - \text{Slope})} \quad (5)$$

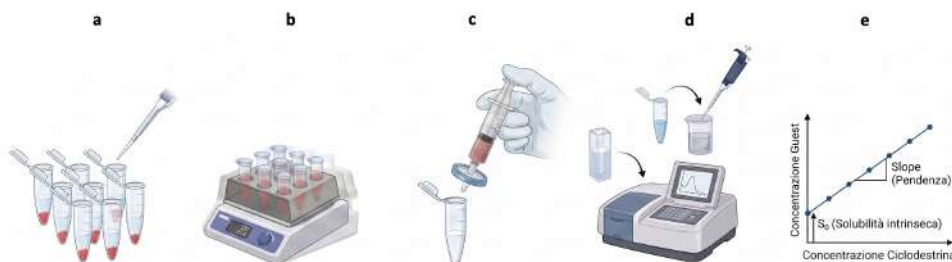


Figura 19: **Workflow sperimentale metodo di Higuchi-Connors.** (a) Allestimento delle provette in cui viene inserito un eccesso di candidato inibitore solido, seguito dall'aggiunta di volumi crescenti di soluzioni di ciclodestrine. (b) Fase di equilibratura termodinamica in agitatore orbitale. (c) Purificazione mediante filtri da siringa per separare il solido non disciolto dalla soluzione acquosa. (d) Decomplessazione quantitativa del *guest* ottenuta diluendo un'aliquota del filtrato in solvente organico, e successiva lettura analitica allo spettrofotometro UV-Vis. (e) Diagramma di solubilità di fase, costruito riportando la concentrazione molare del *guest* in funzione della concentrazione di ciclodestrina per il calcolo della $K_{1:1}$.

In una serie di prove parallele, al fine di ottimizzare la bagnabilità e incrementare la frazione iniziale di guest disciolto, è stato valutato l'impiego di un sistema idro-organico. Nello specifico, il composto **C21** è stato pesato allo stato solido e solubilizzato diretta-

mente nelle diverse soluzioni idro-organiche a concentrazione crescente di ciclodestrina, contenenti una quota fissa di DMSO al 5 %. Il composto **C8** è stato preventivamente solubilizzato in DMSO alla concentrazione di 10 mg/mL e successivamente, sono state addizionate aliquote fisse di questa soluzione madre (50 μ L) alle soluzioni acquose a concentrazione crescente di ciclodestrina.

Ciascun campione è stato preparato per ottenere un volume finale di 1.0 mL per la serie C8-DIMEB e di 1.4 mL per la serie C21-DIMEB, garantendo una percentuale costante di cosolvente organico pari al 5 % *v/v* in tutti i campioni delle serie Tabella 8 e 9. Il tempo di agitazione (72 h), la temperatura (25 °C) e le successive fasi di filtrazione e quantificazione UV-Vis sono stati mantenuti identici a quanto descritto per i sistemi puramente acquosi.

Tabella 7: Parametri di preparazione delle soluzioni madri di ciclodestrina utilizzate negli studi di solubilità di fase con 5% *v/v* di DMSO in incubazione.

Candidato	Macrocielo	Mezzo di dissoluzione	Massa CD (mg)	Conc. (mM)
C21	DIMEB	H ₂ O purificata + 5% <i>v/v</i> DMSO	99.80	12.49
C8	DIMEB	H ₂ O purificata	41.02	6.16

Tabella 8: Schema di campionamento e piano di diluizione per lo studio di solubilità di fase del candidato **C21** in sistema idro-organico (Volume finale: 1.4 mL, concentrazione di DMSO costante al 5% *v/v* in incubazione).

Campione N°	V Sol. Madre DIMEB (al 5% DMSO) (mL)	V Solvente Diluizione (H ₂ O + 5% DMSO) (mL)	Conc. Finale DIMEB (mM)
<i>S</i> ₀	0.00	1.40	0.00
1	0.10	1.30	0.89
2	0.20	1.20	1.79
3	0.30	1.10	2.68
4	0.40	1.00	3.57
5	0.50	0.90	4.46
6	0.60	0.80	5.35
7	0.70	0.70	6.25

Tabella 9: Schema di campionamento e piano di diluizione per lo studio di solubilità di fase del candidato **C8** con il 5% *v/v* di DMSO in incubazione (Volume finale: 1.0 mL).

Campione N°	V Sol. C8 in DMSO (mL)	V Sol. Madre DIMEB (mL)	V H ₂ O (mL)	Conc. Finale DIMEB (mM)
<i>S</i> ₀	0.05	0.00	0.95	0.00
1	0.05	0.10	0.85	0.62
2	0.05	0.20	0.75	1.23
3	0.05	0.30	0.65	1.85
4	0.05	0.40	0.55	2.46
5	0.05	0.50	0.45	3.08
6	0.05	0.60	0.35	3.70
7	0.05	0.70	0.25	4.31

Nota: Tutti i campioni da 1 a 7 contengono un'aliquota fissa iniziale di **C8** pari a 0.5 mg introdotta tramite i 50 μ L di soluzione madre in DMSO. Il volume finale è di 1.0 mL.

Analisi dei dati e propagazione dell'errore:

L'elaborazione statistica dei dati ha previsto una prima fase di determinazione della propagazione delle incertezze associate a ciascuna fase sperimentale, valutando sia

l'errore sulla concentrazione del macrociclo (ΔX) sia quello sulla concentrazione del candidato inibitore solubilizzato (ΔY).

L'incertezza sulla concentrazione di ciascun campione di ciclodestrina (ΔX) è stata calcolata propagando gli errori strumentali sistematici derivanti dalla sensibilità della bilancia analitica (± 0.1 mg) e dalle tolleranze volumetriche delle pipette semi-automatiche e di vetro impiegate per l'allestimento delle soluzioni madri e per le successive diluizioni. L'incertezza sulla concentrazione totale di *guest* (ΔY) è stata invece ricavata dall'accuratezza fotometrica del cammino ottico dello spettrofotometro UV-Vis ($\Delta A = 0.005$), dall'errore associato ai fattori di diluizione e dall'errore standard della pendenza della retta di calibrazione analitica del farmaco.

I diagrammi di solubilità di fase così ottenuti sono stati sottoposti a regressione lineare mediante il metodo dei minimi quadrati per estrarre la pendenza della retta (m) e il rispettivo errore standard (Δm).

L'incertezza assoluta finale associata alla costante di associazione apparente ($\Delta K_{1:1}$) è stata quindi stimata applicando la legge di propagazione dell'errore per variabili indipendenti, sommando i contributi degli errori relativi della pendenza della retta e della solubilità intrinseca del farmaco isolato (ΔS_0), secondo la seguente equazione:

$$\Delta K_{1:1} = K_{1:1} \cdot \sqrt{\left(\frac{\Delta m}{m}\right)^2 + \left(\frac{\Delta S_0}{S_0}\right)^2} \quad (6)$$

2.4 Tecniche computazionali di complessazione supramolecolare

2.4.1 Preparazione delle molecole e Dinamica Molecolare Supervisionata (SuMD)

Sono stati utilizzati i file .sdf di ciclodestrine (β CD, DIMEB e TRIMEB) e di **C8** e **C21**, che successivamente sono stati elaborati da diversi tool di Openeye, Tautomers (per l'analisi delle strutture tautomeriche) [35], Fixpka (per la generazione degli stati di protonazione dei ligandi) [36], OMEGA (per generare la conformazione 3d calcolando la torsione e geometria della distanza) [37], MolCharge (per generare le cariche parziali delle molecole) [38]. Si è eseguita una prova preliminare con adamantano, un composto noto per la sua alta efficienza di complessazione, per testare il metodo. I sistemi selezionati per le simulazioni comprendono i quattro stereoisomeri di **C21**, il composto **C8** nella sua forma unica e quattro forme di **C8** idratato (C8i), distinte sulla base delle due forme tautomeriche e dei due centri stereogenici individuati dall'analisi conformazionale: C8i_S1 (isomero S con ossidrile aromatico), C8i_S2 (isomero S con chetone aromatico), C8i_R1 e C8i_R2, con la medesima distinzione tautomerica per la configurazione R. In particolare, per completare la preparazione di **C8**, **C21** e delle CD sono stati applicati i campi di forza, per i ligandi è stato utilizzato GAFF (*general amber force field*), per le macromolecole è stato usato un repository online [39], per la costruzione delle CD native e sostituite, ovvero Glicam04 con l'aggiunta di Q4MDCD per la correzione del FF degli zuccheri ciclici. L'acqua è stata preparata con

il FF Tip3p. Tramite il tool di Amber viene preparato il sistema per le prove di DM, creando il sistema di CD e ligando posti a 30 Å come distanza indicativa, solvatati con acqua e ioni Na^+ e Cl^- 0,154 M. Questo sistema è stato rinchiuso in un box di lato 150 Å con uguale concentrazione di ioni.

È stata condotta una minimizzazione a gradiente coniugato di circa 500 passi precedente alle equilibrature per eliminare i contatti sterici sfavorevoli. Un motore di dinamica molecolare ha gestito sia la fase di equilibratura sia la successiva produzione, assicurando la compatibilità con la topologia AMBER (*.prmtop*) e scrivendo le traiettorie in formato DCD. L'algoritmo M-SHAKE ha vincolato i legami covalenti che coinvolgono atomi di idrogeno. L'eliminazione di queste vibrazioni ad alta frequenza ha consentito l'adozione di un passo di integrazione pari a 2 fs. Le interazioni elettrostatiche a lungo raggio sono state calcolate con il metodo particle-mesh Ewald, adottando una distanza di switching di 7,5 Å per il potenziale di Lennard-Jones e un cutoff di 9,0 Å per le componenti di Lennard-Jones ed elettrostatica nello spazio reale.

Nello step successivo sono state eseguite due equilibrature, la prima a temperatura costante di 310 K e volume costante per un tempo standard, in cui sono state fissate nello spazio la CD e il ligando. In questa fase è stato permesso il movimento di acqua e ioni per la minimizzazione energetica, necessaria prima della dinamica produttiva. La seconda equilibratura è stata eseguita a pressione e temperatura costante permettendo il movimento anche degli idrogeni e delle catene laterali delle molecole. Il vincolo armonico posizionale applicato in entrambe vale $5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ Å}^{-2}$, mentre la prima equilibratura è stata eseguita per 1 ns in ensemble NVT, la seconda per 1 ns in ensemble NPT con barostato Monte Carlo a 1 atm, mentre un termostato di Langevin regola la temperatura a 310 K in entrambe le fasi.

La supervisione geometrica descritta nel capitolo introduttivo si articola in step di 300 ps di dinamica non vincolata, condotti in ensemble canonico a 310 K. La distanza monitorata congiunge il centro di massa dell'intera ciclodestrina a quello dell'intero ligando, scelta coerente con la geometria dei due partner e con l'assenza di sottostrutture mobili da discriminare lungo il cammino di inclusione. La supervisione si disattiva nel momento in cui la distanza tra i due oggetti scende sotto la soglia che individua lo stato incluso, e la simulazione prosegue come dinamica classica, lasciando assestare la posa entro la cavità.

Per ciascun sistema host-guest sono state condotte 3 repliche indipendenti a partire dalla medesima configurazione iniziale, così da saggiare la riproducibilità della posa di inclusione e dei descrittori energetici e geometrici. Le sole porzioni produttive di ogni traiettoria, salvate in ordine cronologico, costituiscono l'insieme di frame su cui poggiano le analisi di ΔSASA ed energia di interazione descritte nella sezione seguente.

2.4.2 Analisi semi-quantitativa dell'efficienza di complessazione con SuMD

Le traiettorie SuMD, fornite in formato *.dcd* con relativa topologia *.prmtop*, sono state ricevute già processate ed esenti da artefatti dovuti alle condizioni di bordo periodiche (PBC).

Δ SASA: Quantificazione della sepoltura interfacciale La Superficie Accessibile al Solvente (*Solvent Accessible Surface Area*, SASA) di una molecola è definita come il luogo geometrico dei centri di una sonda sferica di raggio r_s che rotola a contatto con la superficie di van der Waals degli atomi della molecola stessa [40]. Nella pratica computazionale si adopera convenzionalmente $r_s = 1.4 \text{ \AA}$, che corrisponde al raggio di una molecola d'acqua, in modo che la SASA approssimi l'area di contatto tra la superficie molecolare e il solvente acquoso.

Formalmente, per un insieme di atomi $\mathcal{A}$, la SASA è:

$$\text{SASA}(\mathcal{A}) = \oint_{\Sigma(\mathcal{A})} dA \quad (7)$$

dove $\Sigma(\mathcal{A})$ è la superficie accessibile generata dalla sonda. Il calcolo viene eseguito numericamente per ogni *frame* della traiettoria mediante l'algoritmo implementato nel pacchetto VMD [6], utilizzando i raggi di van der Waals forniti dal campo di forza AMBER del sistema.

Area Sepolta di Interfaccia (Δ SASA)

Quando un ligando **L** si inserisce nella cavità di una ciclodestrina **H** (host), le due superfici molecolari si nascondono reciprocamente, in questo modo la sonda non è più in grado di accedere alla zona di contatto, che risulta "sepolta" rispetto al solvente. Per quantificare questa perdita di accessibilità si definisce l'*Area Sepolta di Interfaccia* (Δ SASA), comunemente nota anche come *Buried Surface Area* (BSA) [41]:

$$\Delta\text{SASA}(t) = \underbrace{\text{SASA}_H(t)}_{\text{host libero}} + \underbrace{\text{SASA}_L(t)}_{\text{ligando libero}} - \underbrace{\text{SASA}_{HL}(t)}_{\text{complesso}} \quad (8)$$

dove le tre SASA sono calcolate sullo stesso frame t della traiettoria:

- $\text{SASA}_H(t)$: superficie accessibile della ciclodestrina calcolata *in assenza* del ligando, ovvero con la sonda libera di esplorare anche la cavità interna dell'anello glucopiranosidico;
- $\text{SASA}_L(t)$: superficie accessibile del ligando calcolata *in assenza* della ciclodestrina;
- $\text{SASA}_{HL}(t)$: superficie accessibile dell'*intero complesso*, con entrambe le molecole presenti e mutuamente schermanti.

Il Δ SASA può essere decomposto nei contributi dei due partner:

$$\Delta\text{SASA}(t) = \underbrace{[\text{SASA}_H(t) - \Delta S_H(t)]}_{\text{sepoltura dell'host}} + \underbrace{[\text{SASA}_L(t) - \Delta S_L(t)]}_{\text{sepoltura del ligando}} \quad (9)$$

dove ΔS_H e ΔS_L indicano rispettivamente la superficie residua del macrociclo e del guest nell'adotto. La grandezza così definita conta entrambe le facce sepolte dell'interfaccia: la parete interna della cavità della ciclodestrina e la superficie del ligando che vi si inserisce.

Significato geometrico Il ΔSASA è una misura diretta della profondità di inclusione. Il suo valore cresce all’aumentare del numero di atomi del ligando che si trovano nell’interno della cavità. Poiché $\text{SASA}_{HL} \leq \text{SASA}_H + \text{SASA}_L$ si ha sempre $\Delta\text{SASA}(t) \geq 0$, con il limite inferiore raggiunto quando le due molecole non sono a contatto.

Il valore massimo raggiungibile è fissato dalla geometria della cavità della ciclodestrina, che costituisce un tetto fisico all’area della parete interna che viene nascosta. Per ligandi di dimensione superiore alla cavità, il ΔSASA si satura e non cresce ulteriormente al crescere del ligando. Questo comportamento a saturazione rende il ΔSASA un indice sensibile all’occupazione della cavità e non solo alla dimensione del *guest*. Questa misurazione è utile per il confronto tra sistemi *host-guest* con ligandi di dimensione eterogenea (Adamantane, **C8**, **C8i**, **C21**) senza una normalizzazione esplicita per la superficie del solo ligando.

Nel caso delle ciclodestrine parzialmente metilate (2,6-DIMEB e TRIMEB), le catene metiliche in posizione C2/C6/C3 dei residui glucopiranosidici possono riorganizzarsi conformazionalmente attorno al *guest*, schermando dal solvente anche porzioni della corona ossidrilica del macrociclo (*self-capping*). Questo contributo è direttamente incluso nel termine ΔS_H dell’equazione (9) e si manifesta come un incremento del ΔSASA rispetto alla beta-CD nativa a parità di ligando, coerentemente con la maggiore idrofobicità della cavità delle ciclodestrine metilate [7].

Protocollo di calcolo Per ogni traiettoria SuMD, le tre SASA che compaiono nell’equazione (8) sono state calcolate *frame-per-frame* mediante lo script TCL integrato in VMD, utilizzando un raggio di sonda di 1.4 Å e i raggi di van der Waals atomici del campo di forza AMBER in accordo con la topologia `.prmtop` di ciascun sistema. Le selezioni atomiche per *host* e *ligando* sono state definite sui rispettivi nomi di residuo (`resname`), con identificazione dinamica del residuo della ciclodestrina. I dati per ogni frame sono stati esportati in formato CSV e successivamente elaborati in ambiente R per estrarre il valore medio e la deviazione standard nello stato legato, identificato come l’ultimo plateau stabile della distanza tra i centri di massa *host-guest* sezione 5.2 e Figura 21.

Calcolo energetico con NAMD Energy La stima semi-quantitativa dell’energia di interazione non-covalente tra ciclodestrina e ligando è stata eseguita tramite il plugin *NAMD Energy* [42], integrato nell’ambiente VMD, che consente di calcolare *frame-per-frame* le componenti di energia di van der Waals (vdW) ed elettrostatica (Elec) tra due selezioni atomiche distinte, sfruttando il campo di forza AMBER e la topologia `.prmtop` di ciascun sistema.

Per ogni frame t della traiettoria SuMD, l’energia di interazione totale tra *host* **H** e *ligando* **L** è definita come:

$$E_{\text{int}}(t) = E_{\text{vdW}}^{HL}(t) + E_{\text{elec}}^{HL}(t) \quad (10)$$

dove E_{vdW}^{HL} rappresenta il contributo di Lennard-Jones e E_{elec}^{HL} il termine coulombiano tra gli atomi dei due partner, senza alcun termine di auto-energia intra-molecolare.

Protocollo di calcolo Il calcolo energetico è stato integrato nella pipeline TCL automatizzata descritta per le misure geometriche. Per ciascuna traiettoria veniva invocato il plugin `namdenergy` con le opzioni `-vdw` e `-elec`, passando come selezioni atomiche la ciclodestrina e il ligando. I risultati sono stati scritti in un file `.dat` dedicato per simulazione e successivamente importati in ambiente R per l'estrazione dei valori medi e delle deviazioni standard nello stato legato, identificato come l'ultimo plateau stabile della distanza tra i centri di massa (sezione 5.2 e Figura 21).

Si sottolinea che i valori di energia ottenuti con questo approccio non costituiscono energie libere di legame (ΔG), ma grandezze prive del contributo entropico e della ri-organizzazione del solvente. Essi sono impiegati esclusivamente come descrittori comparativi semi-quantitativi per valutare la stabilità relativa dei complessi di inclusione.

I dati energetici e geometrici estratti dalle traiettorie di Dinamica Molecolare Supervisionata (SuMD) sono stati condensati in un diagramma bidimensionale denominato *Quadrante di Efficacia Inclusionale dei Complessi* (Figura 20). Questo plot correla l'energia potenziale totale di interazione (E_{totale} , espressa in kcal/mol), che quantifica il contributo puramente entalpico delle forze intermolecolari dirette *host-guest* (forze di van der Waals e contributi elettrostatici), con la frazione di area superficiale sepolta ($\Delta SASA$).

Grafici diagnostici delle traiettorie SuMD Per ciascuno dei descrittori analizzati, è stato prodotto un grafico diagnostico a doppio asse che costituisce il riferimento primario per l'identificazione della complessazione. Il primo grafico per ogni simulazione presenta il profilo energetico E_{tot} in funzione della distanza dei centri di massa (*profilo di avvicinamento*). Ogni punto corrisponde a un frame della traiettoria, e riporta una mappa colore utile a identificare il calore di $\Delta SASA$ per ogni frame in funzione dell'avvicinamento delle molecole. Il secondo grafico è quello principale e riporta il profilo temporale a doppio asse y : la distanza dei centri di massa (asse sinistro, Å) e E_{tot} (asse destro, kcal/mol) in funzione del frame. La convergenza simultanea di entrambe le grandezze verso un valore stazionario definisce il *plateau di binding*, ovvero la finestra temporale su cui sono stati calcolati i valori medi di $\Delta SASA$ e E_{tot} riportati in Figura 21. La raccolta completa dei grafici diagnostici per tutti i sistemi *host-guest* simulati è riportata in appendice (sezione 5.2).

2.5 Produzione degli addotti *host-guest* per co-macinazione

2.5.1 Complessazione in mortaio

Al fine di ottimizzare la tecnica di co-macinazione per la formazione del complesso di inclusione, sono stati comparati due differenti tipi di mortaio, ovvero il mortaio in ceramica (porcellana grezza) e il mortaio in vetro (fondo liscio e pestello satinato). Il

mortaio in ceramica permette generalmente di apportare più energia grazie all'elevato coefficiente d'attrito tra le superfici del pestello e del fondo del mortaio, mentre un mortaio in vetro permette un maggior recupero del composto grazie a una minore adesione sulle superfici. Sono state co-macinare quantità equimolari di guest e di host, per una massa complessiva di 250 mg (Tabella 10). Le sostanze sono state aggiunte al mortaio tramite il metodo delle aggiunte progressive per permettere una massima omogeneizzazione della polvere [43]. La miscela solida è stata sottoposta a una fase preliminare di macinazione a secco per 5 minuti, finalizzata a uniformare la dimensione delle particelle e massimizzare i contatti interparticolari. Successivamente, sono stati addizionati 100–200 μL di una soluzione acquosa di etanolo al 25% v/v . L'utilizzo di questa soluzione è stato utile per aumentare la bagnabilità della polvere, grazie all'alcol che riduce la tensione superficiale del mezzo liquido, favorendo la bagnatura omogenea della miscela solida [44]. Questo ha permesso di ottenere una pasta fluida ma coesa, ottimizzando l'omogeneizzazione e la trasmissione dell'energia meccanica durante il processo. La co-macinazione assistita da solvente è stata condotta per un tempo totale di 45 minuti [45]. Poiché l'apporto energetico e la volatilità del solvente, permettevano l'evaporazione della fase acquosa seccando la miscela in pochi minuti, si è ripristinata la consistenza pastosa ottimale mediante aggiunte successive di ulteriori 100–200 μL di soluzione idroalcolica [46]. Questo protocollo dinamico ha garantito il mantenimento dello stato di pasta per gran parte della durata del trattamento meccanico. La miscela secca alla fine della macinazione è stata recuperata in vial di vetro, conservate in freezer a -20°C .

Tabella 10: Composizione delle miscele per i complessi di inclusione (rapporto molare 1:1). Valori riferiti a una singola preparazione.

Sistema	Quantità (mol)	Massa Guest (mg)	Massa CD (mg)	Massa Tot. (mg)	Guest (%)	CD (%)
C21 + DIMEB	0.149	51.1	198.9	250.0	20.44	79.56
C8 + DIMEB	0.153	46.5	203.5	250.0	18.60	81.40
C21 + β -CD	0.169	57.9	192.1	250.0	23.16	76.84
C8 + β -CD	0.174	52.9	197.1	250.0	21.14	78.86

2.5.2 Complessazione in mulino a sfere

La preparazione dei complessi di inclusione host-guest è stata eseguita anche mediante trattamento mecanochimico. A tal proposito è stato impiegato un mulino miscelatore a sfere Retsch® MM 400 con vasi di macinazione in acciaio e sfere da 5 mm di diametro. Le polveri, pesate secondo le proporzioni riportate in Tabella 10 (250mg), sono state preventivamente omogeneizzate in mortaio per meno di 5 minuti attraverso il metodo delle aggiunte progressive [43]. La miscela solida è stata quindi trasferita nel vaso di macinazione con l'aggiunta di 100 μL di una soluzione acquosa di etanolo al 25% v/v per eseguire una macinazione assistita da solvente (Liquid-Assisted Grinding, LAG). Questa tecnica è stata adottata sia per minimizzare i fenomeni di impaccamento (caking) e favorire la dispersione termica, sia per incrementare la diffusione molecolare

del sistema [20]. Al fine di prevenire il surriscaldamento del campione nella camera di reazione, la macinazione è stata condotta a una frequenza di 20 Hz in 9 cicli ciascuno di 5 minuti alternati tra movimentazione e pausa termica. I parametri operativi del trattamento meccanochimico (durata e frequenza di oscillazione) sono stati definiti attraverso un'ottimizzazione basata sui dati di letteratura riportati da Lin et al.[34] e Jug et al.[20]. Le condizioni sperimentali adottate (45 minuti a 20 Hz) rappresentano un compromesso razionale tra il protocollo a elevata frequenza ma breve durata descritto da Jug et al. (15 min a 25-30 Hz)[20], ad alto rischio termico, e quello a frequenza ridotta ma tempo prolungato proposto da Lin et al. (60 min a 15 Hz)[34]. Il composto è stato successivamente lasciato all'aria per un tempo necessario al totale essiccamento della miscela e recuperato in vial di vetro, conservate in freezer a -20°C.

2.6 Strumenti analitici e utilizzo

2.6.1 Spettrofotometria UV-Vis

Le caratterizzazioni spettrofotometriche nell'intervallo dell'ultravioletto e del visibile (UV-Vis) sono state eseguite mediante uno spettrofotometro a doppio raggio *Cary 50* (*Varian Instruments*). Lo strumento opera in un range di lunghezze d'onda compreso tra 190 e 1100 nm ed è equipaggiato con un monocromatore Czerny-Turner a banda spettrale fissa di 1.5 nm. Il sistema ottico sfrutta una lampada a impulsi allo Xeno (*Xe pulse lamp*) come sorgente luminosa a spettro completo e un sistema di doppia rivelazione a diodi al silicio [47].

Le misurazioni sono state condotte utilizzando cuvette in quarzo a cammino ottico standard (10 mm), selezionando di volta in volta geometrie a volume normale (2 mL), ridotto (1.4 mL) o micro-volumi (600 μ L) in base alla disponibilità volumetrica del campione analizzato. Prima di procedere con l'acquisizione degli spettri, è stata sistematicamente registrata una correzione della linea di base (*baseline*) inserendo nel raggio di misura il rispettivo solvente come riferimento.

Le analisi sono state eseguite in modalità scansione (*scan mode*), impostando una finestra di campionamento variabile a seconda del sistema supramolecolare o del farmaco in esame: i limiti inferiori di lunghezza d'onda sono stati fissati a 200 o 240 nm, mentre i limiti superiori sono stati estesi fino a 400, 600 o 800 nm. I dati spettrali grezzi sono stati esportati dal software di gestione in file CSV (*Comma-Separated Values*). L'elaborazione delle curve di assorbanza, dei dati relativi e la rappresentazione grafica finale sono state eseguite in due diversi ambienti mediante i software *Microsoft Excel* e *RStudio* [48, 49].

2.6.2 Analisi Termogravimetrica (TGA)

Le analisi termogravimetriche (TGA) sono state condotte mediante un analizzatore termogravimetrico ad alte prestazioni *Discovery TGA 5500* (*TA Instruments, Waters*). Lo strumento è equipaggiato con un forno a infrarossi (*IR furnace*), progettato per massimizzare il controllo termico e garantire un'elevata stabilità della linea di base, con una deriva inferiore a 10 μ g senza necessità di sottrazioni matematiche post-test.

Il monitoraggio in tempo reale della massa è stato affidato a una bilancia a doppio range *Tru-Mass*, caratterizzata da una risoluzione di pesata pari a 8 ng [50].

Per ogni misurazione, un'aliquota di campione (approssimativamente da 2 a 5 mg) è stata posta in un crogiolo in platino da 50 µL. L'analisi è stata eseguita in atmosfera inerte sotto flusso costante di azoto (N_2) ad alta purezza, con una configurazione a spurgo orizzontale per ottimizzare l'interazione dinamica con il campione. Il profilo termico ha previsto una rampa di riscaldamento lineare impostata da una temperatura iniziale di circa 25-30 °C fino a un massimo di 800 °C, applicando una velocità di scansione costante pari a 10 °C/min.

L'acquisizione dei dati grezzi è stata gestita tramite il software proprietario *TRIOS* (*TA Instruments*) ricavando per derivazione matematica rispetto alla temperatura le rispettive curve della derivata prima (*Derivative Thermogravimetry*, DTG). Mediante questo software i file sono stati esportati in formato open-standard JSON (*JavaScript Object Notation*)[50]. La rappresentazione grafica dei profili, l'analisi statistica e l'elaborazione dei dati sono state eseguite utilizzando il linguaggio R all'interno dell'interfaccia RStudio [48, 49].

2.6.3 Spettroscopia Infrarossa a Trasformata di Fourier (FT-IR/ATR)

Le analisi di spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR) sono state condotte in modalità di riflettanza totale attenuata (*Attenuated Total Reflectance*, ATR). Le misurazioni sono state eseguite avvalendosi di uno spettrometro *Nicolet Nexus 670 FT-IR* (*Thermo Nicolet*) ???. Lo strumento opera nell'intervallo delle medie frequenze infrarosse (Mid-IR, da 4000 a 400

Prima di ogni sessione analitica, è stata effettuata l'acquisizione del fondo (*background*) in aria ambiente per consentire la corretta sottrazione dei segnali interferenti dei gas atmosferici (H_2O e CO_2). I campioni sotto forma di polveri sono stati posizionati direttamente sulla superficie del cristallo dell'accessorio ATR, garantendo l'omogeneità dell'interfaccia di contatto e l'ottimizzazione del cammino ottico dell'onda evanescente tramite il serraggio controllato della torretta di pressione.

L'acquisizione e il controllo dei parametri dello strumento sono stati gestiti tramite il software proprietario *OMNIC* (*Thermo Nicolet*). La visualizzazione grafica e l'elaborazione secondaria degli spettri è stata eseguita in ambiente R all'interno dell'interfaccia RStudio [48, 49].

2.7 Metodo per l'analisi semi-quantitativa dei dati termogravimetrici

L'elaborazione semi-quantitativa delle curve DTG è stata sviluppata per stimare l'efficienza di complessazione mecano-chimica allo stato solido. Il metodo è applicabile ai soli sistemi i cui picchi di degradazione del guest e dell'host risultano sufficientemente risolti.

2.7.1 Modello di deconvoluzione e strategia di vincolo

Il parametro analitico oggetto di elaborazione è l'area sottesa dai picchi della curva DTG, direttamente proporzionale alla frazione di massa persa in un determinato intervallo termico. L'analisi si basa sulla scomposizione del segnale sperimentale nei singoli contributi degradativi delle specie chimiche presenti, e sul successivo confronto delle rispettive aree. Per modellare tali contributi sono state impiegate tre differenti funzioni matematiche: la Gaussiana simmetrica, la funzione asimmetrica di Fraser-Suzuki e la funzione bi-gaussiana asimmetrica. La selezione di questi specifici profili geometrici è stata guidata dall'andamento empirico dei segnali, per garantire l'aderenza del fit e preservare il significato chimico-fisico della deconvoluzione.

La procedura si articola in due fasi successive.

Fase 0 – Definizione della costante di vincolo K . La miscela fisica (in rapporto molare 1:1), nella quale guest e host coesistono in assenza pre-macinazione meccanica, costituisce la condizione di riferimento in cui entrambe le specie si trovano allo stato libero. Dalla deconvoluzione del relativo profilo DTG si ricavano le aree dei picchi indipendenti e si definisce la costante di vincolo

$$K = \frac{A_{\text{host}}}{A_{\text{guest}}}, \quad (11)$$

ovvero il rapporto fra l'area dell'host e quella del guest nel loro stato non interagente. La costante K opera come uno standard interno del sistema. Rispetto all'impiego dei profili termici dei singoli componenti puri (ottenuti in analisi separate), la miscela fisica cattura il reale comportamento termico delle due specie quando sono unite nello stesso crogiolo. Questo approccio normalizza gli eventuali effetti di vicinanza e interazione macroscopica ad alte temperature, assicurando che la costante descriva lo stato non complessato in condizioni di co-presenza.

Fase 1 – isolamento del complesso mediante vincolo stechiometrico. Nei campioni co-macinati compare un picco intermedio, assente nella miscela fisica, attribuibile alla degradazione della frazione interagita e interpretato come firma termica del complesso supramolecolare. Poiché tale picco si sovrappone parzialmente a quelli del guest e dell'host non interagiti, per ottenere una soluzione stabile ed evitare la sovra-parametrizzazione del fit l'area dell'host libero residuo è stata vincolata a mantenere con quella del guest libero residuo il medesimo rapporto K stabilito in Fase 0:

$$A_{\text{host}}^{\text{libero}} = K \cdot A_{\text{guest}}^{\text{libero}}. \quad (12)$$

Bloccando le specie libere nel loro rapporto stechiometrico naturale, l'area del picco del complesso viene isolata come unico grado di libertà aggiuntivo del modello.

2.7.2 Implementazione numerica

Le curve DTG sono state esportate dal software TRIOS (TA Instruments) in formato JSON ed elaborate in ambiente R. La finestra termica diagnostica è stata fissata indicativamente fra 210 °C e 390 °C, estesa secondo necessità per includere interamente la coda di carbonizzazione del singolo sistema. Il fit non lineare è stato eseguito con algoritmo di Levenberg–Marquardt per la miscela fisica e con ottimizzazione vincolata L-BFGS-B per i preparati co-macinati. Le aree assolute sono state ricavate per integrazione numerica con il metodo dei trapezi e quindi convertite in rapporti relativi rispetto all’area totale dello spettro.

2.7.3 Analisi statistica delle incertezze e dei residui

A ciascun parametro stimato mediante la procedura di *fitting* (quali altezze, larghezze e posizioni dei picchi) è associata un’incertezza standard, calcolata dal software Rstudio sulla base della sensibilità del modello rispetto ai punti sperimentali della curva DTG. Nelle regioni in cui il segnale presenta variazioni nette e pendenze marcate, i parametri risultano ben vincolati e l’errore associato è minimo, al contrario, nelle zone di forte sovrapposizione tra i picchi, l’incertezza tende ad aumentare.

Le grandezze di reale interesse macroscopico sono le aree dei picchi, le frazioni percentuali e la costante di vincolo K , che rappresentano il risultato di combinazioni non lineari di questi parametri. Poiché questi parametri sono intimamente correlati tra loro, le tradizionali formule di propagazione analitica dell’errore risultano inaffidabili. Per superare questo limite, l’incertezza è stata propagata tramite una simulazione Monte Carlo con $N = 10\,000$ iterazioni. Questo metodo computazionale campiona ripetutamente i parametri di partenza rispettando le loro correlazioni, generando una distribuzione empirica per ogni grandezza finale. La deviazione standard di tale distribuzione fornisce l’incertezza ($\pm\sigma$) riportata nelle tabelle e nelle barre d’errore.

La fedeltà con cui il modello così costruito riproduce il profilo sperimentale è stata quantificata attraverso due indici di residuo globali complementari, espressi in percentuale. Per la miscela fisica si è adottato lo *scarto d’area* (R_{area}), definito come la deviazione relativa fra l’area sperimentale complessiva e l’area totale ricostruita dal fit:

$$R_{\text{area}} = \frac{|A_{\text{sper}} - A_{\text{fit}}|}{A_{\text{sper}}} \times 100 \quad (13)$$

Questo indice ha lo scopo di verificare la conservazione globale della massa persa durante il processo degradativo, dopo le deconvoluzioni. Per le prove di complessazione si è impiegato lo *scarto quadratico medio* (R_{RMSE}) normalizzato rispetto all’altezza massima del segnale DTG, che valuta la precisione del fit punto per punto:

$$R_{\text{RMSE}} = \frac{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}}{\max_i y_i} \times 100 \quad (14)$$

dove y_i rappresenta il valore DTG sperimentale e $\hat{y}_i$ quello ricostruito dal modello.

3 Analisi e Risultati

3.1 Analisi computazionale SuMD

3.1.1 Analisi dei profili SuMD individuali

I grafici in appendice (sezione 5.2, Figura 57–Figura 85) costituiscono la mappa di ogni simulazione, se analizzati in coppia, permettono di ricostruire la fenomenologia del processo di complessazione senza dover ricorrere alla visualizzazione diretta delle simulazioni molecolari. Ogni coppia di grafici descrive una singola simulazione. Il **profilo di avvicinamento** (grafico superiore) riporta E_{tot} in funzione della distanza dei centri di massa e codifica il ΔSASA istantaneo tramite la mappa cromatica (da blu scuro, nessun contatto, a rosso intenso, massima superficie sepolta). Il **profilo spazio-energetico** (grafico inferiore), riporta sullo stesso asse temporale la distanza di centri di massa (curva blu, asse sinistro) e E_{tot} (curva rossa, asse destro).

Analisi globale delle dinamiche tramite grafici sezione 5.2 L’osservazione sistematica dell’intera raccolta di profili permette di individuare tre pattern ricorrenti, che coprono la totalità dei comportamenti osservati.

1. **Inclusione diretta e stabile.** Il caso più esplicativo è dato dall’adamantano in β -CD (Figura 57). Nel profilo di avvicinamento, la nuvola di punti descrive un’unica traiettoria, osservando da destra verso sinistra (avvicinamento progressivo), l’energia crolla da valori prossimi allo zero fino alla zona finale (≈ -20 kcal/mol), mentre i punti passano direttamente da blu a rosso intenso, indicando la crescita simultanea e di ΔSASA . Nel profilo spazio-energetico la curva blu precipita in pochi nanosecondi verso valori stabili ($d < 4$ Å) e rimane costante per tutta la durata residua della traiettoria. La curva rossa scende simultaneamente alla curva blu e si stabilizza su un plateau piatto. I due segnali convergono simultaneamente senza disaccoppiamenti tra avvicinamento geometrico e stabilizzazione entalpica, a conferma di un’inclusione completa e irreversibile già nelle primissime fasi. Un comportamento analogo, con dinamica di avvicinamento più rapida e plateau energetico significativamente più negativo, si osserva per C8i in TRIMEB isomero R 1 (Figura 78) e isomero S 1 (Figura 80), sistemi che raggiungono il minimo energetico in modo diretto se pur con uno scalino energetico evidente a pochi nanosecondi.
2. **Doppio gradino: interazione superficiale seguita da inclusione.** Un secondo pattern, osservabile in diverse traiettorie, è caratterizzato da una struttura a due stadi separati. Il solo profilo spazio-energetico non sarebbe sufficiente ad interpretare la dinamica senza il contributo del profilo di avvicinamento. L’esempio più nitido è C8i-DIMEB isomero R2 (Figura 69): nel pannello inferiore si vede chiaramente come la curva blu raggiunga rapidamente valori intermedi di distanza ($d \approx 8\text{--}12$ Å) e vi rimanga per un periodo prolungato prima di scendere ulteriormente al plateau di binding, mentre la curva rossa presenta una prima diminuzione parziale seguita da una seconda discesa in corrispondenza del secondo

avvicinamento. Nel profilo di avvicinamento questa fase intermedia corrisponde a una fascia di punti di colore verde (ciano-giallo, $\Delta\text{SASA} \approx 100\text{--}250 \text{ \AA}^2$) che si interpone tra la nuvola blu dell'approccio libero e il cluster rosso del plateau di binding. In questo caso la superficie di contatto è non nulla ma molto inferiore a quella dello stato legato finale, indicando che il ligando è in contatto con la parete esterna o con il bordo del macrociclo senza essere ancora inserito nella cavità. In questo tipo di grafico si vedono tre nuvole distinte che descrivono i tre stati della dinamica appena descritta. Il medesimo schema, con varianti nella durata della fase intermedia, è riscontrabile in C8i-TRIMEB isomero R Replica 2 (Figura 79), dove il profilo spazio-energetico mostra un lungo plateau intermedio a $d \approx 10 \text{ \AA}$ e $E_{\text{tot}} \approx -50 \text{ kcal/mol}$ prima della caduta definitiva verso il minimo assoluto a -127 kcal/mol , e in C8i-TRIMEB isomero S Replica 2 (Figura 81), la cui fase intermedia è particolarmente estesa e corrisponde visivamente a una larga fascia di punti arancioni nel profilo di avvicinamento.

3. **Mancata complessazione.** Il terzo tipo di grafico descrive i sistemi in cui l'avvicinamento fisico delle molecole non è accompagnato da una stabilizzazione entalpica e neppure da un aumento consistente del ΔSASA . Nei profili di avvicinamento questi sistemi si riconoscono per l'assenza di un cluster rosso a bassa distanza dei centri di massa: i punti rimangono prevalentemente di colore verde o giallo anche a $d < 10 \text{ \AA}$, indicando che il contatto è puramente superficiale e che la cavità non viene mai occupata. Nel profilo spazio-energetico la curva blu può scendere a distanze apparentemente prossime (effetto della supervisione che attrae le molecole l'una verso l'altra), ma la curva rossa oscilla intorno a valori prossimi allo zero o debolmente negativi senza mai convergere su un plateau stabile. Questo comportamento è visibile in modo netto dagli isomeri **C21** (R,R), (R,S) e (S,R) in TRIMEB (Figura 82, Figura 83, Figura 84). In contrasto, lo stesso scheletro molecolare nell'isomero (S,S) (Figura 85) presenta nel profilo di avvicinamento una struttura cromatica progressiva che raggiunge tonalità arancio-rosse a bassa distanza, e nel profilo spazio-energetico una curva di energia che declina lentamente ma in modo direzionale verso -40 kcal/mol , confermando l'avvenuta inclusione molecolare.

3.1.2 Analisi Geometrica e Energetica di complessazione

I descrittori geometrici ed energetici calcolati *frame-per-frame* lungo le traiettorie SuMD sono stati aggregati nello stato legato — identificato come l'ultimo plateau stabile della distanza tra i centri di massa — e sintetizzati in due rappresentazioni complementari. Il *Quadrante di Efficacia Inclusionale* (Figura 20) correla l'energia potenziale di interazione totale (E_{tot} , asse Y, in kcal/mol) con l'area di interfaccia sepolta (ΔSASA , X, in $\text{\AA}^2$). Un sistema ottimale si colloca nel quadrante inferiore destro, che corrisponde alla contemporanea massimizzazione della superficie di contatto e della stabilizzazione entalpica. La *heat map* doppia (Figura 21) riporta invece i valori medi per tutte le combinazioni ligando-macrocielo, permettendo un confronto immediato dell'intero piano sperimentale. I sistemi marcati con asterisco presentano traiettorie a campionamento irregolare o ad elevata varianza.

