



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

Dottorato in Biologia Cellulare e Scienze e Tecnologie del Farmaco
Indirizzo Tecnologie delle Sostanze Biologicamente Attive.

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF).
Settore Scientifico Disciplinare CHIM 09.

VALUTAZIONE DEL PROFILO DI RILASCIO E DELL'ATTIVITÀ BIOLOGICA DI SOSTANZE ATTIVE VEICOLATE MEDIANTE SISTEMI PARTICELLARI A MATRICE LIPIDICA

IL DOTTORE
ALESSIA OFFERTA

IL COORDINATORE
PREG.MA PROF. PATRIZIA DIANA

REFERENTE DELL'INDIRIZZO
PREG.MO PROF. GAETANO GIAMMONA

IL TUTOR
PREG.MO PROF. FRANCESCO PAOLO BONINA

CICLO XXV.
ANNO CONSEGUIMENTO TITOLO 2015.

Indice

1. Background	pag. 1
2. Carrier Systems: evoluzione delle nanotecnologie	pag. 7
2.1 SLN vs NLC	pag. 9
2.2 Principali materie prime e tecniche per la produzione di nanoparticelle lipidiche	pag. 13
2.3 MAD: Monooleine aqueous dispersion	pag. 20
3. Applicazione dei sistemi nanoparticellari lipidici (SLN, NLC, MAD) nella veicolazione di sostanze di origine naturale	pag. 23
4. Progetto di ricerca	pag. 25
4.1 Valutazione dell'efficacia di veicoli quali MAD ed SLN nella veicolazione di Curcumina	pag. 26
4.1.1 <i>Valutazione delle dispersioni acquose di monooleina come veicolo per l'applicazione topica di curcumina: caratterizzazione, studi in vivo ed ex-vivo</i>	pag. 27
4.1.2 <i>Valutazione dell'ipoacetilazione istonica indotta dalla curcumina caricata in sistemi NLC, somministrati per via intraperitoneale nel topo</i>	pag. 51
4.2 Valutazione dell'inclusione della capsaicina nei sistemi SLN al fine di prevenire la defunzionalizzazione del recettore TRPV1 indotta dalla molecola	pag. 63
4.3 Valutazione della stabilità del Coenzima Q10 in veicoli nanoparticellari a matrice lipidica di ultima generazione (NLC)	pag. 75
4.4 Valutazione dell'attività infiammatoria della palmitoiletanolamide (PEA), veicolata mediante carriers lipidici di ultima generazione	pag. 91
4.5 Valutazione della biocompatibilità di formulazioni NLC su colture cellulari di fibroblasti cutanei umani (HDF)	pag. 104
5. Conclusioni	pag. 114
Bibliografia	pag. 120

1. Background

Negli ultimi anni la ricerca scientifica si è rivolta con crescente interesse all'utilizzo di sostanze naturali dotate di attività biologica.

I motivi legati al crescente interesse nei confronti di tali sostanze, possono essere ricondotti a diversi fattori. Tra questi risultano di straordinaria importanza le percezioni dei consumatori attuali, secondo cui tutto ciò che è “naturale è buono”.

Altri fattori sono legati all'aumento del costo di molti prodotti farmaceutici, alle campagne di marketing insistenti, alla crescente necessità di una dieta sana e alla sua importanza per il benessere della salute e dell'omeostasi dell'organismo.

Punto fondamentale è che i nutraceutici, i vegetali e altri rimedi a base di erbe, tra cui nuovi alimenti funzionali immessi nel mercato, risultano di straordinaria importanza per la loro *accettabilità* come nuove e moderne forme di “sostanze naturali”. A causa della rapida espansione di tali sostanze nel mercato, è necessario focalizzare diversi aspetti, quali:

- lo sviluppo di politiche di regolamentazione
- l'applicabilità e la sicurezza
- l'esecuzione di rapidi controlli per verificarne la composizione, come nel caso dell'aggiunta di estratti vegetali, di adulterazione per migliorarne l'efficacia, della presenza di droghe sintetiche.

D'altro canto aspetti, come quello relativo alla sicurezza, sono garantiti dall'utilizzo millenario di alcune di tali sostanze; infatti le proprietà terapeutiche di molte “sostanze naturali” sono tradizionalmente note agli uomini che, fin dai primordi della civiltà, non avendo a disposizione nessun altro rimedio “terapeutico”, le hanno utilizzate sulla base d'osservazioni, esperienze e coincidenze come “rimedi curativi” e come tali ci sono state tramandate.

Basti pensare a sostanze quali la *curcumina*, un'antica spezia e un rimedio tradizionale ottenuto dal rizoma della pianta *Curcuma longa*, usata come medicina in scritti risalenti a oltre 2000 anni fa. Marco Polo, raccontando i suoi viaggi in Cina, descrive la Curcuma nel 13° secolo: "*Vi è anche un vegetale, che ha tutte le proprietà del vero*

zafferano, così come il colore, ma che non è vero zafferano. (La Curcuma) è tenuta in grande considerazione, ed è un ingrediente in tutti i loro piatti".

Negli ultimi anni la curcumina è stata ampiamente studiata per il suo potenziale effetto terapeutico in molte patologie croniche come le neoplasie, patologie neurodegenerative e infiammatorie [1,2].

Altre sostanze provenienti dal mondo naturale e il cui uso clinico è ampiamente documentato sono:

La liquirizia, estratta dalle radici di *Glycyrrhiza glabra*, era una pianta importante nell'antico Egitto, in Assiria e in Cina. Già nota nell'antica medicina greca, solo nel XV secolo è stata introdotta dai frati domenicani in Europa. Come risulta dal primo erbario cinese, in Asia la liquirizia è utilizzata da circa 5.000 anni ed è una delle piante più importanti. I medici cinesi la prescrivono per curare la tosse, i disturbi del fegato e le intossicazioni alimentari. Uno studio recente condotto da Puglia e collaboratori ha dimostrato l'importanza di due attivi estratti dalle radici della pianta (dipotassium glycyrrhizinate e stearyl glycyrrhetinate), impiegati per uso esterno in campo cosmetico come agenti lenitivi e anti-arrossamento [3] e in campo dermatologico per il miglioramento dei sintomi di dermatite acuta e cronica [4]. Lo studio, condotto su volontari sani, ha dimostrato l'azione antinfiammatoria dei due attivi nell'inibire l'eritema della pelle sottoposta ad irraggiamento UVB [5,6].

La capsaicina è presente in numerose diverse specie di peperoncino rosso, piante del genere *Capsicum*, il cui gusto "piccante" deriva proprio dalla concentrazione di tale sostanza.

Dal punto di vista farmacologico la capsaicina è una sostanza molto interessante perché esercita diversi effetti sul nostro organismo; infatti, somministrata per via topica può essere utilizzata per alleviare il dolore alla cute (ad esempio dopo un trauma, una contusione o una scottatura). Molto importante l'azione antidolorifica della capsaicina che viene esplicitata nell'osteoartrite [7]. Ci sono in natura altre sostanze che avendo un elevato potenziale antiossidante, come vitamine (vitamina C, vitamina E), flavonoidi, acidi fenolici e coenzima Q10, giocano un ruolo principale nella lotta contro le specie di radicali liberi che sono la principale causa di numerose alterazioni cutanee. Molti studi hanno dimostrato che il tè verde e nero (polifenoli) migliorano le reazioni avverse

cutanee dovute ad esposizione ai raggi UV. Per esempio è ampiamente documentato che estratti come quelli ottenuti da *Aloe barbadensis* sono usati per stimolare la pelle e permettere la crescita di nuove cellule. L'Olio di sesamo, gli oli di cocco, arachidi, ulivo e di cotone, invece, hanno una spiccata azione protettiva per la pelle contro i raggi UV[8]. Sebbene le sostanze di origine naturale presentano numerosi vantaggi, tuttavia l'uso di molte di queste è limitato a causa della loro scarsa stabilità chimica (nel caso di applicazione cosmetica), oppure della scarsa biodisponibilità, bassa quota di assorbimento e di un rapido metabolismo ed eliminazione (nel caso di applicazione in campo farmacologico).

Molte di queste sostanze di origine naturale vengono raggruppate nella famiglia delle "poorly water-soluble drugs"(PWSDs), questa peculiarità ne limita gli approcci formulativi, l'applicazione clinica e l'immissione nel mercato.

Caratteristica di tali sostanze è la scarsa biodisponibilità legata alla elevata lipofilia ed ad un non ottimale assorbimento.

La biodisponibilità di una molecola dipende fortemente dalla sua natura e dalle sue proprietà chimico-fisiche; infatti è dettata principalmente dalla solubilità in acqua della molecola e dalla sua permeabilità attraverso le membrane cellulari [9].

Questi concetti vengono riassunti dal sistema di classificazione Biopharmaceutics (BCS). Secondo questo sistema (tabella 1) si può affermare che, eccetto per le molecole appartenenti alla classe I, tutti gli attivi farmaceutici raggruppabili nelle classi II, III, IV, possono essere testati con saggi sulla biodisponibilità perché presentano o una bassa quota di dissoluzione o una ridotta permeabilità o entrambe [10].

Tabella 1. Sistema di classificazione BCS

S.No.	Class	Permeability	Solubility
1.	I	High	High
2.	II	High	Low
3.	III	Low	High
4.	IV	Low	Low

Secondo il sistema di classificazione BCS:

- Una sostanza è considerata altamente solubile quando la dose più elevata di essa risulta solubile in una soluzione acquosa (< 250 ml di acqua) in un range di pH compreso tra 1 e 7.5.
- Una sostanza è considerata altamente permeabile quando presenta una quota di adsorbimento nell'uomo > del 90% di dose somministrata, paragonata ad una dose di riferimento intravenosa.
- Una sostanza è considerata a rapida dissoluzione quando la quantità di sostanza disciolta risulta > 85% in una soluzione buffer (volume < 900 ml) all'interno dell'apparecchio adibito alla dissoluzione (USP tipo I o II) nell'arco temporale di 30 minuti.