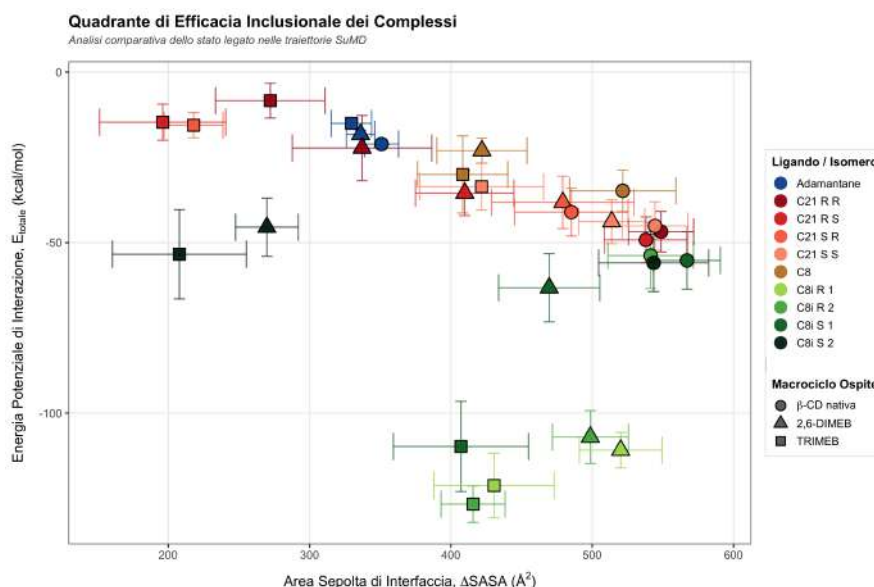


Figura 20: Quadrante di Efficacia Inclusionale dei complessi: energia potenziale di interazione E_{tot} in funzione dell'area di interfaccia sepolta ΔSASA , calcolate sullo stato legato delle traiettorie SuMD. L'efficacia della complessazione aumenta procedendo verso il quadrante inferiore destro (massima stabilizzazione entalpica e massima superficie di contatto tra i due oggetti).

3.1.3 Analisi strutturale delle pose di inclusione legate

L'analisi quantitativa aggregata discussa nei paragrafi precedenti, sintetizzata nel quadrante di efficacia (Figura 20) e nella doppia *heat map* $E_{\text{tot}}/\Delta\text{SASA}$ Figura 21, descrive le tendenze energetiche e geometriche dell'intero piano sperimentale. Per approfondire l'interpretazione meccanicistica dei fenomeni studiati in silico e attribuire un significato strutturale ai valori numerici, le pose di legame dei sistemi più significativi sono state estratte per la visualizzazione in corrispondenza del plateau di binding (il regime stazionario a bassa distanza dei centri di massa, prossimo al minimo energetico della traiettoria) e ispezionate lungo due orientamenti complementari: una *vista*

Analisi SuMD: Efficacia Inclusionale dei Complessi

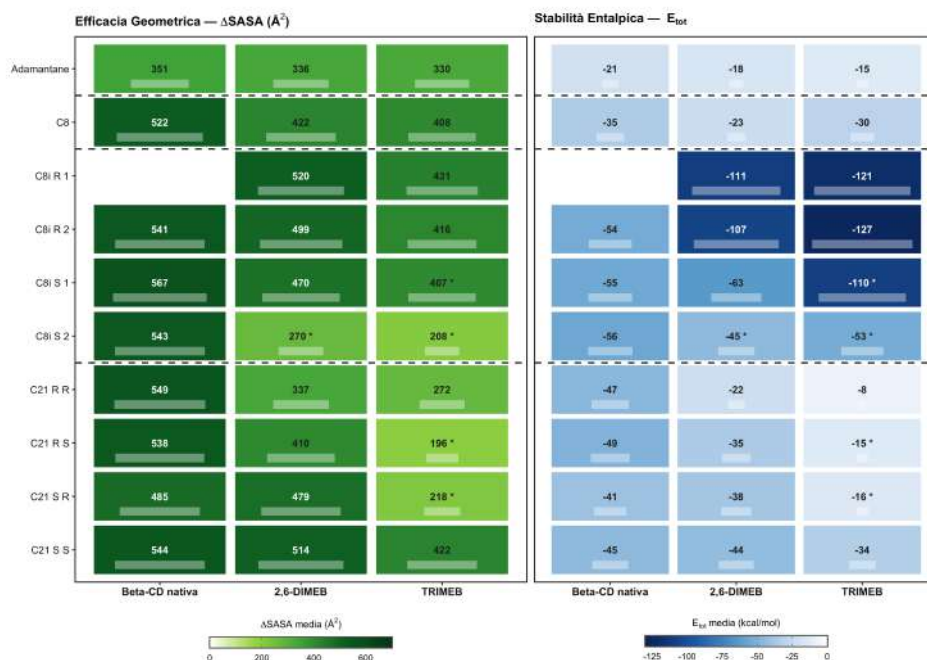


Figura 21: Sintesi tabulare dell’efficacia inclusionale per tutte le combinazioni ligando–macrocielo. A sinistra l’efficacia geometrica (ΔSASA media, $\text{\AA}^2$); a destra la stabilit  entalpica (E_{tot} media, kcal/mol). L’asterisco contrassegna i valori derivanti da traiettorie a campionamento irregolare o ad elevata incertezza. La cella vuota (C8i R 1 con β -CD nativa) rappresenta la mancata simulazione in silico di quel sistema.

laterale, con l’asse della cavit  disposto orizzontalmente, che evidenzia la profondit  di inclusione del guest; e una *vista assiale*, lungo l’asse del macrocielo, che quantifica il grado di occupazione e di copertura del lume.

Adamantano– β -CD La posa rappresentativa dello standard di riferimento (Figura 22) mostra l’adamantano integralmente sepolto e simmetricamente confinato al centro del tronco di cono della β -CD nativa, privo di porzioni esposte al solvente lungo entrambe le viste. La vista assiale (Figura 22b) rivela il lume della ciclodestrina interamente occupato, con il guest perfettamente centrato e la corona di gruppi ossidrilici regolarmente disposta attorno ad esso. Questa geometria di inclusione   la conferma visiva diretta del comportamento entropico discusso in sezione 3.1.4: la gabbia rigida e completamente inscatolata non perde gradi di libert  conformazionali, in coerenza con l’elevata affinit  sperimentale a fronte di un E_{tot} solo moderato (-21 kcal/mol) (Grafici della dinamica molecolare in appendice Figura 57).

C8i R 2–DIMEB Il complesso del Composto 8 idratato con DIMEB (Figura 23) si pu  visualizzare in una inclusione profonda e diagonale, il nucleo eterociclico penetra nella cavit  mentre l’anello aromatico emerge lateralmente, e si osserva nella posa un contatto polare direzionale (legame idrogeno) tra un accettore del guest e il bordo del macrocielo (Figura 23b). L’elevato valore di ΔSASA in questo sistema ($499 \text{ \AA}^2$, a fronte di $336 \text{ \AA}^2$ dell’adamantano nella stessa CD) eccede rispetto a quanto atteso dalla



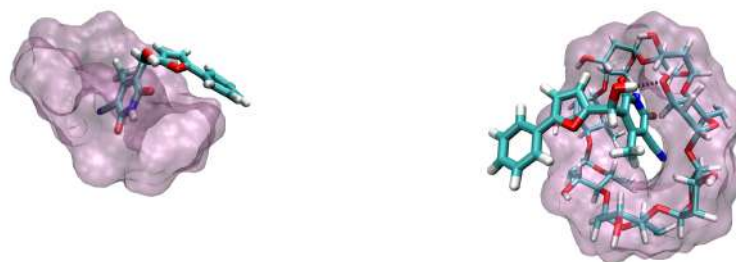
(a) Vista laterale

(b) Vista assiale

Figura 22: Posa di inclusione rappresentativa del complesso Adamantano- β -CD. (a) La vista laterale mostra il guest completamente e simmetricamente sepolto nel tronco di cono. (b) La vista assiale evidenzia il lume della ciclodestrina occupato dal guest al centro. La superficie del macrociclo è resa semitrasparente.

sola inclusione intracavitaria, infatti, in questa geometria conformazionale l'anello aromatico non incapsulato sottrae una superficie al contatto con il solvente per contatto con la parete esterna del macrociclo. Un contributo aggiuntivo, può essere attribuito al parziale ripiegamento delle catene metiliche flessibili del bordo della DIMEB verso il guest, tale contributo richiederebbe tuttavia un'analisi della dinamica conformazionale del macrociclo per poter essere quantificato (Grafici della dinamica molecolare in appendice Figura 69).

(Figura 23b).



(a) Vista laterale (superficie)

(b) Vista assiale

Figura 23: Posa di inclusione rappresentativa del complesso C8i R 2-2,6-DIMEB. (a) Vista laterale: il guest attraversa la cavità in diagonale, con il nucleo eterociclico incluso e l'anello aromatico esposto. (b) Vista assiale: è visibile lo scheletro metilato del macrociclo e il contatto polare direzionale (tratteggiato) tra il guest e il bordo della ciclodestrina.

C8i R 2–TRIMEB Questo complesso corrisponde al minimo energetico assoluto dell'intero screening (-127 kcal/mol; Figura 20), a fronte di una Δ SASA intermedia ($416 \text{ \AA}^2$). La posa rappresentativa (Figura 24) chiarisce questa apparente dissociazione tra stabilità e profondità: la vista laterale (Figura 26a) mostra una inclusione soltanto parziale, in cui penetra il solo nucleo eterociclico mentre il sistema aromatico permane integralmente esterno; la vista assiale (Figura 26b) evidenzia come il guest non sia centrato sull'asse ma appoggiato alla parete interna del macrociclo. La stabilizzazione entalpica non deriva da un confinamento geometrico completo, ma dalla complementarità di contatti di Van der Waals stabiliti dalla porzione inclusa e dalla interazione a bassa intensità di dipolo tra la superficie metilata della CD e il gruppo furanico e fenilico della molecole (Grafici della dinamica molecolare in appendice Figura 79).

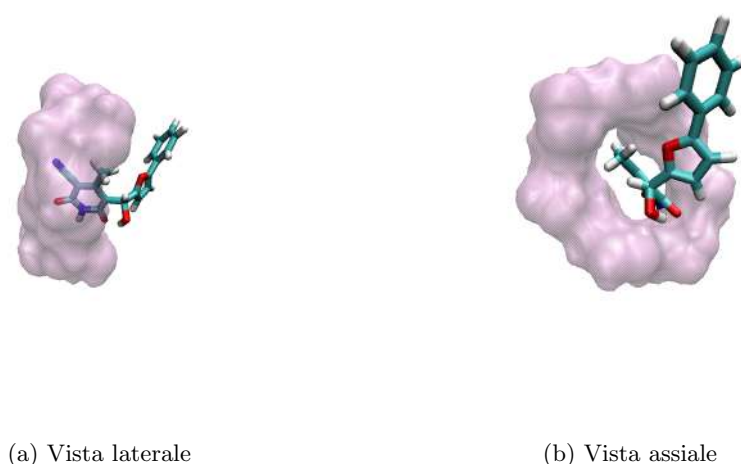
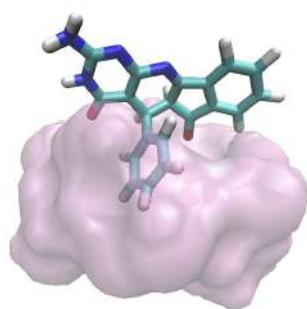


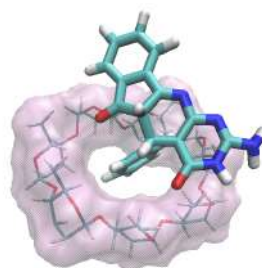
Figura 24: Posa di inclusione rappresentativa del complesso C8i R 2–TRIMEB, corrispondente al minimo energetico assoluto del piano sperimentale. (a) Vista laterale: inclusione parziale del solo nucleo eterociclico, con il sistema aromatico esterno. (b) Vista assiale: il guest occupa eccentricamente il lume, appoggiandosi alla parete interna del macrociclo.

C21 in TRIMEB Il confronto tra gli stereoisomeri del Composto 21 a parità di macrociclo ospite e di scheletro molecolare fornisce la dimostrazione strutturale più probabile di selettività sterica della TRIMEB (Figura 25). L'isomero (S,S) è l'unico a realizzare un'inclusione (Δ SASA $422 \text{ \AA}^2$): nella vista laterale (Figura 25a) il nucleo eterociclico si inserisce nel lume mentre il sistema aromatico condensato resta esterno, e la vista assiale (Figura 25b) mostra una cavità deformata che si adatta parzialmente al guest. Gli isomeri (S,R) (Figura 25c) e (R,S) (Figura 25d) restano completamente esclusi, semplicemente appoggiati sul bordo esterno del macrociclo con il lume sostanzialmente vuoto, in pieno accordo con i valori prossimi allo zero di Δ SASA ($196\text{--}218 \text{ \AA}^2$) e di E_{tot} ($-15/-16$ kcal/mol).

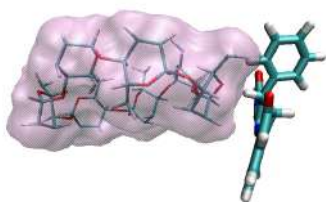
La mancata inclusione degli isomeri (R,S) e (S,R) può essere dovuta a cause sia steriche sia elettroniche. La configurazione relativa opposta dei due centri stereogenici conferisce al guest un profilo molecolare più planare. A determinare l'esclusione



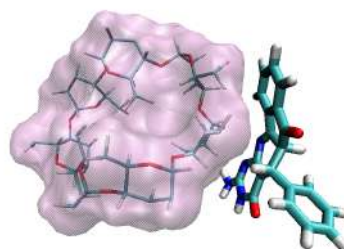
(a) (S,S) – vista laterale



(b) (S,S) – vista assiale



(c) (S,R) – escluso



(d) (R,S) – escluso

Figura 25: Selettività diastereomerica della TRIMEB verso il Composto 21. (a,b) L'isomero (S,S) è l'unico a realizzare un'inclusione, inserendo il nucleo eterociclico nel lume del macrociclo. (c,d) Gli isomeri (S,R) e (R,S) restano completamente esclusi, appoggiati sul bordo esterno con il lume vuoto. Il confronto, a parità di ospite e di scheletro, illustra il comportamento di riconoscimento della cavità completamente metilata.

concorrono due effetti complementari legati ai gruppi carbonilici del guest. Sul piano sterico, l'ingombro laterale indotto da tali gruppi preclude l'alloggiamento nel lume della TRIMEB. Il diametro di questa cavità è intrinsecamente inferiore rispetto a quello della β -CD nativa. La totale metilazione degli ossidril distrugge la rete di legami a idrogeno interanello, esaltando la flessibilità conformazionale del macrociclo. L'elevata libertà torsionale spinge l'anello ad assumere geometrie distorte o parzialmente collassate che restringono ulteriormente l'apertura utile della cavità. Sul piano elettronico, i carbonili polari necessitano, per stabilizzare la posa di transizione all'ingresso della cavità, di interazioni con donatori di legame idrogeno: nella β -CD nativa tale ruolo è svolto dagli idrossili liberi del bordo, mentre nella TRIMEB, il microambiente è fortemente lipofilo e privo di donatori favorendo il carbonile a riorientarsi verso il solvente esterno, opponendosi all'inserimento (Grafici della dinamica molecolare in appendice Figura 85).

3.1.4 Analisi e confronto delle dinamiche con adamantano

Un'analisi preliminare del quadrante di efficacia inclusionale (Figura 20 e 21) evidenzia un comportamento apparentemente controintuitivo per l'adamantano (cerchi blu): la molecola si colloca a valori di area sepolta moderati ($\Delta\text{SASA} \approx 330\text{--}351 \text{ \AA}^2$) e si stabilizza a un livello di energia potenziale d'interazione contenuto ($E_{\text{tot}} \approx -18/-21 \text{ kcal/mol}$), nettamente inferiore in valore assoluto rispetto a quello registrato dai candidati C8i e **C21** in DIMEB e TRIMEB, che riescono a raggiungere anche -127 kcal/mol . Sperimentalmente, tuttavia, l'adamantano è caratterizzato da una costante di affinità (K_a) eccezionalmente elevata verso la β -CD nativa. Questa discrepanza si razionalizza distinguendo l'energia potenziale di interazione calcolata *in silico* (E_{tot}) dall'energia libera di legame reale ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$).

Il processo di complessazione dell'adamantano è guidato primariamente da fattori entropici. La struttura rigida e simmetrica dell'adamantano non perde gradi di libertà conformazionali durante il binding, e l'interazione è sostenuta dall'espulsione delle molecole d'acqua ad alta energia intrappolate nella cavità oligosaccaridica. Il calcolo di E_{tot} esclude la riorganizzazione entropica complessiva: esso coglie unicamente l'interazione diretta guest-macrociclo, escludendo per costruzione i contributi entropici del solvente, sottostimando sistematicamente l'affinità reale dei sistemi guidati da fattori entropici [51]. Al contrario, i candidati C8i e **C21**, molecole più estese e dotate di sistemi aromatici e gruppi polari, instaurano un numero di contatti atomo-atomo maggiore con la cavità ciclodestrinica, da cui i valori di E_{tot} marcatamente più negativi. Tale guadagno entalpico è tuttavia probabilmente controbilanciato in soluzione, da una maggiore perdita entropica legata al congelamento dei rotameri flessibili durante l'inclusione.

Durante il cammino di associazione, il trasferimento nella tasca idrofobica induce frequentemente nel guest una ridistribuzione conformazionale verso configurazioni più estese, che massimizzano la complementarità geometrica con la cavità (*induced fit*).

3.1.5 Analisi differenziale dei macrocicli: effetti di selettività sterica ed entalpica

Lo screening tridimensionale rivela profili di selettività strutturale marcatamente differenziati in base alla natura chimica dell'ospite (Figura 20, Figura 21):

- **TRIMEB (quadrati):** Per **C21**, l'ingombro sterico dato dalla completa metilazione delle unità idrossiliche su C₂, C₃ e C₆ sfavorisce l'accesso alla cavità. I valori estratti dalle dinamiche molecolari di questi sistemi evidenzia la bassa interazione superficiale ($\Delta\text{SASA} \approx 196\text{--}272 \text{ \AA}^2$) e un'energia d'interazione prossima allo zero ($\sim -8/-16 \text{ kcal/mol}$). A determinare l'esclusione concorrono due effetti complementari legati ai gruppi carbonilici del guest. Sul piano sterico, tali gruppi aumentano l'ingombro laterale della molecola, rendendola incompatibile con le dimensioni del lume già ridotto della TRIMEB. Sul piano elettronico, i carbonili destabilizzano la posa di transizione all'ingresso della cavità, infatti nella β -CD nativa gli idrossili liberi del bordo interagiscono con i carbonili di **C21**, mentre la superficie metilata della TRIMEB è priva di donatori causando una repulsione elettrostatica e quindi opponendosi attivamente all'inserimento. L'unica eccezione è rappresentata dall'isomero (S,S), la cui geometria più compatta consente l'inclusione nella cavità ($\Delta\text{SASA} = 422 \text{ \AA}^2$, $E_{\text{tot}} = -34 \text{ kcal/mol}$), come discusso in sezione 3.1.3. Al contrario, con gli isomeri **C8** e C8i (quadrati verde scuro), la TRIMEB stabilisce l'interazione più forte dell'intero piano sperimentale, raggiungendo un minimo energetico tra -110 e -127 kcal/mol a fronte di una ΔSASA intermedia ($407\text{--}431 \text{ \AA}^2$).

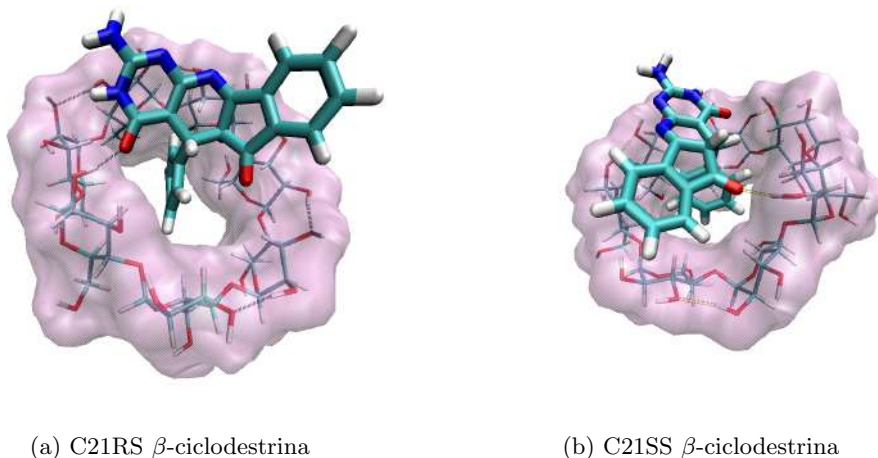


Figura 26: Posa di inclusione rappresentativa del complesso C21RS β -ciclodestrina e C21SS β -ciclodestrina. Si osserva il legame idrogeno tra l'ossidril della beta ciclodestrina e il gruppo carbonilico di **C21**.

- **β -CD nativa (cerchi):** si dimostra il macrociclo termodinamicamente più versatile e stericamente ospitale. Accoglie uniformemente tutti i ligandi, indipendentemente dalla configurazione sterica, guidandoli verso un confinamento geometrico completo ($\Delta\text{SASA} \approx 485\text{--}567 \text{ \AA}^2$ per C8i; $485\text{--}549 \text{ \AA}^2$ per **C21**) e sta-

bilizzandosi in un range energetico omogeneo compreso tra -41 e -56 kcal/mol. La disponibilità degli idrossili liberi sul bordo consente interazioni direzionali con i gruppi polari dei guest, favorendo l'orientamento all'ingresso della cavità anche per gli isomeri che risultano esclusi dalla TRIMEB.

- **2,6-DIMEB (triangoli):** si posiziona come intermedio strutturale e funzionale. Per la serie C8i con 2,6-DIMEB, tre isomeri (R 1, R 2, S 1) mostrano valori di Δ SASA elevati e omogenei (470 – 520 Å²) associati a energie di interazione fortemente negative (63 fino a 111 kcal/mol), suggerendo un'inclusione profonda ed entalpicamente favorevole. L'isomero C8i S 2 costituisce un'eccezione significativa: con SASA di soli 270 Å² e E_{tot} di 45 kcal/mol (entrambi marcati con asterisco), indica un minore avanzamento geometrico e una stabilizzazione entalpica ridotta, associata a una mancata complessazione.

In conclusione, l'indagine *in silico* tramite SuMD conferma che la modulazione chimica delle ciclodestrine per metilazione introduce rigide barriere di selettività sterica ed elettronica (TRIMEB/C21), ma è in grado di sbloccare canali di stabilizzazione entalpica straordinariamente efficienti (TRIMEB/C8i), sfruttabili per la progettazione di forme farmaceutiche allo stato solido.

3.2 Confronto tra ciclodestrine in acqua

Nell'analisi dei risultati riguardanti le diverse specie di ciclodestrine dotate del maggior potere solubilizzante nei confronti dei candidati inibitori Composto 21 (**C21**) e Composto 8 (**C8**), è stato condotto uno screening comparativo in ambiente acquoso seguendo il protocollo di equilibrizzazione a breve e lungo termine (40 h e 1 settimana). La quantificazione della concentrazione totale di *guest* solubilizzato è stata eseguita mediante spettrofotometria UV-Vis, interpolando i valori di assorbanza registrati con le rispettive rette di calibrazione analitica:

- Per il **Composto 21 (C21)**, la retta determinata in DMSO puro alla lunghezza d'onda di massima assorbanza ($\lambda = 265$ nm) risponde all'equazione linearizzata $y = 37,85x$ con un coefficiente di correlazione $R^2 = 0,9998$.
- Per il **Composto 8 (C8)**, la quantificazione è stata eseguita a $\lambda = 331$ nm in una soluzione acquosa al 90% di DMSO (utilizzata per causare la decomplessazione tra host e guest), sfruttando l'equazione $y = 17,549x$ ($R^2 = 0,9959$) ricavata dalla retta di calibrazione.

I risultati numerici derivati dallo screening sono riassunti nella Tabella 11.

3.2.1 Analisi del comportamento di C21

I dati raccolti confermano la marcata insolubilità intrinseca di *C21* in ambiente acquoso non modificato (*No CD*), il quale fa registrare una concentrazione di appena $1,18$ μM a 40 h e $1,9$ μM ad una settimana. Tale comportamento riflette l'elevata energia

Tabella 11: Profili di solubilità apparente (μM) dei candidati inibitori **C21** e **C8** a 25°C in assenza e in presenza di diverse classi di ciclodestrine native e funzionalizzate ($13,2\text{ mM}$), con valori ottimizzati a una cifra decimale.

Campione	Composto 21 (C21) [μM]		Composto 8 (C8) [μM]
	40 h	1 settimana	1 settimana
No CD	$1,2 \pm 0,0$	$1,9 \pm 0,0$	$3,2 \pm 2,9$
α -CD	$20,1 \pm 0,3$	$16,1 \pm 0,2$	$9,5 \pm 2,9$
β -CD	$12,4 \pm 0,2$	$26,1 \pm 0,6$	$20,8 \pm 2,9$
γ -CD	$3,4 \pm 0,0$	$3,2 \pm 0,0$	$8,4 \pm 2,9$
DM- β CD	$32,9 \pm 0,9$	$23,4 \pm 0,5$	$69,7 \pm 3,4$
TM- β CD	$22,3 \pm 0,5$	$27,7 \pm 0,7$	$8,4 \pm 2,9$
HP- β CD	$14,7 \pm 0,3$	$13,4 \pm 0,2$	$18,4 \pm 2,9$
CM- β CD	–	–	$31,0 \pm 3,0$

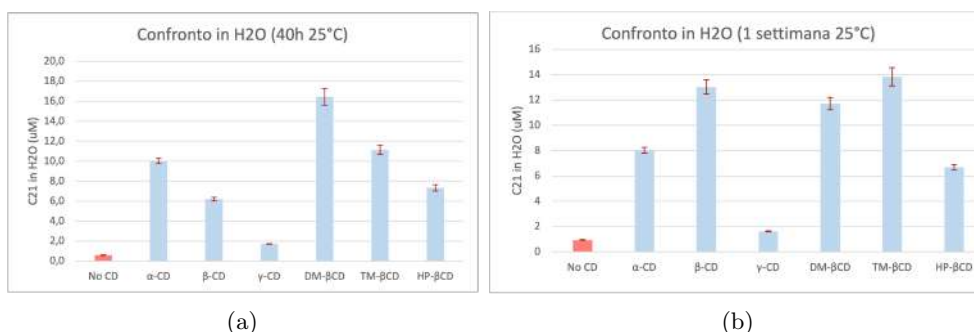


Figura 27: Studio comparativo della solubilità apparente del candidato inibitore **C21** in ambiente acquoso a 25°C in assenza (*No CD*) e in presenza di ciclodestrine native e funzionalizzate alla concentrazione di $13,2\text{ mM}$. I grafici mostrano la concentrazione di analita solubilizzato (μM) in funzione del tempo di incubazione: (a) 40 h di agitazione orbitale; (b) 1 settimana di agitazione orbitale. Le barre d'errore rosse quantificano la propagazione dell'errore sperimentale.

reticolare coesiva impressa dalla rigidità planare del nucleo eterociclico condensato dell'indenone, che ostacola fortemente la solvatazione passiva nel bulk del solvente.

L'aggiunta delle ciclostreine determina un incremento della solubilità apparente che varia sensibilmente in funzione alle modificazioni chimiche della cavità ciclostreina. Nelle prime fasi dello studio (40 h), i derivati metilati si dimostrano gli agenti solubilizzanti di gran lunga più efficienti: DM- β CD (DIMEB) permette di raggiungere il valore picco di 32,9 μ M, seguita dalla TM- β CD (TRIMEB) con 22,3 μ M e dalla α -CD nativa (20,1 μ M). L'eccellente performance della DM- β CD e della TM- β CD concorda con i modelli descritti in letteratura, secondo cui la parziale o totale metilazione delle corone ossidriliche esterne estende l'idrofobicità complessiva della cavità, incrementando l'affinità termodinamica di inclusione per *guest* fortemente lipofili. Al contrario, la γ -CD mostra la minore capacità solubilizzante (3,4 μ M), suggerendo che il diametro interno del suo macrociclo a 8 unità glucidiche risulta troppo ampio per garantire una complementarietà geometrica efficace e un accoppiamento *host-guest* stabile Figura 27. Sebbene queste evidenze divergano parzialmente dai dati in silico, la spiccata capacità solubilizzante della TRIMEB verso **C21** suggerisce una plausibile dinamica chimico-fisica. L'effetto si ricollega alle superiori proprietà bagnanti del macrociclo metilato rispetto alla β -CD nativa. Questa bagnabilità scherma l'ospite. Interponendosi tra le unità libere, la TRIMEB ne inibisce il π -stacking intermolecolare allo stato solido e ne contrasta l'impacchettamento cristallino.

L'analisi condotta a lungo termine (1 settimana) evidenzia deviazioni cinetiche ed equilibri dinamici secondari. Sistemi quali la β -CD nativa e la TM- β CD mostrano un significativo incremento tardivo della solubilità, attestandosi rispettivamente a 26,1 μ M e 27,7 μ M. Nel sistema contenente DM- β CD si assiste a una contrazione della quota disciolta, che scende a 23,4 μ M Figura 28.

Ipotesi di instabilità chimica: ossidazione di C21 Una ipotesi riguardo all'anomalo profilo cinetico a lungo termine di **C21** (1 settimana) può essere ricondotta ad un probabile fenomeno di instabilità chimica. Il nucleo eterociclico del candidato **C21** presenta infatti un sistema parzialmente ridotto (anello diidropiridinico condensato) che risulta intrinsecamente suscettibile a processi di deidrogenazione ossidativa che portano all'aromatizzazione dell'eterociclo condensato Figura 29b.

Questo processo ossidativo può essere ricondotto principalmente a due cause concorrenti, favorite dal prolungato tempo di permanenza (7 giorni) del composto in soluzione acquosa:

1. **Ossidazione mediata dall'ossigeno disciolto in acqua:** l'ossigeno molecolare capillarmente presente nel bulk del mezzo acquoso può agire da accettore di elettroni, promuovendo la graduale conversione della specie diidro-derivata nella corrispondente forma aromatica.

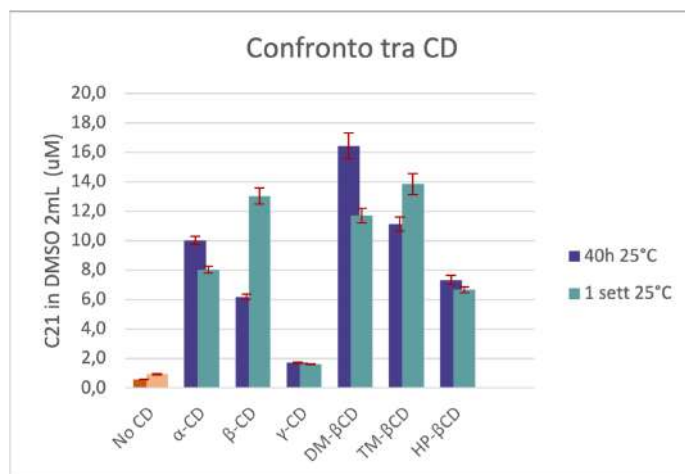


Figura 28: Screening comparativo del potere solubilizzante di ciclodestrine native e funzionalizzate (13,2 mM) nei confronti di **C21** a 40 h e 1 settimana di incubazione (25°C). I valori rappresentano la concentrazione di analita (µM) ridissolto in 2 mL di DMSO post-liofilizzazione. Le barre d'errore rosse quantificano la propagazione dell'errore sperimentale.

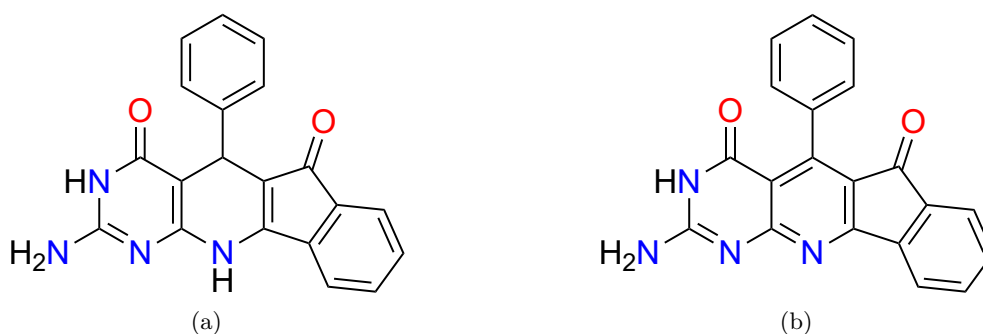


Figura 29: (a) **C21**; (b) Ipotesi struttura **C21** ossidato

2. **Processi di foto-ossidazione radicalica:** l'esposizione continua e prolungata alla luce ambientale durante la fase di agitazione orbitale può innescare transizioni fotochimiche ed eccitazioni di stato, catalizzando l'ossidazione della molecola.

L'aromatizzazione dell'anello modifica le proprietà chimico-fisiche del *guest*, la diversa coniugazione π altera la geometria dello *scaffold*, modifica il potenziale elettrostatico superficiale e modifica il profilo di lipofilia complessiva. Di conseguenza, la transizione chimica da specie parzialmente ridotta a specie completamente aromatica modifica sia la solubilità in mezzo acquoso del candidato sia la complementarità geometrico-energetica alla base del fenomeno di inclusione *host-guest* (utile all'interpretazione del decremento di solubilità apparente registrato con la DM- β CD). Questa instabilità chimica può quindi essere una spiegazione plausibile del cambio di comportamento del sistema a lungo termine.

3.2.2 Analisi del comportamento del Composto 8 (C8)

Il profilo di solubilità acquosa di **C8** a una settimana rivela uno scenario simile a quello osservato per il candidato **C21**, sebbene caratterizzato da una selettività strutturale ancora più marcata verso specifici derivati.

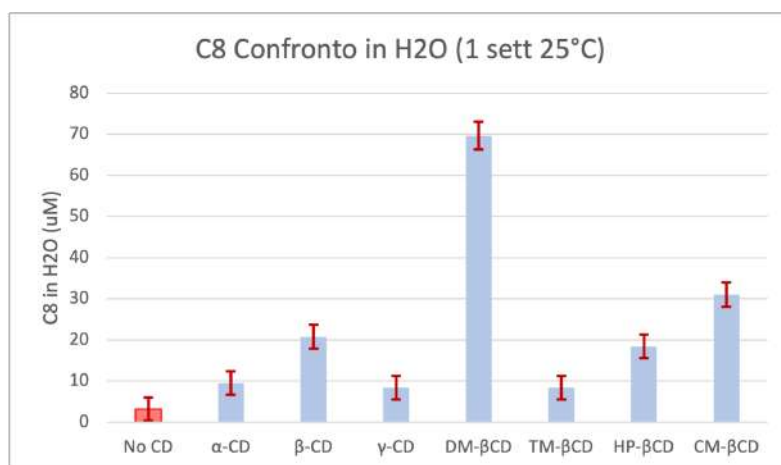


Figura 30: Profilo di solubilità apparente (μM) del candidato inibitore **C8** in ambiente acquoso dopo 1 settimana di equilibrizzazione alla temperatura costante di 25°C . Il grafico mostra la solubilizzazione del sistema in assenza (*No CD*) e in presenza di ciclodestrine native e derivati funzionalizzati alla concentrazione standard di 6,2 mM. Le barre d'errore rosse quantificano la propagazione dell'errore sperimentale.

La DM- β CD si riafferma come l'*host* con capacità solubilizzanti migliore, conducendo la solubilità apparente di **C8** fino al valore massimo di $69,7 \mu\text{M}$. Un incremento significativo è indotto anche dalla carbossimetil- β -ciclodestrina (CM- β CD), con la quale si isola una concentrazione di $31,0 \mu\text{M}$, evidenziando come l'introduzione di cariche sulla corona del macrociclo possa collaborare alla stabilità idrofila superficiale del sistema. I derivati, β -CD nativa e HP- β CD, mostrano un'efficacia minore, stabilizzandosi intorno ai $18\text{--}20 \mu\text{M}$, mentre la α -CD, la γ -CD e la TM- β CD non producono incrementi significativamente rilevanti rispetto al campione di controllo senza aggiunta di agenti complessanti ($3,1 \mu\text{M}$) Figura 30.

L'errore associato ai dati di solubilità è stato ricavato mediante propagazione delle incertezze strumentali. Si evidenzia che l'errore sperimentale complessivo potrebbe risentire dei passaggi procedurali critici, come l'efficienza di recupero post-liofilizzazione e l'adsorbimento sulle membrane di filtrazione. In particolare, per le prove condotte su **C8**, l'elevato valore dell'incertezza associata ($\Delta C \approx 2,8 - 3,0 \mu\text{M}$) riflette le sfide analitiche connesse alla manipolazione di fasi solide a bassissima solubilità intrinseca, dove minime oscillazioni termiche o igrometriche ambientali durante la filtrazione e la diluizione in DMSO possono alterare la quota finale di analita libero o parzialmente aggregato in soluzione.

3.3 Risultati nella determinazione della costante di complessazione

Lo studio dell'interazione supramolecolare tra i candidati inibitori di NEK6 (C8 e C21) e le ciclodestrine (β -CD, DIMEB e TRIMEB) è stato condotto applicando il metodo della solubilità di fase di Higuchi-Connors.

La quantificazione spettrofotometrica dei candidati inibitori (C8 e C21) è stata eseguita previa costruzione delle rette di calibrazione nei diversi mezzi analitici considerati. I parametri lineari fondamentali ricavati sperimentalmente — pendenza (m), incertezza della pendenza (Δm) e coefficiente di determinazione (R^2) — sono riassunti nella Tabella 12 e costituiscono la base analitica per la conversione dei segnali di assorbanza in valori di concentrazione micromolare (μM).

Tabella 12: Parametri analitici delle rette di calibrazione spettrofotometriche per C8 e C21 nei diversi solventi.

Farmaco	Solvente	Pendenza m ($\text{AU} \cdot \text{M}^{-1}$)	Δm ($\text{AU} \cdot \text{M}^{-1}$)	R^2
C8	90% v/v DMSO	17549	425	0.9984
C8	90% v/v DMSO	17549	425	0.9989
C21	60% v/v DMSO	27206	560	0.9912
C21	60% v/v DMSO	27206	560	0.9934
C21	5% v/v DMSO	36152	115	0.9997

Le sessioni sperimentali condotte in assenza di cosolventi organici, come da protocollo originale del metodo, non hanno generato profili di solubilità riproducibili o linearità positive interpretabili.

I primi tentativi di caratterizzazione hanno riguardato il sistema costituito dal candidato C8 in presenza di β -ciclodestrina (Figura 31). Questo esperimento è stato però escluso dalle fasi di calcolo a causa di segnali spettrofotometrici deboli. L'insufficiente assorbanza UV ha impedito l'estrapolazione del profilo di solubilità di fase e la conseguente stima della costante di associazione. Analogamente, anche gli altri esperimenti condotti in acqua pura hanno evidenziato una marcata assenza di linearità riproducibile, come illustrato nei corrispondenti diagrammi di solubilità (Figura 32 e 33).

Tabella 13: Concentrazioni sperimentali ed errori per il sistema C8 / β -CD in acqua.

Campione	$[\beta\text{-CD}]$ (mM)	$\Delta[\beta\text{-CD}]$ (mM)	$[\text{C8}]$ (μM)	$\Delta[\text{C8}]$ (μM)
Punto 0	0.00	0.00	1.2	0.2
Punto 1	1.50	0.02	1.1	0.1
Punto 2	3.00	0.03	1.1	0.1
Punto 3	6.00	0.06	1.0	0.1
Punto 4	9.00	0.08	1.0	0.1
Punto 5	12.00	0.11	1.1	0.1
Parametri della retta di calibrazione di riferimento (90% DMSO):				
$m = 24851 \text{ AU} \cdot \text{M}^{-1}$ $\Delta m = 182 \text{ AU} \cdot \text{M}^{-1}$ $R^2 = 0.9981$				

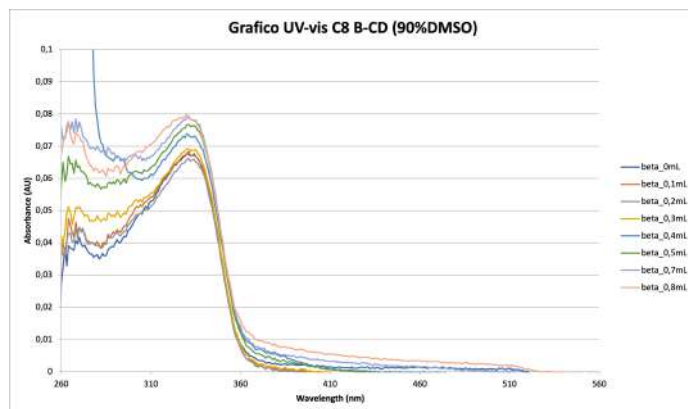


Figura 31: Grafico delle assorbanze delle prove per C8 / β -CD in acqua pura (segnali di assorbanza insufficienti per la determinazione della costante).

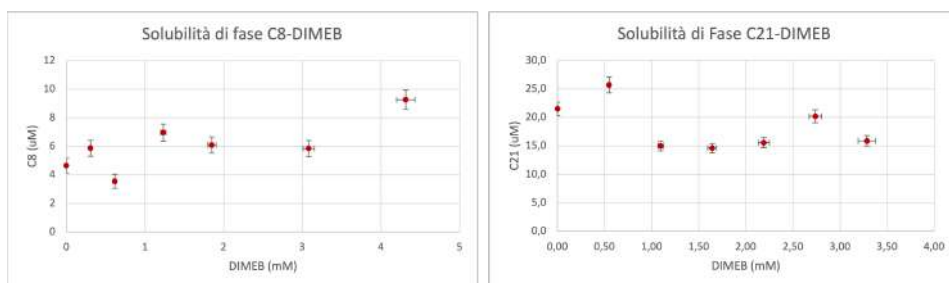


Figura 32: Diagrammi di solubilità di fase in acqua per i sistemi C8 / DIMEB (sinistra) e C21 / DIMEB (destra).

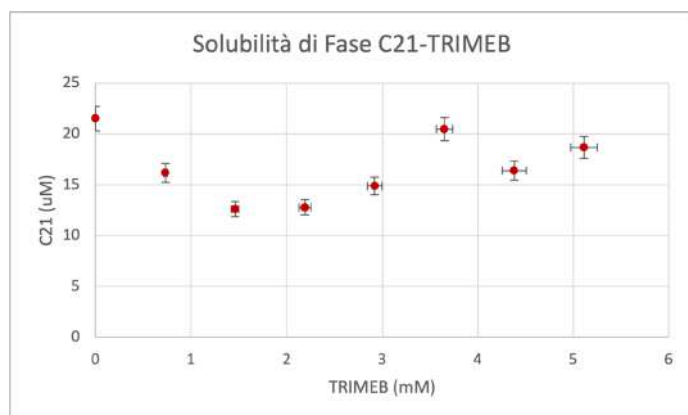


Figura 33: Diagramma di solubilità di fase in acqua per il sistema C21 / TRIMEB.

Tabella 14: Concentrazioni sperimentali ed errori per il sistema C8 / DIMEB in acqua.

Campione	[DIMEB] (mM)	Δ [DIMEB] (mM)	[C8] (μ M)	Δ [C8] (μ M)
Punto 0	0.00	0.00	8.5	0.5
Punto 1	1.25	0.02	7.1	0.4
Punto 2	2.50	0.03	7.0	0.4
Punto 3	5.00	0.05	6.8	0.4
Punto 4	7.50	0.07	6.9	0.4
Punto 5	10.00	0.09	7.0	0.4
Parametri della retta di calibrazione di riferimento (90% DMSO):				
$m = 17549 \text{ AU} \cdot \text{M}^{-1} \quad \quad \Delta m = 425 \text{ AU} \cdot \text{M}^{-1} \quad \quad R^2 = 0.9984$				

Tabella 15: Concentrazioni sperimentali ed errori per il sistema C21 / DIMEB in acqua pura.

Campione	[DIMEB] (mM)	Δ [DIMEB] (mM)	[C21] (μ M)	Δ [C21] (μ M)
Punto 0	0.00	0.00	13.9	0.8
Punto 1	0.61	0.02	11.2	0.7
Punto 2	1.22	0.02	11.1	0.6
Punto 3	2.45	0.04	11.0	0.6
Punto 4	3.67	0.06	11.0	0.6
Punto 5	4.90	0.08	11.2	0.7
Parametri della retta di calibrazione di riferimento (60% DMSO):				
$m = 27206 \text{ AU} \cdot \text{M}^{-1} \quad \quad \Delta m = 560 \text{ AU} \cdot \text{M}^{-1} \quad \quad R^2 = 0.9912$				

Tabella 16: Concentrazioni sperimentali ed errori per il sistema C21 / TRIMEB in acqua pura.

Campione	[TRIMEB] (mM)	Δ [TRIMEB] (mM)	[C21] (μ M)	Δ [C21] (μ M)
Punto 0	0.00	0.00	21.5	1.2
Punto 1	0.73	0.02	16.2	0.9
Punto 2	1.46	0.03	16.0	0.9
Punto 3	2.92	0.05	15.8	0.9
Punto 4	4.38	0.07	15.9	0.9
Punto 5	5.84	0.10	16.1	0.9
Parametri della retta di calibrazione di riferimento (60% DMSO):				
$m = 27206 \text{ AU} \cdot \text{M}^{-1} \quad \quad \Delta m = 560 \text{ AU} \cdot \text{M}^{-1} \quad \quad R^2 = 0.9934$				

Al fine di incrementare la bagnabilità iniziale dei campioni solidi e favorirne la solubilizzazione, sono stati eseguiti esperimenti impiegando una miscela idro-organica contenente il 5% v/v di DMSO. In tali condizioni, due sistemi hanno mostrato un profilo lineare coerente con un diagramma di tipo A_L (Figura 13) [14], permettendo di creare un diagramma di solubilità di fase con relativa retta di tendenza Figura 34 e 35.

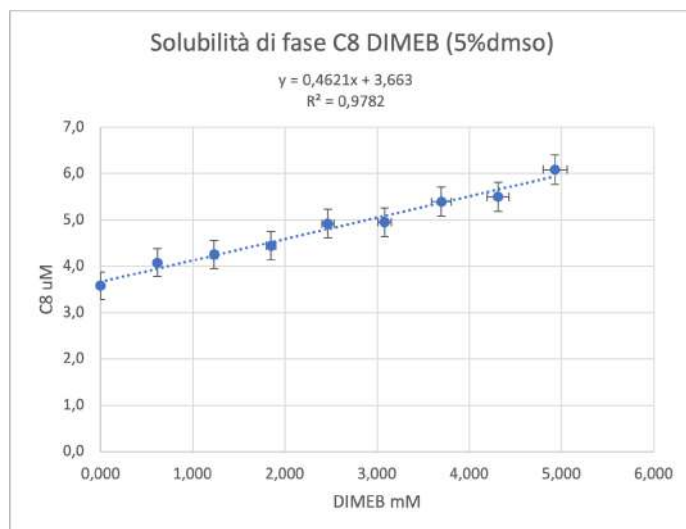


Figura 34: Diagramma di solubilità di fase per il sistema C8/DIMEB in presenza di 5% v/v di DMSO. Sono riportate la retta di tendenza lineare, completa di equazione e coefficiente (R^2), e le barre di errore relative a ciascun punto sperimentale, calcolate mediante propagazione dell'errore.

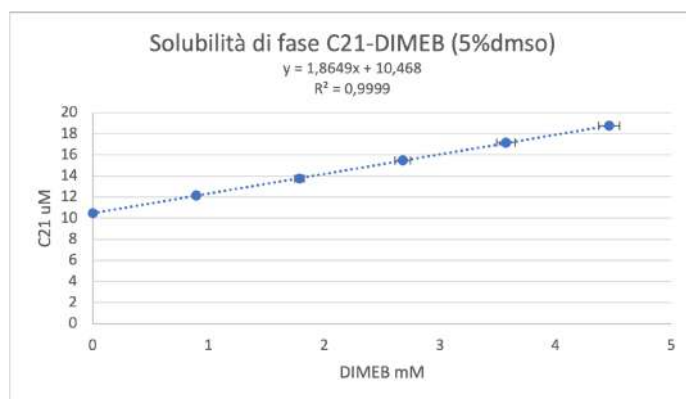


Figura 35: Diagramma di solubilità di fase per il sistema C21/DIMEB in presenza di 5% v/v di DMSO. Sono riportate la retta di tendenza lineare, completa di equazione e coefficiente (R^2), e le barre di errore relative a ciascun punto sperimentale, calcolate mediante propagazione dell'errore.

I corrispondenti valori sperimentali di concentrazione di DIMEB e dei guest solubilizzati (C8 e C21) con rispettivi errori, sono riportati nelle Tabella 17 e 18.

Questo comportamento ha consentito il calcolo formale della costante di complessazione apparente $K_{1:1}$ sfruttando la pendenza della retta di tendenza del grafico e la solubilità intrinseca (S_0) del rispettivo guest.

Tabella 17: Valori sperimentali di concentrazione di host (DIMEB) e guest (C8) in presenza di 5% v/v di DMSO.

Campione	[DIMEB] (mM)	Δ [DIMEB] (mM)	[C8] (μ M)	Δ [C8] (μ M)
Punto 0	0.00	0.00	5.1	0.1
Punto 1	1.25	0.02	6.5	0.1
Punto 2	2.50	0.03	7.9	0.1
Punto 3	5.00	0.05	10.5	0.2
Punto 4	7.50	0.07	13.2	0.2
Punto 5	10.00	0.09	16.0	0.2
Parametri della retta di calibrazione di riferimento (90% DMSO - Inc.):				
$m = 17549 \text{ AU} \cdot \text{M}^{-1} \quad \quad \Delta m = 425 \text{ AU} \cdot \text{M}^{-1} \quad \quad R^2 = 0.9989$				

Tabella 18: Valori sperimentali di concentrazione di host (DIMEB) e guest (C21) in presenza di 5% v/v di DMSO.

Campione	[DIMEB] (mM)	Δ [DIMEB] (mM)	[C21] (μ M)	Δ [C21] (μ M)
Punto 0	0.00	0.00	10.5	0.1
Punto 1	0.89	0.02	12.1	0.2
Punto 2	1.78	0.03	13.8	0.2
Punto 3	3.57	0.05	17.1	0.2
Punto 4	5.35	0.07	20.4	0.3
Punto 5	7.14	0.10	23.7	0.3
Parametri della retta di calibrazione di riferimento (5% DMSO - Non diluito):				
$m = 36152 \text{ AU} \cdot \text{M}^{-1} \quad \quad \Delta m = 115 \text{ AU} \cdot \text{M}^{-1} \quad \quad R^2 = 0.9997$				

- **Sistema C8 / DIMEB (5% DMSO):** il diagramma di solubilità di fase ha mostrato un andamento lineare con una pendenza pari a 1.09×10^{-3} , presenta un valore di solubilità intrinseca sperimentale $S_0 = 8.5 \mu\text{M}$, l'applicazione del modello di Higuchi-Connors ha permesso di ricavare una costante di stabilità apparente $K_{1:1} = 126 \pm 7 \text{ M}^{-1}$ (Figura 34).
- **Sistema C21 / DIMEB (5% DMSO):** la retta di regressione ha mostrato una pendenza pari a 1.85×10^{-3} e una solubilità intrinseca calcolata nel mezzo di $S_0 = 10.5 \mu\text{M}$, restituendo dopo il calcolo una costante di associazione apparente $K_{1:1} = 178 \pm 1 \text{ M}^{-1}$ (Figura 35).

Per quanto riguarda il sistema **C21** in 5% v/v di DMSO, è stata adottata una variante procedurale differente. Infatti, rispetto ai protocolli analitici visti finora, l'assorbanza dei campioni è stata misurata direttamente sulla soluzione iniziale filtrata, senza eseguire una diluizione al 60% in DMSO per favorire la decomplessazione. Questa scelta è supportata da indagini preliminari che hanno dimostrato come il profilo spettroscopico del guest non venisse alterato o distorto dalla presenza delle ciclodestrine in soluzione.

Nonostante questo era comunque necessario costruire una retta di calibrazione per C21 in soluzione acquosa al 5% di DMSO prevenendone la precipitazione precoce. Tale ostacolo è stato superato sfruttando uno stato cinetico metastabile: il C21 è stato inizialmente solubilizzato in DMSO puro ad un'elevata concentrazione, successivamente aliquote minime di questa soluzione sono state addizionate alla soluzione acquosa,

garantendo la frazione finale di cosolvente fissa al 5% v/v. L'introduzione di volumi così ridotti di fase organica ha rallentato la cinetica precipitazione, mantenendo temporaneamente il farmaco in soluzione per un intervallo di tempo sufficiente a consentire la lettura spettrofotometrica e la conseguente formalizzazione di una retta di calibrazione altamente affidabile Figura 36.

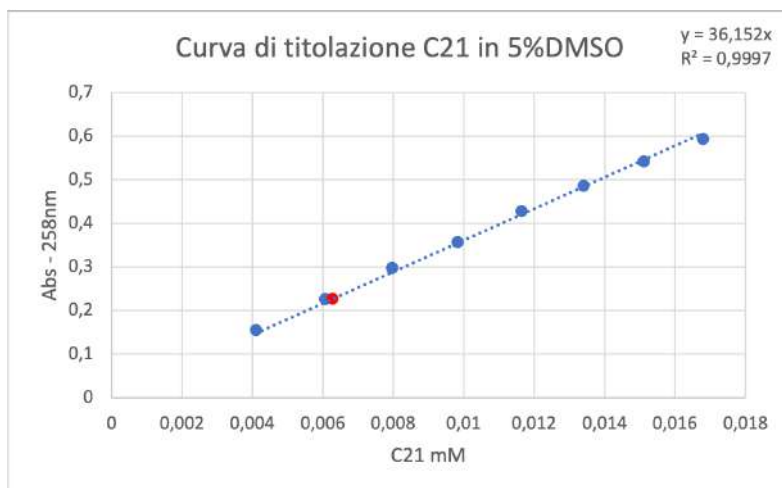


Figura 36: Retta di calibrazione per **C21** in 5%DMSO. Sono riportate la retta di tendenza lineare, completa di equazione e coefficiente (R^2)

3.3.1 Considerazioni critiche sull'incertezza e sulla riproducibilità dei risultati

Se da un lato l'approccio matematico basato sul metodo di Higuchi-Connors ha consentito di determinare pendenze e costanti per le serie in presenza di 5% DMSO (Figura 34 e 35), dall'altro un esame metodologico approfondito impone cautela nell'interpretazione dei dati, a causa dell'elevata incertezza intrinseca associata a queste specifiche sessioni sperimentali. La linearità della retta di tendenza riscontrata non deve essere interpretata come il definitivo superamento delle criticità analitiche, in quanto numerose repliche condotte in condizioni analoghe hanno evidenziato una non-riproducibilità dei dati. Le ragioni di tale inaffidabilità sono da attribuire a una serie di fattori limitanti:

1. **Criticità della fase di filtrazione:** La procedura sperimentale ha previsto l'impiego di volumi di soluzione estremamente ridotti. Dal punto di vista analitico, la disponibilità di volumi così contenuti ha precluso la possibilità di scartare una prima aliquota abbondante di filtrato, operazione necessaria per saturare i siti di adsorbimento aspecifico della membrana filtrante. Di conseguenza, non è statisticamente possibile escludere che una quota indeterminata di guest sia stata trattenuta sulla superficie del filtro, alterando in modo imprevedibile le concentrazioni misurate successivamente.
2. **Entità dei segnali spettrofotometrici:** I valori di assorbanza registrati per una parte dei punti sperimentali si sono collocati frequentemente in un range

ridotto, compreso tra 0.1 e 0.3 unità di assorbanza (UA), e a volte inferiori. Operare in prossimità del limite inferiore di sensibilità dello strumento riduce il rapporto segnale/rumore, rendendo la valutazione di una linearità molto vulnerabile a piccole variazioni operative durante le fasi sperimentali.

3. **Significato statistico delle barre d'errore:** È fondamentale evidenziare che le barre d'errore associate ai punti sperimentali derivano da un calcolo matematico basato sulle formule di propagazione dell'errore (derivanti dalle tolleranze delle strumentazioni e della vetreria volumetrica). Questi valori non riflettono una variabilità statistica derivata da diversi esperimenti indipendenti ($N > 1$). Qualora si procedesse a una determinazione statistica formale, l'ampiezza delle barre subirebbe un incremento tale da suggerire che la linearità osservata in alcune sessioni possa essere attribuita a fluttuazioni stocastiche favorevoli piuttosto che a un trend termodinamico solido.
4. **Natura della costante e sensibilità al parametro S_0 :** Le costanti di stabilità $K_{1:1}$ determinate non costituiscono costanti termodinamiche pure in ambiente acquoso, bensì parametri apparenti descrittivi di un sistema ternario complesso contenente il 5% di cosolvente organico. Inoltre, l'equazione di Higuchi-Connors:

$$K_{1:1} = \frac{\text{pendenza}}{S_0 \cdot (1 - \text{pendenza})} \quad (15)$$

esibisce una sensibilità iperbolica nei confronti del valore di solubilità intrinseca del farmaco (S_0). Le variazioni o incertezze nella determinazione sperimentale di questo dato si ripercuotono in modo elevato sul calcolo della costante K , modificandone drasticamente l'ordine di grandezza.

Un'ulteriore criticità mette in discussione l'affidabilità del metodo di Higuchi-Connors per questo specifico caso, è legata all'instabilità chimica dei candidati inibitori durante il lungo periodo di incubazione in ambiente acquoso. Il protocollo sperimentale prevede un'agitazione continua del sistema termodinamico per ben 72 ore. Tuttavia, l'analisi quantitativa tramite UV-Vis presuppone l'integrità strutturale del cromoforo e la conseguente costanza del coefficiente di estinzione molare (legge di Lambert-Beer) per tutta la durata del saggio. Come precedentemente discusso, entrambe le molecole target risultano chimicamente labili in soluzione acquosa:

- *Equilibrio di idratazione del Composto 8 (C8):* In presenza di acqua, il **C8** va incontro a un attacco nucleofilo sul sito vinilico che altera l'ibridazione del carbonio ponte da sp^2 a sp^3 [4]. Questo processo reversibile di idratazione interrompe la coniugazione elettronica π tra l'anello piridonico e quello furanico, provocando una drastica variazione delle proprietà ottiche, come evidenziato dalla scomparsa della banda di assorbimento a 480 nm a favore di una banda a 330 nm, lunghezza d'onda che tra l'altro è stata usata come riferimento per la quantificazione in fase di analisi Figura 5.
- *Ossidazione del Composto 21 (C21):* Il sistema parzialmente ridotto dell'anello diidropiridinico condensato di **C21**, in soluzione acquosa per tempi prolungati, va

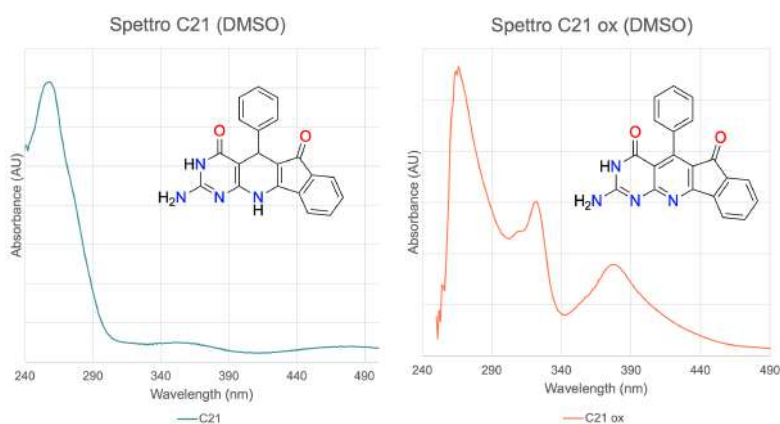


Figura 37: Spettri rappresentativi di **C21** (destra) e c21 ossidato (sinistra) in DMSO, nello spettro di c21 ox compare un picco a 325nm e uno a 380nm

incontro a una aromatizzazione ossidativa. Probabilmente a causa dell'ossigeno molecolare disciolto nel solvente e per processi di foto-ossidazione viene modificato il sistema di delocalizzazione elettronica della molecola con una conseguente variazione del suo profilo di assorbimento UV Figura 29.

La coesistenza di miscele dinamiche di farmaco intatto, forma idratata (nel caso di **C8**) e forma ossidata (nel caso di **C21**), rende il riferimento delle rette di calibrazione non in grado di quantificare in modo assoluto e selettivo la reale concentrazione del target. Queste limitazioni analitiche in soluzione acquosa, avvalorano la scelta metodologica di approfondire i meccanismi di inclusione *host-guest*, impiegando tecniche di complessazione allo stato solido, affiancate dall'approccio predittivo *in silico* della Dinamica Molecolare Supervisionata (SuMD).

Per concludere, nonostante l'aggiunta del 5% di DMSO abbia permesso di isolare alcuni profili interpretabili, la forte dispersione dei dati complessivi e la scarsa riproducibilità spingono a considerare i valori numerici ottenuti come stime indicative dell'ordine di grandezza dell'affinità supramolecolare, piuttosto che come costanti termodinamiche rigorose.

3.4 Complessazione

Dopo le operazioni sperimentali di complessazione allo stato solido sono state visibili delle variazioni cromatiche e morfologiche rispetto alle corrispondenti miscele fisiche. Mentre queste ultime si presentavano come polveri eterogenee dal colore sbiadito, in cui risultava possibile distinguere a occhio nudo dei micro-granuli cristallini dei componenti, i prodotti trattati tramite co-macinazione hanno mostrato una maggiore uniformità.

In particolare, per tutte le combinazioni dei candidati inibitori con le rispettive ciclodestrine (β -CD e DIMEB), si è osservato un cambiamento verso colorazioni omogenee e molto intense: viola per i sistemi contenenti il **C8** e un rosso per quelli basati sul **C21**. Questa evidenza visiva permette un primo e immediato riscontro

qualitativo del incremento del livello di omogeneizzazione e della transizione verso una nuova fase solida.

Le tre metodologie preparative impiegate co-macinazione sono state comparate permettendo fare delle considerazioni in termini di resa quantitativa, efficienza del processo e riproducibilità:

- **Mortaio in ceramica (porcellana non invetriata):** Il mortaio in ceramica garantisce un elevato attrito iniziale necessario per il trasferimento dell'energia cinetica al campione, ma l'alta porosità superficiale del materiale durante la co-macinazione assistita da solvente ha favorito una forte adesione della pasta, disperdendo il materiale in uno strato sottile e riducendone drasticamente la percentuale di recupero effettivo sulla massa totale di 250 mg. Oltre a questo l'applicazione manuale della forza ha precluso la possibilità di esercitare una pressione costante e uniforme sul volume del campione essendo distribuito in gran parte sulle pareti.
- **Mortaio in vetro (fondo liscio e pestello satinato):** Ha permesso di superare parzialmente i limiti della ceramica. La ridotta porosità della superficie vetrosa ha diminuito la dispersione del composto, mantenendo la massa coesa sul fondo del reattore. Ciò ha consentito di concentrare l'azione meccanica attraverso una forza verticale di compressione costante e uniforme.
- **Mulino miscelatore a sfere (Retsch MM 400):** Si è dimostrato l'approccio di gran lunga più efficiente e controllato. La conduzione automatizzata del processo ha garantito il mantenimento di parametri operativi rigorosamente standardizzati e riproducibili (45 minuti a 20 Hz, suddivisi in cicli per prevenire il surriscaldamento), azzerando la variabilità stocastica intrinsecamente legata alla manipolazione manuale degli operatori.

Sebbene l'impiego del mortaio in vetro offra una migliore resa sperimentale rispetto alla ceramica, il sistema complessivo di macinazione manuale risulta eccessivamente laborioso e dispendioso in termini di tempo ed energie rispetto al sistema automatizzato di *ball mill*. Tale deduzione trova riscontro nelle successive caratterizzazioni strutturali allo stato solido (mediante analisi TGA e spettroscopia FT-IR): i profili analitici dei complessi ottenuti per via meccanochimica automatizzata si sono dimostrati del tutto comparabili rispetto a quelli derivanti dalle lunghe sessioni di macinazione manuale.

3.5 Analisi e risultati TGA

3.5.1 Analisi Termogravimetrica (TGA e DTG) dei Complessi allo Stato Solido

L'analisi dello spettro termogravimetrico (TGA) e della sua derivata (DTG) sono stati utilizzati per valutare la formazione dei complessi di inclusione allo stato solido. Contrariamente all'effetto schermante tipicamente atteso da questi sistemi, in cui la cavità macrociclica protegge il guest innalzandone la temperatura di degradazione,

l'analisi comparativa dei sistemi **C8** e **C21** complessati con β -CD e DIMEB rivela un comportamento opposto. Si osserva una diminuzione della stabilità termica del macrociclo stesso rispetto alle sostanze pure di riferimento.

Analisi della perdita di massa (Curve TGA) I profili TGA mostrano come la temperatura di *onset* della degradazione principale risulti anticipata nei campioni co-macinati rispetto alle ciclodestrine pure. Come evidenziato in Figura 38, nel sistema C8/ β -CD i complessi Pr12, Pr13 e Pr14 (ottenuti rispettivamente per kneading in ceramica, ball milling e kneading in vetro) mostrano una caduta percentuale del peso che inizia a temperature inferiori rispetto alla β -CD pura. Il medesimo comportamento si osserva nel sistema C8/DIMEB (Figura 39), dove il DIMEB puro mantiene la propria massa stabile sino a circa 350°C, mentre i preparati co-macinati (Pr6, Pr7, Pr8) iniziano a perdere peso a temperature inferiori.

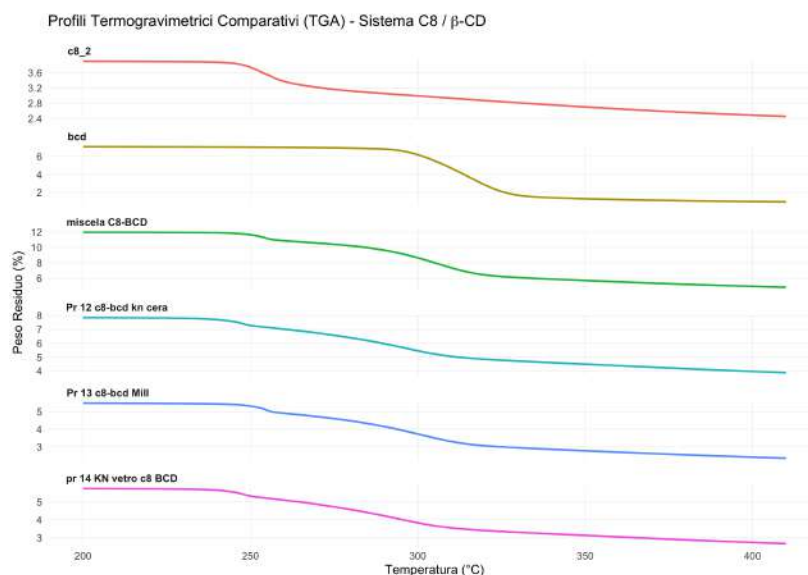


Figura 38: Profili TGA comparativi per il sistema **C8** / β -CD. I complessi co-macinati (Pr12, Pr13, Pr14) mostrano un anticipo nell'onset della perdita di massa rispetto alla β -CD pura.

Analogamente, per i sistemi contenenti **C21**, le curve TGA di Figura 40 e 41 confermano lo stesso andamento: i complessi con β -CD (Pr9, Pr11) e con DIMEB (Pr3, Pr4, Pr5) mostrano tutti un anticipo nella caduta di massa rispetto ai rispettivi host puri.

Analisi dello shift termico (Curve DTG) Le curve DTG permettono di quantificare con precisione lo spostamento della temperatura di massima velocità di degradazione (T_{max}). In tutti i sistemi esaminati si osserva un inequivocabile *shift termico negativo* del picco relativo alla ciclodestrina.

Nel sistema C8/ β -CD (Figura 42), il picco di degradazione della β -CD nativa a 315.45°C trasla a valori nettamente inferiori nei complessi Pr12, Pr13 e Pr14. Le curve dei preparati co-macinati presentano inoltre un primo picco intorno a 250°C,

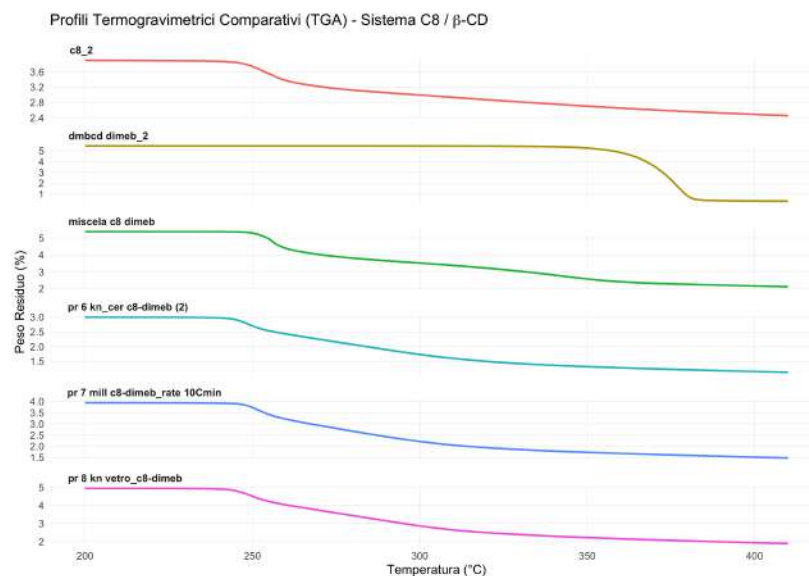


Figura 39: Profili TGA comparativi per il sistema **C8** / DIMEB. I preparati Pr6, Pr7 e Pr8 evidenziano una degradazione anticipata rispetto al DIMEB puro, il cui crollo termico avviene oltre 350°C.

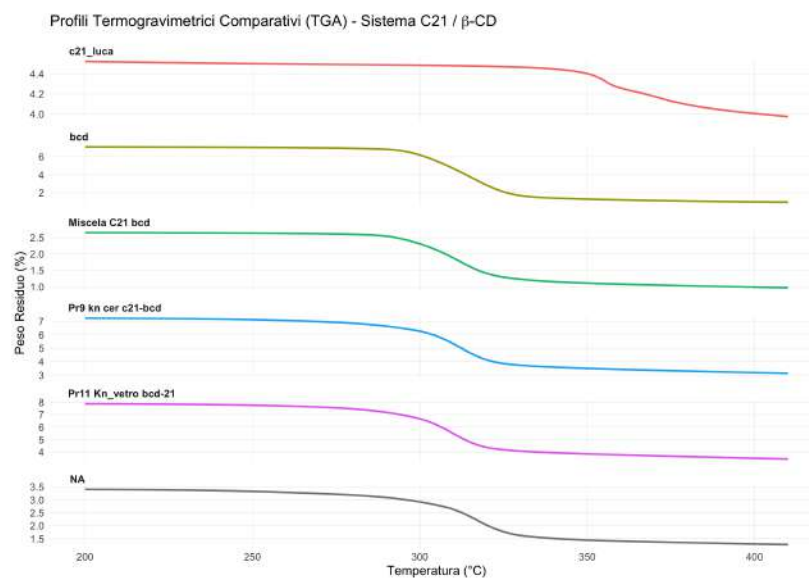


Figura 40: Profili TGA comparativi per il sistema **C21** / β -CD. I complessi Pr9 e Pr11 mostrano un onset della degradazione anticipato rispetto alla β -CD pura.

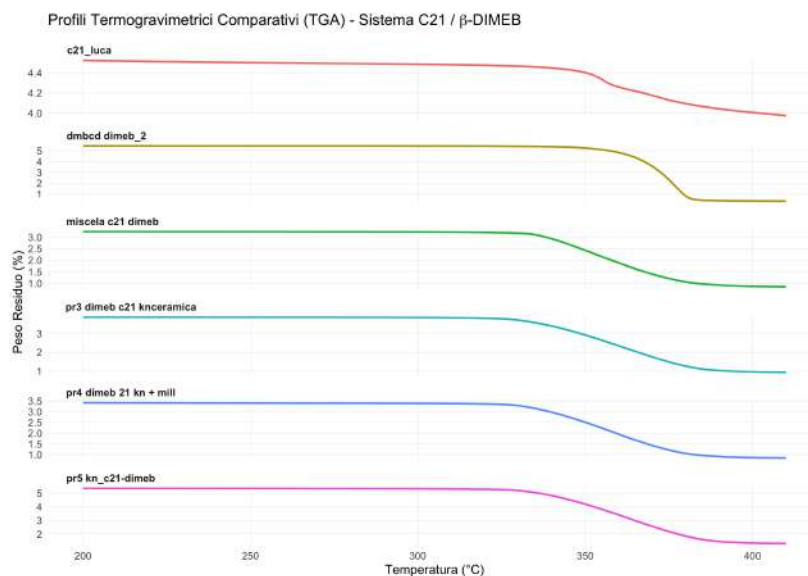


Figura 41: Profili TGA comparativi per il sistema **C21** / DIMEB. I preparati Pr3, Pr4 e Pr5 presentano una perdita di massa che inizia a temperature inferiori rispetto al DIMEB puro.

attribuibile al contributo del **C8**, e un secondo picco corrispondente alla degradazione della ciclodestrina, entrambi anticipati rispetto ai riferimenti puri. Per il sistema C8/DIMEB, i profili DTG sono riportati in Figura 43: la rappresentazione in colonna (Figura 42) e la disposizione a griglia mostrano come il picco del DIMEB puro (376.51°C) sia anticipato in tutti i preparati co-macinati Pr6, Pr7 e Pr8, con shift simile tra i diversi metodi preparativi.

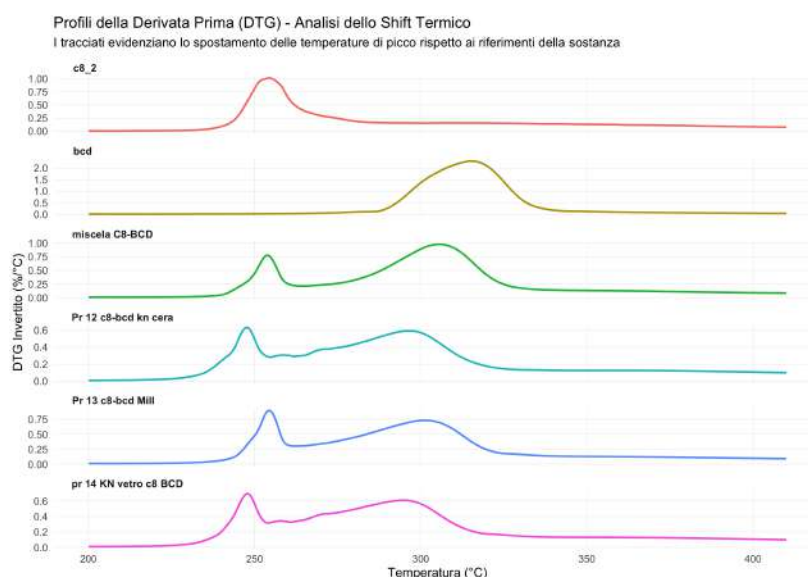
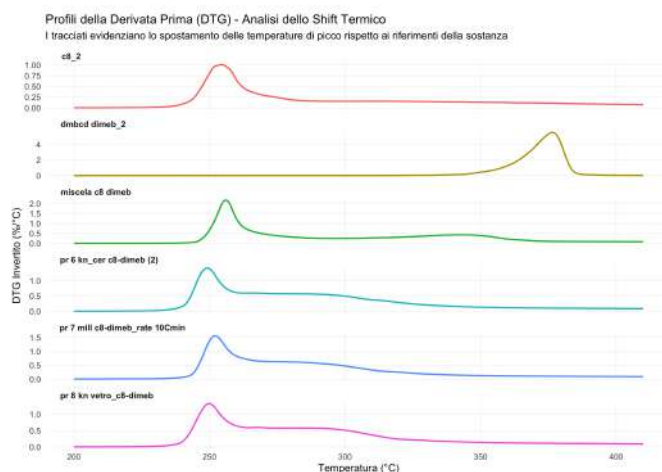
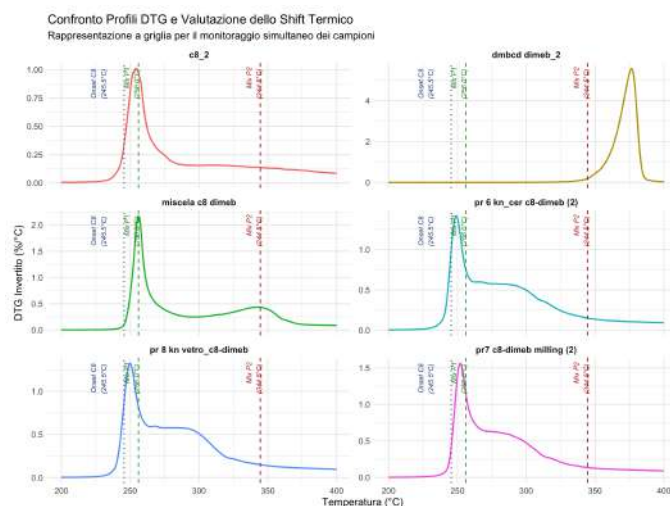


Figura 42: Profili DTG per il sistema **C8** / β -CD. Il picco di degradazione della β -CD (riferimento: 315.45°C) subisce uno shift negativo nei complessi Pr12, Pr13 e Pr14.

Il medesimo comportamento si riscontra nei sistemi con **C21**. In Figura 44, i



(a) disposizione a sovrapposizione verticale



(b) disposizione a griglia

Figura 43: Profili DTG per il sistema **C8** /DIMEB. I preparati Pr6, Pr7 e Pr8 mostrano uno spostamento del picco del DIMEB verso temperature inferiori rispetto al riferimento puro (376.51°C).

picchi di degradazione della β -CD nei complessi Pr9 e Pr11 risultano traslati a sinistra rispetto al riferimento (315.45°C). Per il sistema C21/DIMEB (Figura 45), l'host puro degrada a 376.51°C, mentre nei preparati Pr3, Pr4 e Pr5 il picco è anticipato in modo marcato e riproducibile.

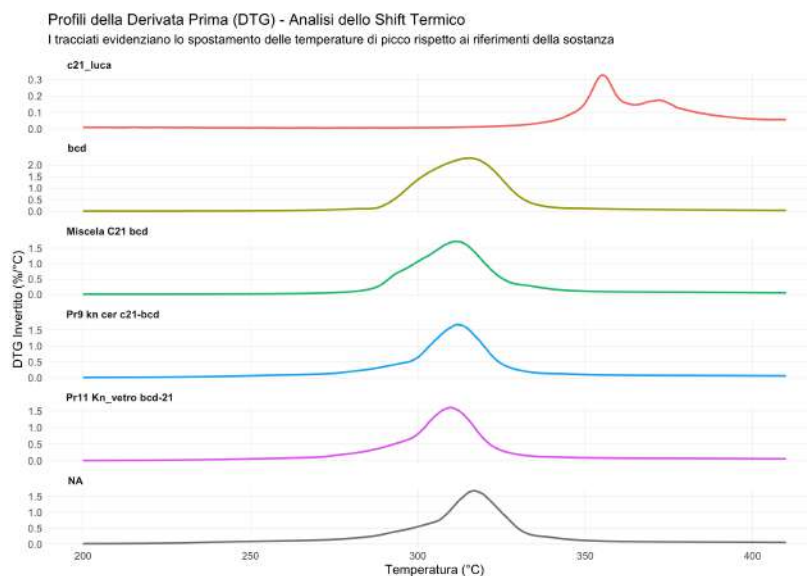


Figura 44: Profili DTG per il sistema **C21** / β -CD. I complessi Pr9 e Pr11 mostrano uno shift negativo del picco della β -CD rispetto al valore di riferimento.

Meccanismo della destabilizzazione termica La riduzione della stabilità termica del macrociclo nei complessi può essere razionalizzata considerando due fenomeni concomitanti:

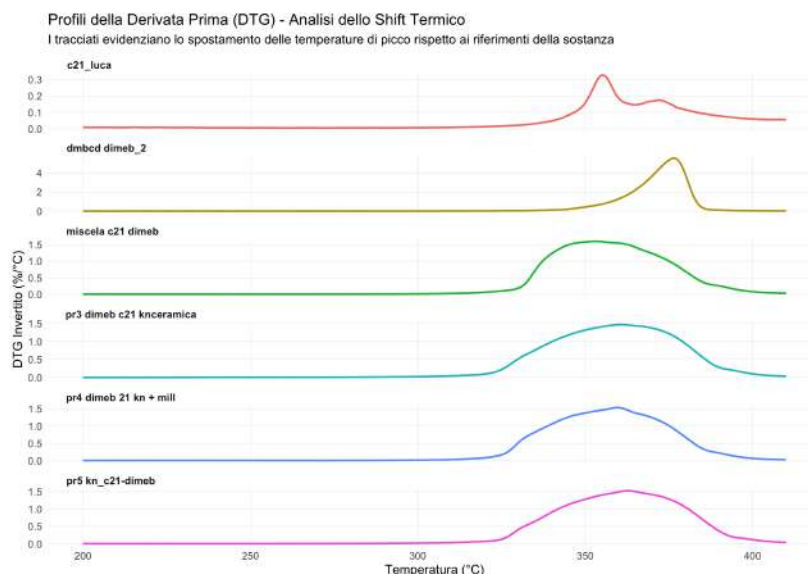


Figura 45: Profili DTG per il sistema **C21** /DIMEB. Il picco del DIMEB puro (376.51°C) è traslato a temperature inferiori in tutti i preparati co-macinati (Pr3, Pr4, Pr5), confermando la destabilizzazione termica indotta dalla complessazione.

1. **Amorfizzazione meccanica:** Le tecniche di co-macinazione (kneading e ball milling) trasferiscono un'elevata energia cinetica al sistema, inducendo la rottura del reticolo cristallino originario della ciclodestrina e la transizione verso una fase amorfa. La riduzione dell'energia reticolare si traduce in un abbassamento della temperatura di *onset* del calo peso, come osservato nelle curve TGA.
2. **Co-degradazione host-guest:** A elevate temperature, il rilascio o la degradazione termica delle molecole **C8** e **C21** destabilizza la conformazione assunta dall'host nel complesso. La rottura delle interazioni intermolecolari che stabilizzano il sistema (legami a idrogeno, forze di Van der Waals) accelera la scissione dei legami glicosidici della ciclodestrina, anticipandone la decomposizione pirolitica.

In conclusione, la correlazione tra le curve TGA e DTG dei quattro sistemi esaminati conferma l'avvenuta formazione dei complessi allo stato solido, ma evidenzia come i trattamenti mecano-chimici e la geometria di inclusione annullino l'effetto protettivo della ciclodestrina, determinando una co-degradazione sinergica con il principio attivo.

3.5.2 Analisi semi-quantitativa ed efficienza di complessazione allo stato solido

Dopo aver valutato in via qualitativa il comportamento termico dei complessi (sezione 3.5.1), l'analisi termogravimetrica è stata estesa a una valutazione semi-quantitativa con lo scopo di stimare l'efficienza di complessazione mecano-chimica raggiunta in fase solida. L'indagine è stata circoscritta ai sistemi contenenti il candidato **C8**, sia con β -CD sia con DIMEB, essendo che in questi casi i picchi di degradazione del guest e dell'host ricadono in intervalli di temperatura sufficientemente separati da

consentire una deconvoluzione affidabile delle curve DTG, mentre nei sistemi con **C21** la sovrapposizione dei picchi degradativi è troppo marcata.

La quantità su cui si fonda l'analisi è l'area sottesa dai picchi DTG, proporzionale alla frazione di massa persa nel rispettivo intervallo termico. La procedura, descritta in dettaglio in sezione 2.7, si articola in due fasi: dalla miscela fisica (Fase 0) si ricava la costante di vincolo $K = A_{\text{host}}/A_{\text{guest}}$, che fissa il rapporto stechiometrico naturale di degradazione fra le specie libere. Poiché il complesso presenta un'organizzazione supramolecolare distinta dalle singole componenti, viene assunto che la sua degradazione si manifesti a una temperatura intermedia. Nei preparati co-macinati (Fase 1) la costante di vincolo viene applicata esclusivamente alle quote residue di host e guest non interagenti, consentendo di isolare il picco intermedio del complesso, altrimenti assente nella miscela fisica.

Sistema C8/DIMEB La deconvoluzione della miscela fisica (Figura 46) ha fornito una costante di vincolo $K = 1.0547 \pm 0.0177$, prossima all'unità coerentemente con il rapporto equimolare di partenza (46.5 mg di **C8** e 203.5 mg di DIMEB su 250 mg totali). In questo sistema il fondo di carbonizzazione è risultato trascurabile in quanto privo di impatto significativo sulla quantificazione delle aree. Nei tre preparati co-macinati il picco del **C8** libero, dominante nella miscela fisica, si riduce drasticamente fino a stabilizzarsi su un'area relativa di circa il 20 %, mentre emerge il picco del complesso a 280.00 °C in tutte e tre le prove (sezione 5.3.1). I risultati sono riassunti in Tabella 19.

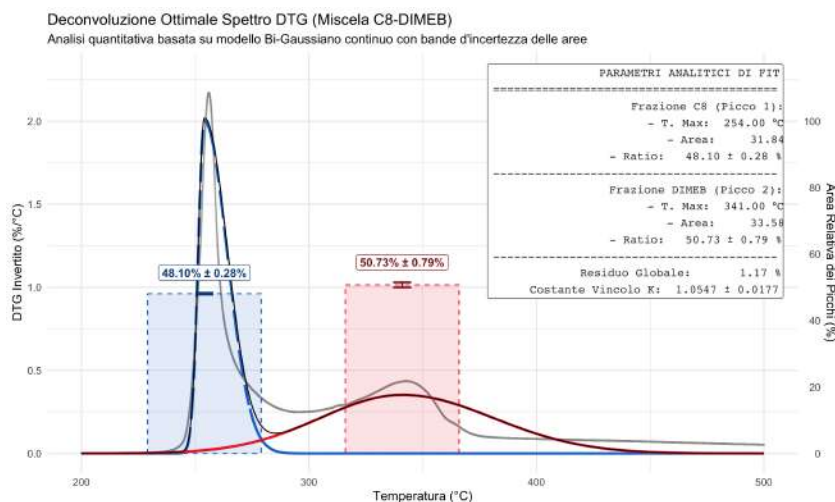


Figura 46: Deconvoluzione del profilo DTG della miscela fisica C8/DIMEB (Fase 0). Il fit definisce la costante di vincolo $K = 1.0547 \pm 0.0177$.