Riassumendo, in base al sistema di classificazione Biopharmaceutics (BCS) un composto attivo è scarsamente solubile se la dose più elevata non è solubile in 250 ml di mezzo acquoso in un determinato range di pH e alla temperatura di 37°C [11]. Questi composti per lo più appartengono alla Classe II (IIa e IIb), e possiedono le caratteristiche di scarsa solubilità ed elevata permeabilità secondo il valore di pH del fluido gastrointestinale e tendono a presentare solubilità o quota di dissoluzione limitata [12]. Nonostante l'elevata permeabilità, questi attivi spesso presentano bassa biodisponibilità orale a causa del lento e limitato rilascio dell'attivo nel fluido gastrointestinale [13].

Pertanto, una delle maggiori sfide dell'industria farmaceutica consiste nella formulazione di strategie che possano migliorare la dissoluzione e l'apparente solubilità di tali sostanze scarsamente solubili in acqua. Tra queste sono degne di nota: salt formation [14], pro-drug [15], riduzione della particle size [16], complessazione [17], micelle [18], microemulsioni [19], nanoemulsioni [20], nanosospensioni [21], e non da ultimo l'impiego delle solid lipid nanoparticles (SLN) [22] (figura 1).



Figura 1. Approcci per incrementare la solubilità e la quota di dissoluzione dei poorly water soluble drugs

Come mostrato in figura 1, la quasi totalità delle metodiche impiegate per incrementare la solubilità e la dissoluzione delle PWSDs, consiste nelle cosiddette modifiche fisiche tra le quali si definiscono “dispersioni solide”, le dispersioni di uno o più attivi farmaceutici in un carrier inerte o in una matrice allo stato solido ottenuta tramite diverse metodiche di preparazione (impiego di solventi, processo di fusione o accoppiamento di entrambi) [23]. L'ingrediente attivo nelle dispersioni solide può essere disperso come molecola separata, particella amorfa o cristallina.

Sono stati pubblicati numerosi studi che hanno dimostrato notevoli vantaggi nell'utilizzo di dispersioni solide nel miglioramento della solubilità e della quota di dissoluzione delle molecole scarsamente solubili in acqua (PWSDs). Questi vantaggi includono la riduzione della dimensione particellare, il miglioramento della “wettability” e della porosità, cambiamenti nello stato cristallino della molecola preferibilmente all'interno dello stato amorfo [13].

Nonostante i numerosi vantaggi sopraelencati, il numero di prodotti commercializzabili derivanti da approcci di dispersione solida è deludente. Solo poche molecole formulate nelle dispersioni solide sono state immesse nel mercato nel corso dell'ultimo mezzo secolo (tabella 2).

Table 2 Prodotti immessi nel mercato, formulati tramite la tecnica della dispersione solida

Product	Model drug	Carrier type	Dosage form
Certican®	Everolimus	HPMC	Tablet
Cesamet®	Nabilone	PVP	Tablet
Crestor®	Rosuvastatin	HPMC	Tablet
Afeditab® CR	Nifedipin	Ploxamer/PVP	Tablet
Fenoglide®	Fenofibrate	PEG	Tablet
Gris-PEG®	Griseofulvin	PEG	Tablet
Zelboraf®	Vemurafenib	HPMCAS	Tablet
Incivek®	Telaprevir	HPMCAS-M	Tablet
Prograf®	Tacrolimus	HPMC	Capsule
Sporanox®	Itraconazole	HPMC	Capsule

L'esiguo numero di prodotti immessi nel mercato a base di dispersioni solide, è dovuto principalmente ai problemi di scale-up e di instabilità fisico-chimica che si evincono durante il processo di fabbricazione o durante la fase di stoccaggio, quest'ultima responsabile dei processi che coinvolgono la separazione di fase e la cristallizzazione delle molecole incluse nelle dispersioni solide [24-27].

2. Carrier Systems: evoluzione delle nanotecnologie

Un altro approccio interessante per incrementare la solubilità e la quota di dissoluzione delle molecole PWSDs è rappresentato dall'utilizzo dei sistemi carrier (figura 1).

Negli ultimi anni vi è stato un crescente interesse per le nanotecnologie, le quali hanno fornito un contributo assai rilevante in molti settori tecnici, compresi i prodotti cosmetici e quelli farmaceutici.

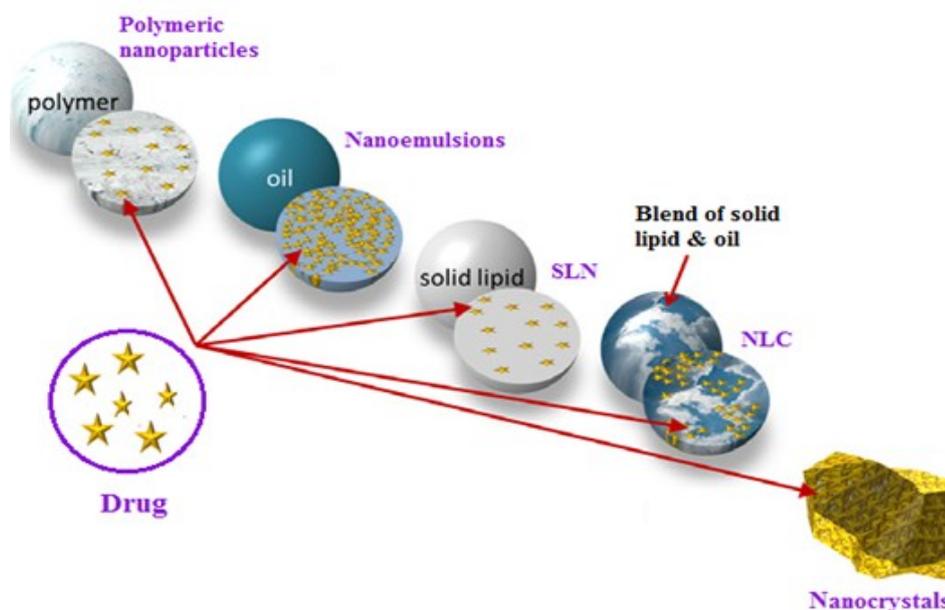


Figura 2. Evoluzione delle nanotecnologie

La storia dell'applicazione delle nanoparticelle nella ricerca farmaceutica nasce con le nanoparticelle polimeriche, carriers dalle dimensioni submicron costituiti da polimeri biodegradabili e non-biodegradabili [28]. Questi veicoli hanno mostrato importanti caratteristiche come il targeting sito-specifico e il rilascio controllato del principio attivo incorporato, tuttavia hanno mostrato problemi non irrilevanti, come la citotossicità dei polimeri utilizzati come materie prime, ed uno scale-up industriale complesso [29]. Questo è sufficiente a spiegare perché questi veicoli non fossero adatti al mercato farmaceutico.

Gli anni '90 sono stati fondamentali nel campo delle nanotecnologie applicate in campo farmaceutico. La ricerca ha prodotto nanoparticelle alternative costituite da lipidi solidi, conosciute come solid lipid nanoparticles (SLN) [30,31].

Le nanoparticelle lipidiche fondono i vantaggi mostrati da altri ben noti nanocarriers (come i liposomi, le nanoemulsioni o le sopra menzionate nanoparticelle polimeriche) minimizzando i problemi legati a questi veicoli. Da un certo punto di vista sono un'evoluzione naturale e logica di questi, difatti la prima generazione di nanoparticelle lipidiche deriva dalla sostituzione della fase oleosa (liquida) delle nanoemulsioni con un lipide solido.

I principali vantaggi associati alle SLN, paragonati ad altri sistemi colloidali, sono l'elevata biocompatibilità, la stabilità fisica, la protezione dei principi attivi instabili, la possibilità di ottenere un rilascio controllato del principio attivo, la facile produzione su larga scala e le materie prime economiche.

Nonostante ciò il sistema SLN mostra alcune limitazioni, come la scarsa capacità di carico, l'instabilità dovuta a fenomeni di espulsione del principio attivo nella dispersione acquosa e la scarsa percentuale di materiale lipidico (dal 1 al 30%) rispetto alla fase acquosa [32,33].

Alla fine del secolo, per superare queste limitazioni, è stata sviluppata una seconda generazione di nanoparticelle lipidiche, le cosiddette NLC o "Nanostructured lipid carriers". L'innovazione di questi carriers consiste nell'aggiunta di un lipide liquido alla fase costituita dal lipide solido per ostacolare la formazione di cristalli lipidici perfetti, minimizzando, così, il fenomeno dell'espulsione di principio attivo (figura 3) [34].

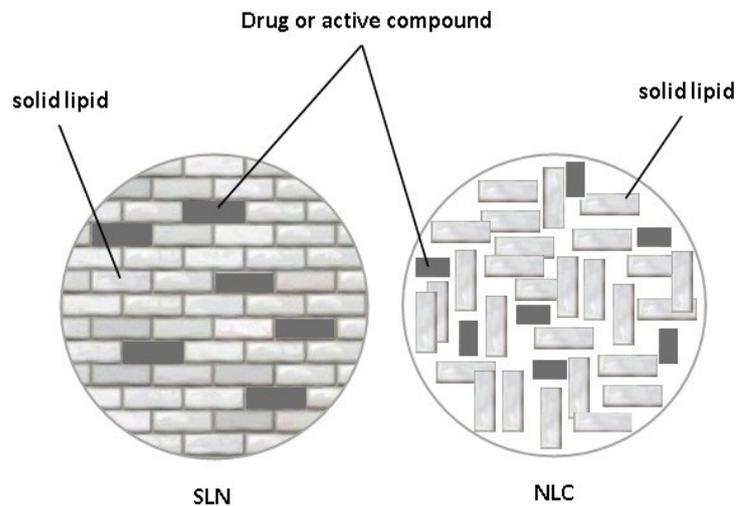
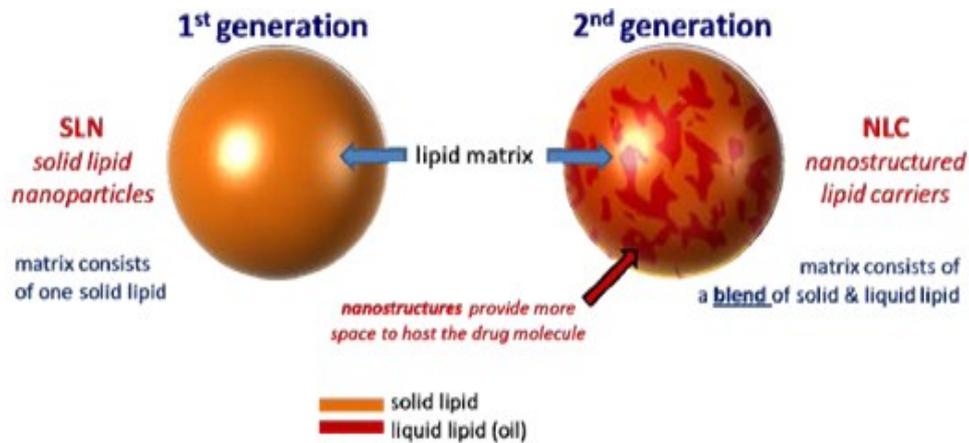


Figura 3. Rappresentazione della struttura di SLN ed NLC.

2.1 SLN vs NLC

Agli inizi degli anni Novanta soltanto tre gruppi di ricerca Muller (Berlino, Germania), Gasco (Torino, Italia) e Westesen (Braunschweig, Germania) lavoravano su nanoparticelle lipidiche. Attualmente i gruppi di ricerca sono notevolmente aumentati. L'interesse suscitato dai veicoli a matrice lipidica è dovuto all'ampia applicabilità in ambito orale, parenterale, oculare, polmonare e dermico [35]. Quest'ultimo è stato il settore più studiato per l'utilizzo delle NLC.

Le NLC rappresentano la "seconda primavera" della tecnologia nanoparticellare in quanto evoluzione delle SLN. Nel 2005 si diffuse l'innovativa idea che il core del veicolo dovesse essere solido per preservare la stabilità dell'attivo e permetterne un rilascio graduale. Nasce la prima generazione di NANO-CRISTALLI: la tecnologia SLN, "Solid-Lipid-Nanocrystals", nano-cristalli con lipidi solidi. La struttura all'interno del veicolante è perfetta. E' assimilabile a mattoni composti di oli solidi, disposti in modo da lasciare poco spazio alle sostanze funzionali.

La seconda generazione di nano-cristalli segna nel 2005 l'inizio di una nuova era: con una tecnologia di produzione innovativa, vengono immessi in mercato i sistemi NLC, "Nanostructured-Lipid-Carriers", veicolanti lipidici nano-strutturati. La particolarità delle strutture NLC risiede nel fatto che l'interno delle vescicole è composto di cristalli imperfetti di lipidi solidi che consentono un maggior caricamento dell'attivo rispetto ai carrier di prima generazione (SLN) e che minimizzano i fenomeni di espulsione della matrice lipidica durante lo stoccaggio.

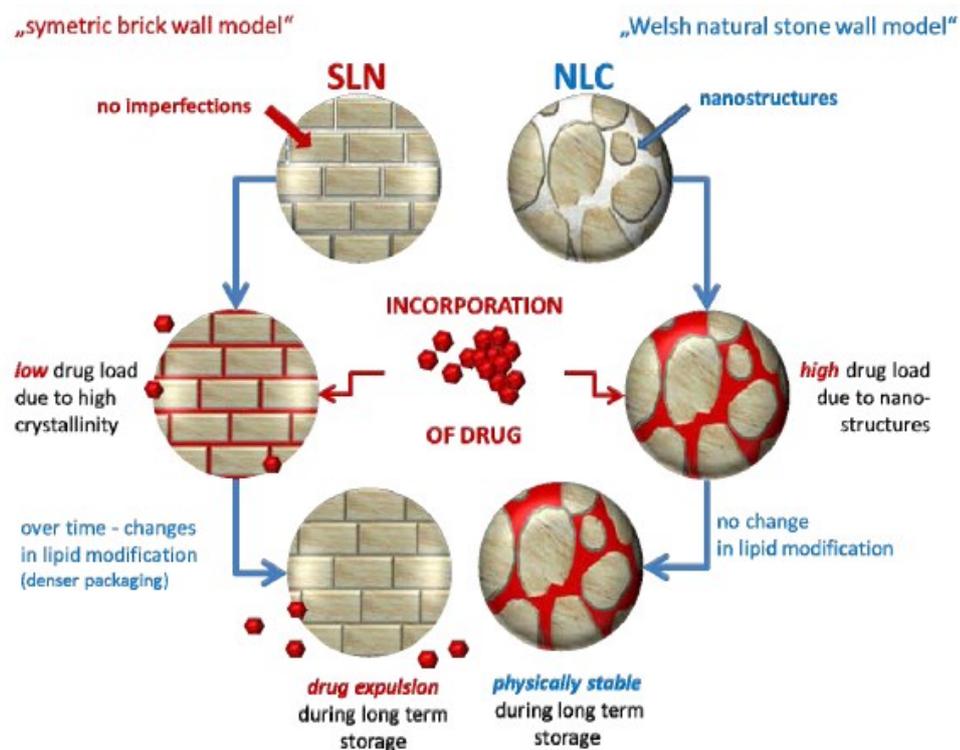


Figura 4. Struttura SLN e NLC

La tecnologia NLC ha ricevuto un riconoscimento internazionale premiato al gruppo di ricerca del professore Müller dell'Università di Berlino, in stretta collaborazione con il laboratorio farmaceutico/cosmetico Dr.Rimpler GmbH di Hannover.

Esistono tre diverse strutture di NLC [35]:

- 1) tipo imperfetto
- 2) tipo amorfo
- 3) tipo multiplo

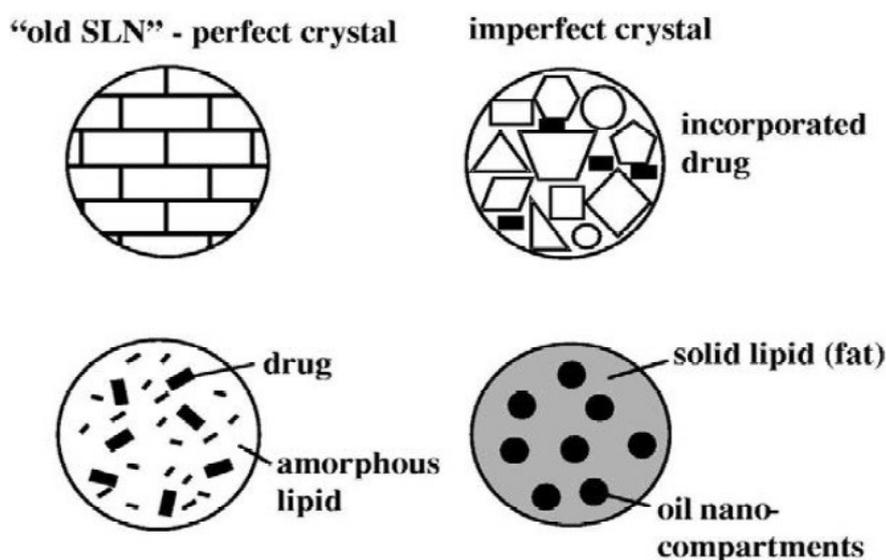


Figura 5. I tre tipi di NLC paragonati alla matrice ordinata della SLN (in alto a sinistra); tipi di NLC: tipo imperfetto (in alto a destra), tipo amorfo (in basso a sinistra), tipo multiplo (in basso a destra).

Il tipo "imperfetto" è caratterizzato da miscele di lipidi spazialmente differenti. Nel tipo "amorfo" la matrice lipidica solida non è cristallina: si trova in uno stato amorfo. Questo effetto può essere raggiunto miscelando particolari tipi di lipidi.

Il tipo "multiplo" è paragonabile ad un'emulsione W/O/W essendo presente un olio in un lipide solido che a sua volta si trova in una dispersione acquosa. La matrice lipidica contiene minuscoli nanocompartimenti oleosi: ciò consente di solubilizzare quegli attivi per i quali la solubilità in olio risulta essere superiore rispetto alla solubilità nel lipide solido.

E' stato dimostrato che le strutture NLC costituiscono dei sistemi altamente efficaci per veicolare sostanze funzionali nei prodotti cosmetici e principi attivi nei farmaci.

Le capacità stabilizzanti sono attribuibili sia alla matrice lipidica, che rimane solida a temperatura ambiente e corporea, che in generale all'intera formulazione, nonché al metodo di produzione che influenza le dimensioni particellari, l'indice di polidispersione e il potenziale zeta, tutti parametri che si correlano alla stabilità del veicolo.

Il processo produttivo e i tempi di preparazione sono cruciali per il raggiungimento delle dimensioni desiderate e per evitare la formazione di agglomerati non disperdibili (caking). In generale le NLC sono sistemi con scarsa o nulla tendenza all' aggregazione.

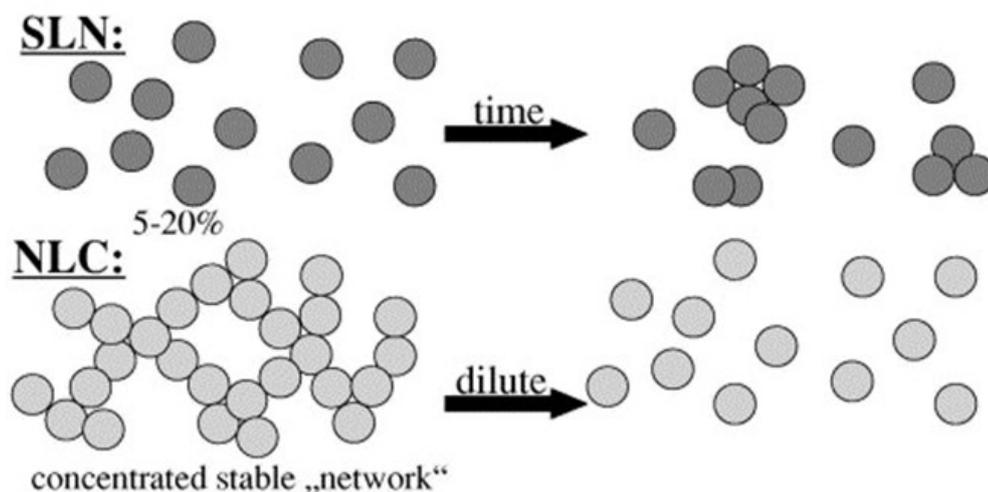


Figura 6. Comportamento dei sistemi SLN e NLC dopo un certo tempo di conservazione.