La frazione di complesso si attesta in modo riproducibile tra il 58 e il 60 % nelle tre tecniche. Viene esaminata anche la consistenza interna di questo risultato attraverso un bilancio di massa fondato sulla diminuzione del picco **C8** libero, che utilizza una logica di calcolo distinta da quella del fit geometrico. Assumendo come riferimento al 100 % l'area di **C8** nella miscela fisica (48.10 %) e come valore residuo l'area media nei

Tabella 19: Frazioni relative (%) e residuo globale del fit per il sistema C8/DIMEB. Fase 0: miscela fisica ($K = 1.0547 \pm 0.0177$); Fase 1: preparati co-macinati. Incertezze ($\pm\sigma$) propagate via Monte Carlo.

Campione	C8 libero	Complesso	DIMEB libero	$T_{\max}^{\text{compl.}}$ (°C)	Residuo
Miscela fisica	48.10 ± 0.28	—	50.73 ± 0.79	—	1.17
Pr6 (kneading cer.)	19.87 ± 0.10	59.18 ± 0.25	20.95 ± 0.29	280.00 ± 0.05	2.69
Pr7 (ball milling)	19.65 ± 0.10	59.62 ± 0.26	20.72 ± 0.29	277.20 ± 0.06	3.42
Pr8 (kneading vetro)	20.50 ± 0.07	57.87 ± 0.14	21.63 ± 0.37	280.00 ± 0.05	2.87

preparati ($\sim 20.0\%$), la frazione di **C8** rimasta libera risulta

$$f_{\text{C8 libero}} = \frac{20.0}{48.10} \approx 0.416, \quad (16)$$

da cui per differenza una frazione complessata $f_{\text{C8 compl.}} \approx 0.584$. Poiché la miscela di partenza era equimolare e la costante di vincolo $K \approx 1$ indica che le due specie contribuiscono in proporzione quasi identica all'area DTG, la medesima frazione si applica direttamente alla massa pesata di ciascuna componente. Sui 46.5 mg di **C8** iniziali, circa 27.2 mg risultano complessati; analogamente, sui 203.5 mg di DIMEB, circa 118.9 mg si trovano nel complesso, per una massa totale del complesso di circa 146 mg, pari al 58.4 % dei 250 mg totali.

Sistema C8/ β -CD Per il sistema C8/ β -CD la miscela fisica (Figura 47) ha fornito una costante di vincolo nettamente maggiore, $K = 4.1174 \pm 0.1300$, riflesso del diverso rapporto fra le aree degradative dell'host e del guest. I preparati co-macinati (Figura 87) mostrano un quadro qualitativamente analogo a quello del sistema C8/DIMEB, con una riduzione del **C8** libero e comparsa del picco del complesso, ma con un'efficienza di complessazione decisamente inferiore, come riportato in Tabella 20. In questo sistema la coda di carbonizzazione costituisce una frazione rilevante dello spettro e viene quindi inclusa come componente esplicita del modello.

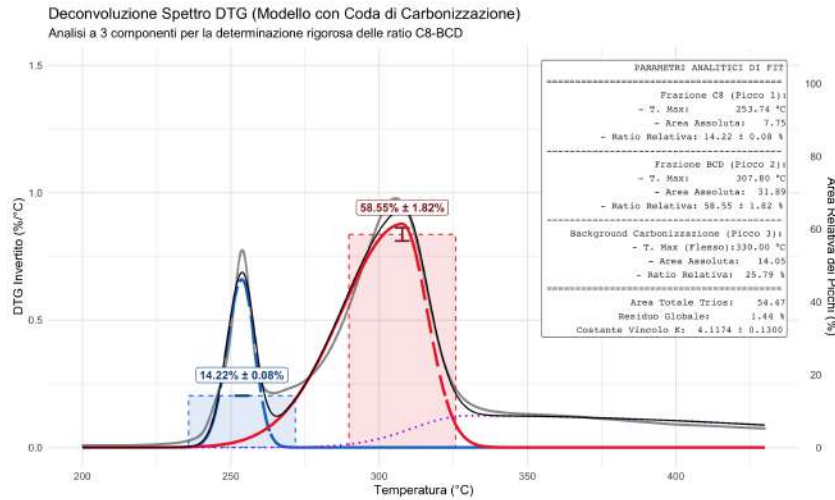


Figura 47: Deconvoluzione del profilo DTG della miscela fisica C8/ β -CD (Fase 0), da cui si ricava la costante di vincolo $K = 4.1174 \pm 0.1300$.

Tabella 20: Frazioni relative (%), temperatura di picco del complesso ($T_{\max}$) e residuo globale per il sistema C8/ β -CD. Incertezze ($\pm\sigma$) propagate via Monte Carlo.

Campione	C8 libero	Complesso	β -CD libero	Carboniz.	$T_{\max}^{\text{compl.}}$ ($^{\circ}\text{C}$)	Residuo
Miscela fisica	14.22	—	58.55	25.79	—	1.44
Pr12 (kneading cer.)	7.32 ± 0.08	26.72 ± 0.29	30.14 ± 0.67	35.82	264.71	2.33
Pr13 (ball milling)	8.84 ± 0.10	24.61 ± 0.32	36.38 ± 0.73	30.16	268.36	2.04
Pr14 (kneading vetro)	7.23 ± 0.07	28.94 ± 0.30	29.75 ± 0.66	34.08	265.09	1.98

La frazione di complesso si colloca tra il 25 e il 29 %. Il picco del complesso cade in modo coerente nell'intervallo da 265°C a 268°C , ben al di sotto della temperatura di degradazione della β -CD nativa (315.45°C), in accordo con la destabilizzazione termica discussa in sezione 3.5.1.

Un aspetto morfologico degno di nota emerge dal confronto visivo dei profili DTG dei preparati (Figura 87 e figure in Appendice): nelle prove di kneading, sia in mortaio di ceramica (Pr12) Figura 87a sia in mortaio di vetro (Pr14) Figura 87c, il picco del complesso presenta una struttura secondaria con irregolarità del profilo, invece nella prova con mulino a sfere (Pr13) Figura 87b questo tipo di struttura è assente e il profilo risulta più regolare. questo fenomeno può essere interpretato come indizio di una maggiore omogeneizzazione, grazie al trattamento automatizzato rispetto alla macinazione manuale.

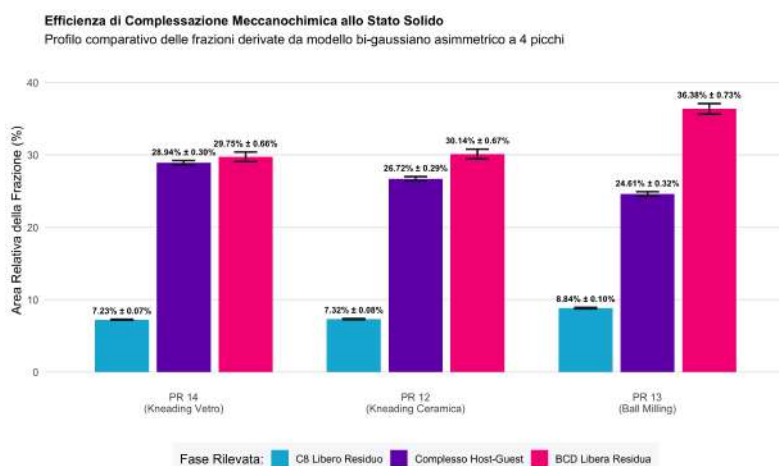
Incetrezze e residuo globale Le incetrezze associate a tutte le frazioni sono state stimate per propagazione Monte Carlo dei parametri del fit (sezione 2.7.3). Come si osserva in Tabella 19 e 20, le deviazioni standard sulle frazioni di complesso restano inferiori a 0.4 punti percentuali, valore che attesta la robustezza della determinazione. Il residuo globale del fit si mantiene contenuto in tutti i campioni, 1.2 % per la miscela C8/DIMEB e 2.7 – 3.4 % nelle prove di complessazione rispettive, ancora più basso per il sistema C8/ β -CD (1.4 – 2.3 %). Valori così ridotti di errore e di residuo globale dimostrano che il modello riproduce in modo fedele il profilo sperimentale confermando che il picco del complesso non è un artefatto matematico tratto dall'interpolazione di valori.

Confronto tra i sistemi e tra le tecniche Il confronto fra i due host (Figura 48) evidenzia una netta differenza di efficienza: il DIMEB raggiunge frazioni di complesso di circa il 58–60 %, oltre il doppio di quelle ottenute con la β -CD (25–29 %). All'interno di ciascun sistema le tre tecniche di co-macinazione restituiscono valori molto vicini fra loro, a indicare che, nelle condizioni adottate, la natura dell'host incide sull'efficienza di complessazione assai più del metodo meccanico impiegato (kneading in ceramica, kneading in vetro o mulino a sfere).

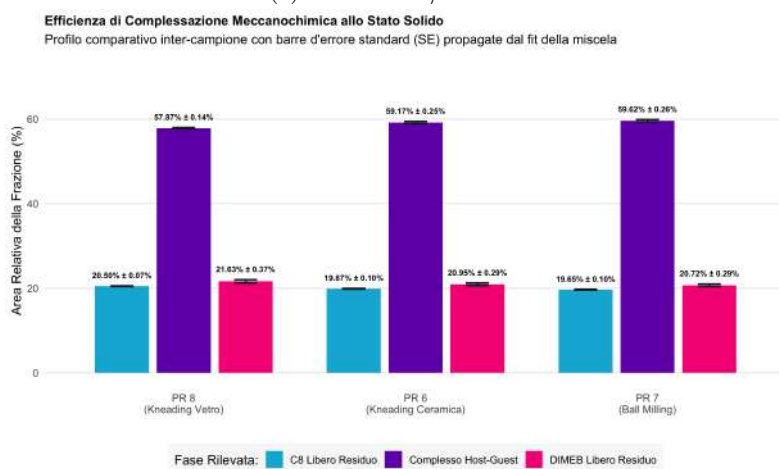
Si desidera sottolineare che l'approccio di deconvoluzione vincolata costituisce una metodologia d'indagine non convenzionale, infatti l'assenza di protocolli standardizzati preclude un confronto diretto con dati esterni, nonostante ciò questo approccio permette di assolvere ad una analisi semiquantitativa di confronto interno. In quest'ottica, la

minima entità dei residui globali e la convergenza statistica dei dati confermano la solidità del modello.

La validazione assoluta di questa analisi richiederebbe l'affiancamento di tecniche complementari come l'analisi calorimetrica a scansione differenziale (DSC). Questo esame analitico utilizzato come standard per la valutazione di sistemi complessati, consentirebbe di verificare di quantificare le entalpie di complessazione o fusione delle diverse fasi, fornendo una misura diretta non derivata dall'elaborazione secondaria o terziaria dei segnali registrati dallo strumento.



(a) Sistema C8/DIMEB



(b) Sistema C8/ β -CD

Figura 48: Confronto dell'efficienza di complessazione allo stato solido per i diversi metodi di preparazione.

3.6 Analisi e risultati FT-IR

La spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier in modalità ATR è stata impiegata per ricercare le variazioni vibrazionali causate dalla formazione dei complessi di inclusione allo stato solido. Il principio dell'analisi si fonda sul confronto sistematico fra ogni preparato co-macinato e la rispettiva *miscela fisica* (PM) dei medesimi componenti.

La PM, pur condividendo la medesima composizione chimica dei sistemi complessati, consiste in una semplice miscela meccanica dei componenti. Di conseguenza, essa funge da base di riferimento per descrivere il sistema nello stato non complessato [31]. La variazione ($\Delta\tilde{\nu}$) di una banda rispetto al riferimento della PM è indicativa della sola interazione host-guest, in quanto il confronto con la miscela fisica corregge già i contributi derivanti dalla composizione e dal trattamento del campione. Uno spostamento di una banda caratteristica viene quindi interpretato come perturbazione dell'intorno locale del relativo gruppo funzionale. In sistemi di inclusione con β -ciclodestrina analoghi, perturbazioni di questo tipo sono state attribuite a meccanismi differenti a seconda del sistema e della banda coinvolta: formazione o cessione di legami a idrogeno fra guest e host [52], attenuazione dell'intensità per inclusione nella cavità idrofobica [53], oppure effetti di campo elettrico e sterici locali esercitati dagli ossidrili della ciclodestrina sul gruppo incluso [54]. Non esiste quindi un'unica spiegazione univoca per il segno e l'entità di uno spostamento FT-IR in questi sistemi: l'interpretazione proposta nel seguito è specifica per il caso osservato e distingue, dove possibile, l'osservazione sperimentale (presenza ed entità dello shift) dall'ipotesi meccanicistica avanzata per spiegarla.

Per ciascun sistema sono state monitorate le bande più sensibili al processo di inclusione: lo *stretching* O–H del macrociclo ($\sim 3290\text{--}3430\text{ cm}^{-1}$, posizione fortemente dipendente dal campione e, nei sistemi con **C21**, in parte sovrapposta all'assorbimento N–H/O–H del guest), lo *stretching* C–H alifatico/metinico ($\sim 2900\text{ cm}^{-1}$) e, soprattutto, le bande specifiche dei guest: per il **C8** lo *stretching* del nitrile $\text{C}\equiv\text{N}$ ($\sim 2217\text{ cm}^{-1}$) e del carbonile $\text{C}=\text{O}$ ($\sim 1665\text{ cm}^{-1}$); per il **C21** lo *stretching* del carbonile $\text{C}=\text{O}$ ($\sim 1626\text{ cm}^{-1}$) e lo *stretching* aromatico $\text{C}=\text{C}$ ($\sim 1518\text{ cm}^{-1}$). Le posizioni dei massimi di assorbimento sono state determinate per interpolazione dei profili sperimentali all'interno di finestre spettrali predefinite per ogni gruppo funzionale. La banda O–H non è stata trattata quantitativamente in termini di $\Delta\tilde{\nu}$, data l'ampiezza del profilo, la presenza di più componenti e la sovrapposizione host/guest: nelle figure ne viene riportata la posizione a solo titolo descrittivo.

Le figure di questa sezione (Figura 49–52) accostano, per ciascun sistema, lo spettro a sinistra presenta i profili in trasmittanza dei vari campioni, le rette tratteggiate indicano la posizione delle bande riferite alla PM e le etichette riportano il numero d'onda dei massimi di trasmittanza. Gli istogrammi a destra quantificano lo spostamento $\Delta\tilde{\nu}$ rispetto alla PM, banda per banda, e la perturbazione media. I valori numerici degli spostamenti sono riassunti nelle Tabelle 21 e 22. Le sovrapposizioni sull'intero intervallo FT-IR (regione dei gruppi funzionali e regione *fingerprint*) sono raccolte in Appendice (sezione 5.4, Figura 88–91).

3.6.1 Sistemi con il Composto 8 (C8)

Sistema C8/DIMEB. Nel sistema con dimetil- β -ciclodestrina (Figura 49) i tre preparati co-macinati, Pr6 (kneading in ceramica), Pr7 (mulino a sfere) e Pr8 (kneading in vetro), mostrano uno spostamento positivo e sistematico del segnale del carbonile rispetto alla PM. Il carbonile $\text{C}=\text{O}$, che nella PM si trova a 1666 cm^{-1} , trasla a

1670–1671 cm^{-1} ($\Delta\tilde{\nu} \approx +4 \div +5 \text{ cm}^{-1}$) in tutti e tre i preparati. Il nitrile $\text{C}\equiv\text{N}$ mostra invece un comportamento meno uniforme: l’escursione è marcata in Pr6 (+6 cm^{-1}) e modesta in Pr8 (+2 cm^{-1}), mentre in Pr7 si riduce a +1 cm^{-1} , prossimo alla risoluzione strumentale. Anche lo *stretching* C–H si sposta lievemente verso numeri d’onda maggiori (+2 $\div$ +3 cm^{-1}). Uno spostamento verso numeri d’onda *più alti* di una banda C=O è stato razionalizzato in sistemi di inclusione β -CD/estere analoghi attraverso un effetto di campo elettrico e di ingombro sterico esercitato dagli ossidrili della ciclodestrina sul carbonile incluso, che ne aumenta la densità elettronica e rinforza la costante di forza del legame [54]. Tuttavia, lo spostamento positivo osservato va letto come un indizio del confinamento del guest in un intorno diverso da quello della miscela fisica. I soli dati disponibili non permettono infatti di attribuire con certezza lo shift a un preciso meccanismo elettronico. La perturbazione media si attesta fra 2.7 e 4.7 cm^{-1} , con il valore più elevato per Pr6.

Sistema C8/ β -CD. Il quadro cambia con la β -ciclodestrina nativa (Figura 50). In Pr12 (*kneading* in ceramica) e Pr13 (*ball mill*) le bande del guest restano sostanzialmente sovrapposte a quelle della PM ($\Delta\tilde{\nu} = 0 \div +1 \text{ cm}^{-1}$, entro la risoluzione strumentale), e solo Pr14 (*kneading* vetro) evidenzia spostamenti apprezzabili del carbonile (+3 cm^{-1}) e del nitrile (+2 cm^{-1}). La perturbazione vibrazionale indotta dalla β -CD risulta quindi nettamente inferiore a quella prodotta da DIMEB. Questo risultato spettroscopico conferma quanto emerso dall’analisi semi-quantitativa TGA (sezione 3.5.2, che attribuiva al DIMEB un’efficienza di complessazione di **C8** circa doppia rispetto alla β -CD. La maggiore frazione di complesso formata con il DIMEB si traduce in un segnale di shift più intenso.

Tabella 21: Spostamenti vibrazionali $\Delta\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) dei preparati co-macinati rispetto alla miscela fisica (PM), per i sistemi con il Composto 8. Valori positivi indicano traslazione verso numeri d’onda maggiori; $|\Delta\tilde{\nu}|$ è la perturbazione media sulle tre bande diagnostiche. Posizioni di riferimento nella PM: sistema DIMEB — C–H 2924, $\text{C}\equiv\text{N}$ 2216, C=O 1666 cm^{-1} ; sistema β -CD — C–H 2926, $\text{C}\equiv\text{N}$ 2217, C=O 1666 cm^{-1} . Banda O–H dell’host: DIMEB 3406 $\rightarrow$ 3399–3409 cm^{-1} ; β -CD 3302 $\rightarrow$ 3291–3314 cm^{-1} .

Campione	C–H str.	$\text{C}\equiv\text{N}$ str.	C=O str.	$ \Delta\tilde{\nu} $
<i>Sistema C8/DIMEB</i>				
Pr6 (<i>kneading</i> cer.)	+3	+6	+5	4.7
Pr7 (<i>ball milling</i>)	+3	+1	+4	2.7
Pr8 (<i>kneading</i> vetro)	+2	+2	+5	3.0
<i>Sistema C8/β-CD</i>				
Pr12 (<i>kneading</i> cer.)	0	0	0	0.0
Pr13 (<i>ball milling</i>)	0	+1	0	0.3
Pr14 (<i>kneading</i> vetro)	+1	+2	+3	2.0

3.6.2 Sistemi con il Composto 21 (C21)

Sistema C21/DIMEB. Per il **C21** complessato con DIMEB (Figura 51) la banda che più riscontra un maggiore spostamento è nuovamente il carbonile C=O, che

dalla posizione di PM (1626 cm^{-1}) trasla a 1630 cm^{-1} ($+4\text{ cm}^{-1}$) in Pr3 (*kneading* ceramica) e Pr5 (*kneading* vetro) e a 1627 cm^{-1} ($+1\text{ cm}^{-1}$) in Pr4 (*ball mill*). Lo *stretching* aromatico C=C rimane invece quasi invariato (1519 cm^{-1} in tutti i preparati), suggerendo che lo scheletro aromatico sia perturbato in misura trascurabile. La banda C-H mostra in questo sistema spostamenti modesti e di segno negativo ($-2, 0, -1\text{ cm}^{-1}$ in Pr3, Pr4, Pr5), opposti cioè a quello positivo del carbonile, ma di entità in gran parte compatibile con il rumore strumentale. La perturbazione media ($0.3\text{--}2.0\text{ cm}^{-1}$) è complessivamente più contenuta rispetto al sistema C8/DIMEB.

Sistema C21/ β -CD. Nel sistema con β -CD (Figura 52) il carbonile si sposta di $+1\div+4\text{ cm}^{-1}$ e lo *stretching* aromatico C=C di $+1\div+6\text{ cm}^{-1}$, con perturbazione media compresa fra 2.7 e 5.7 cm^{-1} . La banda C-H restituisce in questo caso spostamenti ampi e negativi ($-6\div-10\text{ cm}^{-1}$): tale valore va però interpretato con cautela, poiché nella regione $2970\text{--}2820\text{ cm}^{-1}$ il **C21** presenta un assorbimento debole e parzialmente sovrapposto a quello dell'host, e la posizione del massimo nella PM (2934 cm^{-1} , intermedia fra β -CD a 2926 e **C21** a 2942 cm^{-1}) risulta poco affidabile; le bande realmente diagnostiche restano dunque il carbonile e lo *stretching* aromatico. Anche limitando il confronto alle sole bande C=O e C=C, la perturbazione media risulta in generale più elevata nei preparati con β -CD ($1.0\text{--}5.0\text{ cm}^{-1}$) che in quelli con DIMEB ($0.5\text{--}2.0\text{ cm}^{-1}$), sebbene il preparato Pr10 (*ball mill*, β -CD) risulti meno perturbato di Pr3 e Pr5 (DIMEB): un quadro complessivamente opposto a quello del **C8**, dove era il DIMEB a perturbare in misura nettamente maggiore in ciascun preparato.

Tabella 22: Spostamenti vibrazionali $\Delta\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) dei preparati co-macinati rispetto alla miscela fisica (PM), per i sistemi con il Composto 21. $|\overline{\Delta\tilde{\nu}}|$ è la perturbazione media sulle tre bande diagnostiche. Posizioni di riferimento nella PM: sistema DIMEB — C-H 2928 , C=O 1626 , C=C 1519 cm^{-1} ; sistema β -CD — C-H 2934 , C=O 1626 , C=C 1518 cm^{-1} .

Campione	C-H str.	C=O str.	C=C ar.	$ \overline{\Delta\tilde{\nu}} $
<i>Sistema C21/DIMEB</i>				
Pr3 (<i>kneading</i> cer.)	-2	+4	0	2.0
Pr4 (<i>ball mill</i>)	0	+1	0	0.3
Pr5 (<i>kneading</i> vetro)	-1	+4	0	1.7
<i>Sistema C21/β-CD</i>				
Pr9 (<i>kneading</i> cer.)	-10	+4	+3	5.7
Pr10 (<i>ball mill</i>)	-6	+1	+1	2.7
Pr11 (<i>kneading</i> vetro)	-6	+4	+6	5.3

3.6.3 Confronto fra i sistemi e considerazioni

L'analisi degli spostamenti vibrazionali consente alcune deduzioni di carattere generale, da considerare con la cautela dovuta al numero limitato di campioni per condizione. Il picco di *stretching* del carbonile si conferma valutabile per confermare un processo di inclusione, in tutti e quattro i sistemi mostra uno spostamento positivo, pur non essendo la banda con lo spostamento assoluto maggiore. Nel sistema C21/ β -CD lo

stretching aromatico C=C (fino a $+6\text{ cm}^{-1}$ in Pr11) e la banda dello *stretching* C-H (fino a -10 cm^{-1} mostrano spostamenti pari o superiore allo *stretching* C=O. Lo spostamento del picco riferito allo *stretching* aromatico C=C del **C21** è pressoché immobile nel sistema con DIMEB e presenta uno spostamento solo in presenza di β -CD.

I dati mostrano una selettività dei guest verso i due macrocicli. **C8** risente molto più del DIMEB che della β -CD nativa, manifestando perturbazioni nettamente superiori. Questa evidenza concorda con l'analisi semi-quantitativa TGA, che indicava già il derivato metilato della ciclodestrina come l'host più efficace per questo candidato. Il **C21** delinea un profilo opposto. La ciclodestrina nativa induce lo spostamento medio maggiore su tutte le bande monitorate, con valori tra 2.7 e 5.7 cm^{-1} contro gli 0.3 – 2.0 cm^{-1} del DIMEB. Il trend si mantiene valido anche escludendo la banda dello *stretching* C-H dal calcolo. Questo riscontro FT-IR acquisisce un valore specifico proprio per il **C21**. Poiché per questa molecola mancano i dati TGA di indagine semiquantitativa, le variazioni vibrazionali offrono una prima visione quantitativa generale sull'efficienza relativa dei due host.

Il confronto tra i metodi di co-macinazione mostra spostamenti dello stesso ordine di grandezza per la macinazione a mano e la lavorazione in mulino a sfere. Nel sistema C8/DIMEB la perturbazione media del preparato Pr6 (*kneading* ceramica) raddoppia l'effetto riscontrato per Pr7 (*ball mill*). Un andamento differente caratterizza il binomio C21/ β -CD, dove il campione Pr10 (*ball mill*) subisce una perturbazione dimezzata rispetto a Pr9 e Pr11 (*kneading* ceramica e vetro). L'assenza di una superiorità metodologica sistematica tra i vari sistemi convalida le precedenti conclusioni della analisi dati per TGA. La struttura chimica dell'host determina l'esito della complessazione in misura molto maggiore rispetto al trattamento meccanico.

L'analisi FT-IR si configura come uno strumento di supporto spettrale piuttosto di una prova strutturale definitiva. Gli spostamenti spettrali si limitano a pochi numeri d'onda, sfiorando nei campioni meno reattivi la risoluzione nominale dello strumento di 2 cm^{-1} . Questa entità modesta riflette le forze deboli di van der Waals e i legami a idrogeno tipici della co-macinazione assistita da solvente. Nonostante questo il dato si allinea perfettamente con le efficienze di complessazione stimate tramite TGA. Il costante riferimento alla miscela fisica irrobustisce l'interpretazione dei piccoli shift, poiché isola il puro contributo dell'interazione host-guest al netto della composizione chimica. La definizione univoca della geometria di inclusione richiede comunque il supporto di tecniche complementari come la calorimetria a scansione differenziale (DSC) o la spettroscopia di correlazione bidimensionale (2D-COS).

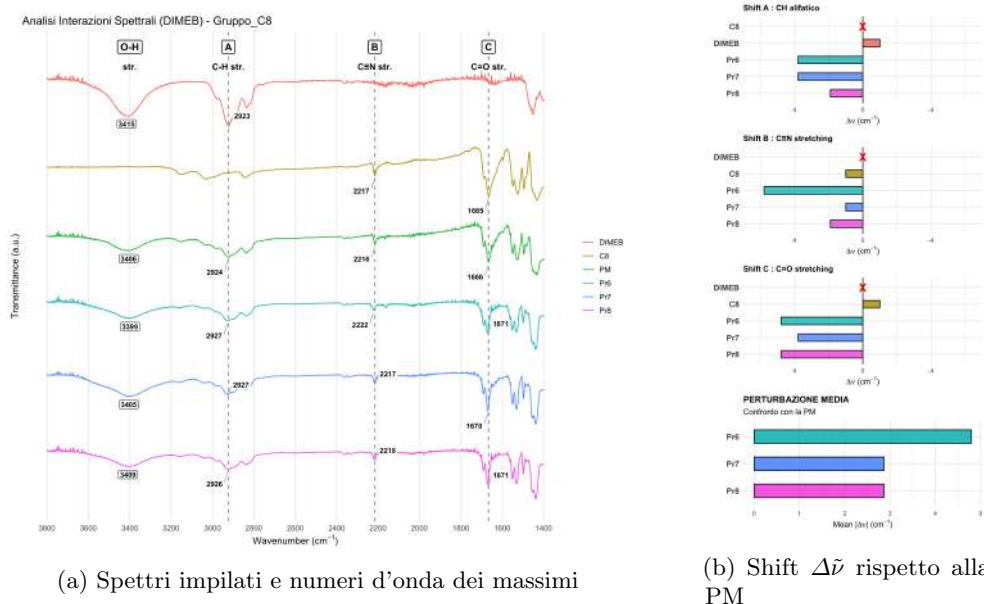


Figura 49: Analisi FT-IR del sistema C8/DIMEB. A sinistra gli spettri ATR in trasmittanza normalizzata (DIMEB, **C8**, miscela fisica PM e preparati co-macinati Pr6, Pr7, Pr8) con le bande diagnostiche A (C–H str.), B (C≡N str.) e C (C=O str.) marcate dalle rette tratteggiate; a destra gli spostamenti $\Delta\nu$ delle singole bande e la perturbazione media rispetto alla PM. La X indica le bande non diagnostiche per la specie considerata.

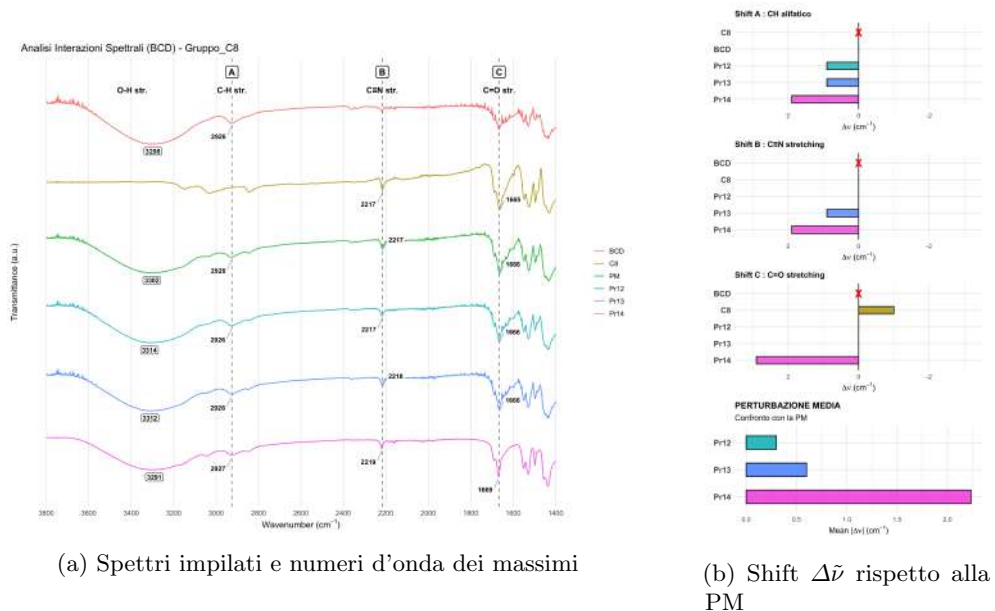
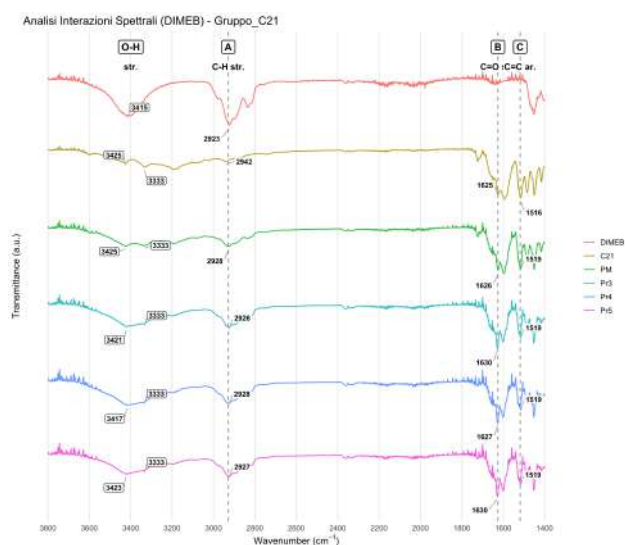
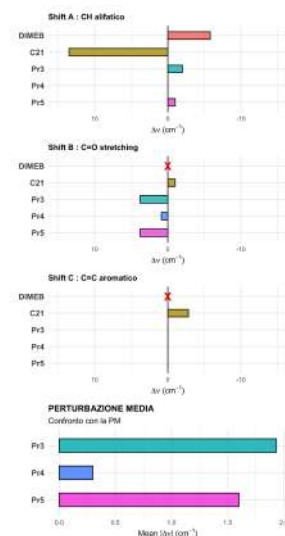


Figura 50: Analisi FT-IR del sistema C8/ β -CD (β -CD, **C8**, PM e preparati Pr12, Pr13, Pr14). La perturbazione delle bande del guest è nettamente inferiore a quella del corrispondente sistema con DIMEB, in accordo con la minore efficienza di complessazione stimata alla TGA.

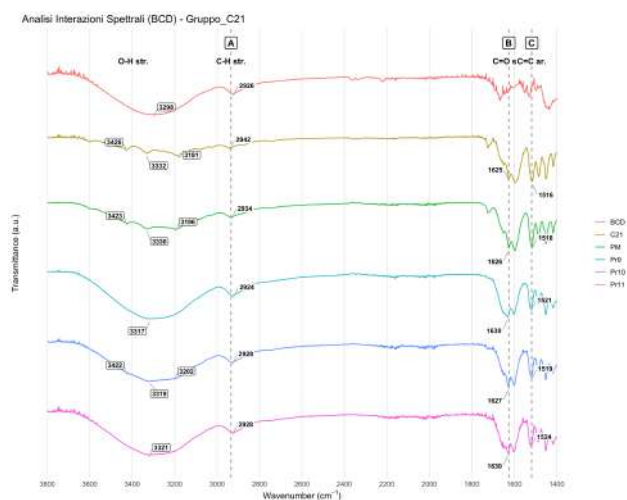


(a) Spettri impilati e numeri d'onda dei massimi

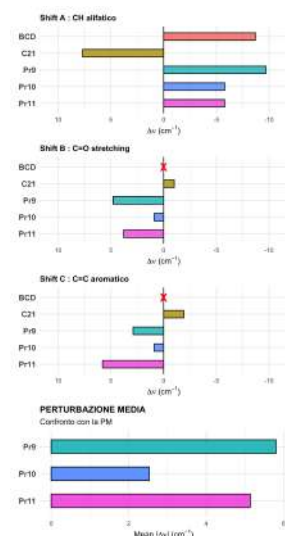


(b) Shift $\Delta\bar{\nu}$ rispetto alla PM

Figura 51: Analisi FT-IR del sistema C21/DIMEB (DIMEB, **C21**, PM e preparati Pr3, Pr4, Pr5). Le bande diagnostiche sono A (C–H str.), B (C=O str.) e C (C=C ar.). Il carbonile è la banda più reattiva, mentre lo *stretching* aromatico C=C rimane sostanzialmente invariato.



(a) Spettri impilati e numeri d'onda dei massimi



(b) Shift $\Delta\bar{\nu}$ rispetto alla PM

Figura 52: Analisi FT-IR del sistema C21/β-CD (β-CD, **C21**, PM e preparati Pr9, Pr10, Pr11). Lo spostamento ampio e negativo della banda C–H è poco affidabile per la debolezza e la sovrapposizione del segnale in questa regione; le bande diagnostiche sono il carbonile e lo *stretching* aromatico C=C.

4 Considerazioni conclusive

Lo sviluppo preclinico di **C8** e **C21**, inibitori selettivi di NEK6 attivi su scala micromolare, si scontra con un'insolubilità acquosa che ne compromette la somministrazione. Questa ricerca ha affrontato tale limite mediante complessazione con ciclodestrine, integrando lo studio sperimentale in soluzione e allo stato solido con un'indagine computazionale di dinamica molecolare.

Lo screening in acqua ha premiato i derivati metilati. La DIMEB si è imposta come host più efficace per entrambi i candidati, spingendo la solubilità apparente di **C8** a 69,7 μM e quella di **C21** a 32,9 μM ; la γ -CD nativa, troppo ampia, non ha prodotto incrementi rilevanti. La metilazione delle corone ossidriliche estende il carattere lipofilo della cavità e ne accresce l'affinità per guest fortemente idrofobici.

La quantificazione dell'affinità con il metodo di Higuchi-Connors ha restituito costanti apparenti dell'ordine delle centinaia di M^{-1} (126 M^{-1} per C8/DIMEB, 178 M^{-1} per C21/DIMEB), ma con scarsa riproducibilità. La lability chimica dei candidati invalida il presupposto della legge di Lambert-Beer: **C8** va incontro a idratazione reversibile, **C21** ad aromatizzazione ossidativa, e la coesistenza di più specie distorce la lettura spettrofotometrica. Questi limiti hanno motivato lo spostamento dell'indagine allo stato solido e il ricorso alla predizione in silico.

La co-macinazione ha generato fasi nuove e omogenee, riconoscibili già dal viraggio cromatico: viola per **C8**, rosso per **C21**. L'analisi termogravimetrica ha stimato frazioni di complesso circa del 60 % con DIMEB contro il 25–30 % con β -CD nativa, segno che la natura chimica dell'host pesa sull'esito molto più della tecnica meccanica adottata. La spettroscopia FT-IR ha confermato l'interazione nei quattro sistemi tramite lo shift dello stretching carbonilico, ma ha rivelato una selettività opposta tra i guest: **C8** manifesta perturbazioni vibrazionali nettamente superiori con DIMEB, infatti **C21** mostra shift medi più marcati con la β -CD nativa.

La dinamica molecolare supervisionata ha razionalizzato queste preferenze a livello molecolare. La β -CD nativa si conferma il macrociclo più versatile, capace di accogliere ogni isomero in un intervallo energetico omogeneo. La DIMEB raggiunge per **C8** energie di interazione tra le più negative dell'intero piano sperimentale (–63 fino a –111 kcal/mol), confermando computazionalmente l'efficienza già emersa dallo screening sperimentale. La metilazione completa (TRIMEB) introduce invece barriere steriche ed elettroniche selettive: esclude **C21**, tranne per la geometria compatta dell'isomero (S,S), nonostante questo il sistema TRIMEB con **C8** raggiunge la stabilizzazione entalpica più intensa dell'intera analisi computazionale (–110/–127 kcal/mol).

Le tecniche impiegate convergono verso un quadro coerente: la complessazione avviene, i derivati metilati la favoriscono, la chimica dell'host ne governa l'efficienza. Nessuna di esse, tuttavia, fornisce una prova strutturale diretta. Gli shift FT-IR spesso sfiorano la risoluzione dello strumento, la deconvoluzione termogravimetrica resta semi-quantitativa e priva di protocolli standardizzati, le costanti in soluzione valgono come stime di ordine di grandezza. La conferma definitiva dell'inclusione, e l'esclusione di meccanismi alternativi, richiede tecniche dirette e complementari:

calorimetria a scansione differenziale (DSC) o NMR allo stato solido, spettroscopia di correlazione bidimensionale (2D-COS) e misure quantitative HPLC per i sistemi in soluzione acquosa.

5 Appendice

5.1 Grafici NMR

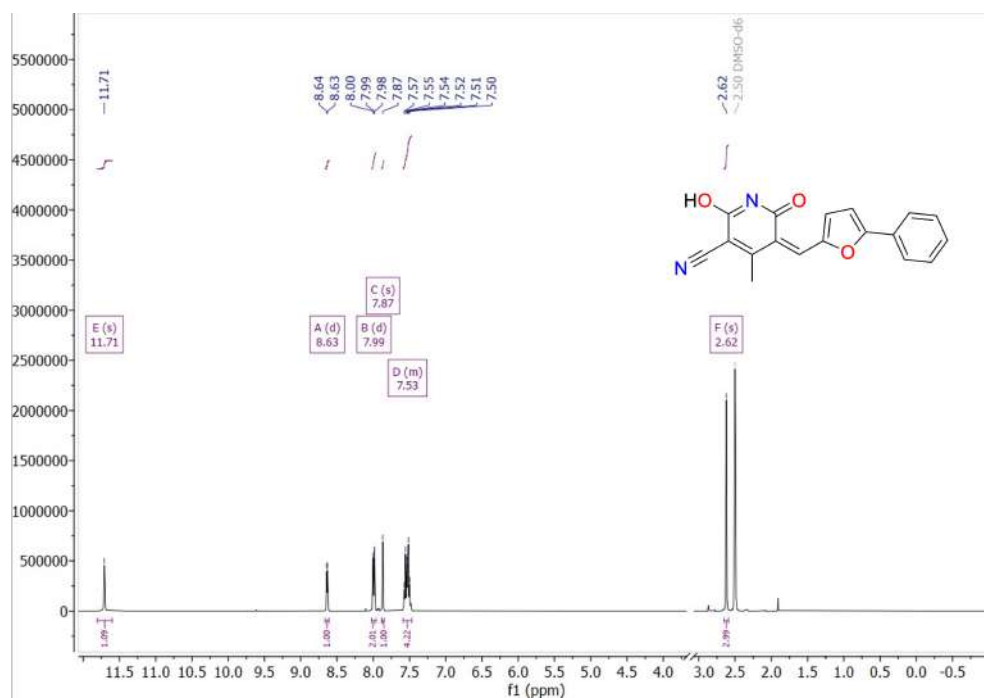


Figura 53: Spettro ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) del composto **C8**. Il segnale a 2.50 ppm è attribuibile al $\text{DMSO}-d_6$ residuo.

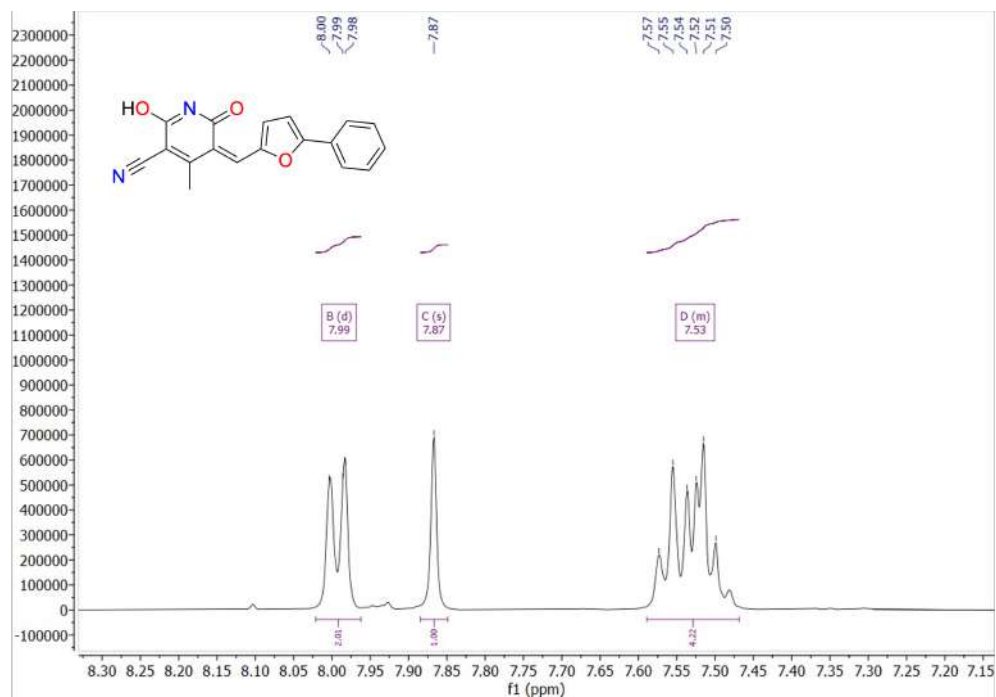


Figura 54: Ingrandimento della regione aromatica (7.15–8.30 ppm) dello spettro ^1H NMR del composto **C8**, con evidenziati i segnali B (d, 7.99 ppm), C (s, 7.87 ppm) e il multipletto D (7.53 ppm).