La figura 6 mostra che i sistemi SLN tendono ad aggregare, mentre le NLC rimangono ben disperse.

La struttura cristallina in genere tende ad essere mantenuta indipendentemente dalla temperatura di conservazione e dal tempo. Soltanto il tipo di lipide ha un peso sulla stabilità delle nanoparticelle a lungo termine.

2.2 Principali materie prime e tecniche per la produzione di nanoparticelle lipidiche

Le SLN sono costituite da uno 0.1% (w/w) ad un 30% (w/w) di lipide solido disperso in un mezzo acquoso e stabilizzato da uno 0.5% (w/w) ad un 5% (w/w) di tensioattivo. Nella seconda generazione le particelle sono prodotte usando miscele di lipidi solidi e liquidi in rapporto da 70:30 a 99.9:0.1 [36].

I lipidi di comune utilizzo nella preparazione delle nanoparticelle comprendono trigliceridi (es. tristearina), gliceridi parziali (es. Imwitor), acidi grassi (es. acido stearico), steroli (es. colesterolo) e cere (es. cetil palmitato).

Un chiaro vantaggio delle SLN e delle NLC sta nel fatto che la matrice lipidica è costituita da lipidi fisiologici che riducono il pericolo di tossicità acuta e cronica (come vedremo in seguito).

I tensioattivi sono scelti in base alla via di somministrazione e sono il più delle volte usati in associazione per prevenire la formazione di agglomerati di particelle. La somministrazione parenterale limita il numero di tensioattivi da utilizzare, mentre l'applicazione topica offre una più ampia scelta.

Una panoramica delle materie prime più utilizzate per la preparazione di questi sistemi nanoparticellari è riportata in tabella 3 [37].

LIPIDS		EMULSIFIER/COEMULSIFIER
Triglycerides	Hard fat type	
-Tricaprin	-Witepsol® W 35	-Soybean lecithin (Lipoid® S75, Lipoid S 100)
-Trilaurin	- Witepsol® H 35	
-Trimyristin	- Witepsol® H42	-Egg lecithin (Lipoid® E 80)
-Tripalmitin	- Witepsol® E 85	-Phosphatidylcholine (Epikuron®170,
-Tristearin	-Glyceril	Epikuron® 200)
-Hydrogenated coco-glycerides (Softisan® 142)	monostearate (Imwitor® 900)	-Poloxamer 188
	-Glyceril behanate (Compritol®888ATO)	- Poloxamer 182
	-Glyceril palmitostearate (Precirol® ATO 5)	- Poloxamer 407
	-Cetyl palmitate	- Poloxamer 908
	-Stearic acid	-Tyloxapol
	-Palmitic acid	-Polysorbate 20
	-Decanoic acid	- Polysorbate 60
	-Behenic acid	- Polysorbate 80
	-Acidan N12	-Sodium cholate
		-Sodium glycocholate
		-Taurocholic acid sodium salt
		-Taurodeoxycholic sodium salt
		-Butanol
		-Butyric acid
		- Dioctyl sodium sulfosuccinate
		-Monooctylphosphoric acid sodium

Tabella 3. Principali materie prime utilizzate nella preparazione di nanoparticelle solide lipidiche

La produzione di nanoparticelle lipidiche può essere realizzata con diverse tecniche. Generalmente tutte le tecniche richiedono uno step comune, la formazione di una nanoemulsione olio-in-acqua seguita dalla solidificazione della fase lipidica dispersa. La preparazione della nanoemulsione diventa lo step critico quando lo scopo è preparare

nanoparticelle lipidiche con dimensioni particellari molto piccole ed un ristretto indice di polidispersione.

Per impedire la polidispersione e la formazione di particelle di dimensioni maggiori di quelle desiderate, i ricercatori spesso sottopongono l'emulsione di partenza a grandi forze meccaniche come nell'*omogeneizzazione ad elevata prestazione*, nell'*omogeneizzazione ad alta pressione* e nell'*ultrasonificazione* [38].

Altri validi metodi di preparazione sono basati su un approccio chimico. I più usati sono la tecnica della *microemulsione* e i metodi dell'*emulsionamento con evaporazione del solvente* o con *diffusione del solvente* [31].

➤ *Omogeneizzazione ad alta pressione*

L'omogeneizzazione ad alta pressione (HPH) si è rivelata un'affidabile ed efficace tecnica per la preparazione di nanoparticelle lipidiche. La HPH è stata usata per anni nella produzione di nanoemulsioni per uso parenterale. A differenza di altre tecniche, lo scale up non rappresenta un problema nella maggior parte dei casi. Gli omogeneizzatori ad alta pressione spingono un liquido con una pressione elevata (100-2000 bar) attraverso uno spazio ristretto (in un range di pochi micron). Il liquido viene accelerato a velocità molto elevate in una distanza molto breve (oltre 1000 km/h). Le forze di taglio molto elevate e le forze di cavitazione riducono le particelle a dimensioni inferiori dei submicron. Il contenuto lipidico varia tra il 5 e il 10% e non rappresenta un problema per l'omogeneizzatore [39]. Nella fase di omogeneizzazione possono essere utilizzati due tipi di approcci, *l'omogeneizzazione con riscaldamento* e *l'omogeneizzazione a freddo* [30,40-41].

In entrambi i casi si ha l'incorporazione del principio attivo nel volume lipidico, sciogliendo o disperdendo il principio attivo nel lipide fuso (Figura7).

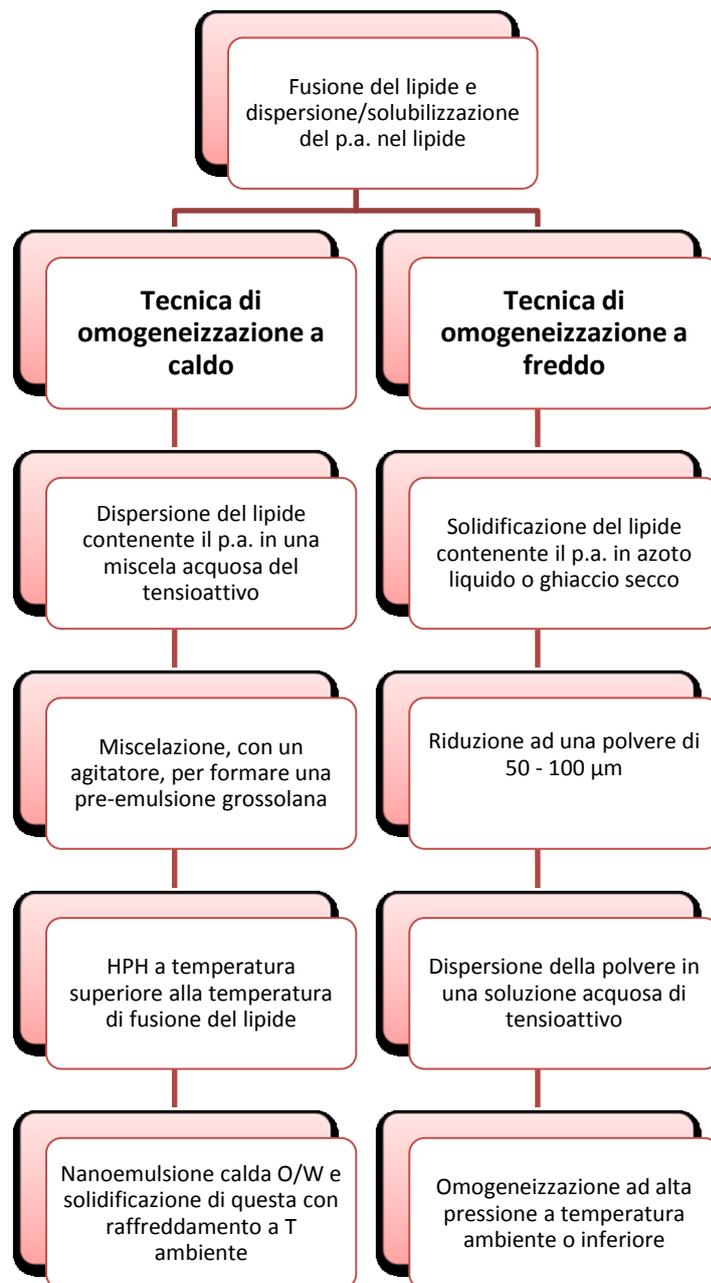


Figura 7. Schema dei metodi di omogeneizzazione a caldo e a freddo nella preparazione di SLN.

➤ Omogeneizzazione a caldo

L'omogeneizzazione a caldo si effettua a temperature superiori alla temperatura di fusione del lipide, e può essere considerata come l'omogeneizzazione di un'emulsione.

Una pre-emulsione, del principio attivo disperso nel lipide fuso e della fase acquosa, è ottenuta utilizzando un miscelatore ad alta prestazione (Ultra-Turrax).

La qualità della pre-emulsione influenza la qualità del prodotto finale ed è auspicabile ottenere particelle in un range di diametro di pochi micrometri. La preparazione della pre-emulsione è condotta a temperature al di sopra della temperatura di fusione del lipide. Di solito, temperature più alte danno minori dimensioni particellari a causa della diminuzione della viscosità della fase interna [42]. Tuttavia temperature più elevate possono anche aumentare il processo di degradazione del principio attivo e del carrier [43]. L'aumento della pressione di omogeneizzazione e del numero di cicli spesso coincide con lo sviluppo di particelle di dimensioni maggiori, a causa dell'elevata energia cinetica di queste che ne favorisce la coalescenza [44].

Il principale prodotto dell'omogeneizzazione a caldo è una nanoemulsione dovuta allo stato liquido del lipide. La formazione delle particelle solide è ottenuta dal successivo raffreddamento del campione a temperatura ambiente o inferiore. A causa delle piccole dimensioni delle particelle e alla presenza dell'emulsionante, la cristallizzazione del lipide potrebbe essere fortemente ritardata [45].