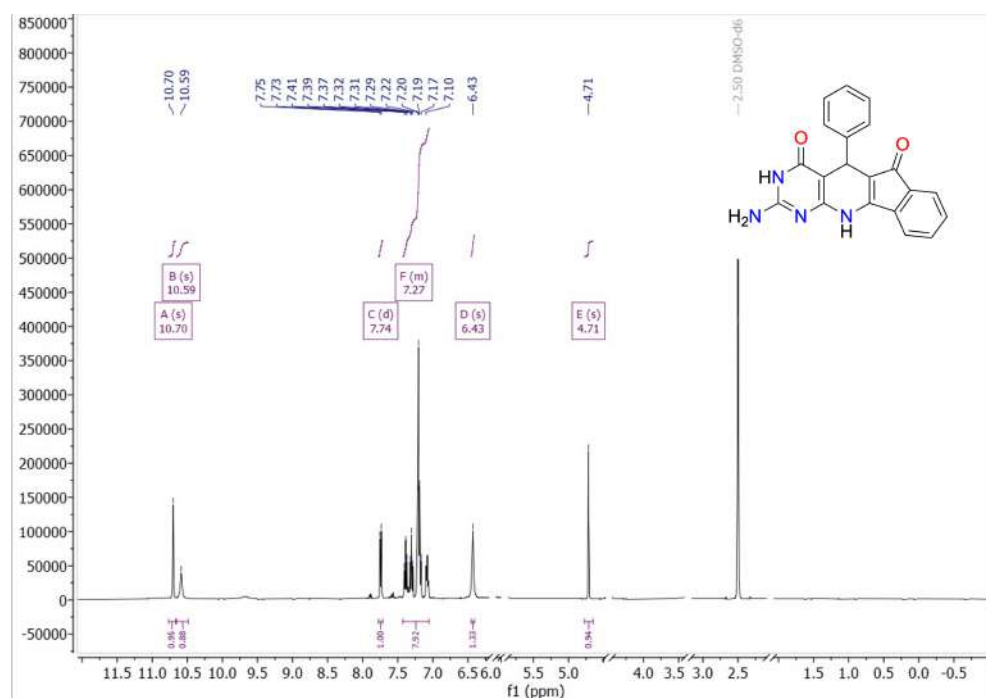


Figura 55: Spettro ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) del composto **C21**. Si osservano i due N–H di anello (10.70 e 10.59 ppm), il gruppo NH_2 (6.43 ppm) e il metino sp^3 (4.71 ppm); il segnale a 2.50 ppm corrisponde al $\text{DMSO}-d_6$ residuo.

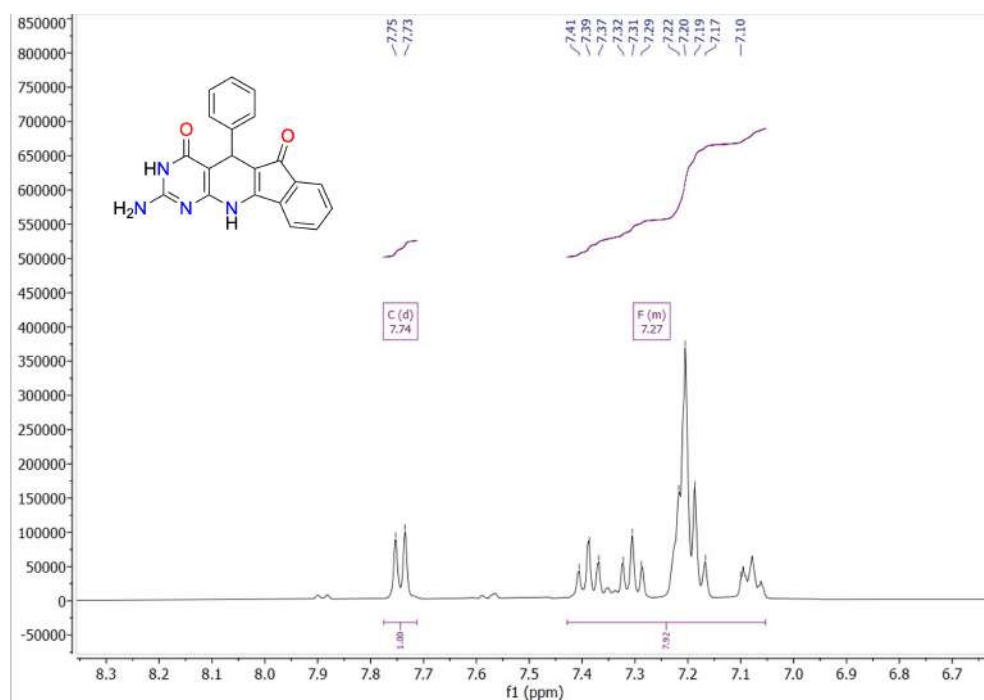
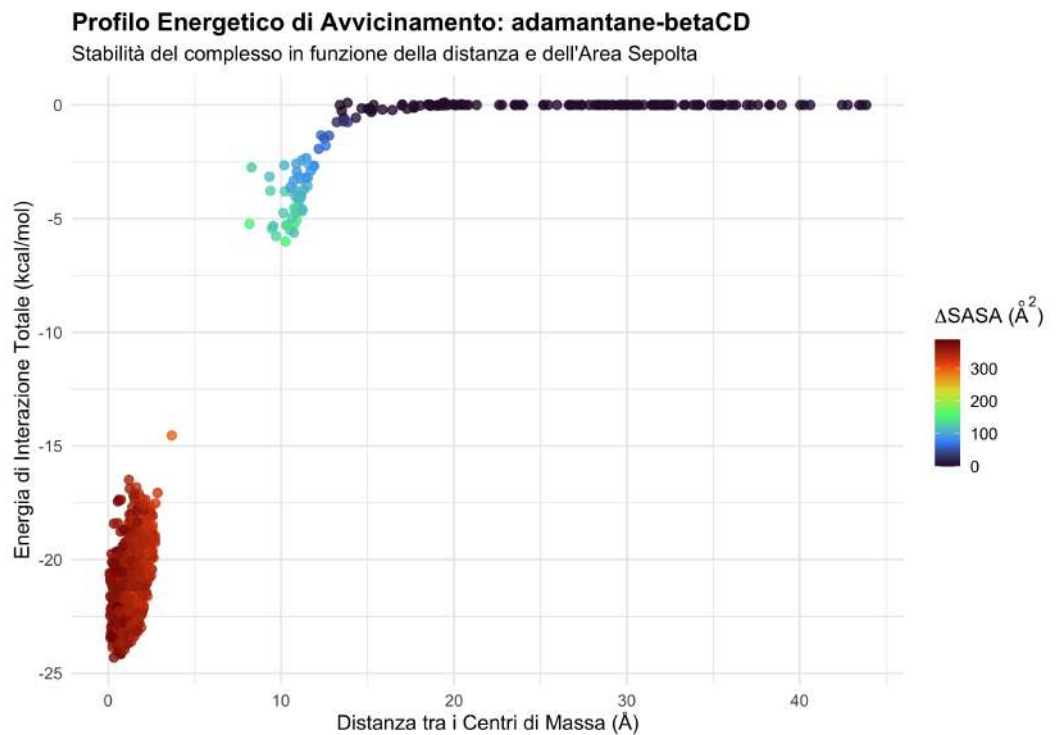
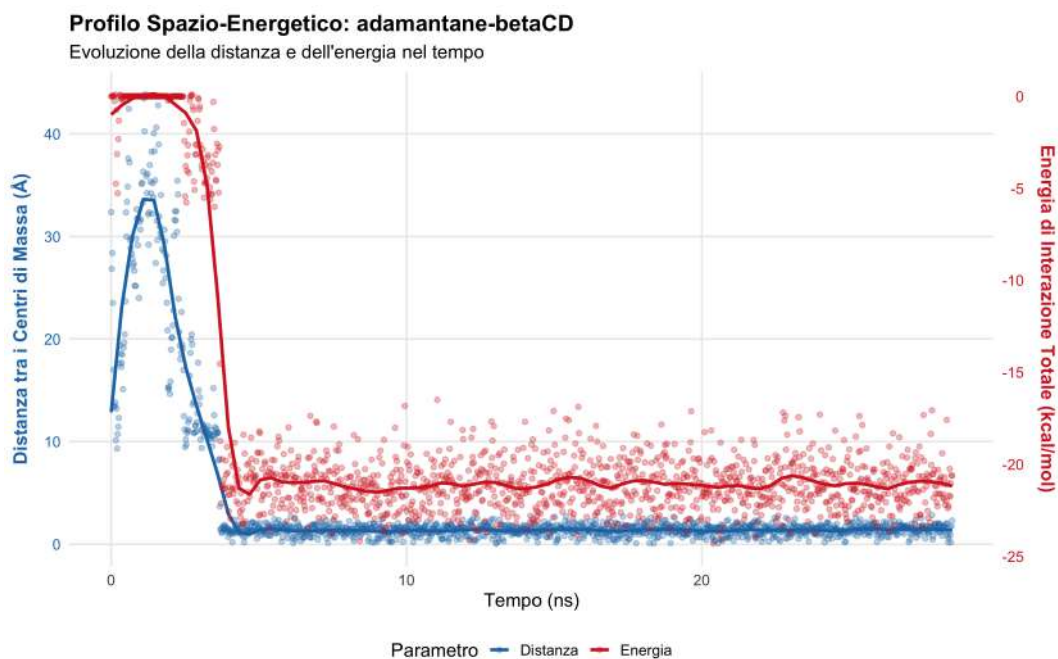


Figura 56: Ingrandimento della regione 6.6–8.3 ppm dello spettro ^1H NMR del composto **C21**, con il doppietto C (7.74 ppm) e il multipletto aromatico F (~ 7.27 ppm, 8H, sovrapposizione dei protoni fenilici e indanonici).

5.2 Grafici SuMD

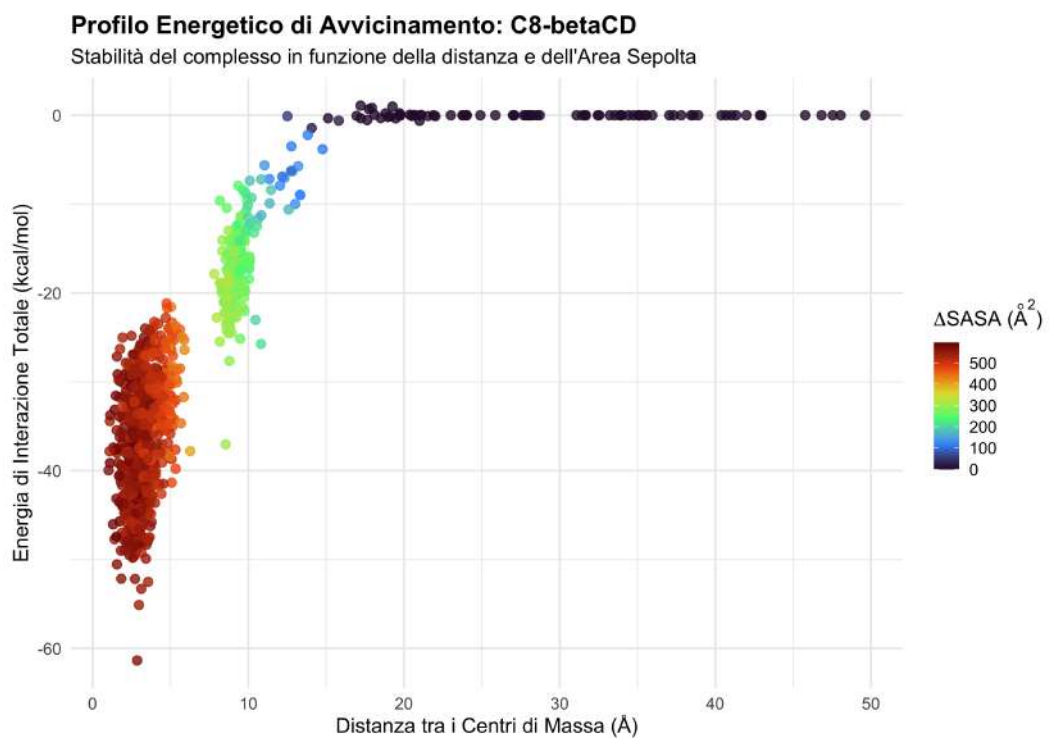


(a) Profilo di avvicinamento

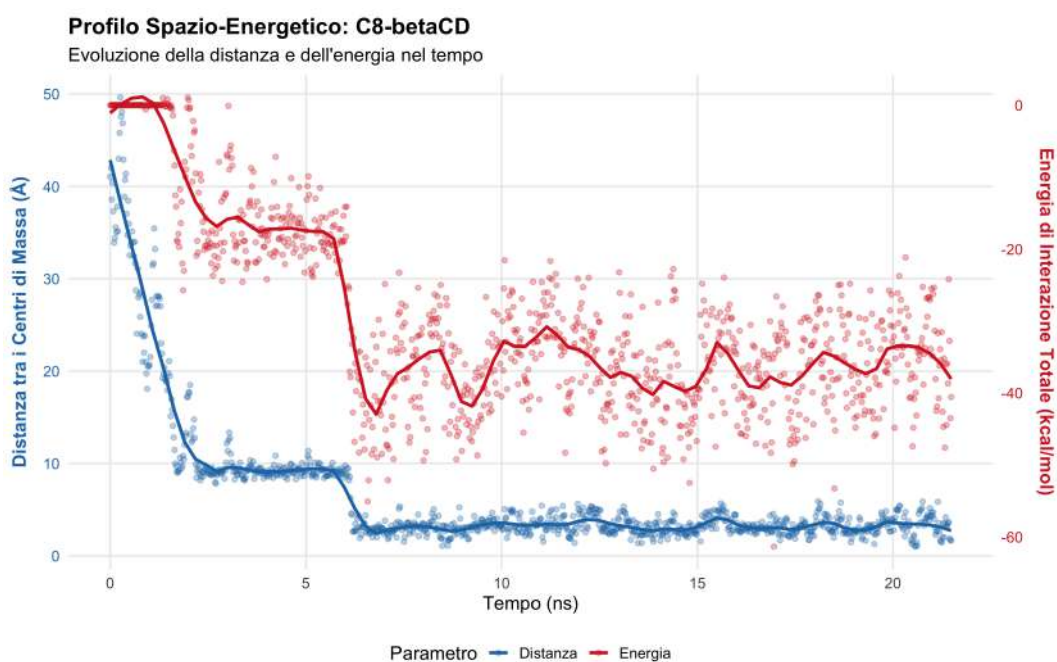


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 57: Analisi per il sistema Adamantano - Beta-CD. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

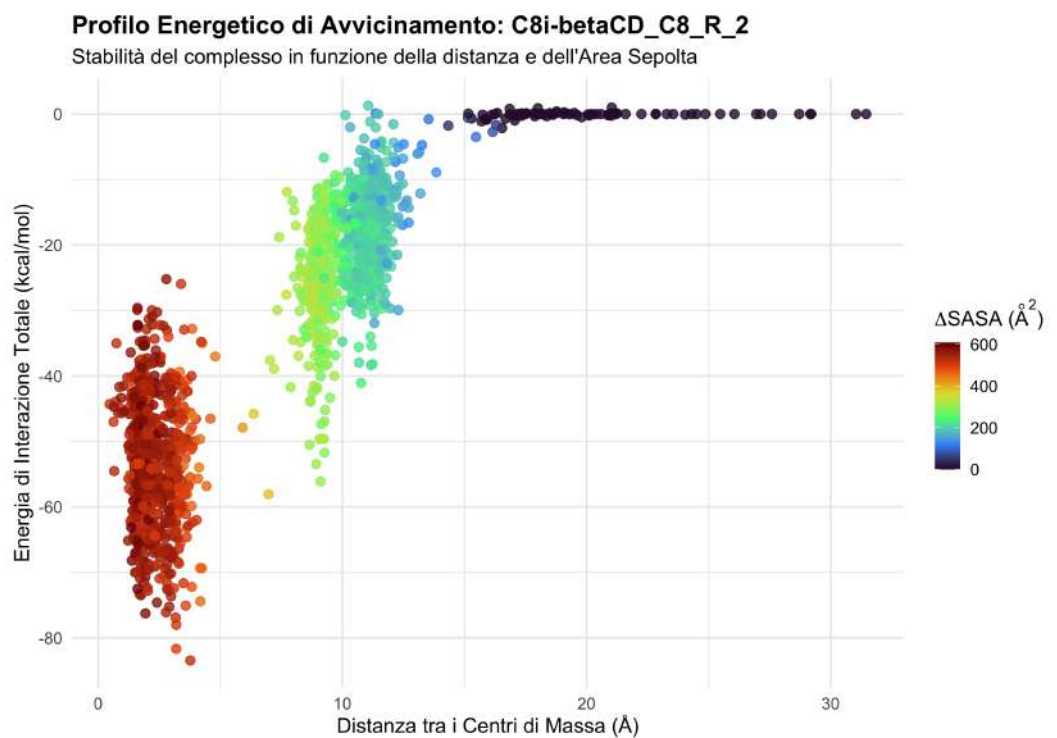


(a) Profilo di avvicinamento

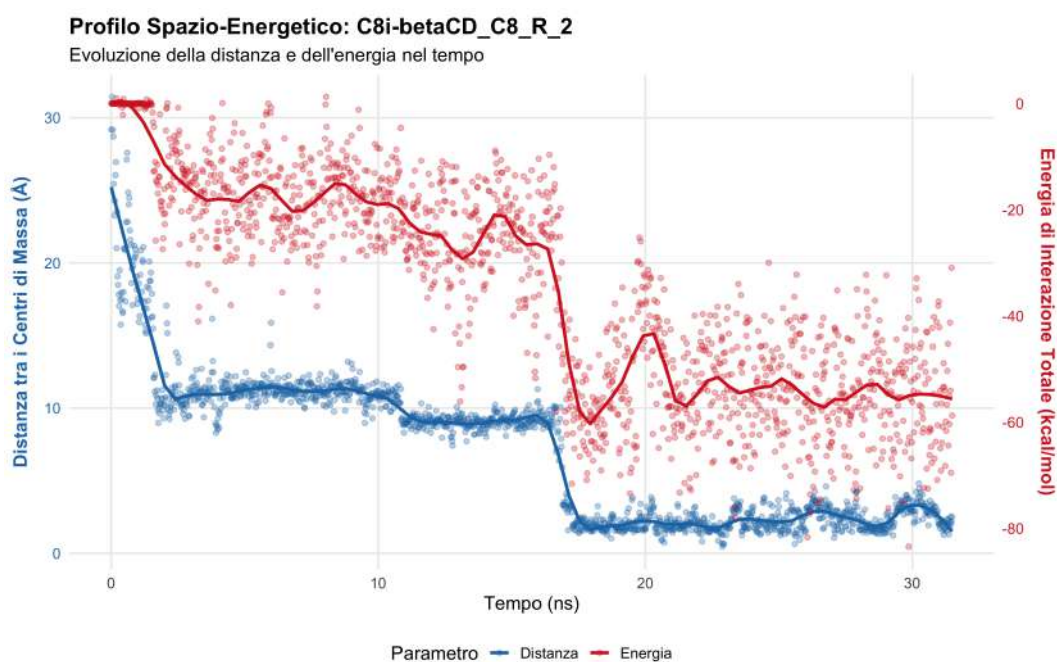


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 58: Analisi per il sistema C8 - Beta-CD. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore $\Delta SASA$, sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

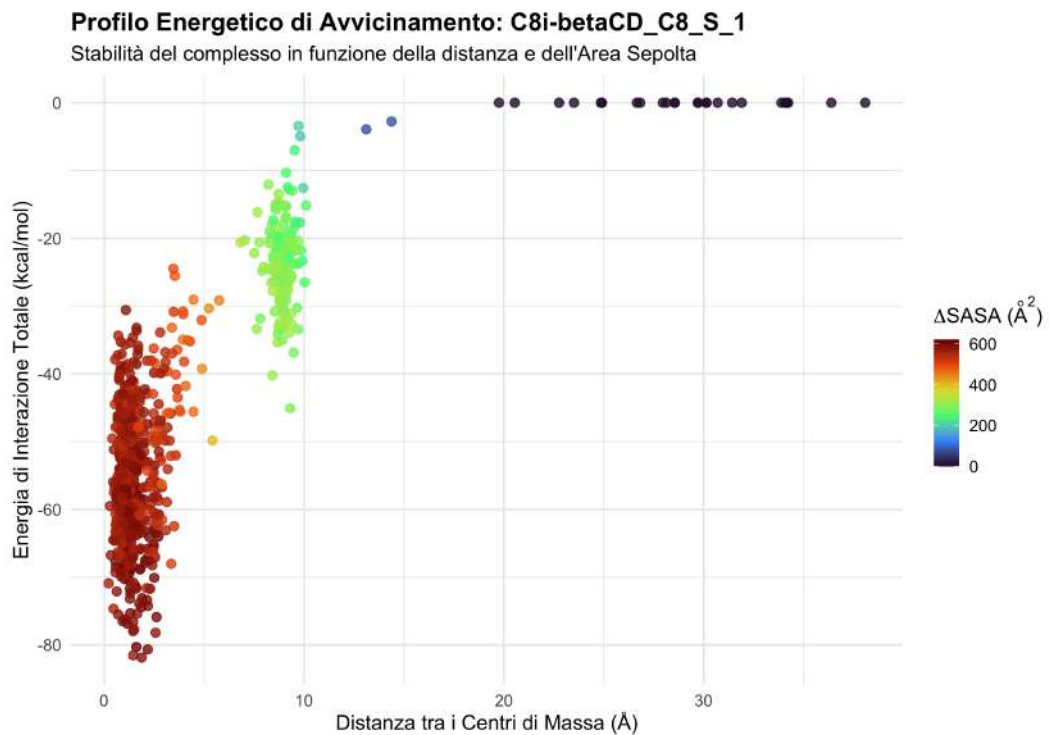


(a) Profilo di avvicinamento

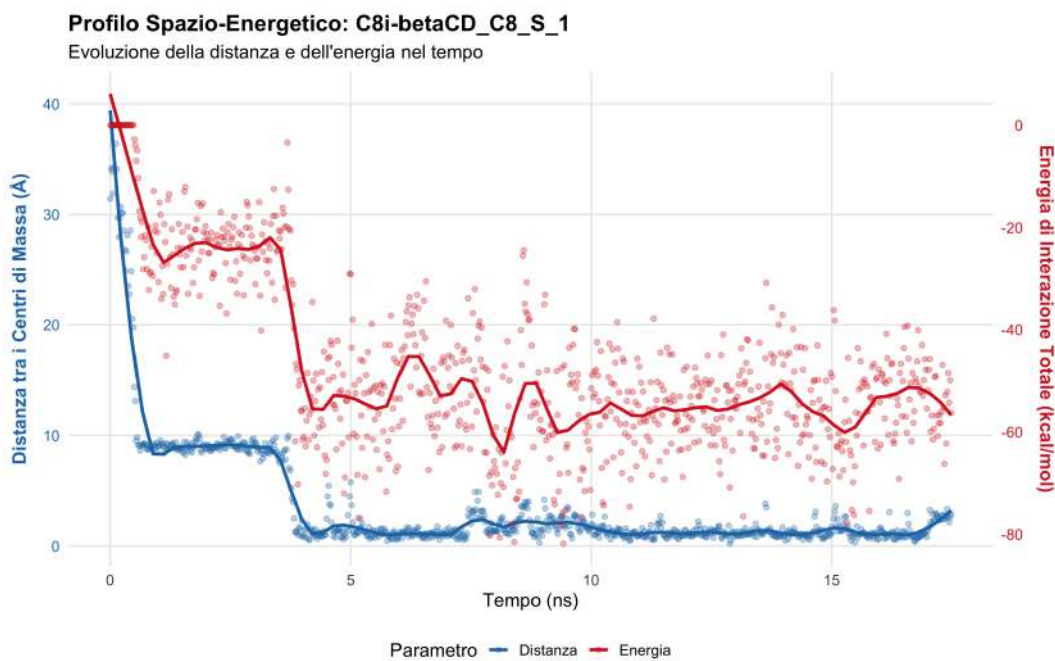


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 59: Analisi per il sistema C8 idratato (Isomero R, Replica 2) - Beta-CD. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

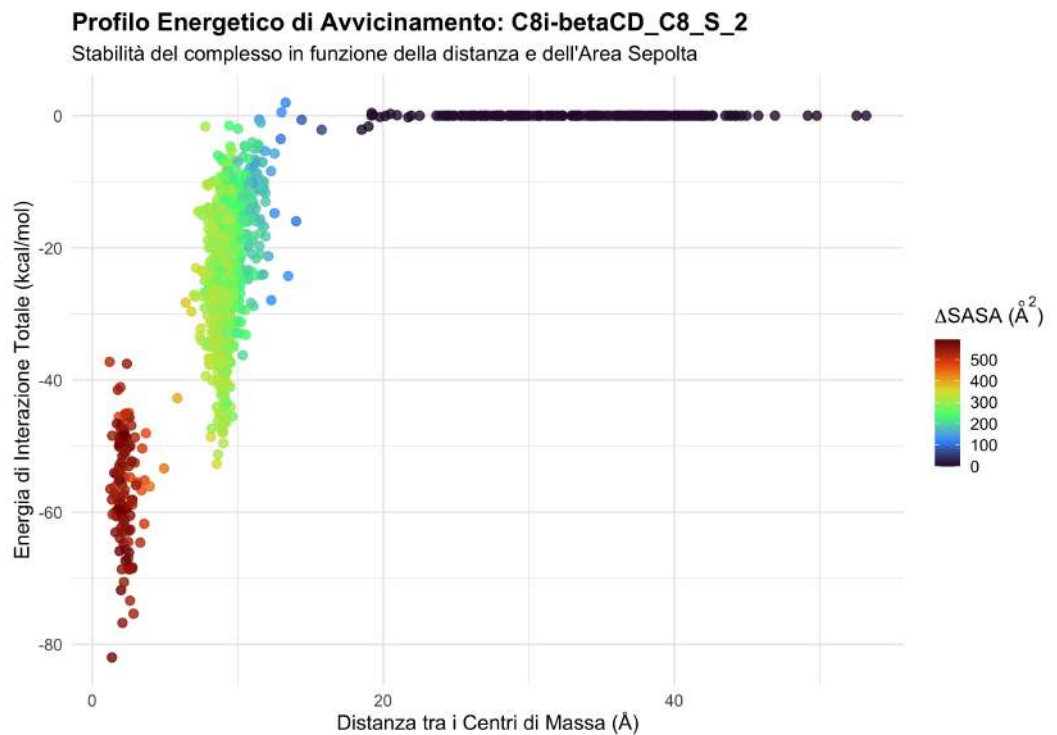


(a) Profilo di avvicinamento

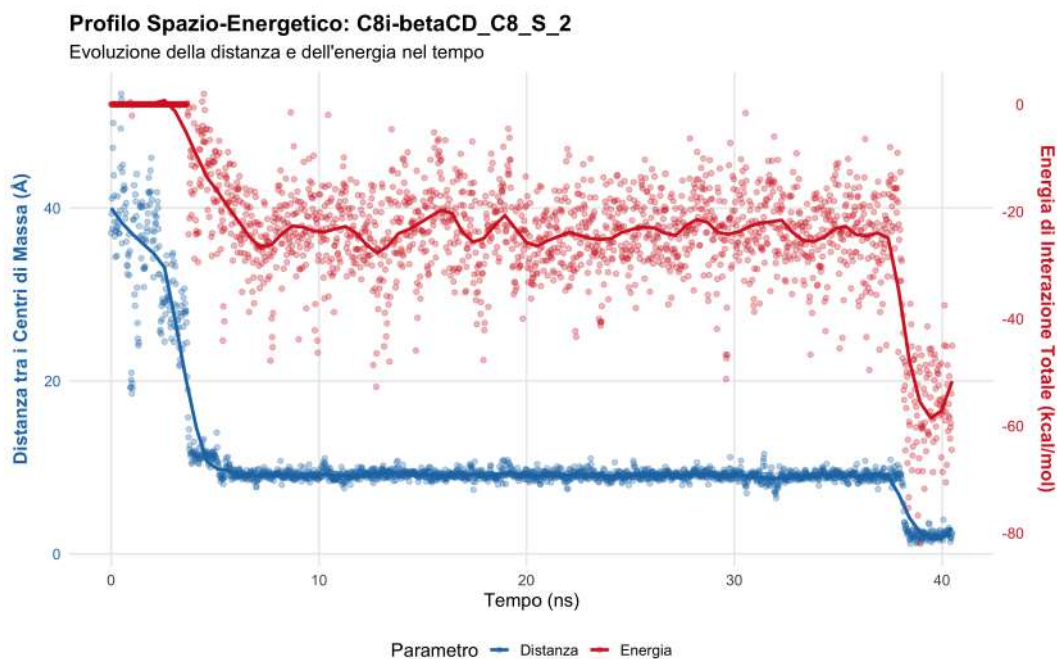


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 60: Analisi per il sistema C8 idratato (Isomero S, Replica 1) - Beta-CD. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

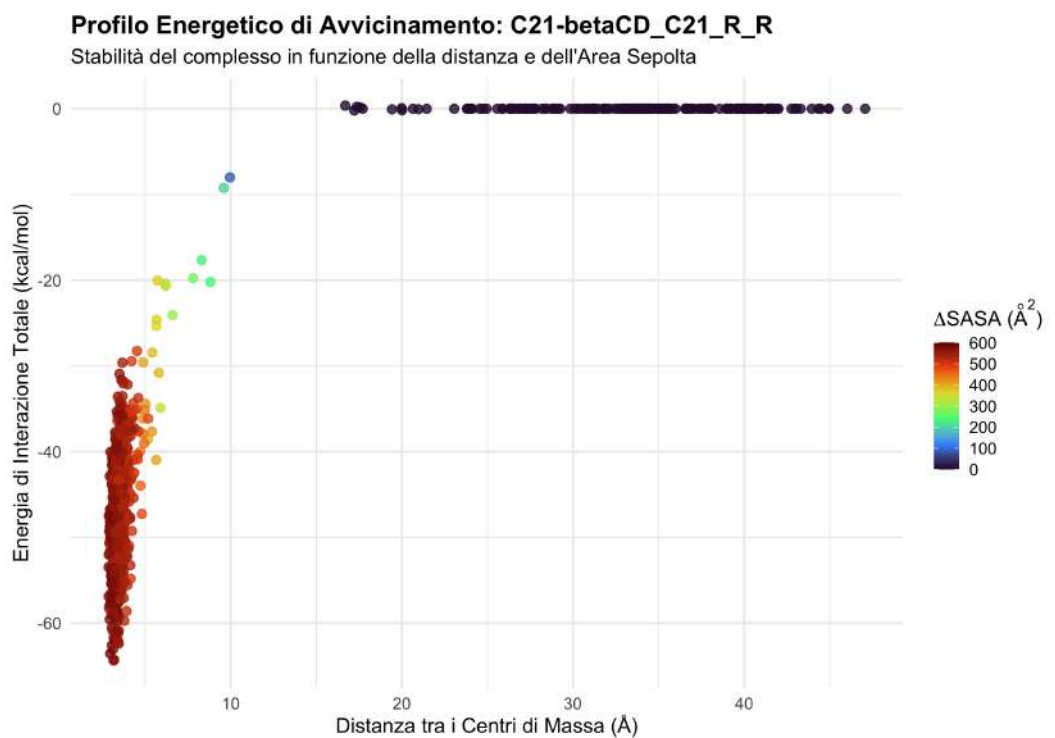


(a) Profilo di avvicinamento

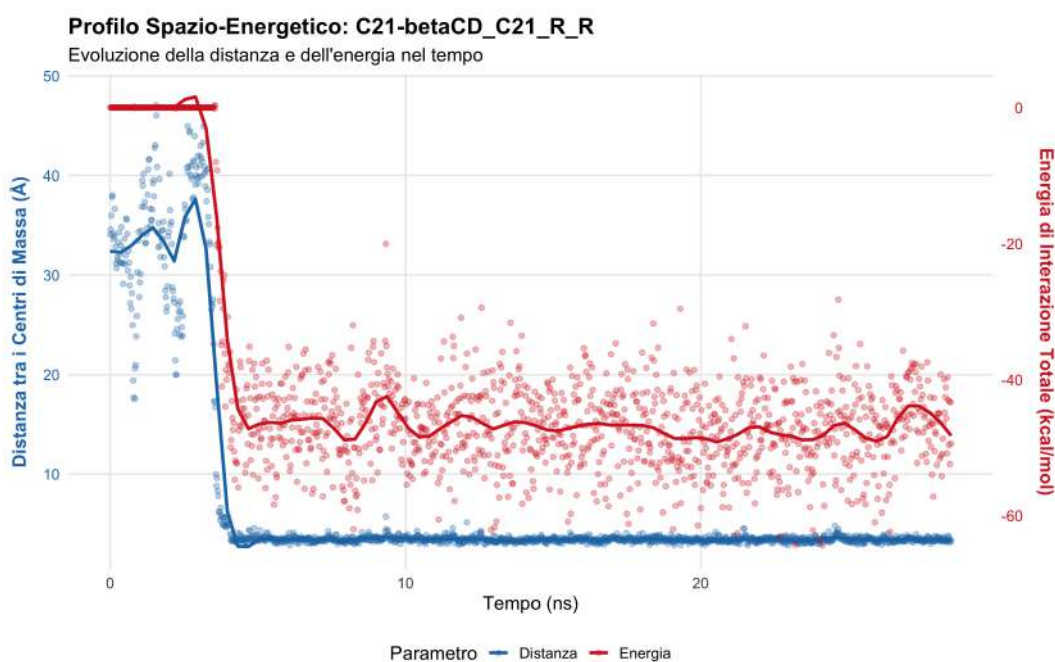


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 61: Analisi per il sistema C8 idratato (Isomero S, Replica 2) - Beta-CD. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

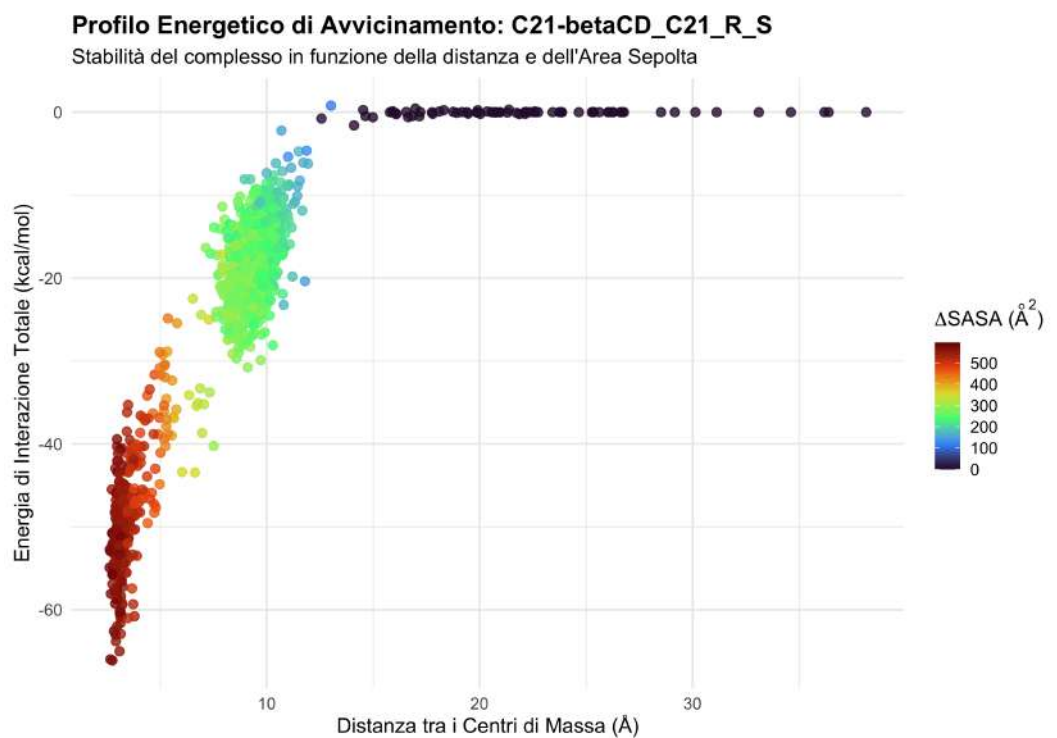


(a) Profilo di avvicinamento

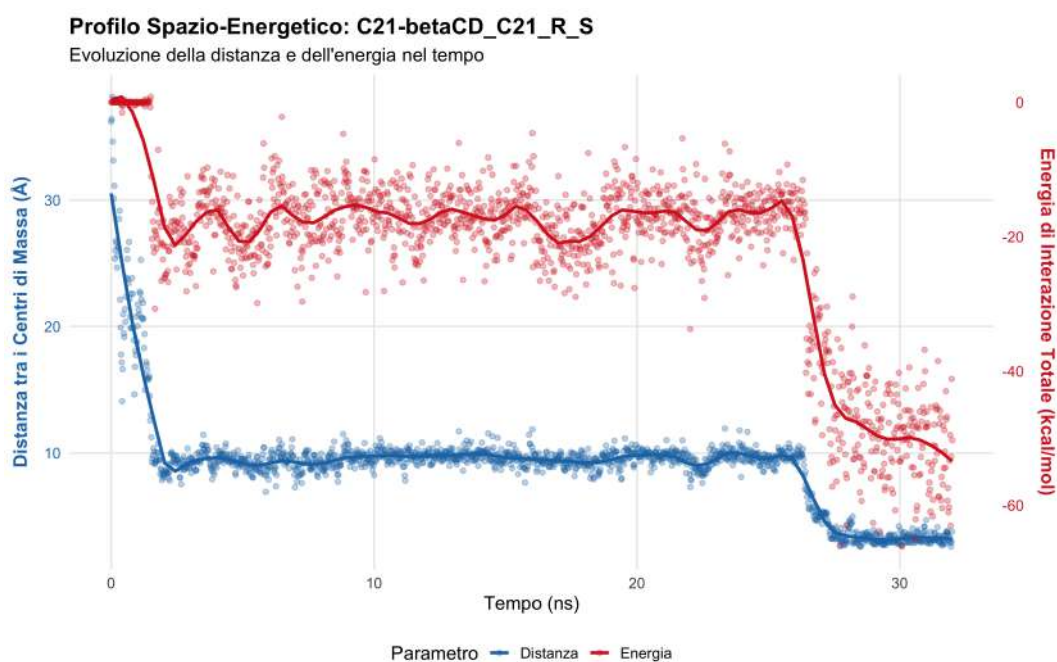


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 62: Analisi per il sistema C21 (R,R) - Beta-CD. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

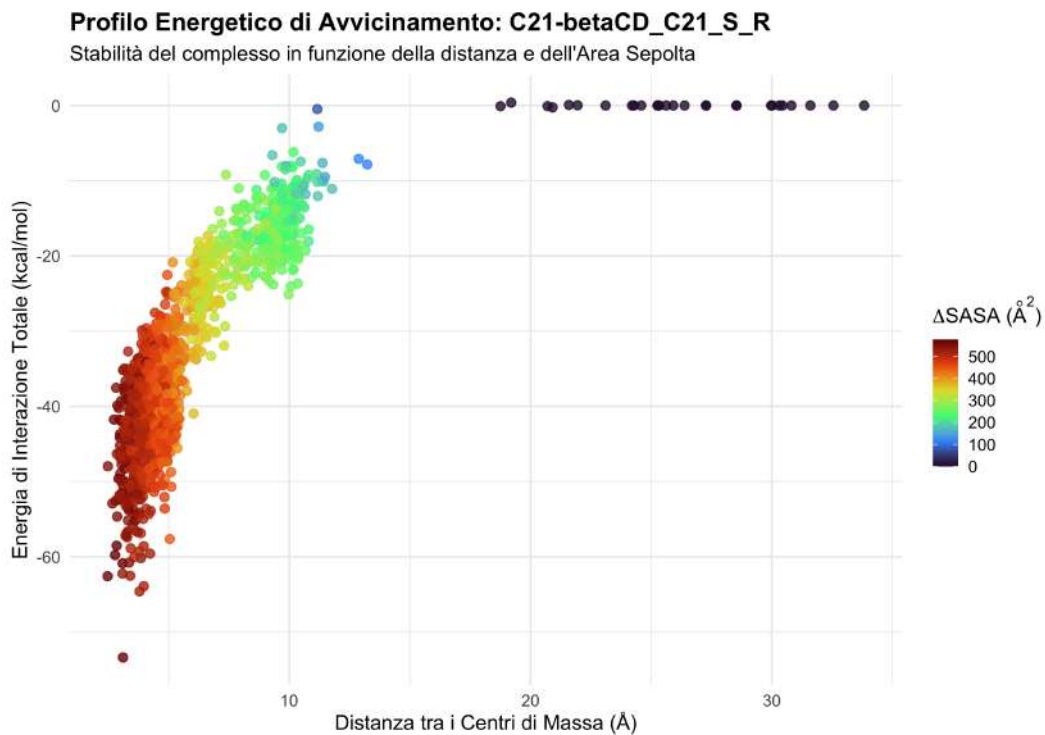


(a) Profilo di avvicinamento

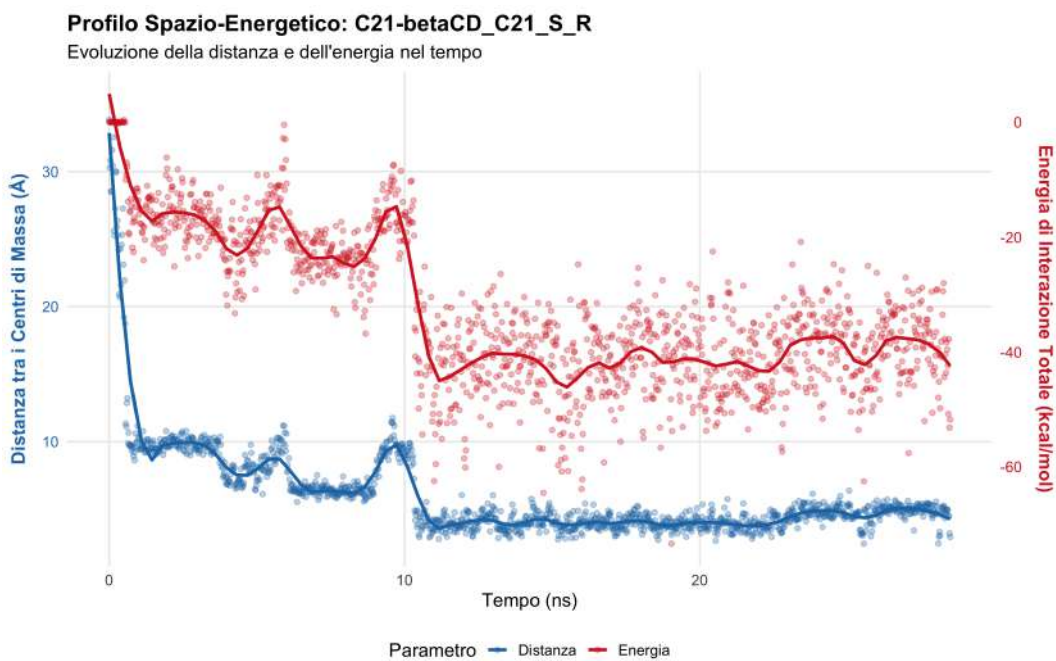


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 63: Analisi per il sistema C21 (R,S) - Beta-CD. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

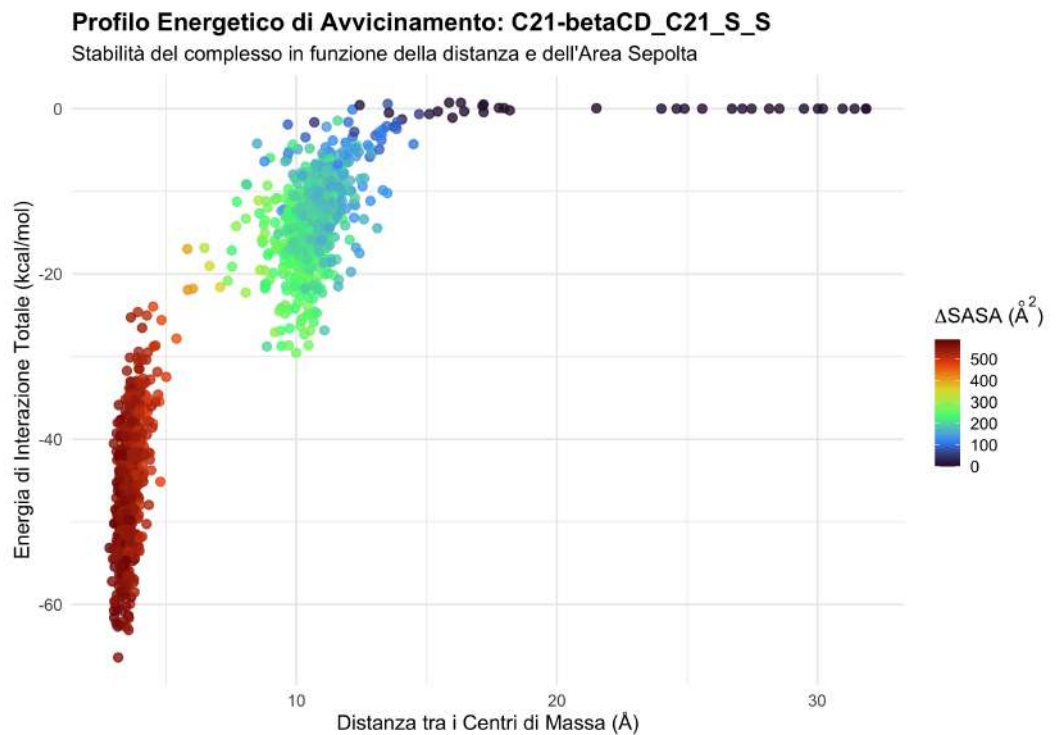


(a) Profilo di avvicinamento

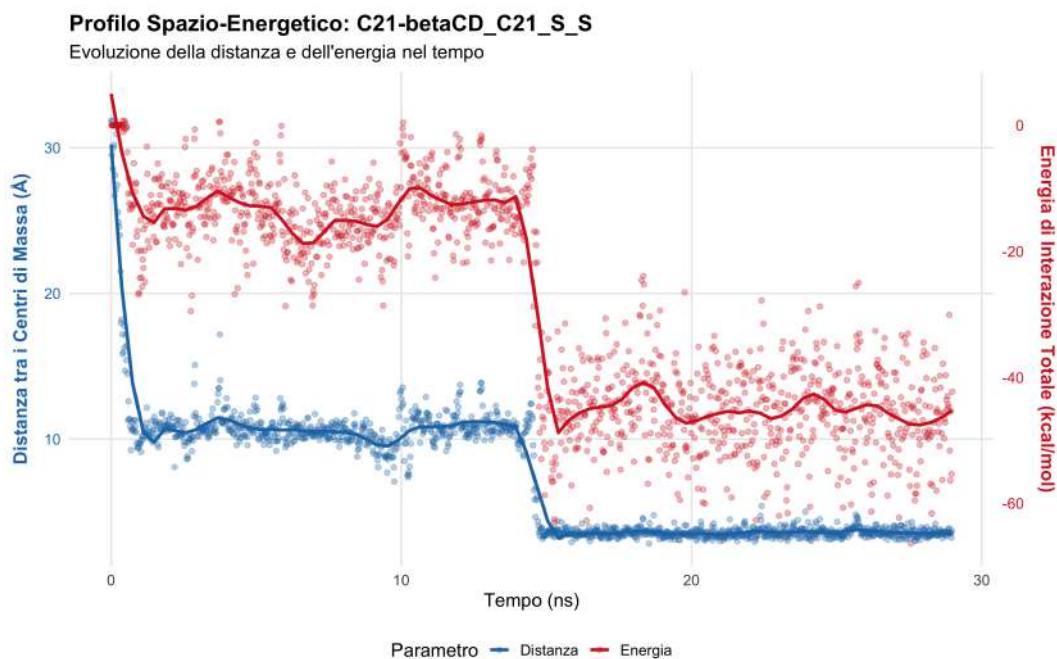


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 64: Analisi per il sistema C21 (S,R) - Beta-CD. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

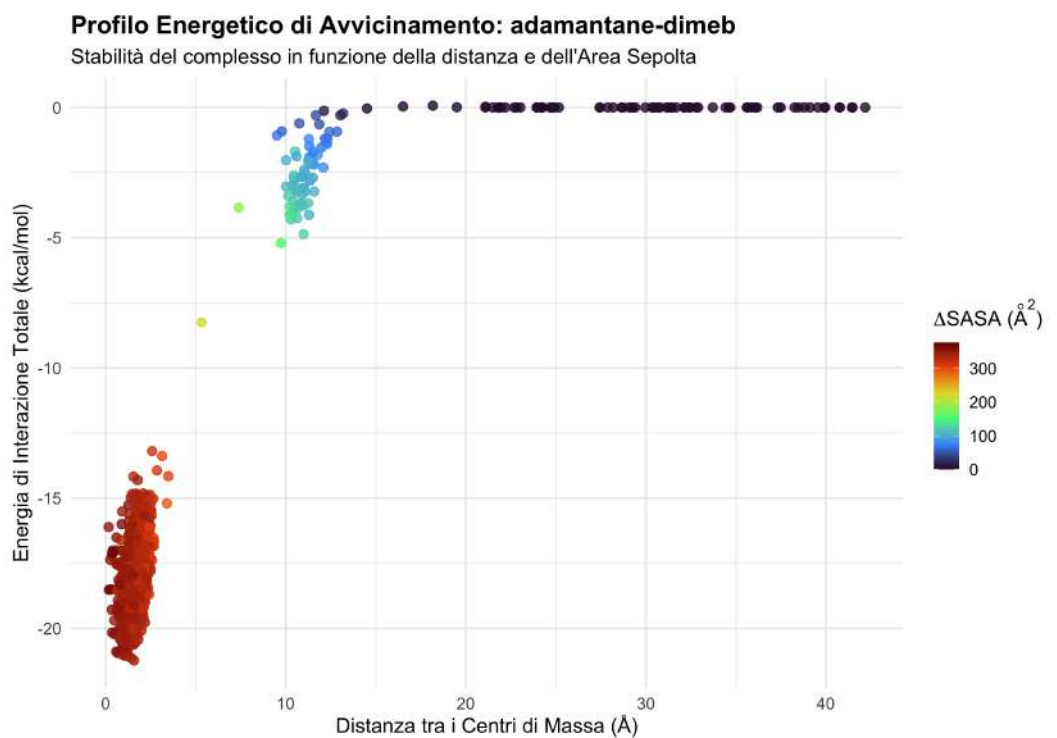


(a) Profilo di avvicinamento

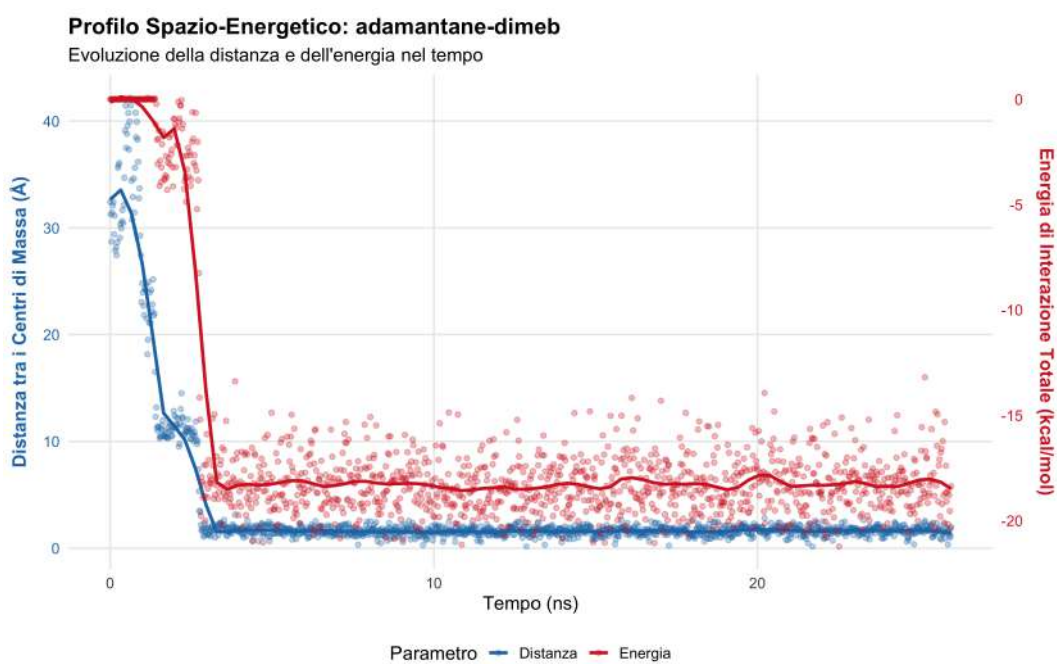


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 65: Analisi per il sistema C21 (S,S) - Beta-CD. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

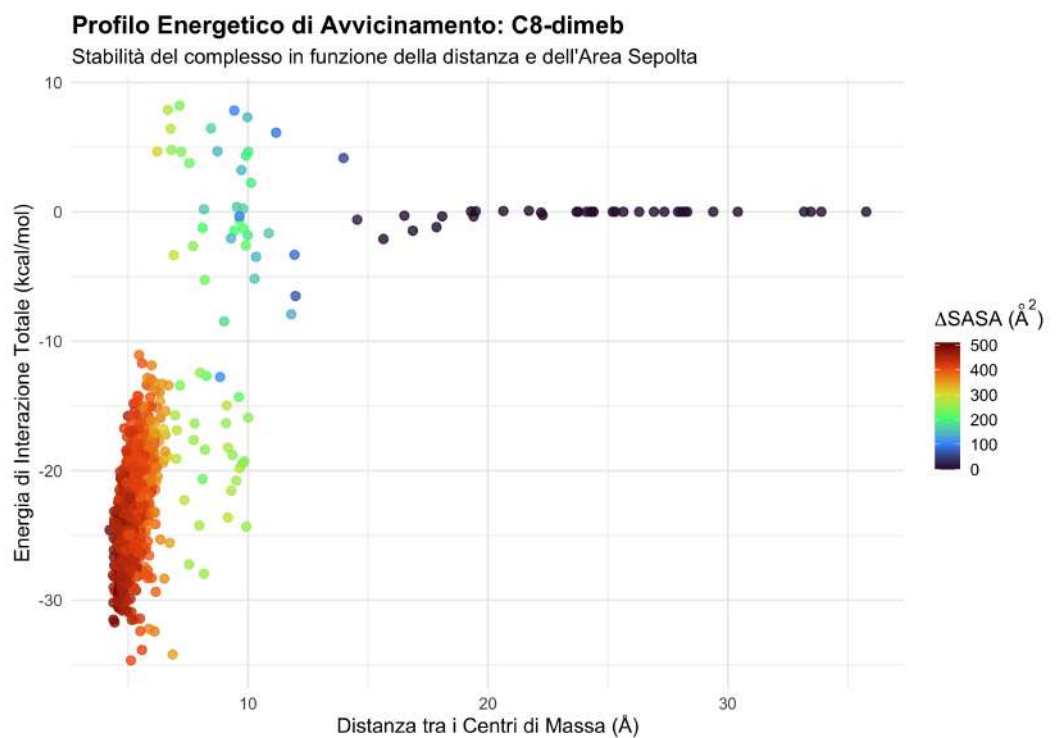


(a) Profilo di avvicinamento

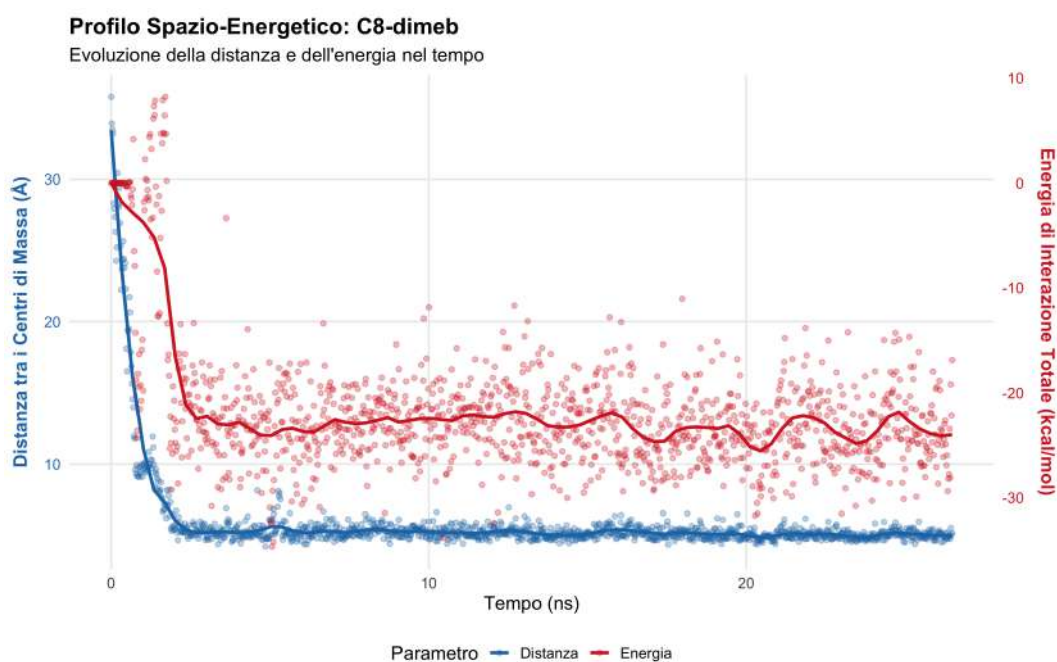


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 66: Analisi per il sistema Adamantano - DiMEB. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

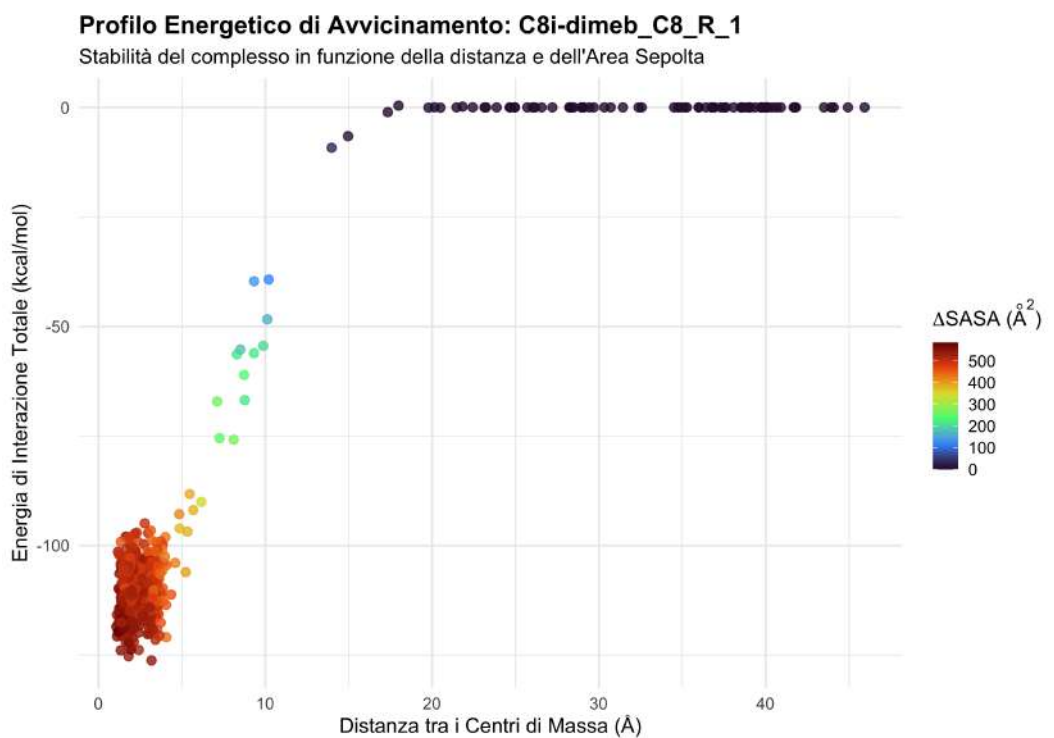


(a) Profilo di avvicinamento

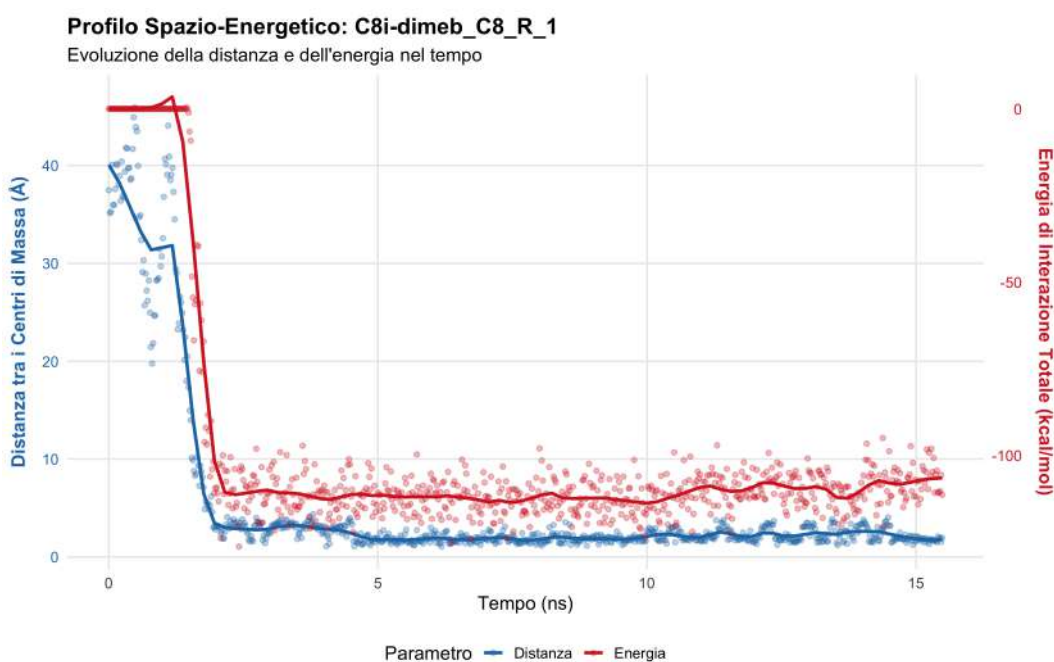


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 67: Analisi per il sistema C8 - DiMEB. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

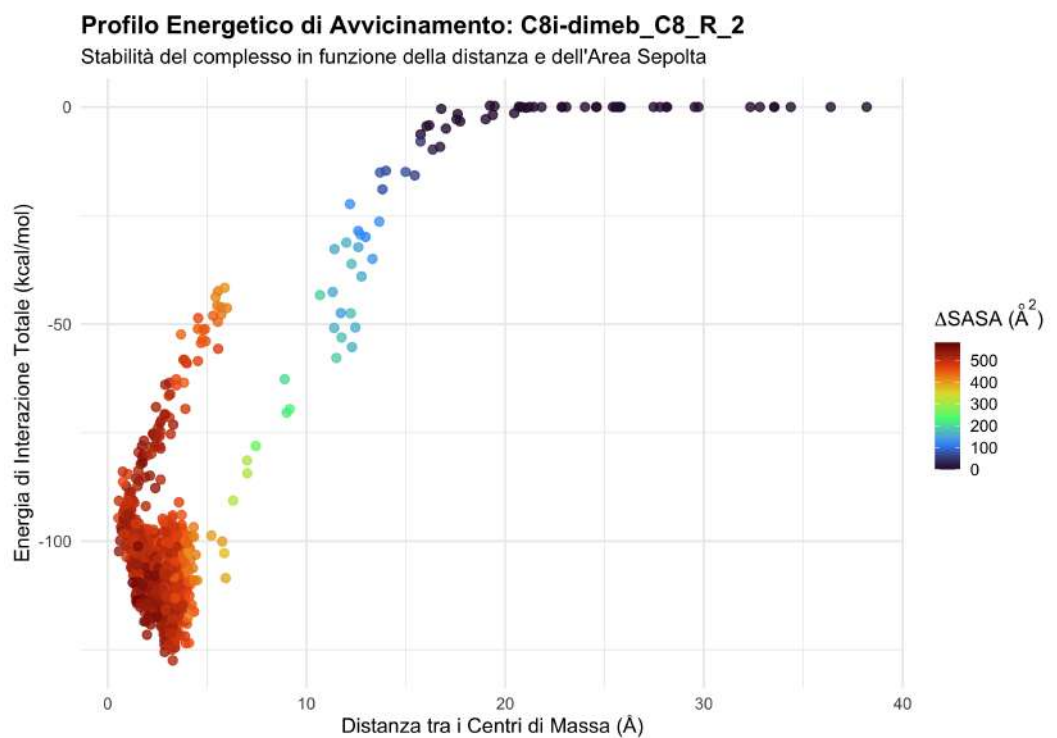


(a) Profilo di avvicinamento

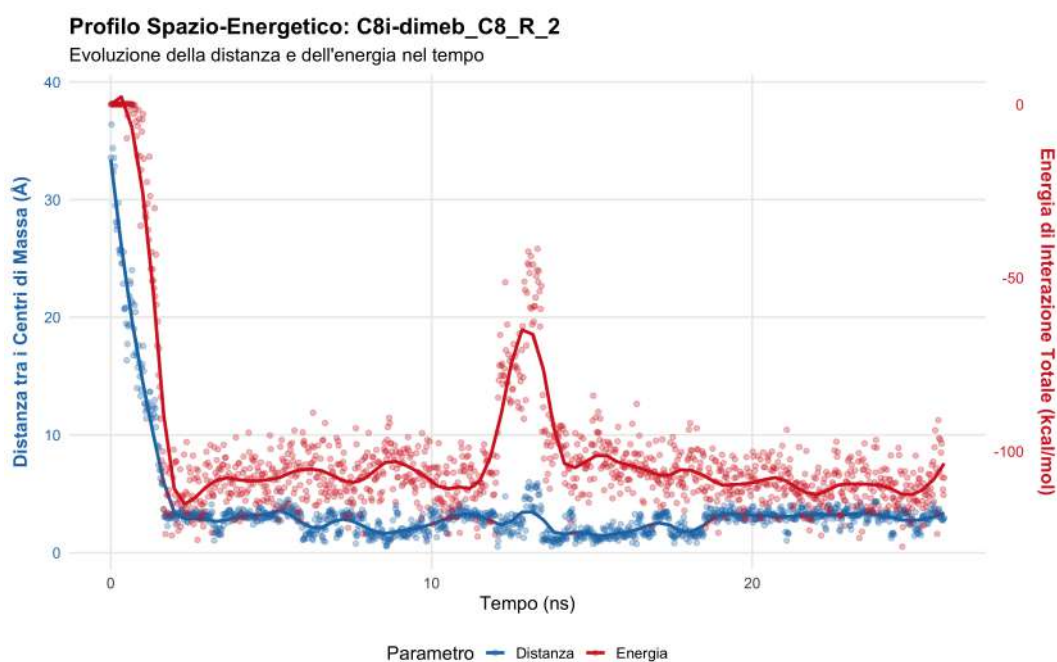


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 68: Analisi per il sistema C8 idratato (Isomero R, Replica 1) - DiMEB. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

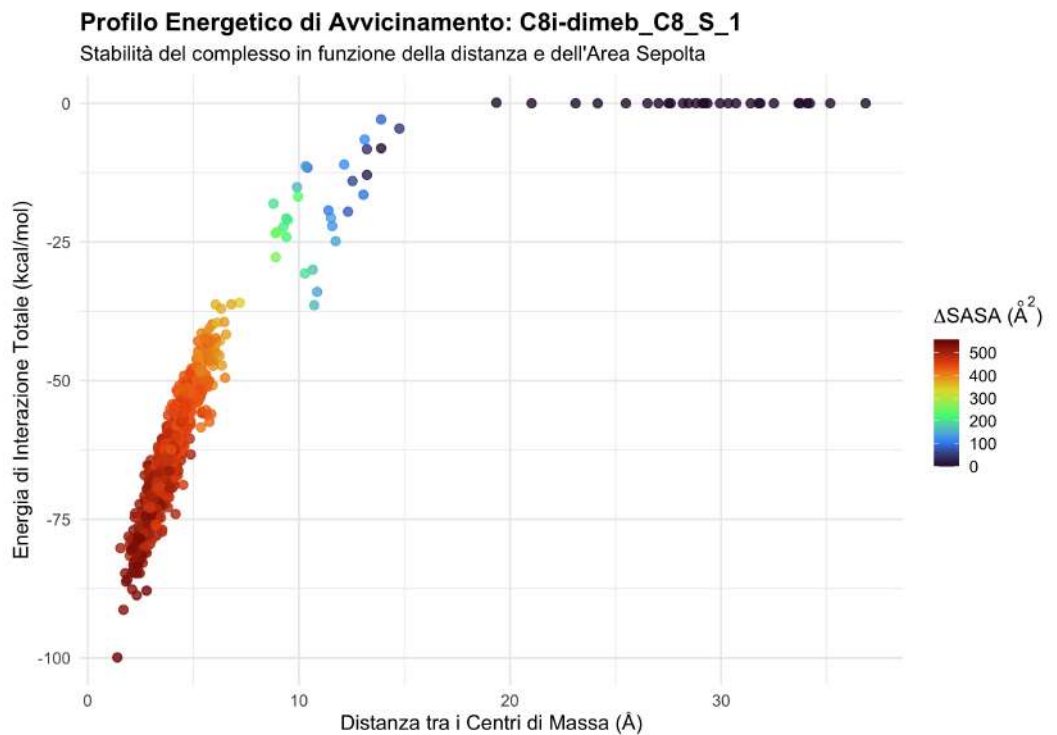


(a) Profilo di avvicinamento

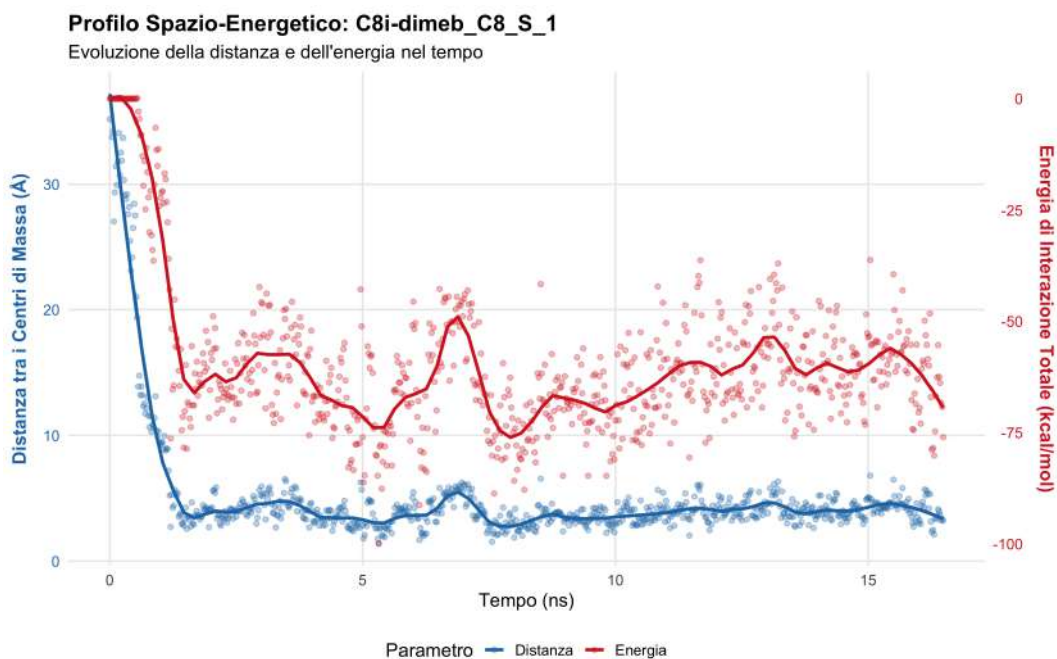


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 69: Analisi per il sistema C8 idratato (Isomero R, Replica 2) - DiMEB. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

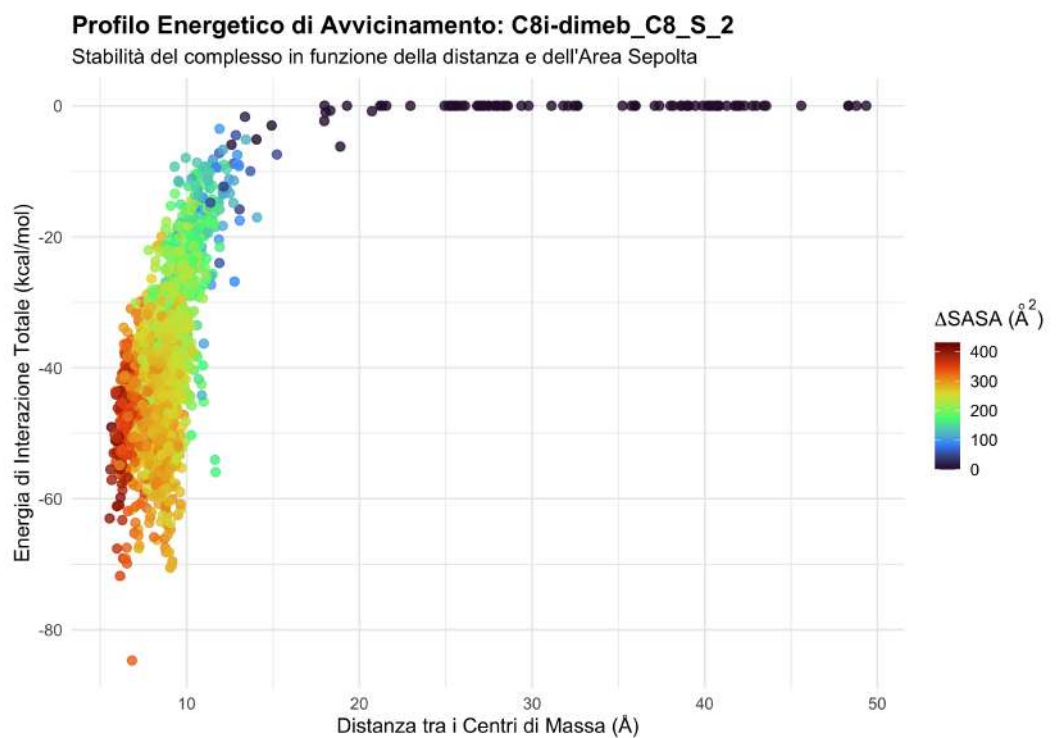


(a) Profilo di avvicinamento

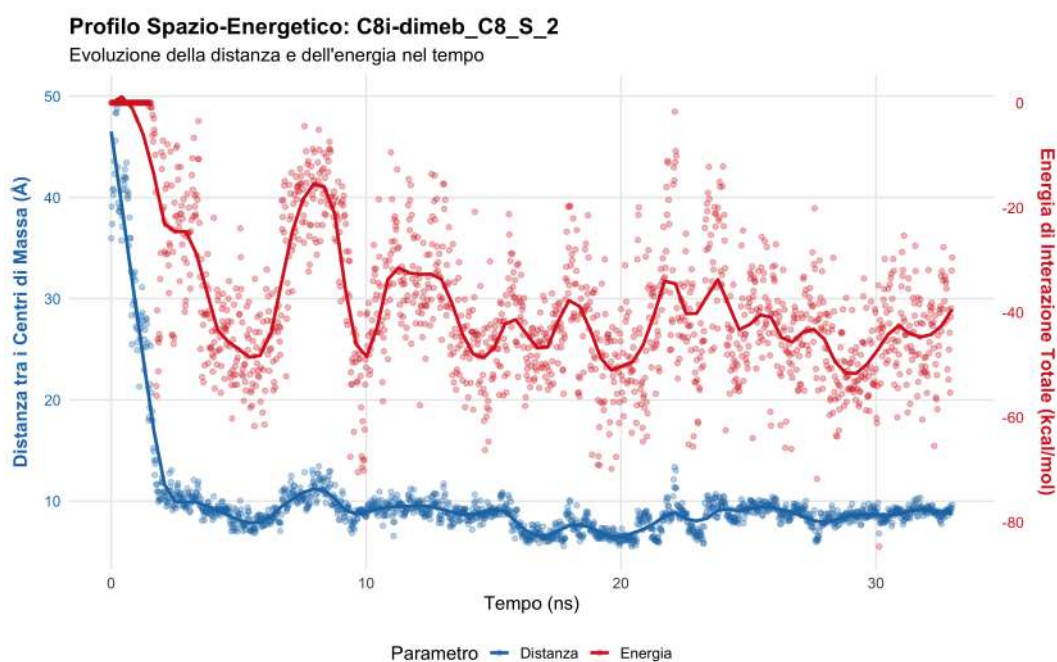


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 70: Analisi per il sistema C8 idratato (Isomero S, Replica 1) - DiMEB. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

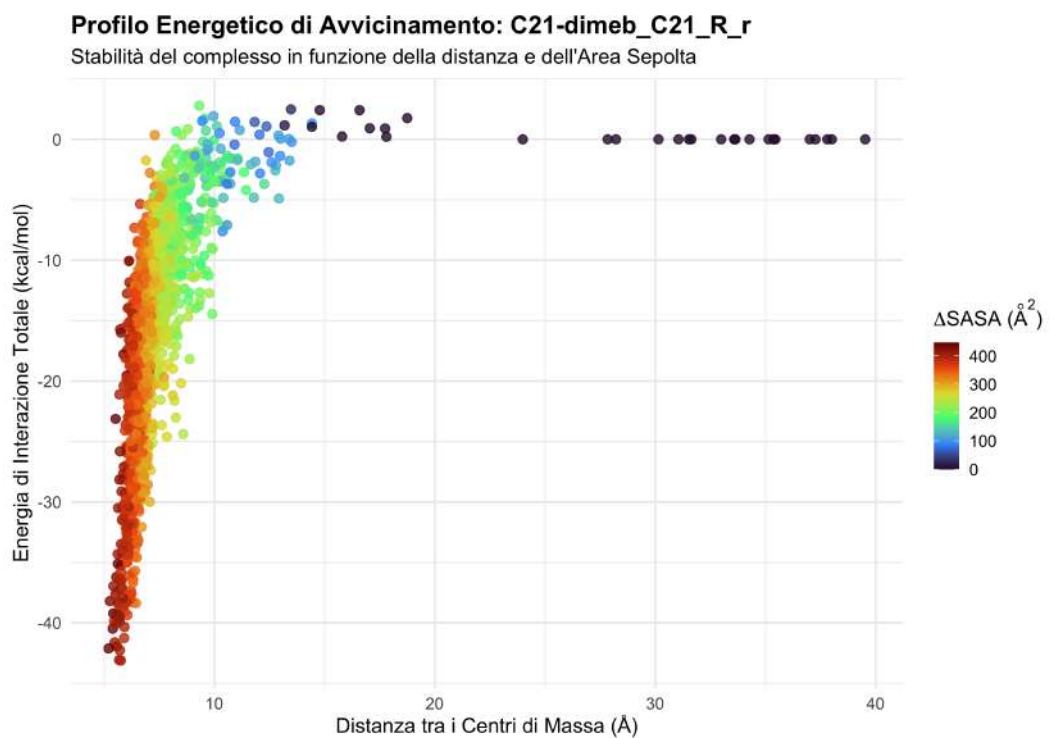


(a) Profilo di avvicinamento

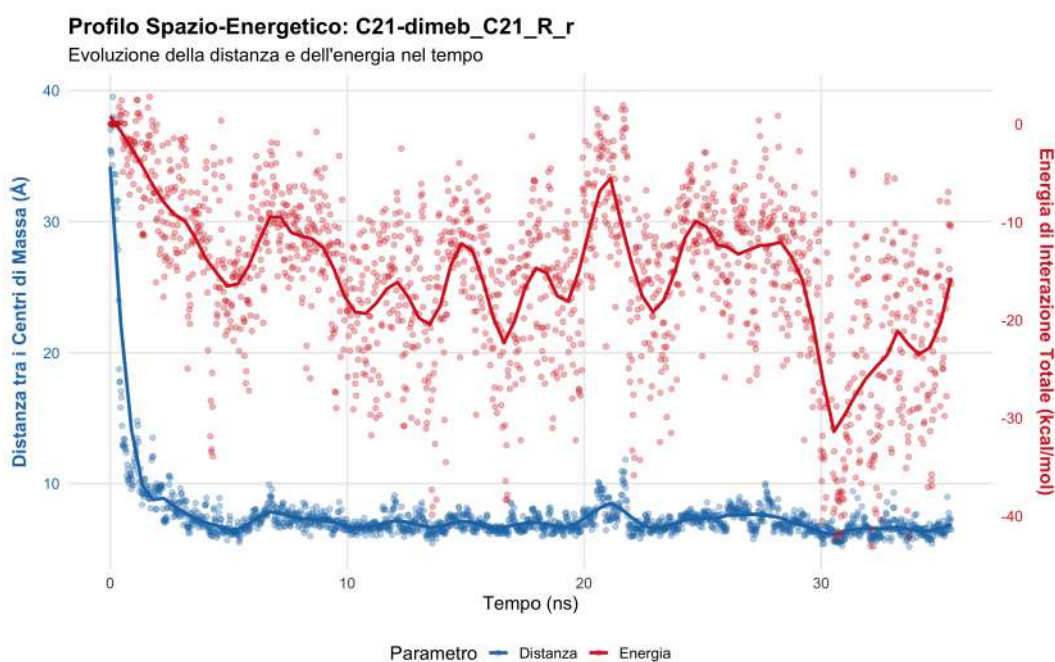


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 71: Analisi per il sistema C8 idratato (Isomero S, Replica 2) - DiMEB. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

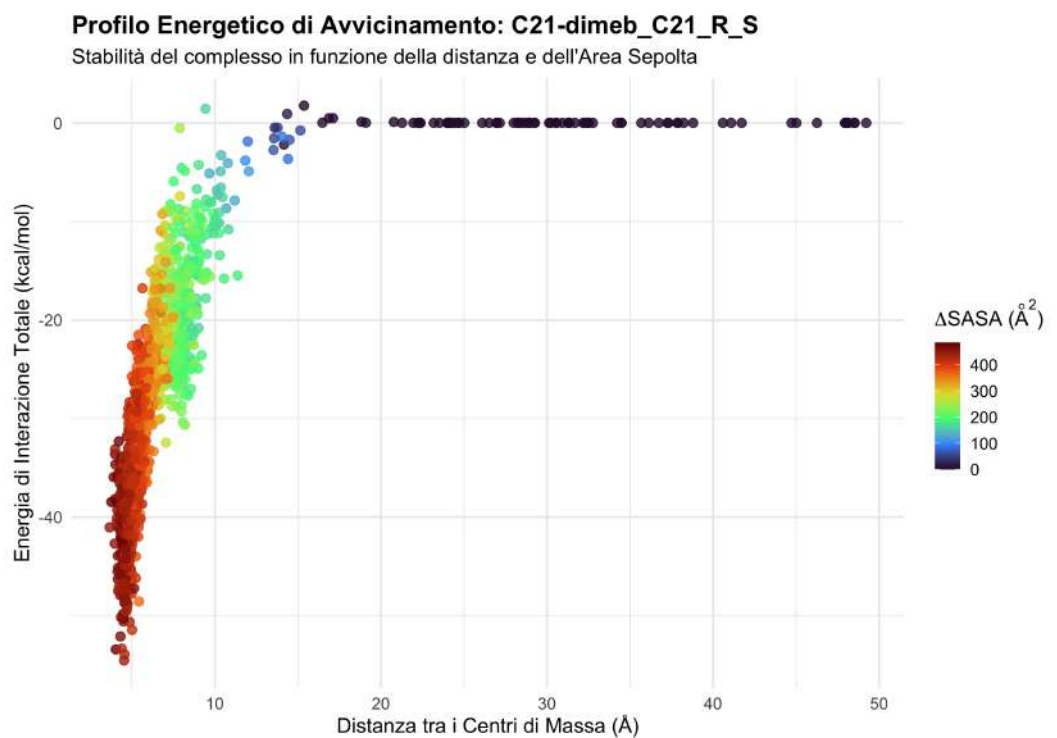


(a) Profilo di avvicinamento

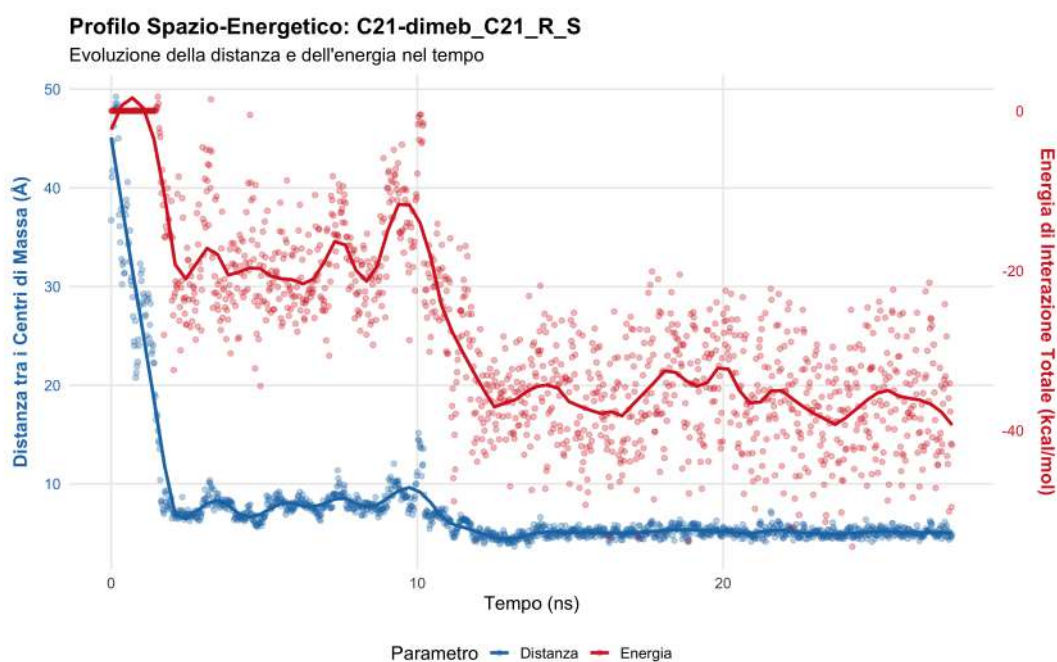


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 72: Analisi per il sistema C21 (R,R) - DiMEB. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