➤ Omogeneizzazione a freddo

Viceversa, l'omogeneizzazione a freddo è ottenuta con un lipide solido e deriva, quindi, dalla frantumazione di una sospensione sottoposta ad alta pressione. E' necessario un controllo e la regolazione della temperatura di lavoro, per assicurare che il lipide non si sciogla, a causa dell'aumento della temperatura che si verifica durante l'omogeneizzazione [43].

L'omogeneizzazione a freddo è stata sviluppata per superare i seguenti limiti dell'omogeneizzazione a caldo:

- La degradazione del principio attivo dovuta alla temperatura.
- La dispersione del principio attivo nella fase acquosa durante l'omogeneizzazione.
- La complessità del processo di cristallizzazione che porta ad alcune modificazioni.

Il primo step è simile a quello dell'omogeneizzazione a caldo e consiste nella dispersione o solubilizzazione del principio attivo nel lipide fuso. Successivamente la miscela contenente il principio attivo è raffreddata velocemente (attraverso ghiaccio secco o azoto liquido). Il raffreddamento veloce favorisce una distribuzione omogenea del principio attivo all'interno della matrice lipidica. Il lipide solido contenente l'attivo è frantumato in particelle di 50-100 micron attraverso dei frantumatori a palle o mortaio. Le microparticelle solide lipidiche sono disperse in una soluzione raffreddata contenente l'emulsionante. La pre-sospensione è sottoposta ad omogeneizzazione ad alta pressione a temperatura ambiente o inferiore.

Rispetto all'omogeneizzazione a caldo, si ottengono generalmente dimensioni particellari superiori ed una più ampia distribuzione delle dimensioni [46]. Il metodo dell'omogeneizzazione a freddo minimizza l'esposizione del campione al calore ma non la elimina del tutto, a causa della fusione della miscela lipide/principio attivo che si effettua nello step iniziale.

➤ Tecnica di emulsione con evaporazione del solvente

Sjostrom e Bergenstahl hanno formulato dei sistemi nanoparticellari attraverso la precipitazione di questi nelle emulsioni o/w [47]. Il materiale lipofilo è disciolto in un solvente organico immiscibile in acqua (es. cicloesano) che è emulsionato in una fase acquosa. Dopo l'evaporazione del solvente si ottiene una dispersione nanoparticellare attraverso la precipitazione del lipide nel mezzo acquoso. Usando colesterolo acetato come modello di attivo e una miscela di lecitina e sodio glicocolato come emulsionante, sono state ottenute particelle con un diametro medio di 25 nm. La riproducibilità di questi dati è stata confermata da Westesen [48] il quale ha inoltre formulato nanoparticelle di tripalmitina sciogliendo il trigliceride in cloroformio. Questa soluzione è stata emulsionata in una fase acquosa attraverso HPH. Il solvente organico è stato rimosso dall'emulsione per evaporazione sotto pressione ridotta (40-60 mbar) e sono state ottenute particelle con una distribuzione dimensionale media compresa tra 30 e 100 nm, dipendente dalla miscela di lecitina/co-tensioattivo.

La dimensione media particellare dipende dalla concentrazione del lipide nella fase organica. Particelle molto piccole possono essere ottenute solo con concentrazioni basse

di lipide (5% w/w) rispetto al solvente organico. Con l'aumento del contenuto lipidico l'efficienza dell'omogeneizzazione diminuisce a causa dell'elevata viscosità della fase dispersa.

I vantaggi di questa procedura sono legati all'assenza di stress termico, mentre lo svantaggio evidente è l'uso di solventi organici che difficilmente possono essere eliminati senza perturbare il sistema.

➤ Tecnica della microemulsione

Gasco e collaboratori hanno sviluppato delle tecniche di preparazione di SLN basate sulla diluizione di microemulsioni [31]. Le microemulsioni sono costituite da sistemi bifasici formati da una fase interna ed una esterna (es. microemulsioni olio in acqua). Sono ottenute per agitazione di una miscela otticamente trasparente a 65-70°C che è generalmente formata da un acido grasso a bassa temperatura di fusione (es. acido stearico), un tensioattivo (es. polisorbato 20 o 60), un co-emulsionante (es. butanolo, sodio ottil fosfato) e acqua. La microemulsione riscaldata è dispersa in acqua fredda (2-3°C) in rapporto di 1:25 o 1:50, sotto agitazione. Come riportato dalla letteratura [49,50] la struttura delle particelle è già presente nella microemulsione per cui non è necessaria energia per ottenere dimensioni particellari nell'ordine del submicron [51]. Riguardo alle microemulsioni, la temperatura e il pH determinano la qualità del prodotto, insieme alla composizione della microemulsione. Alte temperature favoriscono una rapida cristallizzazione ed evitano fenomeni di aggregazione [51,52]. A causa dello step di diluizione, il contenuto lipidico raggiungibile è nettamente inferiore se paragonato alla formulazione con HPH.

➤ Omogeneizzazione ad elevata prestazione e ultrasonificazione

L'omogeneizzazione ad elevata prestazione (HSH) e l'ultrasonificazione (US) sono le tecniche inizialmente usate per la produzione di nanodispersioni solide lipidiche [53,54]. Entrambi i metodi sono molto diffusi e di facile applicazione.

E' stato dimostrato che l'*ultrasonificazione* permette di ottenere una distribuzione di dimensioni nel range tra 30 e 180 nm [30,55], ottimale per questo tipo di nanoparticelle. Tuttavia entrambe queste tecniche mostrano delle limitazioni. La qualità della

dispersione ottenuta con HSH è spesso compromessa dalla presenza di microparticelle, mentre la contaminazione metallica è il problema generalmente riconosciuto al metodo degli ultrasuoni. Dal momento in cui questi problemi sono dovuti a lunghi tempi di preparazione (per entrambe le tecniche HSH e US) un modo per minimizzarli è l'associazione di due brevi cicli di HSH ed US durante la preparazione. Queste tecniche prevedono la fusione dei componenti della miscela e la formazione di una pre-emulsione ad una temperatura di circa 10 gradi superiore alla temperatura di fusione del lipide solido (figura 8). Successivamente la pre-emulsione viene sottoposta ad omogeneizzazione ed a trattamento con ultrasuoni. La formazione delle particelle solide è ottenuta, infine, sottoponendo il campione ad un raffreddamento repentino, in costante agitazione, ad una temperatura al di sotto della temperatura ambiente [38].



Figura 8. Preparazione di SLN con il metodo dell'omogeneizzazione ad alta prestazione e sonicazione.

2.3 MAD: Monooleine aqueous dispersion

Oltre all'utilizzo dei sistemi carrier nanoparticellari lipidici (SLN, NLC), un approccio innovativo nel delivery delle PWSDs è dato dall'utilizzo delle dispersioni acquose di monooleina (MAD), comunemente definite "cubosomi" dalla loro forma strutturale.

I cubosomi sono nanoparticelle ma a differenza delle particelle solide (SLN, NLC), sono formati da particelle liquide cristalline autoassemblate che formano una microstruttura con proprietà uniche di interesse applicativo.

Uno degli eccipienti più comuni utilizzati per la formazione dei sistemi cubosomiali è rappresentato dal monogliceride glicerolo monooleina. La fase cubica, liquida bicontinua cristallina, è otticamente trasparente, molto viscosa ed presenta una struttura unica di dimensioni nanometriche. In genere i sistemi cubosomiali si formano dall'idratazione di un tensioattivo o di un lipide polare da cui si ottengono le così dette "fasi cubiche" in cui la fase solida viene dispersa in particelle più piccole.

Dunque, tali veicoli sono caratterizzati da una fase eterogenea dispersa formata da nanostrutture ben ordinate, lamellari, micellari, esagonali, e fasi liquide-cristalline cubiche [56,57].

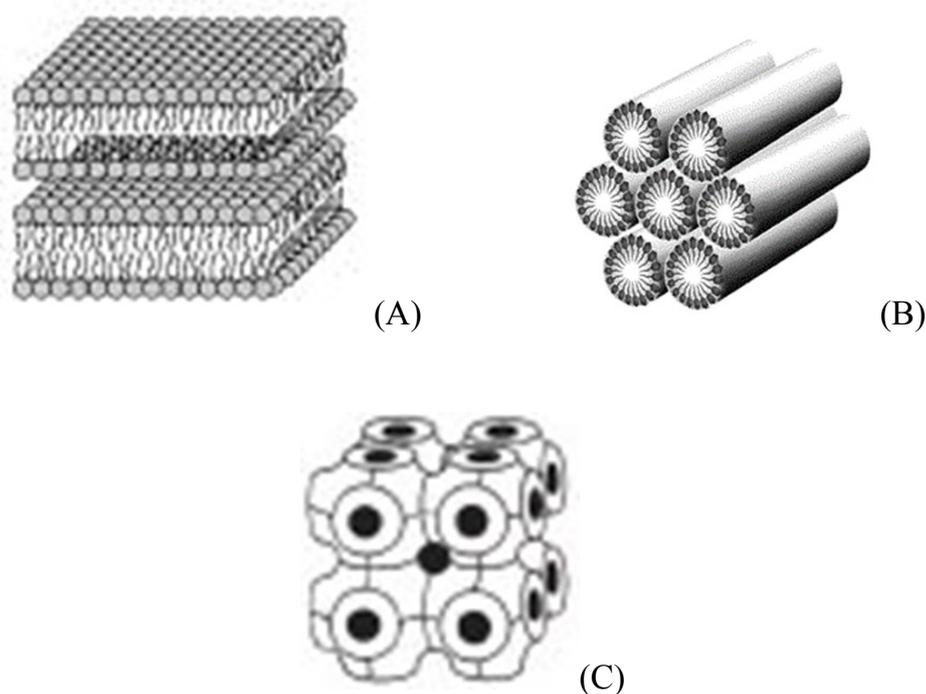


Figura 9. Struttura schematica di una fase lamellare (A), esagonale (B), cubica bicontinua (C).

I cubosomi, definiti come sistemi dispersi nanoparticolati, sono caratterizzati da una elevata biocompatibilità e bioadesività [58,59].

In genere vengono prodotti attraverso diversi metodi, caratterizzati dall'emulsione delle fasi lipidiche cubiche poste a contatto con la soluzione acquosa [60-62], in letteratura sono riportati diversi metodi di emulsione per l'ottenimento di dispersioni nanostrutturate su base lipidica, tra questi ricordiamo:

- ❖ L'applicazione di elevate energie di input (ultrasonificazione, microfluidizzazione e omogenizzazione) [63];
- ❖ Un metodo a multistep che include la formazione di un film secco lipide/stabilizzante e l'applicazione di stirring meccanici durante l'idratazione del film al fine di ottenere particelle cubosomiali stabili costituite da glicolipidi[64];
- ❖ Un processo di diluizione di lipidi in presenza di etanolo: questo metodo è stato introdotto recentemente dal dott. Spicer et al. per la formazione di dispersioni stabili di cubosomi di dimensioni submicron [61];
- ❖ L'applicazione della tecnica di "microfluidization" seguita da un trattamento termico a 125°C, un metodo nuovo proposto per la formazione di cubosomi caratterizzati da una ridotta distribuzione particellare e una buona stabilità colloidale [65];

In generale, il contenuto di fase dispersa riportata in questi metodi è compresa nel range tra 2-10 wt %. Esposito e i coll. hanno pubblicato di recente uno studio sulla produzione di dispersioni a base di monogliceride, utilizzando una tecnica basata sul semplice emulsione di una fase dispersa formata da monogliceride e polossamero 407 in soluzione acquosa [66].

Questo procedimento permette di produrre dispersioni contenenti il 72% di cubosomi e vescicole di dimensioni nanometriche con un range dimensionale maggiore del 28% delle particelle irregolari più grandi.

3. Applicazione dei sistemi nanoparticellari lipidici (SLN, NLC, MAD) nella veicolazione di sostanze di origine naturale

Da quanto riportato in letteratura, i sistemi nanoparticellari lipidici (SLN, NLC, MAD) risultano essere dei sistemi idonei per il targeting di attivi di interesse farmaceutico e cosmetico. Essi sono capaci di garantire una maggiore stabilità dell'attivo incorporato, migliorandone la biodisponibilità e l'efficacia terapeutica[67,68].

Una vasta gamma di sostanze attive, in particolare di natura lipofila, è stata incorporata nelle dispersioni di nanoparticelle lipidiche solide (SLN, NLC), tra cui agenti anti-tumorali, immunosoppressori, corticosteroidi e vitamine lipofile (tabella 4).

Tabella 4. Alcuni esempi di incapsulazione delle PWSDs di origine naturale all'interno delle dispersioni nanoparticellari lipidiche (SLN, NLC)

Classe	Esempi	Origine
Agenti Anticancro	Camptotecina [69]	<i>Camptotheca acuminata</i>
	Paclitaxel [70-73]	<i>Taxus canadensis</i>
	Docetaxel [74]	
	Etoposide (<i>podofillotossina</i>) [75]	<i>Podophyllum peltatum</i>
	Tamoxifene [76]	<i>Taxus baccatus</i>
	Curcumina [77]	<i>Curcuma longa</i>
Vitamine lipofile	Retinoidi [78]	
Altre sostanze	Vinpocetine [79]	<i>Pervinca</i>

Le nanoparticelle lipidiche solide sono state studiate in relazione ad una vasta gamma di vie di somministrazione, compresa la via orale, parenterale, ma anche la via cutanea, polmonare e oculare. In tabella 4 sono riportati alcuni degli esempi di sostanze biologicamente attive di origine naturale che a causa della loro scarsa biodisponibilità ed elevata lipofilia sono state veicolate per mezzo di sistemi nanoparticellari. E' stato dimostrato che l'inclusione di questi attivi all'interno della matrice lipidica promuove una serie di vantaggi, tra i quali:

- Aumentata solubilizzazione dell'attivo

- Protezione contro la degradazione chimica (come nel caso della Camptotecina)
- Estensione dell' emivita plasmatica
- Modifica della biodistribuzione della molecola (degni di nota nel caso di molecole aventi targeting tumorali).

Sostanze come il paclitaxel, quando incorporate nelle nanoparticelle lipidiche solide, presentano una maggiore efficienza nel trattamento di modelli tumorali rispetto alla somministrazione di taxolo [71,72]. Altro esempio è dato dall'inclusione della camptotecina nelle nanoparticelle lipidiche che risulta in un aumento del tempo di circolazione della molecola nel plasma e un incrementato uptake all'interno di alcuni organi (incluso il cervello) rispetto alla somministrazione dell'attivo in una semplice soluzione [69].

Infine molecole come la curcumina, sono state veicolate attraverso sia i sistemi nanoparticellari a matrice lipidica solida (SLN, NLC) sia i sistemi nanoparticellari a struttura cubica (MAD) [80,81].

4. Progetto di ricerca

Sulla base di quanto finora esposto, l'obiettivo del mio progetto di ricerca ha riguardato la valutazione dell'efficacia di sistemi nanoparticellari di natura lipidica (SLN, NLC, MAD) nella veicolazione di sostanze biologicamente attive di origine naturale.

Come abbiamo precedentemente accennato, in letteratura sono numerosi gli esempi di utilizzo di sostanze di origine naturale biologicamente attive caratterizzate da ampio spettro di attività farmacologica (antitumorale, antiossidante, antinfiammatoria ecc.); tuttavia un numero cospicuo di tali sostanze, a causa della loro scarsa solubilità in acqua, mostrano una bassa biodisponibilità anche dovuta ad un non ottimale assorbimento attraverso le membrane biologiche.

Nasce da qui l'esigenza di ricercare strategie formulative in grado di ottimizzare il profilo di rilascio di tali molecole, garantendo inoltre un incremento della loro attività terapeutica e della loro stabilità nel tempo.

In particolare, durante il corso di dottorato, ho approfondito lo studio sulla veicolazione delle seguenti sostanze:

- La Curcumina (CUR), ottenuta da *Curcuma longa*, caratterizzata da ampio spettro di attività (antitumorale, antiossidante, antinfiammatorio), è stata veicolata tramite due tipologie di sistemi nanoparticellari lipidici (MAD, NLC);
- La Capsaicina (CPS) estratta dalle piante del genere *Capsicum*, mostra attività antinfiammatoria e antidolorifica. E' stata incapsulata all'interno di sistemi nanoparticellari di prima generazione "SLN".
- Il Coenzima Q10 (CoQ10), una molecola di natura lipidica appartenente alla famiglia degli ubichinoni. E' una componente biologica di tutti gli animali, che possiedono anche la capacità di sintetizzarla, uomo compreso. Il termine "ubichinone" fa riferimento proprio alla presenza ubiquitaria (molecola house-keeping) di tale sostanza negli organismi viventi. Dalle interessanti proprietà antiossidanti, è stata veicolata per mezzo di sistemi di ultima generazione "NLC".

- La Palmitoiletanolamide (PEA) è stata isolata per la prima volta nella frazione lipidica del tuorlo d'uovo, olio di arachidi e della lecitina di soia. E' dotata di attività infiammatoria, ed è stata inglobata anch'essa, in sistemi NLC.

Nella fase finale del mio lavoro, mi sono occupata di valutare la citotossicità dei componenti lipidici che rappresentano il principale costituente dei sistemi nanoparticellari.

Sebbene i lipidi siano per definizione sostanze GRASS (generally recognized as safe), non mancano in letteratura studi in vitro ed in vivo finalizzati alla valutazione della potenziale tossicità di tali sistemi, con risultati non sempre convergenti [82].

4.1 Valutazione dell'efficacia di veicoli quali MAD ed SLN nella veicolazione di Curcumina

Come accennato precedentemente, la curcumina è una sostanza caratterizzata da un ampio spettro di attività sia biologica che farmacologica [83].

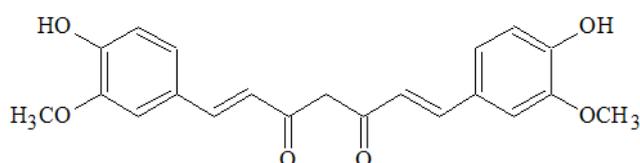


Figura 10. Struttura curcumina. Nomenclatura IUPAC: (1E,6E)-1,7-bis-(4-idrossi-3-metossifenil)-epta-1,6-dien-3,5-dione

I trials clinici hanno dimostrato che la curcumina è dotata di azione antiossidante, antinfiammatoria, antibatterica, antifungina e antitumorale; oltre agli effetti ben noti come cardioprotettivo e neuro protettivo. Essa è ampiamente utilizzata nella medicina tradizionale cinese per le sue proprietà come antinfiammatorio (usata ad esempio nel trattamento della psoriasi), antitumorale e antiossidante. E' stato dimostrato che la curcumina si comporta come una molecola antinfiammatoria, agendo nello specifico a livello degli enzimi pro-infiammatori (cicloossigenasi e lipoossigenasi) e dei fattori di trascrizione coinvolti nel processo infiammatorio come l'NF-κB, un trasduttore di segnale, e il fattore attivatore della trascrizione 3 (STAT3) [2].

Una delle caratteristiche più importanti che ne inducono l'uso terapeutico è proprio il suo profilo di "sicurezza", infatti studi condotti sia su animali che sull'uomo hanno dimostrato l'assenza di tossicità da parte della sostanza, anche a dosi elevate. Sfortunatamente, l'uso terapeutico della curcumina è limitato a causa della sua notevole lipofilia e della breve emivita biologica che porta ad una bassa biodisponibilità ed una rapida eliminazione sistemica [20].

4.1.1 Valutazione delle dispersioni acquose di monooleina come veicolo per l'applicazione topica di curcumina: caratterizzazione, studi in vivo ed ex-vivo

Parte del mio studio di dottorato ha riguardato il delivery della curcumina per mezzo di un approccio innovativo rappresentato dalla formulazione di dispersioni acquose di monooleina (MAD), finalizzate alla somministrazione topica dell'attivo.