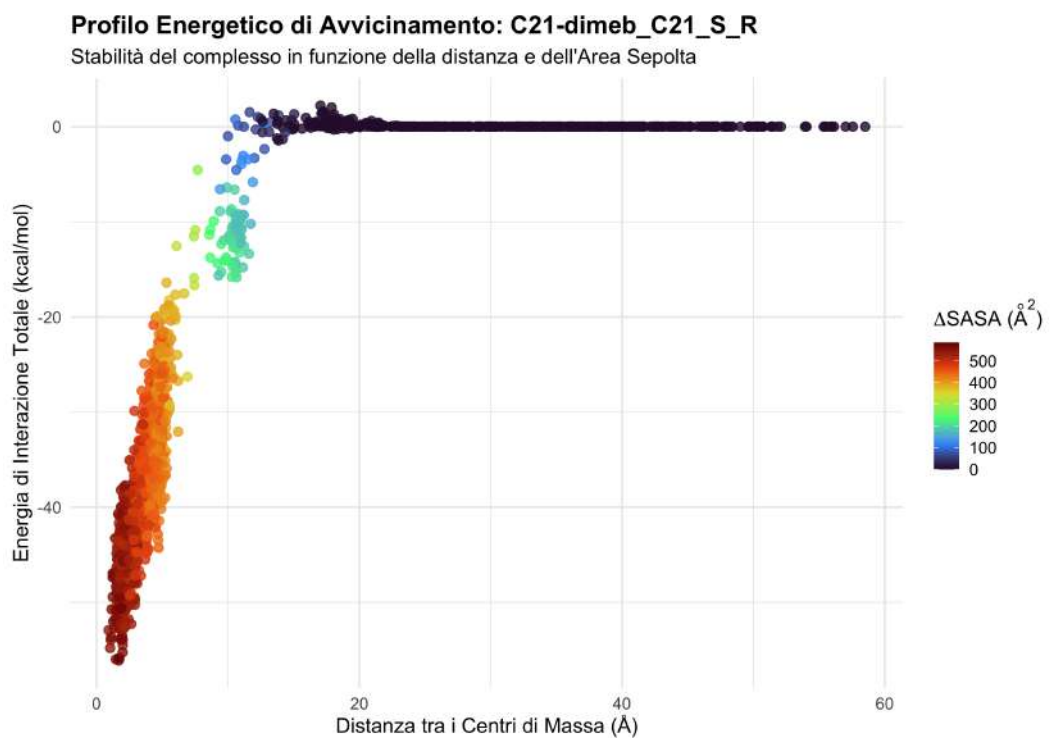


(a) Profilo di avvicinamento

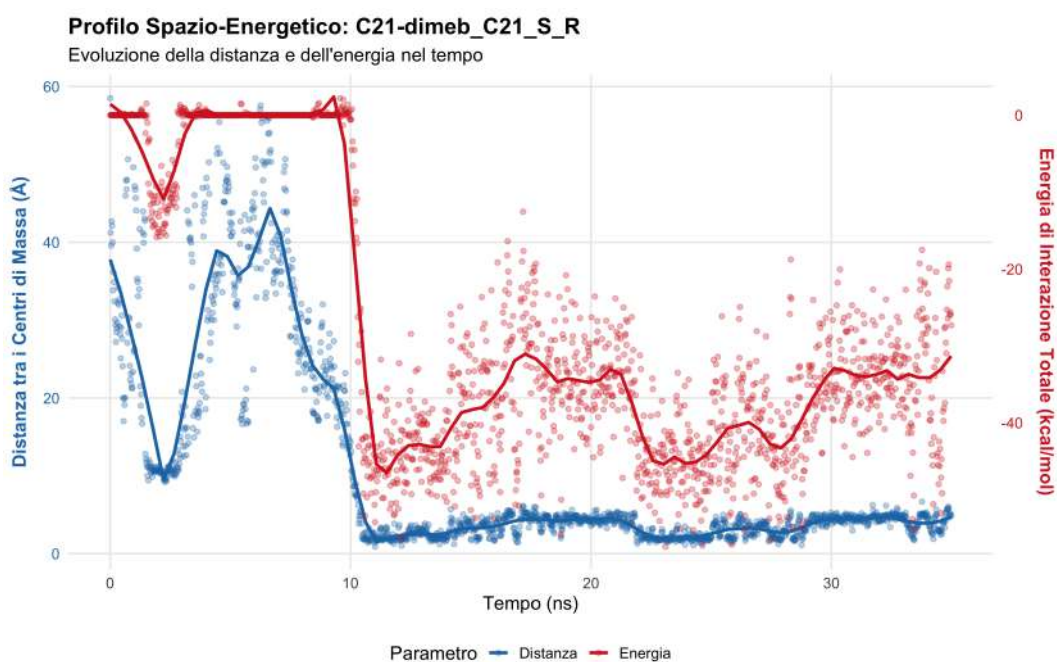


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 73: Analisi per il sistema C21 (R,S) - DiMEB. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

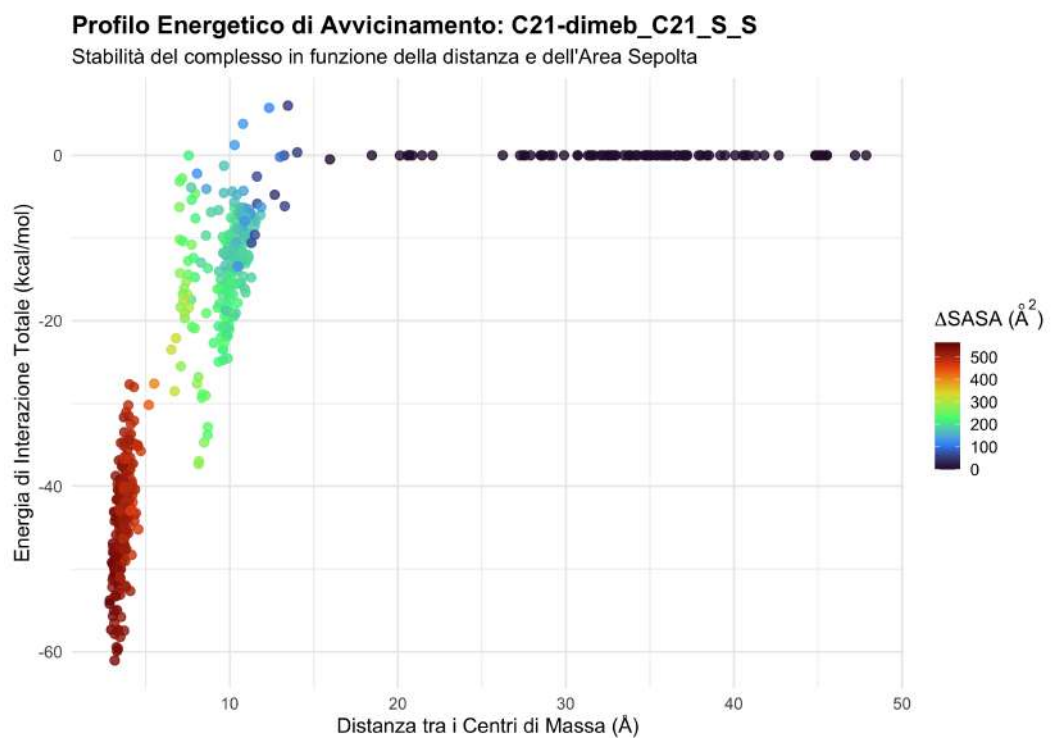


(a) Profilo di avvicinamento

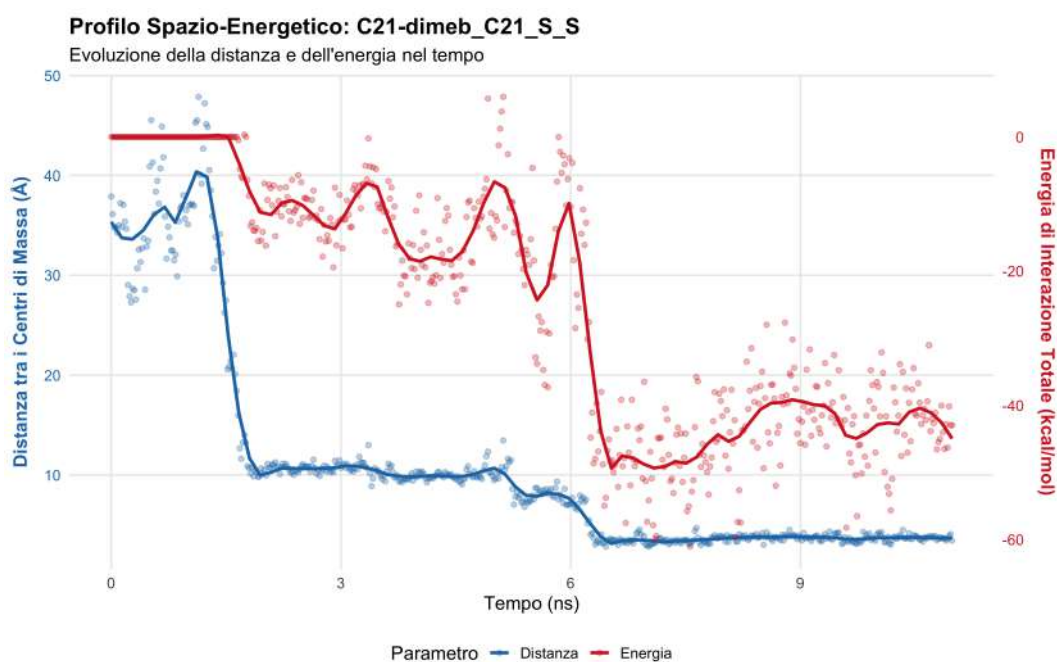


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 74: Analisi per il sistema C21 (S,R) - DiMEB. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore Δ SASA, sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

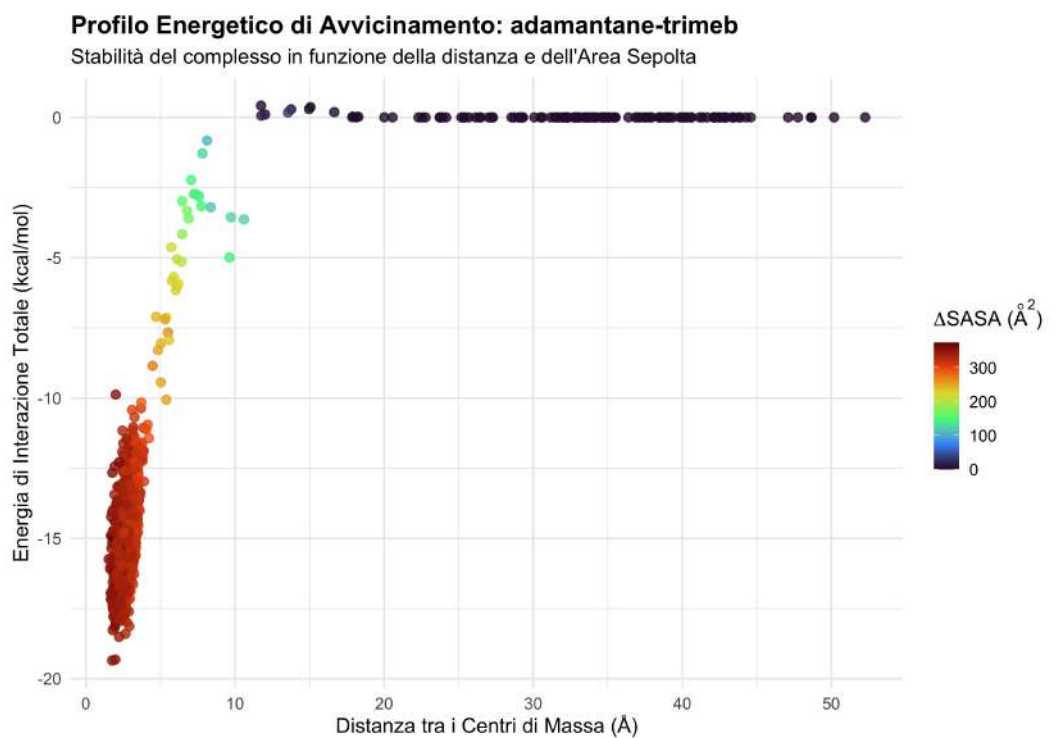


(a) Profilo di avvicinamento

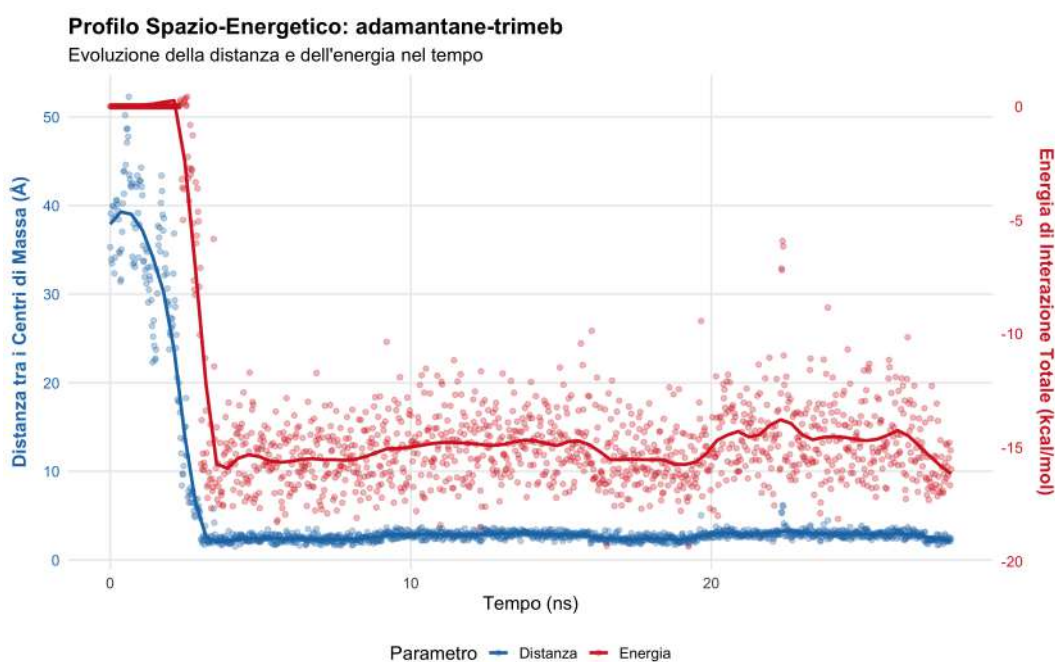


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 75: Analisi per il sistema C21 (S,S) - DiMEB. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).



(a) Profilo di avvicinamento

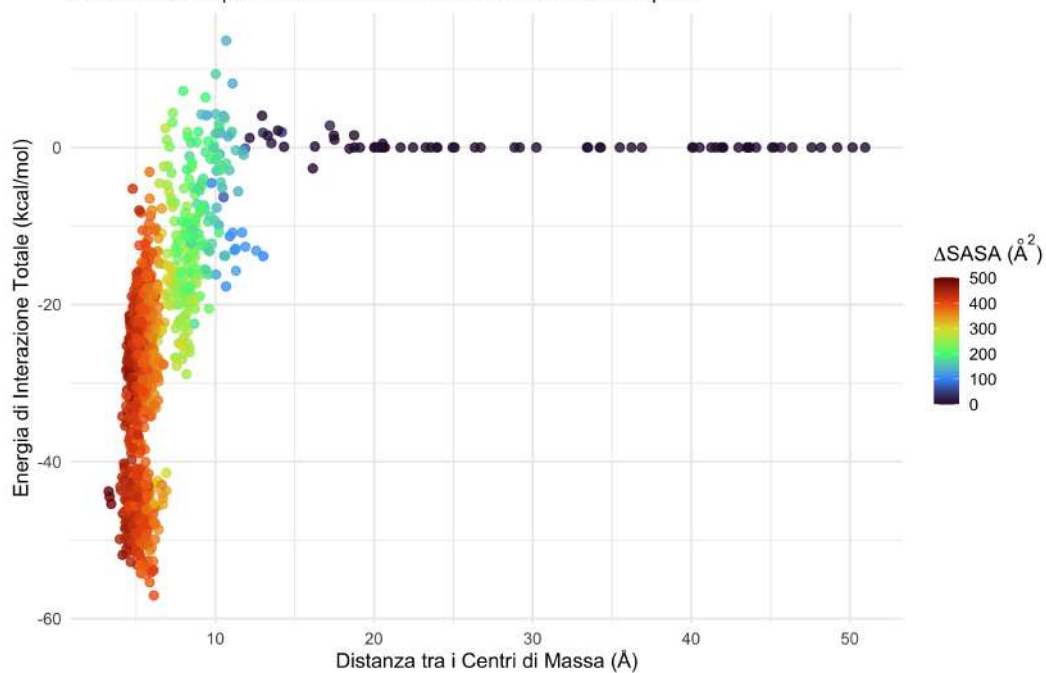


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 76: Analisi per il sistema Adamantano - TriMEB. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

Profilo Energetico di Avvicinamento: C8-trimeb

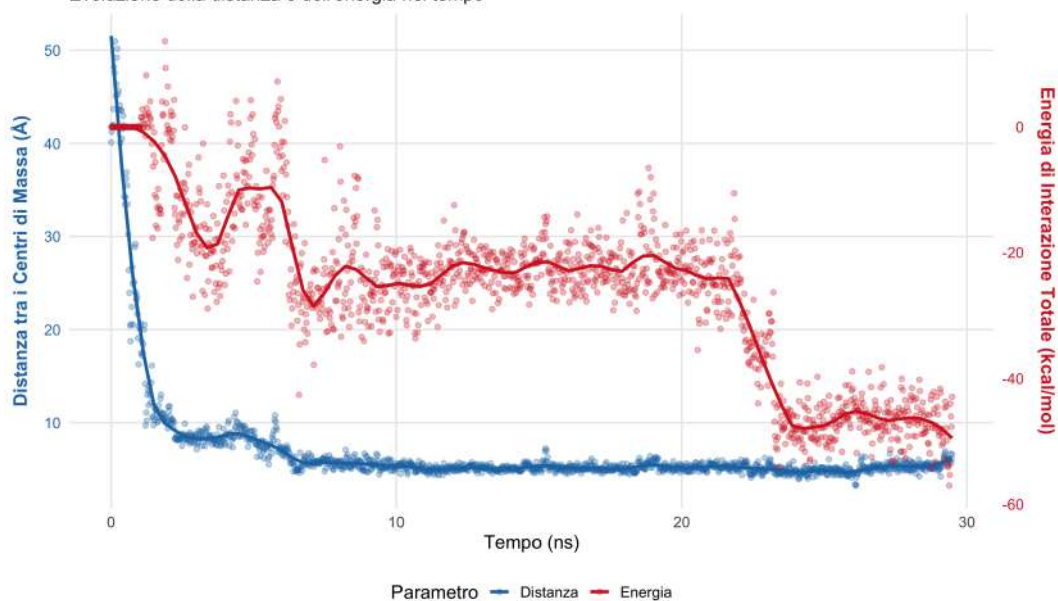
Stabilità del complesso in funzione della distanza e dell'Area Sepolta



(a) Profilo di avvicinamento

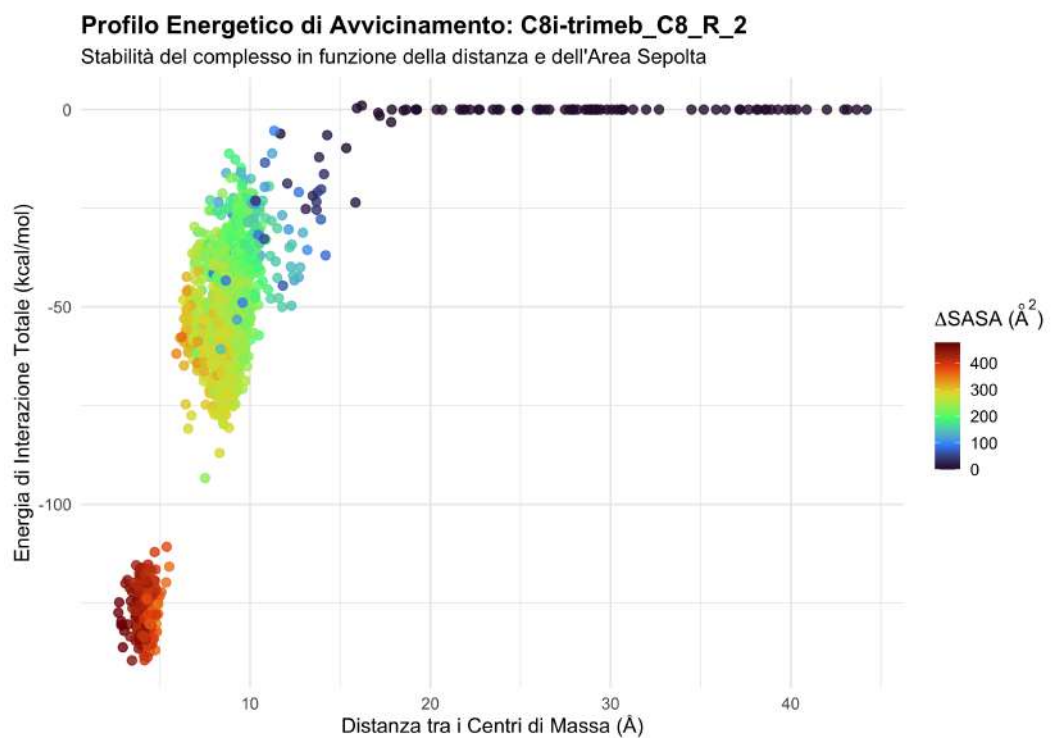
Profilo Spazio-Energetico: C8-trimeb

Evoluzione della distanza e dell'energia nel tempo

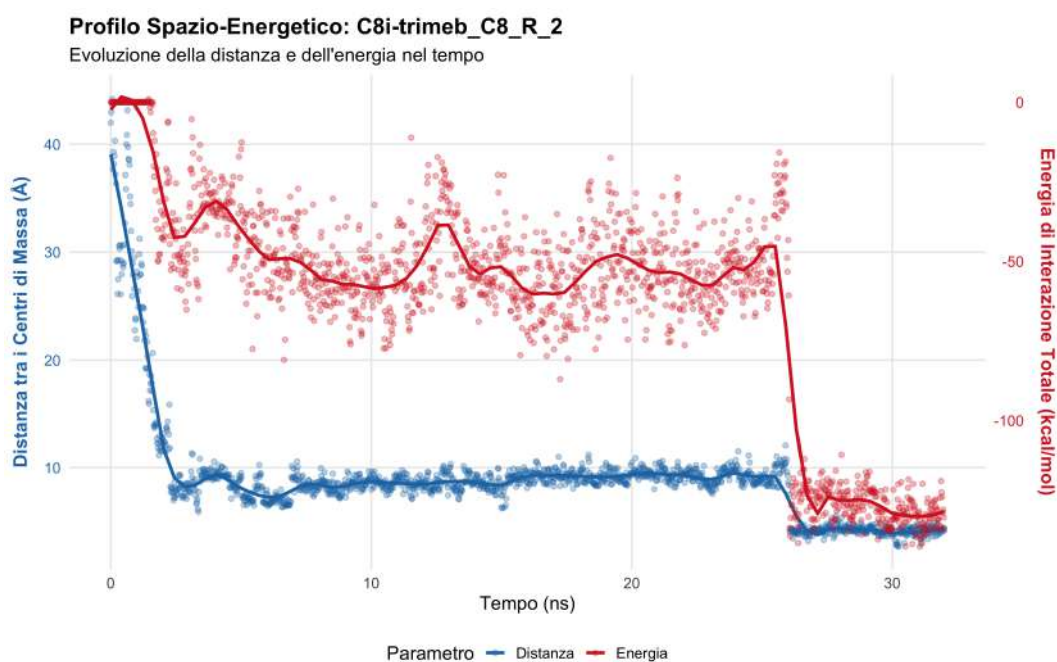


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 77: Analisi per il sistema C8 - TriMEB. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

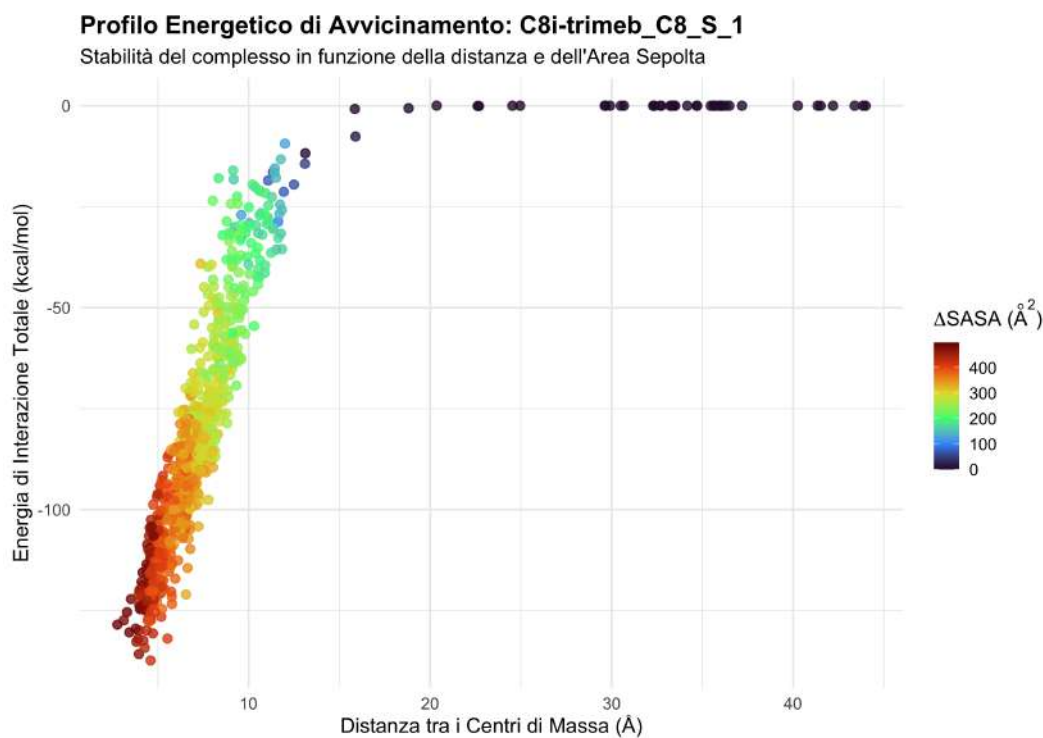


(a) Profilo di avvicinamento

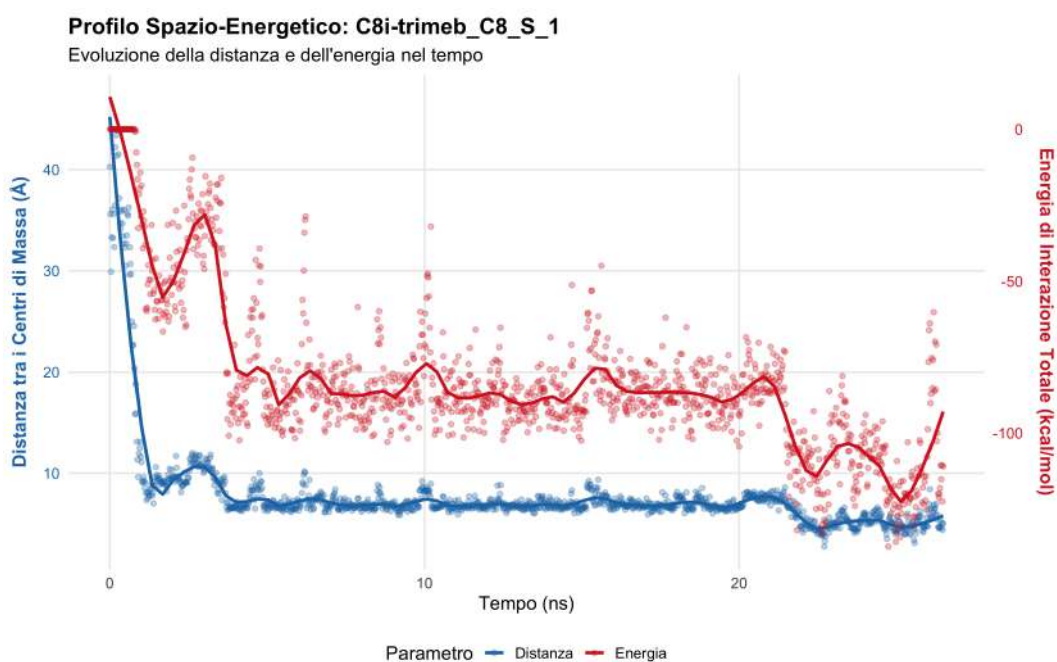


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 79: Analisi per il sistema C8 idratato (Isomero R, Replica 2) - TriMEB. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

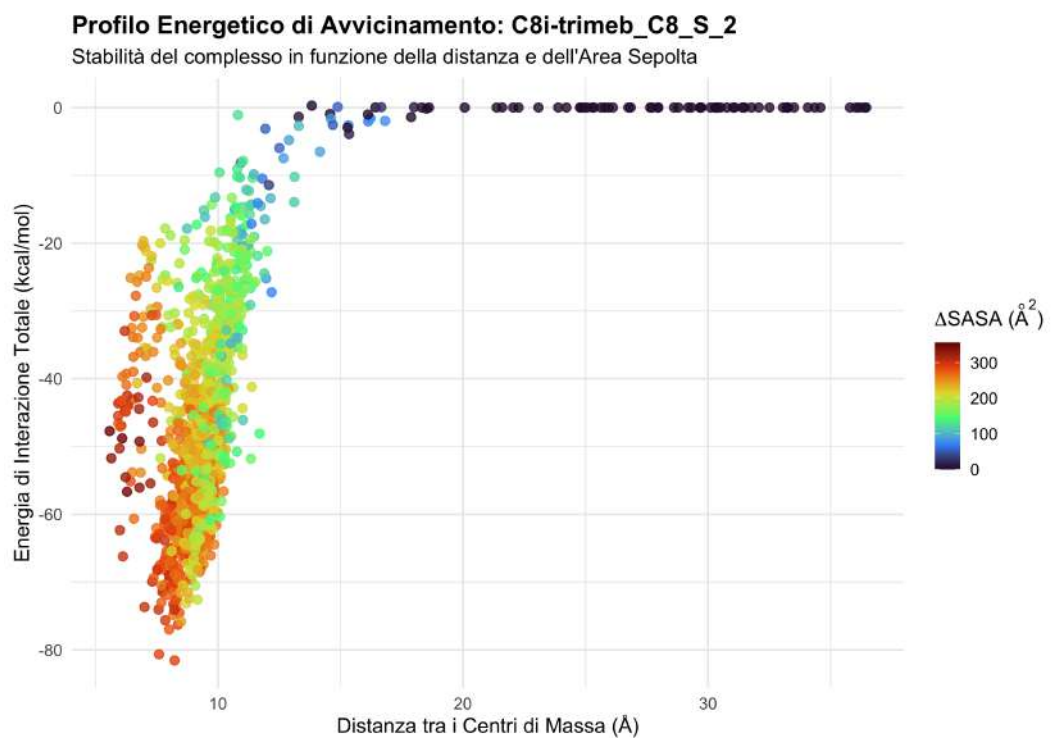


(a) Profilo di avvicinamento

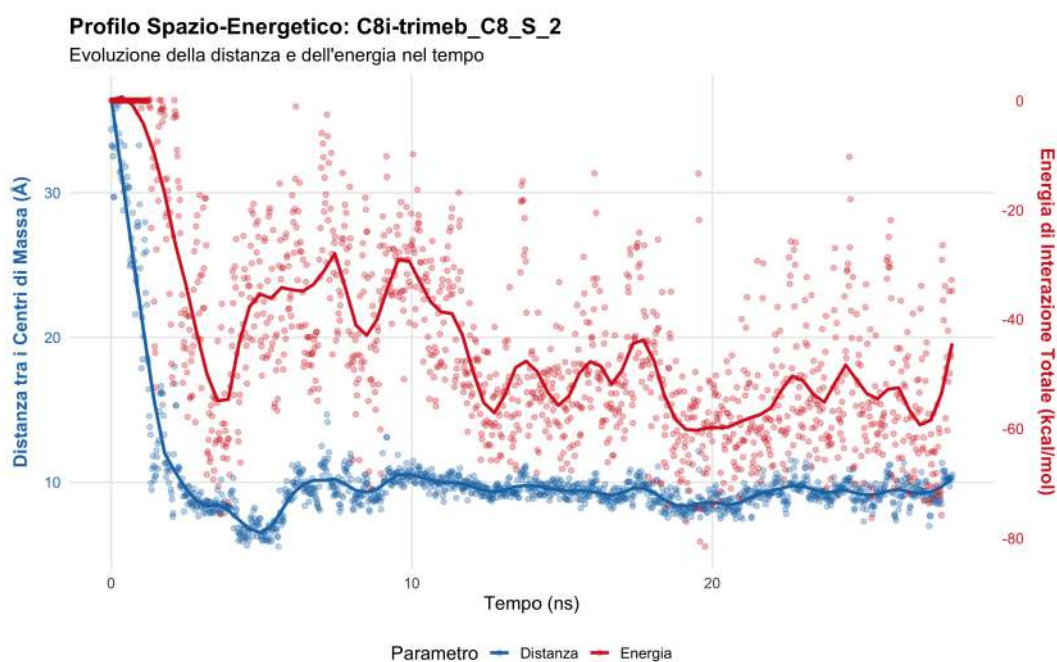


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 80: Analisi per il sistema C8 idratato (Isomero S, Replica 1) - TriMEB. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

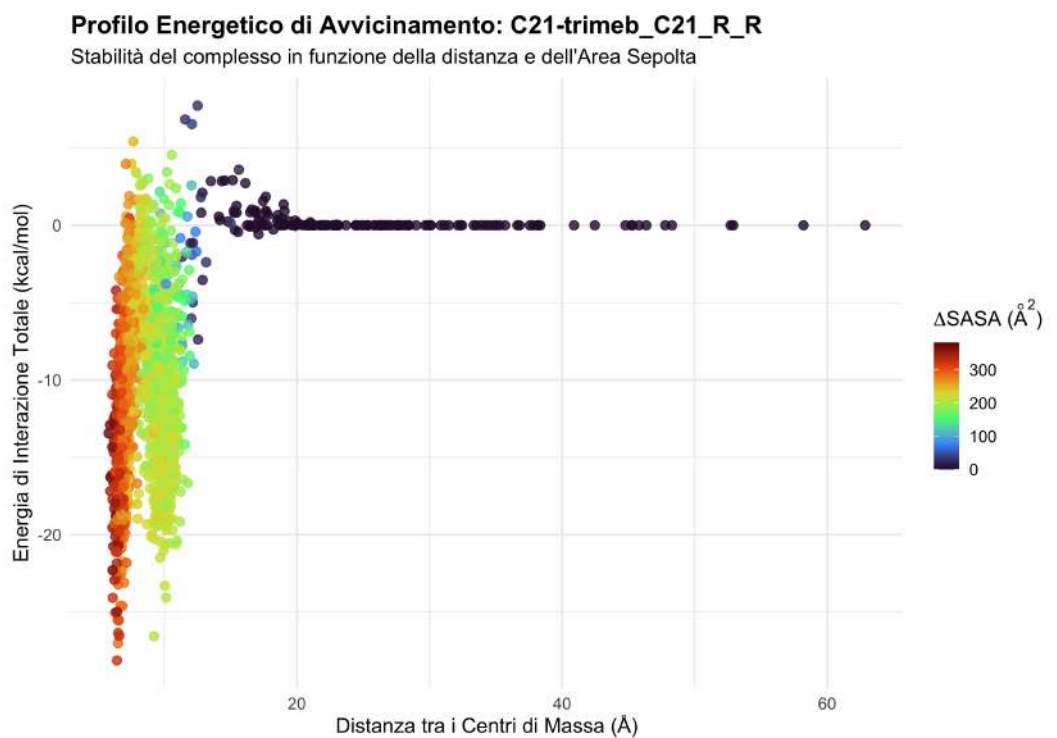


(a) Profilo di avvicinamento

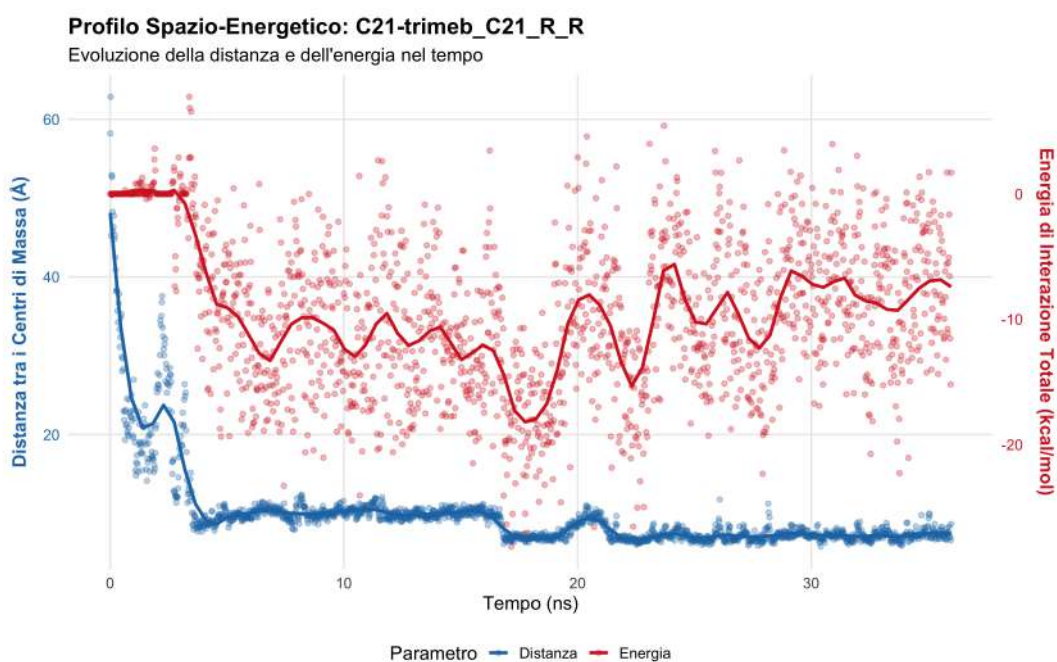


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 81: Analisi per il sistema C8 idratato (Isomero S, Replica 2) - TriMEB. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

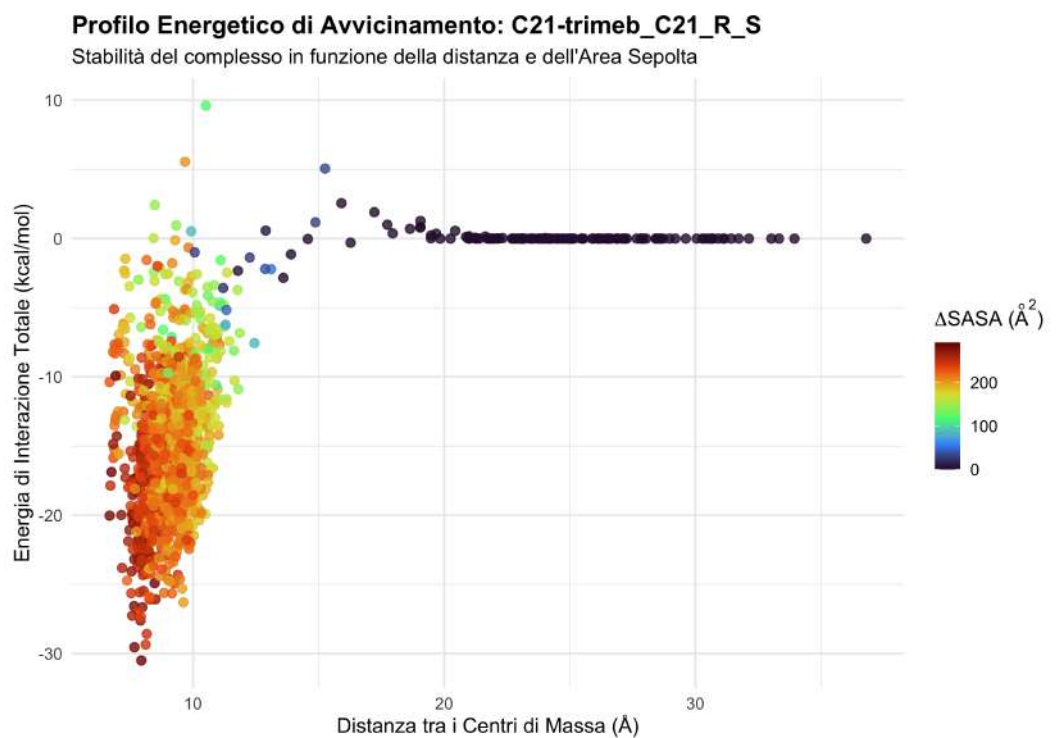


(a) Profilo di avvicinamento

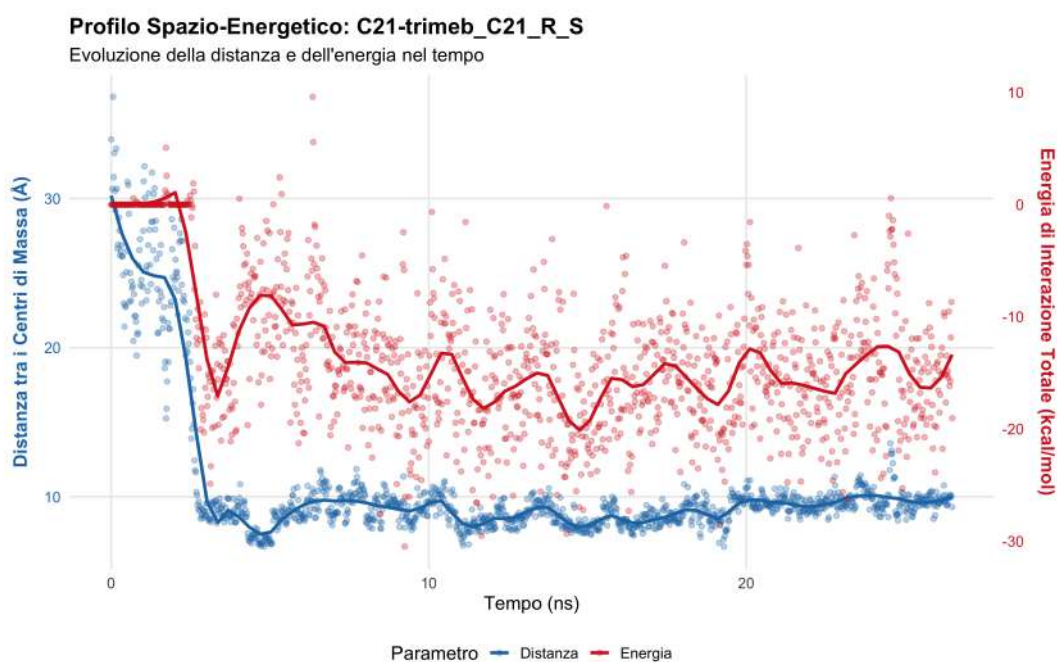


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 82: Analisi per il sistema C21 (R,R) - TriMEB. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).