Le MAD, come spiegato in precedenza, sono sistemi caratterizzati da una fase eterogenea dispersa formata da nanostrutture ben ordinate di forma lamellare, micellare ed esagonale e da fasi liquide cristalline cubiche [56,57].

In prima istanza mi sono preoccupata di effettuare, in collaborazione con l'Università di Ferrara, uno studio pre-formulativo che ha previsto la preparazione di diverse MAD contenenti curcumina.

I risultati ottenuti ci hanno consentito di selezionare due tipologie di MAD, che presentano una diversa composizione in termini di tensioattivo impiegato.

Le MAD sono state caratterizzate da un punto di vista dimensionale e di omogeneità della popolazione particellare tramite photon correlation spectroscopy (PCS), inoltre sono stati eseguiti studi morfologici tramite cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM) e studi ai raggi X per ottenere informazioni sulla struttura delle MAD. Nell'ultima parte dello studio è stato eseguito uno screening in vitro per valutare la possibilità di impiegare tali veicoli per l'applicazione topica, a questo scopo le MAD sono state opportunamente viscosizzate e studiate mediante un protocollo in vitro su celle di franz che ha consentito di determinare i profili di permeazione della curcumina nel tempo. Infine è stata valutata l'attività antiossidante della curcumina inclusa nelle MAD, tramite saggio ORAC, e l'effetto inibitorio delle formulazioni nei confronti

dell'ossido nitrico sintetasi (iNOS) e dell'espressione di ciclossigenasi 2 (COX2) tramite analisi Western blot.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

➤ *Preparazione*

La produzione delle dispersioni si è basata sull'emulsione della monooleina e dell'emulsionante in acqua, utilizzando un metodo riportato in letteratura [84].

La composizione delle MAD è riportata in tabella 5.

Dopo l'emulsione, le dispersioni sono soggette ad omogeneizzazione (15,000 rev min⁻¹; Ultra Turrax, Janke & Kunkel, Ika-Werk, Sardo, Italy) a 60°C per 1 min, poi vengono raffreddate e mantenute a temperatura ambiente nelle vials di vetro.

Nel caso delle MAD contenenti la curcumina, sono stati aggiunti 7,5 mg di attivo (0.33% w/w rispetto alla monooleina, 0.015% w/w rispetto alla dispersione) alla miscela monooleina/emulsionante e disciolta prima dell'aggiunta della soluzione acquosa. Durante la produzione, la vial è stata protetta dalla luce con una pellicola di alluminio per prevenire la fotodegradazione della curcumina.

Tabella 5. Composizione delle MAD (% w/w)

MAD	Monoleina	Sodio colato	Sodio caseinato	Bentonite	Polossamero 407	Acqua	Note
1)	4.5	-	-	-	0.5	95.00	Dispersione stabile lattiginosa con pochi aggregati
2)	4.5	0.15	-	-	0.5	94.85	Dispersione stabile traslucida
3)	5	0.1	-	-	-	94.90	Dispersione trasparente
4)	5	0.25	-	-	-	94.75	Dispersione trasparente schiumosa
5)	4.5	0.15	-	-	-	95.35	Dispersione trasparente con qualche aggregato
6)	4.5	0.25	-	-	-	95.25	Dispersione quasi trasparente
7)	4.5	-	0.15	-	-	95.35	Dispersione scremata traslucida
8)	4.5	-	0.25	-	-	95.35	Dispersione scremata traslucida
9)	5	-	0.25	-	-	94.75	Dispersione scremata traslucida
10)	5	-	-	0.5	-	94.50	Separazione di fase
11)	4.5	-	-	0.5	-	95.00	Separazione di fase
12)	4.5	0.15	-	0.5	-	94.85	Dispersione stabile lattiginosa grigia
13)	4.5	-	0.15	0.5	-	94.85	Dispersione lattiginosa con qualche aggregato
14)	4.5	0.15	0.1	-	-	94.25	Dispersione quasi lattiginosa con qualche aggregato
15)	4.5	0.15	0.07	-	-	95.28	Dispersione lattiginosa con pochi aggregati

➤ Caratterizzazione delle MAD

Tecnica di Microscopia Elettronica di Crio-Trasmissione (Cryo Transmission Electron Microscopy; Cryo-TEM)

Per avere informazioni sulla struttura delle MAD, le dispersioni sono state analizzate tramite Microscopia Elettronica di Crio-Trasmissione (Cryogenic Transmission Electron Microscopy, Cryo-TEM).

È una tecnica di microscopia elettronica che analizza il campione dopo congelamento, questo per visualizzarlo con la minor distorsione possibile rispetto al campione originale.

Per eseguire l'analisi, una goccia di dispersione diluita viene posta su una griglia e l'eccesso di liquido viene eliminato tramite un trasferimento su filtro di carta. Il campione così ottenuto è crio-fissato tramite iniezione all'interno di etano liquido e raffreddato fino alla temperatura di -180°C mediante azoto liquido, all'interno di una camera di congelamento che controlla la temperatura (Zeiss Cryobox, Oberkochen, Germania). All'interno della camera la temperatura viene mantenuta costante durante tutta la procedura; l'eccesso di etano viene successivamente rimosso.

Il campione vitrificato è stato trasferito a Zeiss EM922Omega (Carl Zeiss Microscopy, Oberkochen, Germany), usando un microscopio a trasmissione elettronica (CT3500, Gatan, Munich, Germany). La temperatura del campione è stata mantenuta al di sotto 100 K in tutto l'esperimento.

I campioni sono stati esaminati con dosi ridotte di circa $1000\text{--}2000\text{ e/nm}^2$ a 200 kV.

Le immagini vengono registrate tramite una camera digitale CCD (Ultrascan 1000, Gatan) e analizzate tramite il software GMS 1.8 (Gatan).

Spettroscopia di fotocorrelazione (PCS)

L'analisi delle particelle di dimensioni submicron, è stata eseguita tramite Zetasizer 3000 PCS (Malvern Instr., Malvern, England) equipaggiato con un laser al neon elio con 5 mW con una lunghezza d'onda di 633 nm. Il campione in vetro è stato pulito dalla polvere, tramite lavaggio con detergente e risciacquando due volte con acqua sterile. Le misure sono state eseguite a 25°C ad un angolo di 90° con un run time di almeno 180 s. I campioni sono stati diluiti con acqua bidistillata in un rapporto 1:10 v:v [85].

➤ Contenuto del farmaco nella dispersione

Il metodo SdFFF (Sedimentation Field Flow Fractionation) è stato utilizzato per ottenere informazioni sull'incapsulazione della curcumina e la sua distribuzione nelle dispersioni. Durante il frazionamento, alcune frazioni sono state raccolte e analizzate tramite HPLC per determinare la quantità di farmaco contenuta nelle diverse popolazioni particellari della fase dispersa. I valori di curcumina incapsulata sono stati ottenuti sommando la quantità di curcumina nelle diverse frazioni.

L'efficacia di incapsulamento della curcumina è stata anche determinata [86] diluendo una quantità di MAD con etanolo (1:10, v/v) e agitando per 3 h a 0 °C in una bottiglia di vetro ambrata per prevenire la degradazione della curcumina. Un campione filtrato è stato analizzato tramite HPLC per determinare il contenuto di CUR.

Tutti i dati derivano dalla media di 4 determinazioni su differenti batches dello stesso tipo di dispersione. La stabilità chimica è stata valutata sulle formulazioni caricate con il farmaco, che sono state conservate a 25 °C in una bottiglia di vetro ambrata per 6 mesi, determinando il contenuto di CUR tramite analisi HPLC dopo 30, 90 e 180 giorni. Dagli studi di caratterizzazione le migliori formulazioni sono risultate quelle contenenti Na-colato e Na-caseinato e polossamero 407. Solo su queste formulazioni, denominate rispettivamente MP e MCC, sono stati eseguiti gli studi in vitro.

Tabella 6. Composizione delle MAD*

Componenti (% w/w)	MP	MCC
<i>Monooleina</i>	4.5	4.5
<i>Sodio colato</i>	-	0.15
<i>Sodio caseinato</i>	-	0.07
<i>Polossamero 407</i>	0.5	-
<i>H₂O</i>	95.00	95.28

*Nel caso della MAD che contiene il farmaco, il contenuto di curcumina era dello 0.015 %

➤ Studi di assorbimento percutaneo in vitro

I campioni di pelle umana di adulti (di età media 36 ± 8 anni) sono stati ottenuti da operazioni di riduzione al seno. Il grasso sottocutaneo è stato ritagliato con attenzione, e la pelle è stata immersa in acqua distillata a $60 \pm 1^\circ\text{C}$ per 2 min [87], dopo aver rimosso lo strato corneo/epidermide dal derma usando una lama da bisturi. Le membrane epidermiche sono state essiccate in un dessiccatore a $\sim 25\%$ di umidità relativa. I campioni essiccati sono stati avvolti in fogli di alluminio e conservati a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ fino all'uso. I lavori di ricerca precedenti hanno dimostrato il mantenimento delle caratteristiche della barriera dello strato corneo (SC) dopo la conservazione nelle condizioni riportate [88]. Inoltre, sono stati effettuati esperimenti preliminari per valutare l'integrità della barriera dei campioni SCE, misurando la permeabilità *in vitro* dell'acqua attraverso le membrane [^3H], usando le celle di Franz secondo il metodo descritto di seguito. Il valore del coefficiente di permeabilità calcolato per l'acqua corrispondeva a quello precedentemente riportato [^3H] [89].

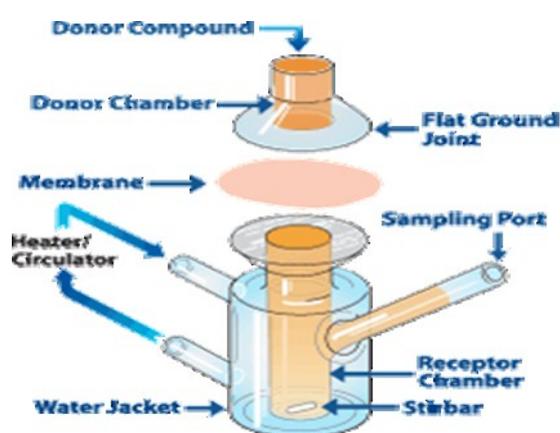


Figura. 11. Schema di una cella di Franz

I campioni SCE essiccati sono stati reidratati immergendoli in acqua distillata a temperatura ambiente per 1 h prima di essere montati nelle celle di Franz, fornite da LGA (Berkeley, California). L'area di superficie di pelle esposta era di 0.78 cm^2 . Il compartimento recettore conteneva 5 mL di una miscela di tampone fosfato (60 mM, pH 7.4) e etanolo (50:50, v/v) per consentire lo stabilirsi delle sink conditions e per mantenere una solubilizzazione permanente [90].