(a) Profilo di avvicinamento

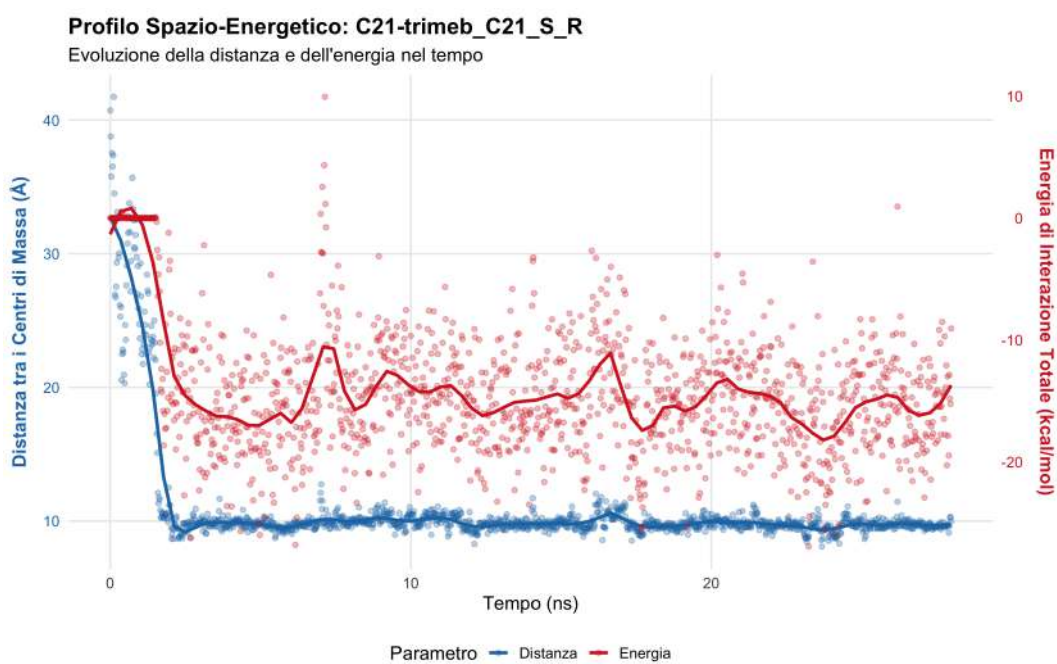


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 83: Analisi per il sistema C21 (R,S) - TriMEB. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

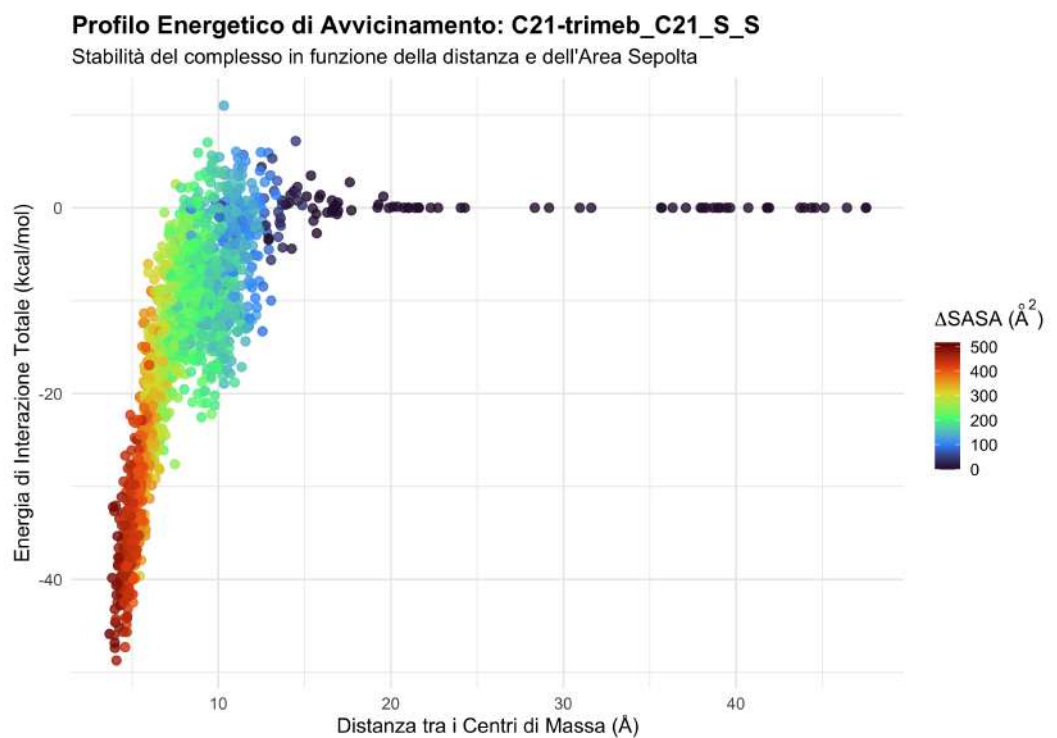


(a) Profilo di avvicinamento

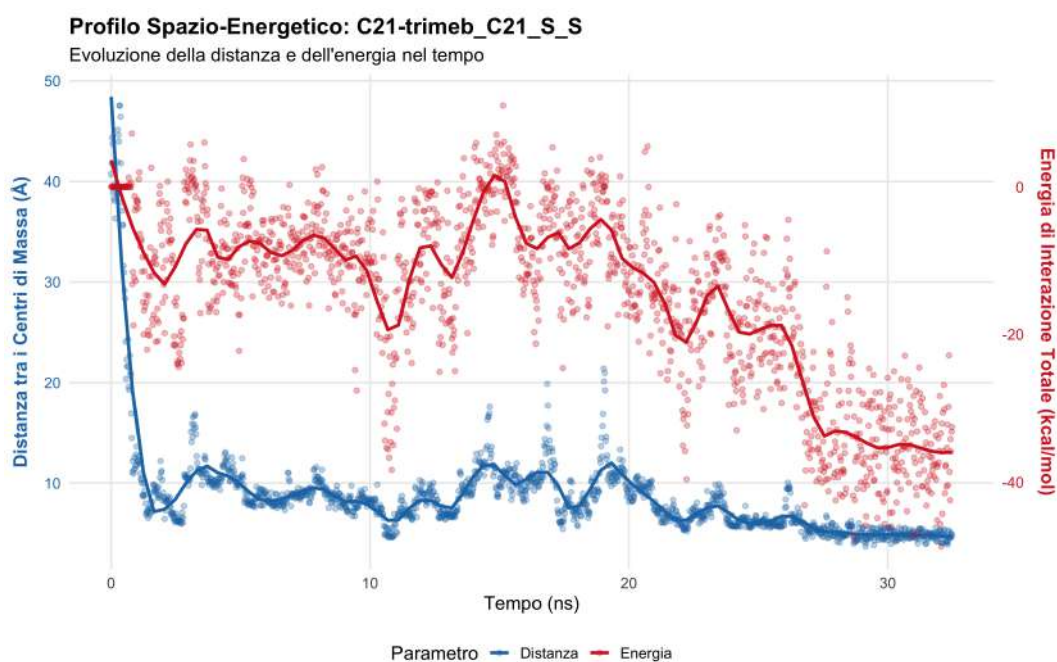


(b) Profilo spazio-energetico

Figura 84: Analisi per il sistema C21 (S,R) - TriMEB. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).



(a) Profilo di avvicinamento



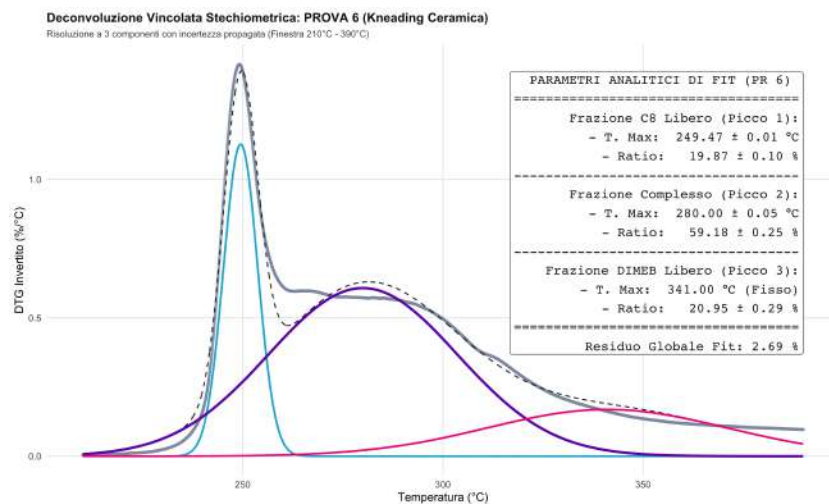
(b) Profilo spazio-energetico

Figura 85: Analisi per il sistema C21 (S,S) - TriMEB. Sopra è riportato il profilo energetico in funzione della distanza con codice colore ΔSASA , sotto il profilo temporale a doppio asse y (distanza dei centri di massa ed energia di interazione).

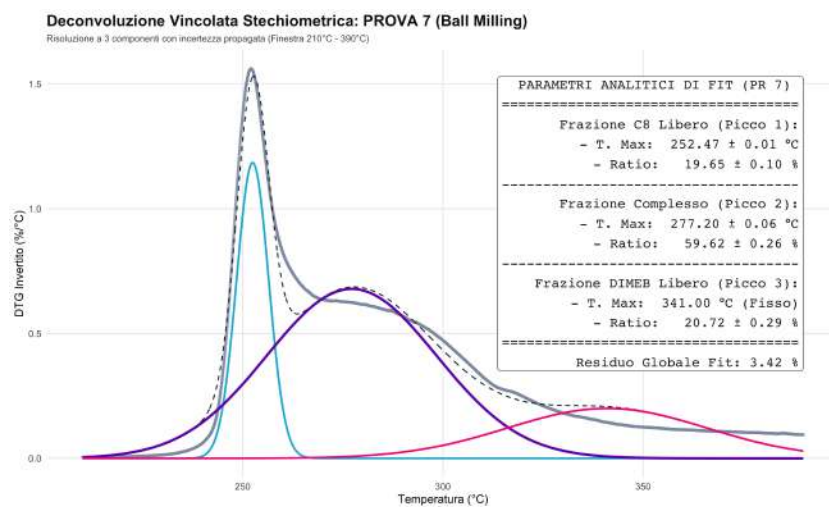
5.3 Grafici deconvoluzione TGA

5.3.1 Sistema C8/DIMEB

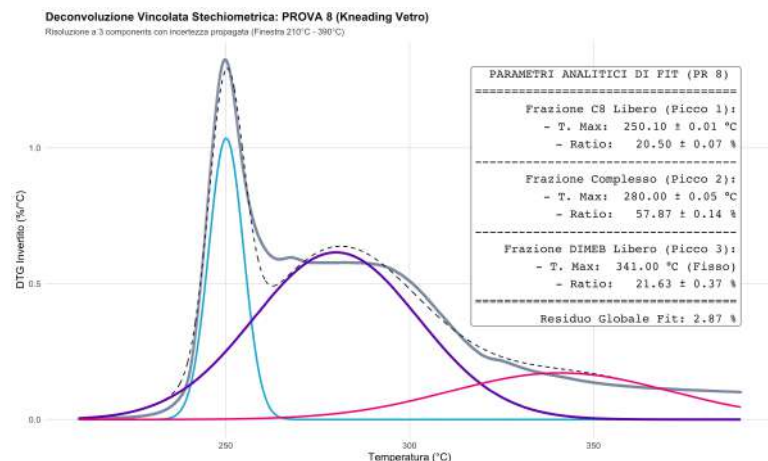
Grafici ottenuti dalle tre tecniche di co-macinazione (Fase 1) del candidato **C8** con DIMEB, dalle quali è stata stimata l'efficienza di complessazione riassunta in Tabella 19.



(a) Pr6 – *Kneading* in ceramica.



(b) Pr7 – (*Ball milling*.)

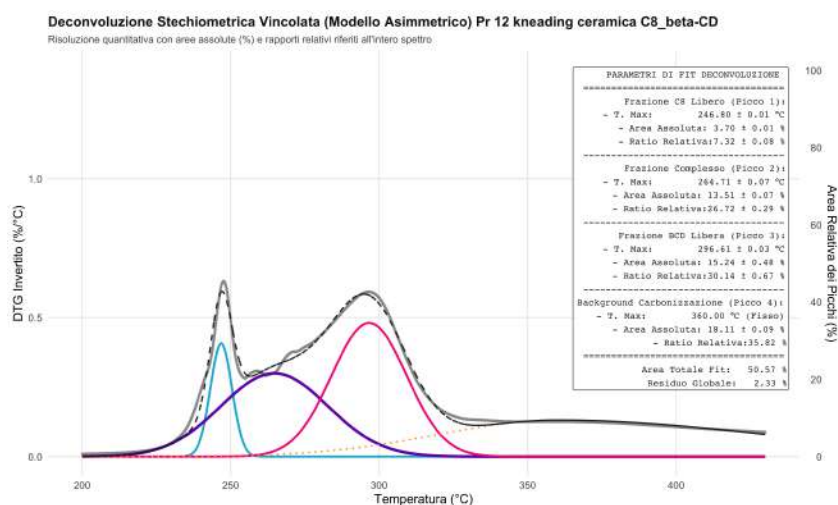


(c) Pr8 – *Kneading* in vetro.

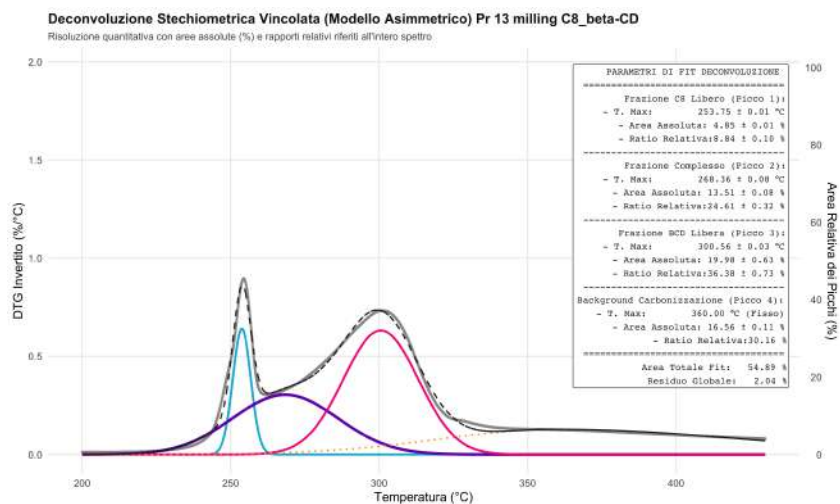
Figura 86: Deconvoluzione dei picchi DTG per i preparati co-macinati del sistema C8/DIMEB.

5.3.2 Sistema C8/ β -CD

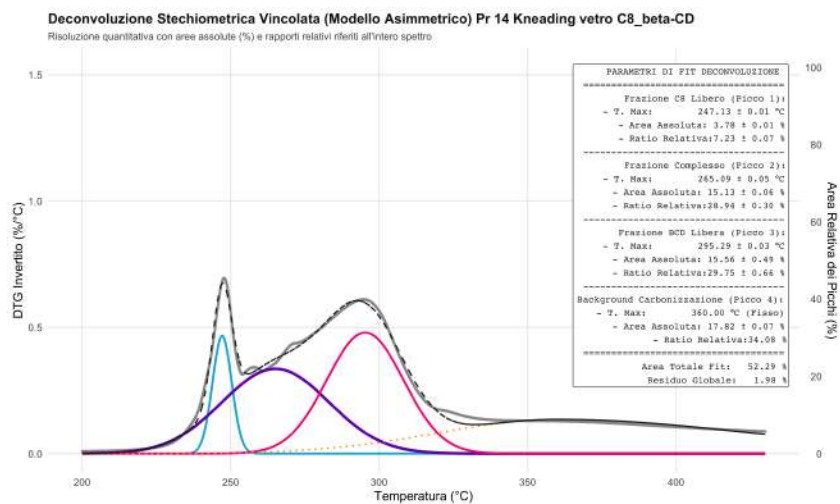
Grafici di deconvoluzione relativi ai preparati del candidato **C8** con β -ciclodestrina nativa, dove si evidenzia il contributo esplicito della componente di carbonizzazione della matrice (Tabella 20).



(a) Pr12 – *Kneading* in ceramica.



(b) Pr13 – *Ball milling*.

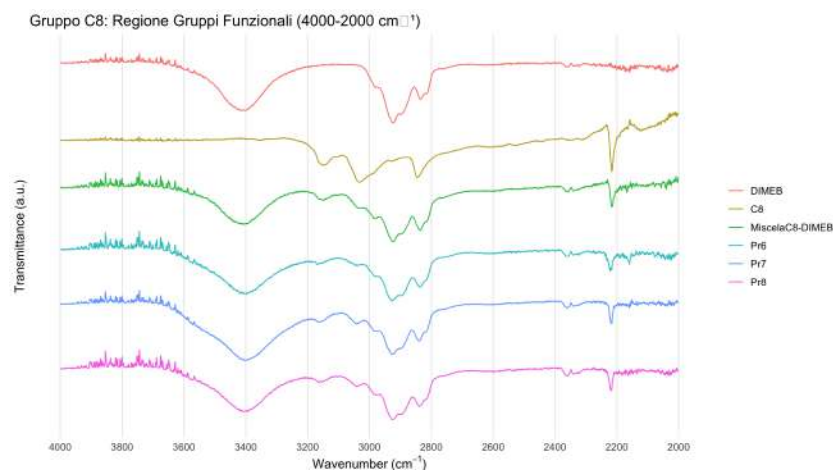


(c) Pr14 – *Kneading* in vetro.

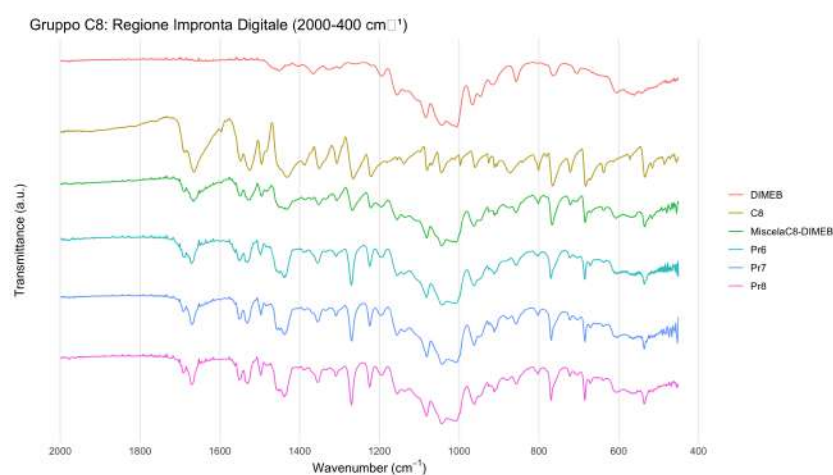
Figura 87: Deconvoluzione asimmetrica dei picchi DTG per i preparati co-macinati del sistema C8/ β -CD.

5.4 Spettri FT-IR: sovrapposizioni complete

Vengono riportate, per ciascuno dei quattro sistemi, le sovrapposizioni degli spettri ATR sull'intero intervallo Mid-IR, suddivise nella regione dei gruppi funzionali ($4000\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$) e nella regione *fingerprint* ($2000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$). In ogni grafico sono confrontati host puro, guest puro, miscela fisica e i tre preparati co-macinati.

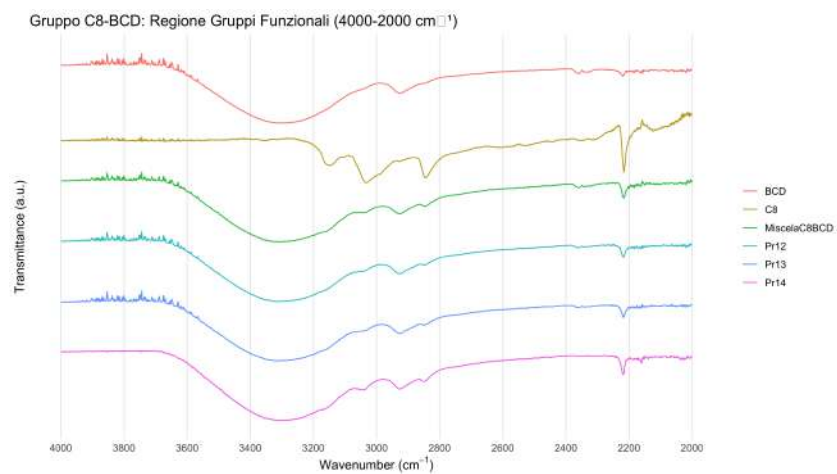


(a) Regione dei gruppi funzionali ($4000\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$)

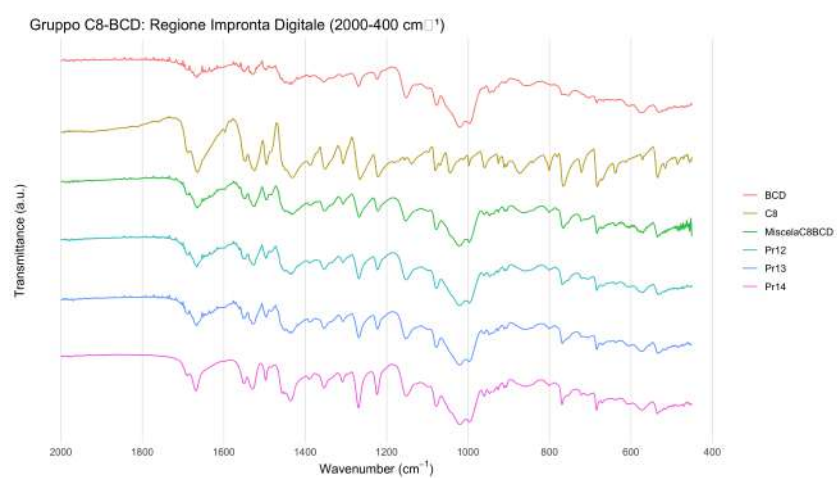


(b) Regione *fingerprint* ($2000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$)

Figura 88: Spettri FT-IR/ATR completi del sistema C8/DIMEB.

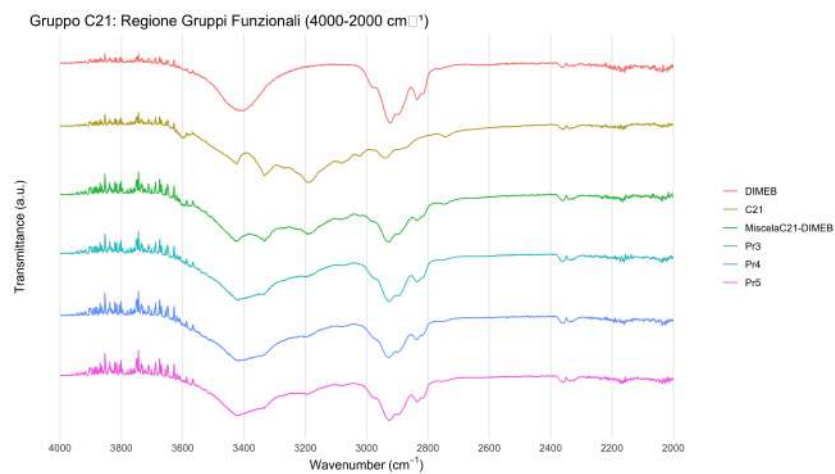


(a) Regione dei gruppi funzionali ($4000\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$)

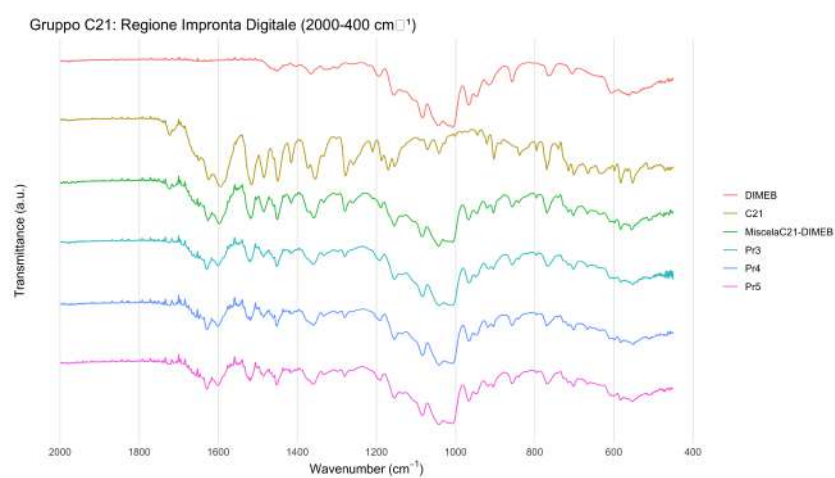


(b) Regione *fingerprint* ($2000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$)

Figura 89: Spettri FT-IR/ATR completi del sistema C8/ β -CD.

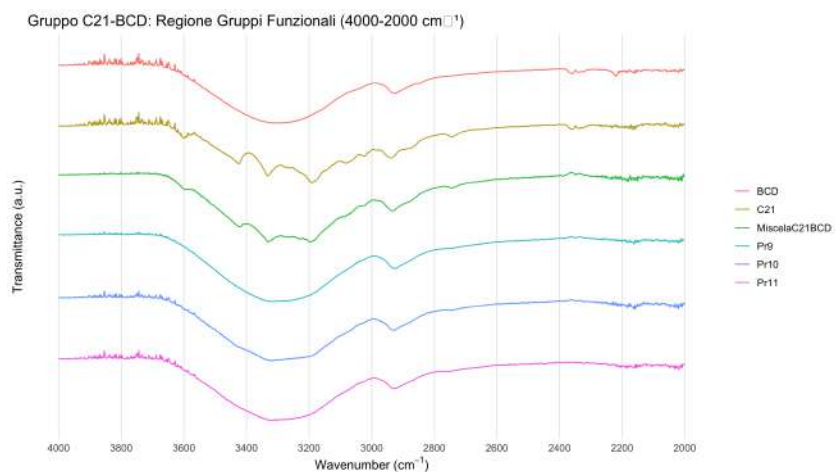


(a) Regione dei gruppi funzionali ($4000\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$)

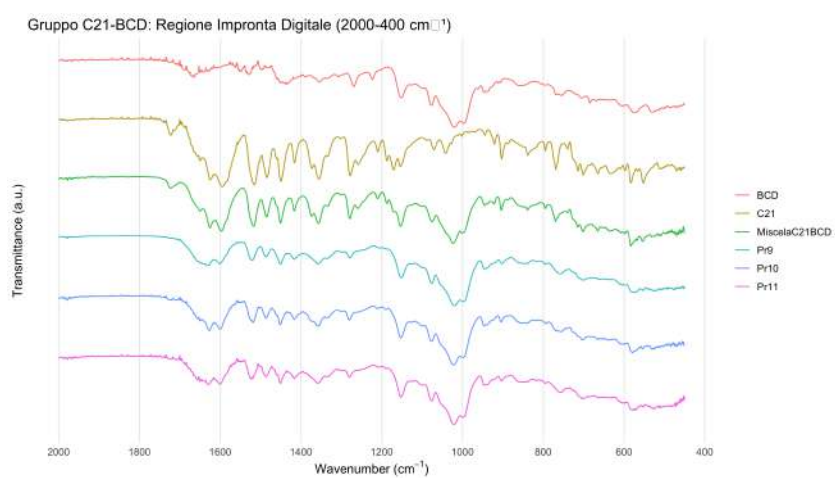


(b) Regione *fingerprint* ($2000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$)

Figura 90: Spettri FT-IR/ATR completi del sistema C21/DIMEB.



(a) Regione dei gruppi funzionali ($4000\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$)



(b) Regione *fingerprint* ($2000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$)

Figura 91: Spettri FT-IR/ATR completi del sistema C21/ β -CD.

Riferimenti bibliografici

- [1] Marta De Donato, Benedetta Righino, Flavia Filippetti, Alessandra Battaglia, Marco Petrillo, Davide Pirolli, Giovanni Scambia, Maria Cristina De Rosa, and Daniela Gallo. Identification and antitumor activity of a novel inhibitor of the nima-related kinase nek6. *Scientific reports*, 8(1):16047, 2018.
- [2] Nagesh Kishan Panchal, Shruti Mohanty, and Sabina Evan Prince. Nima-related kinase-6 (nek6) as an executable target in cancer. *Clinical and Translational Oncology*, 25(1):66–77, 2023.
- [3] Kaiyue Hu, Agnese Pavan, Alessandro Semeraro, Alberto Ongaro, Luigi Brambilla, Maria Cristina De Rosa, Matteo Tommasini, Chiara Castiglioni, and Michele Maggini. Drug loading and release: Development and characterization of a novel therapeutic agent-nanographene conjugate. *The Journal of Physical Chemistry B*, 129(36):9097–9112, 2025.
- [4] Paolo Zardi, Benedetta Righino, Davide Pirolli, Matteo Gramanzini, Alessandro Semeraro, Juan José Galano-Frutos, Anna Königs, Luka orđević, Michele Maggini, Marianna Buttarelli, et al. Design and synthesis of pyridopyrimidines targeting nek6 kinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 768:110391, 2025.
- [5] Marta De Donato, Mara Fanelli, Marisa Mariani, Giuseppina Raspaglio, Deep Pandya, Shiquan He, Paul Fiedler, Marco Petrillo, Giovanni Scambia, and Cristiano Ferlini. Nek6 and hif-1 α cooperate with the cytoskeletal gateway of drug resistance to drive outcome in serous ovarian cancer. *American journal of cancer research*, 5(6):1862, 2015.
- [6] William Humphrey, Andrew Dalke, and Klaus Schulten. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1):33–38, 1996.
- [7] Thorsteinn Loftsson and Marcus E Brewster. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 62(11):1607–1621, 2010.
- [8] Nadia Morin-Crini, Sophie Fourmentin, Éva Fenyvesi, Eric Lichtfouse, Giangiacomo Torri, Marc Fourmentin, and Grégorio Crini. 130 years of cyclodextrin discovery for health, food, agriculture, and the industry: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(3):2581–2617, 2021.
- [9] Adina Magdalena Musuc. Cyclodextrins: Advances in chemistry, toxicology, and multifaceted applications. *Molecules*, 29(22):5319, 2024.
- [10] Gergely Kali, Soheil Haddadzadegan, and Andreas Bernkop-Schnürch. Cyclodextrins and derivatives in drug delivery: New developments, relevant clinical trials, and advanced products. *Carbohydrate Polymers*, 324:121500, 2024.
- [11] Dan Nicolae Păduraru, Adelina-Gabriela Niculescu, Alexandra Bolocan, Octavian Andronic, Alexandru Mihai Grumezescu, and Rodica Bîrlă. An updated overview

- of cyclodextrin-based drug delivery systems for cancer therapy. *Pharmaceutics*, 14(8):1748, 2022.
- [12] Liliana-Roxana Balahura, Andreea Ioana Dinu, Adriana Lungu, Hildegard Herman, Cornel Balta, Anca Hermenean, Andreea Iren Șerban, and Sorina Dinescu. Implantable polymer scaffolds loaded with paclitaxel–cyclodextrin complexes for post-breast cancer tissue reconstruction. *Polymers*, 17(3):402, 2025.
 - [13] Saud Almawash, Ahmed M Mohammed, Mohamed A El Hamd, and Shaaban K Osman. Injectable hydrogels based on cyclodextrin/cholesterol inclusion complexation and loaded with 5-fluorouracil/methotrexate for breast cancer treatment. *Gels*, 9(4):326, 2023.
 - [14] Marcus E Brewster and Thorsteinn Loftsson. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced drug delivery reviews*, 59(7):645–666, 2007.
 - [15] Phennapha Saokham, Chutimon Muankaew, Phatsawee Jansook, and Thorsteinn Loftsson. Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes. *Molecules*, 23(5):1161, 2018.
 - [16] T. Higuchi and K. A. Connors. Phase solubility studies. In *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, chapter 4, pages 117–212. Interscience, New York, 1965.
 - [17] Thorsteinn Loftsson, Hákon Hrafn Sigurdsson, and Phatsawee Jansook. Anomalous properties of cyclodextrins and their complexes in aqueous solutions. *Materials*, 16(6):2223, 2023.
 - [18] Mayara M Doile, Keila A Fortunato, Iára C Schmücker, Sacha K Schucko, Marcos AS Silva, and Patrik O Rodrigues. Physicochemical properties and dissolution studies of dexamethasone acetate- β -cyclodextrin inclusion complexes produced by different methods. *AAPS PharmSciTech*, 9(1):314–321, 2008.
 - [19] Jiaojiao Zhou, Jilai Jia, Jiangling He, Jinjie Li, and Jie Cai. Cyclodextrin inclusion complexes and their application in food safety analysis: recent developments and future prospects. *Foods*, 11(23):3871, 2022.
 - [20] Mario Jug and Paola Angela Mura. Grinding as solvent-free green chemistry approach for cyclodextrin inclusion complex preparation in the solid state. *Pharmaceutics*, 10(4):189, 2018.
 - [21] Jacob D Durrant and J Andrew McCammon. Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC biology*, 9(1):71, 2011.
 - [22] Gianluca Novello, Andrea Dodaro, Chiara Cavastracci Strascia, Silvia Menin, Mattia Sturlese, Veronica Salmaso, and Stefano Moro. Structuring disorder via supervised molecular dynamics: Uncovering arginine-glycine-glycine-mediated ribonucleic acid-intrinsically disordered region recognition mechanisms. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2026.

- [23] Davide Sabbadin, Veronica Salmaso, Mattia Sturlese, and Stefano Moro. Supervised molecular dynamics (sumd) approaches in drug design. In *Rational Drug Design: Methods and Protocols*, pages 287–298. Springer, 2018.
- [24] Davide Sabbadin and Stefano Moro. Supervised molecular dynamics (sumd) as a helpful tool to depict gpcr–ligand recognition pathway in a nanosecond time scale. *Journal of chemical information and modeling*, 54(2):372–376, 2014.
- [25] Nicoleta G Hădărugă, Geza N Bandur, Ioan David, and Daniel I Hădărugă. A review on thermal analyses of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Environmental Chemistry Letters*, 17(1):349–373, 2019.
- [26] Paola Mura. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 113:226–238, 2015.
- [27] Yuxiang Bai, Jinpeng Wang, Mohanad Bashari, Xiuting Hu, Tao Feng, Xueming Xu, Zhengyu Jin, and Yaoqi Tian. A thermogravimetric analysis (tga) method developed for estimating the stoichiometric ratio of solid-state α -cyclodextrin-based inclusion complexes. *Thermochimica acta*, 541:62–69, 2012.
- [28] Piotr Koczoń, Jakub T. Hołaj-Krzak, Bharani K. Palani, Tymoteusz Bolewski, Jarosław Dabrowski, Bartłomiej J. Bartyzel, and Eliza Gruczyńska-Sekowska. The analytical possibilities of FT-IR spectroscopy powered by vibrating molecules. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2):1013, 2023.
- [29] Longwei Jiang, Jingde Yang, Qian Wang, Lili Ren, and Jiang Zhou. Physico-chemical properties of catechin/ β -cyclodextrin inclusion complex obtained via co-precipitation. *CyTA - Journal of Food*, 17(1):544–551, 2019.
- [30] Amine Ez-zoubi, Naima Boutahiri, Mohamed El fadili, Riham Sghyar, Somdutt Mujwar, Wafae Moustaid, Ayoub El-Mrabet, and Abdellah Farah. Beta-cyclodextrin inclusion complexes with phenolic synthetic antioxidants: Synthesis, spectroscopic characterisation, molecular modeling, and activity efficiency. *ChemistrySelect*, 10, 2025.
- [31] I Bratu, A Hernanz, JM Gavira, and GH Bora. Ft-ir spectroscopy of inclusion complexes of beta-cyclodextrin with fenbufen and ibuprofen. *Romanian journal of physics*, 50(9/10):1063, 2005.
- [32] Shu-Jiang Tu, Yan Zhang, Hong Jiang, Bo Jiang, Jun-Yong Zhang, Run-Hong Jia, and Feng Shi. A simple synthesis of furo [3, 4: 5, 6] pyrido [2, 3-d] pyrimidine derivatives through multicomponent reactions in water, 2007.
- [33] Tatyana R Usacheva, Vitaly A Volynkin, Viktor T Panyushkin, Dmitry A Lindt, Thi Lan Pham, Thi Thu Ha Nguyen, Thi My Hanh Le, Diana A Alister, Dz-hovidon N Kabirov, Natalya N Kuranova, et al. Complexation of cyclodextrins with benzoic acid in water-organic solvents: a solvation-thermodynamic approach. *Molecules*, 26(15):4408, 2021.

- [34] Hong-Liang Lin, Shan-Yang Lin, Chih-Cheng Lin, Cheng-Hung Hsu, Tieh-Kang Wu, and Yu-Ting Huang. Mechanical grinding effect on thermodynamics and inclusion efficiency of loratadine–cyclodextrin inclusion complex formation. *Carbohydrate polymers*, 87(1):512–517, 2012.
- [35] OpenEye Scientific Software. Tautomers – applications. <https://docs.eyesopen.com/applications/quacpac/tautomers/tautomers.html>, 2026. Consultato il 12 maggio 2026.
- [36] OpenEye Scientific Software. Fixpka – applications. <https://docs.eyesopen.com/applications/quacpac/fixpka/fixpka.html>, 2026. Consultato il 12 maggio 2026.
- [37] OpenEye Scientific Software. Omega 4.2.0 – applications. <https://docs.eyesopen.com/applications/omega/introduction.html#overview>, 2026. Consultato il 12 maggio 2026.
- [38] OpenEye Scientific Software. Molcharge – applications. <https://docs.eyesopen.com/applications/quacpac/molcharge/molcharge.html>, 2026. Consultato il 12 maggio 2026.
- [39] R.E.D.D.B. (R.E.D. Data Base). Project f-85 – pyred force field parameterization for cyclodextrins. <https://upjv.q4md-forcefieldtools.org/REDDB/projects/F-85/>, 2026. Consultato il 4 giugno 2026.
- [40] Michael L Connolly. Analytical molecular surface calculation. *Applied Crystallography*, 16(5):548–558, 1983.
- [41] Uttamkumar Samanta, Ranjit P Bahadur, and Pinak Chakrabarti. Quantifying the accessible surface area of protein residues in their local environment. *Protein engineering*, 15(8):659–667, 2002.
- [42] James C Phillips, Rosemary Braun, Wei Wang, James Gumbart, Emad Tajkhorshid, Elizabeth Villa, Christophe Chipot, Robert D Skeel, Laxmikant Kale, and Klaus Schulten. Scalable molecular dynamics with namd. *Journal of computational chemistry*, 26(16):1781–1802, 2005.
- [43] Gaurav Swami, MK Koshy, Manisha Pandey, and Shubhini A Saraf. Preparation and characterization of domperidone- β -cyclodextrin complexes prepared by kneading method. *Int J Adv Pharm Sci*, 1(1):68–74, 2010.
- [44] Haresh Patel, Bhanubhai Suhagia, Shailesh Shah, Ishwar Rathod, and Vijay Parmar. Preparation and characterization of etoricoxib- β -cyclodextrin complexes prepared by the kneading method. *Acta pharmaceutica*, 57(3):351, 2007.
- [45] Farouk Semcheddine, Nida El Islem Guissi, XueYin Liu, ZuoMin Wu, and Bo Wang. Effects of the preparation method on the formation of true nimodipine sbe- β -cd/hp- β -cd inclusion complexes and their dissolution rates enhancement. *AAPS PharmSciTech*, 16(3):704–715, 2015.

- [46] P Shankarguru, D Ramya Ddevi, and V Hari Bn. Effect of water content in kneading method of solid dispersion technique for solubility enhancement. *Int J App Pharm*, 9(5):14–21, 2017.
- [47] Varian, Inc. *Varian Cary 50 UV-Vis Spectrophotometer — Guaranteed Specifications*. Varian, Inc., 2006. Specification Sheet, Ref. SI-0270. Ultimo accesso: 17 giugno 2026.
- [48] Posit Team. *RStudio: Integrated Development Environment for R*. Posit Software, PBC, Boston, MA, 2025.
- [49] R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2025.
- [50] TA Instruments. Discovery TGA 5500 — Thermogravimetric Analyzer Specifications and Features. <https://www.tainstruments.com/tga-5500/>, 2026. Ultimo accesso: 17 giugno 2026.
- [51] Olivia Bistri, Karim Mazeau, Rachel Auzély-Velty, and Matthieu Sollogoub. A hydrophilic cyclodextrin duplex forming supramolecular assemblies by physical cross-linking of a biopolymer. *Chemistry—A European Journal*, 13(31):8847–8857, 2007.
- [52] Longwei Jiang, Jingde Yang, Qian Wang, Lili Ren, and Jiang Zhou. Physicochemical properties of catechin/ β -cyclodextrin inclusion complex obtained via co-precipitation. *CyTA-Journal of Food*, 17(1):544–551, 2019.
- [53] Amine Ez-zoubi, Naima Boutahiri, Mohamed El Fadili, Riham Sghyar, Somdutt Mujwar, Wafae Moustaid, Ayoub El-Mrabet, and Abdellah Farah. Beta-cyclodextrin inclusion complexes with phenolic synthetic antioxidants: synthesis, spectroscopic characterisation, molecular modeling, and activity efficiency. *ChemistrySelect*, 10(10):e202405310, 2025.
- [54] Wenwen Zhang, Tai-Ping Zhou, Wenjing Zou, Yuyu Wang, Kexuan Wang, Yichao Yang, Chuan Liu, Zhuochao Tu, Qingqing Liu, and Yongjun Yuan. Formation of β -cyclodextrin inclusion complexes with a series of structurally related parabens: Preparation, physicochemical characterization and antifungal properties. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 11:100924, 2025.