Questa soluzione viene mantenuta sotto agitazione con l'aiuto di un agitatore magnetico a 500 rpm e termostato a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ durante tutti gli esperimenti [91].

Circa 500 μL di ogni formulazione (MP, MCC, e CONTROL) sono state poste sulla superficie della pelle nel compartimento donatore, quest'ultimo è stato sigillato per evitare l'evaporazione.

A predeterminati intervalli di tempo, compresi tra 1 e 24 h, i campioni (0.15 mL) della soluzione del recettore sono stati prelevati e la concentrazione di CUR nel recettore è stata misurata usando HPLC. Le concentrazioni di CUR sono state determinate sei volte in esperimenti indipendenti, e poi calcolati i valori medi \pm le deviazioni standard. I valori medi sono stati calcolati come funzione di tempo. I coefficienti di diffusione sono stati calcolati dalla porzione lineare della curva di accumulo ed espressi sia come flussi osservati sperimentalmente (F_o), sia come flussi normalizzati F_n ($F_n = F_o/C$, dove C è la concentrazione di CUR nella forma analizzata, espressa in mg/mL).

➤ Predizione della stabilità a lungo termine

La stabilità della CUR nelle MAD è stata testata in assenza di luce. La formulazione è stata conservata in contenitori di vetro ambrati ben chiusi e mantenuta a temperatura ambiente per 6 mesi.

La stabilità chimica è stata valutata sulle formulazioni di farmaco caricate, determinando il contenuto di CUR tramite analisi HPLC [86].

Il log del contenuto residuo di CUR (%) è stato calcolato rispetto il tempo, e la pendenza (m) è stata calcolata mediante regressione lineare. I valori numerici relativi a m sono stati sostituiti all'interno della seguente equazione per la determinazione dei valori di k :

$$k = m \times 2.303$$

I valori di shelf-life (tempo per una perdita del 10%; t_{90}) and I valori di half-life (il tempo necessario per avere una riduzione del 50%; $t_{1/2}$) sono stati calcolati mediante le seguenti equazioni (1):

$$t_{90} = 0.105/k$$

$$t_{1/2} = 0.693/k$$

come riportato da Wells [92].

➤ Saggio ORAC

Il saggio ORAC permette di determinare l'attività antiossidante di MP e MCC. Per un periodo breve di tempo sia i veicoli vuoti che carichi, (100 μ L) sono stati posti in 48-pozzetti di piastre di colture tissutali. Viene usato anche il bordo più esterno dei pozzetti della piastra, in quanto in alcuni casi è stato trovato falsare le misure di fluorescenza così da introdurre il cambiamento di temperatura nel saggio. Il composto azo-solubile in acqua (AAPH), è stato usato come radicale iniziatore per generare radicali liberi a velocità costante. FL è stato usato come probe per valutare l'attività antiossidante. Sono stati analizzati contemporaneamente un controllo positivo (una soluzione FL che contiene il generatore di radicali liberi AAPH), un controllo negativo (una soluzione FL che non contiene AAPH), e i bianchi (MP e MCC), e i non carichi MP e MCC e CUR (0.015%) in tampone fosfato (PBS). Sono stati aggiunti 170 μ L della soluzione FL ad ogni pozzetto (MP, MCC, e i pozzetti bianchi) per iniziare il saggio. Poi, 30 μ L della soluzione AAPH sono stati aggiunti a tutti i pozzetti, eccetto per il controllo negativo, a cui sono stati aggiunti 30 μ L di tampone fosfato. E' stato avviato un timer quando abbiamo introdotto il generatore dei radicali liberi, e la piastra è stata conservata al buio in una stanza a temperatura ambiente.

Ad un determinato tempo, è stata misurata la fluorescenza della soluzione dopo aver recuperato la materia esterna delle MAD dai pozzetti (excitation 492 nm, emission 535 nm) usando Varian Eclipse fluorimeter e tracciati come funzione di tempo [93].

➤ Analisi Western Blot

La linea cellulare dei cheratinociti (NCTC 2544) è stata fornita da Interlab Cell Line Collection (Genova, Italy) e di routine mantenuta in un mezzo minimo essenziale (Sigma-Aldrich) supplementato con siero di vitello fetale 10%, 100 U/mL penicillina, e 100 :g /mL streptomina. Le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera umidificata del 95% aria/5% CO₂. Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni 2-3 giorni. Le cellule sono state stimulate con 200 U/mL di interferone-gamma (IFN- γ) e 10–4 mol/L di istamina (H), usata per riprodurre i meccanismi coinvolti nella patogenesi dei processi infiammatori. Le cellule stimulate e i controlli non trattati sono stati incubati per 48 h con MAD caricate con CUR (CUR 0.0015% w/v). Le espressioni di iNOS e

COX-2 sono state valutate tramite analisi western. Le linee cellulari non trattate e trattate sono state lavate due volte con ghiaccio freddo PBS e raccolte con la lisi buffer (M-PER[®] mammalian protein extraction reagent; Thermo scientific, PIERCE Biotechnology) con l'aggiunta dell'inibitore della proteasi (complete, Mini, protease inhibitor cocktail tablets; Roche) secondo il protocollo fornito dal produttore.

Venti microgrammi della proteina totale, presente nel supernatante, sono stati caricati in ogni corsia e separati dal gel per elettroforesi 4%–12% Novex Bis–Tris (NuPAGE, Invitrogen). Le proteine sono state poi trasferite su membrane di nitrocellulosa (Invitrogen) in un sistema umido.

Il trasferimento delle proteine è stato verificato mediante colorazione delle membrane di nitrocellulosa con rosso Ponceau. Le membrane sono state bloccate in soluzione salina tamponata con Tris contenente 0,01% di Tween-20 (TBST) e 5% di latte in polvere non grasso a 4° C durante la notte. Gli anticorpi monoclonali anti-iNOS2 (1:300) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e anti- α -tubulina (Sigma, Milano, Italia) (1:5000) sono stati diluiti in TBST e le membrane incubate per 24 ore a temperatura ambiente. Gli anticorpi sono stati rilevati con un anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano utilizzando il sistema di rilevazione di chemiluminescenza Supersignal West Pico Substrate (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Le bande sono state misurate densitometricamente calcolate in base alla densità delle bande di α -tubulina in ciascun campione. I valori sono stati espressi come unità densitometriche arbitrarie (A.D.U.) corrispondenti all'intensità del segnale.

➤ HPLC

La determinazione quali-quantitativa della CUR è stata eseguita tramite HPLC utilizzando un sistema di pompe alternative (Jasco, Japan), un UV-detector settato a 425 nm, e una valvola di iniezione Rheodyne con un loop di 50- μ L. I campioni sono stati caricati su colonna RP C-18 (15 \times 0.46 cm) impaccata con 5 μ m particelle (Grace[®]-Alltima, Alltech). L'eluizione è stata eseguita con una fase mobile contenente metanolo, 2% acido acetico, e acetonitrile 5:30:65 v/v con un flusso di 0.5 mL/min. Il tempo di ritenzione della curcumina era di 7.0 min.

RISULTATI

➤ Caratterizzazione delle dispersioni

Come precedentemente riportato, è stato condotto uno studio preformulativo per selezionare le MAD più idonee per l'incapsulazione della curcumina. Sono state prodotte quindici MAD, impiegando diversi tensioattivi presenti da soli o in miscela. In particolare oltre al polossamero, sono stati utilizzati materiali naturalmente derivati, come il sodio colato (sali biliari comunemente usati per la produzione di liposomi), la caseina (la principale proteina presente nel latte), e la bentonite (un minerale argilloso). La tabella 5 riporta le composizioni delle MAD prodotte, insieme con altri commenti sull'aspetto e la stabilità delle dispersioni. Si può osservare che il polossamero ha permesso di ottenere dispersioni stabili lattiginose con pochi aggregati, mentre il sodio colato induce la produzione delle dispersioni trasparenti. In particolare le dispersioni schiumose trasparenti sono state ottenute usando il più alto contenuto sia di monooleina che di sodio colato (MAD 4). La miscela di sodio colato e polossamero ha dato origine a una dispersione traslucida. L'uso di sodio caseinato porta alla produzione delle dispersioni con un aspetto traslucido iniziale seguito da scrematura, invece quando il sodio caseinato è stato usato insieme al sodio colato, si sono formate le dispersioni lattiginose con pochi aggregati. Infine, l'uso della sola bentonite comporta la separazione di fase, mentre se impiegata insieme con sodio colato o sodio caseinato, permette la formazione delle dispersioni lattiginose con alcuni aggregati. Cinque MAD (denominate 1, 2, 4, 12 e 15) sono state scelte per studiare il potenziale ruolo come deliver system della curcumina, considerando come criteri di selezione l'assenza di fenomeni di separazione e la scarsità degli aggregati. Le MAD selezionate sono state rinominate utilizzando gli acronimi basati sulle loro composizioni: MP (monooleina e polossamero 407), MC (monooleina e sodio colato), MCP (monooleina, sodio colato and polossamero 407), MCC (monooleina, sodio colato and sodio caseinato), e MCB (monooleina, sodio colato e bentonite).

Dopo la produzione delle MAD selezionate caricate con CUR, è stato nuovamente valutato l'aspetto visivo. Si è evidenziato che, ad eccezione di MCC dove si sono formati alcuni aggregati, la CUR, a causa del suo carattere anfifilico, permette di stabilizzare MAD, prevenendo la formazione degli aggregati.

➤ Analisi cryo-TEM

L'analisi tramite microscopio a trasmissione cryo-elettronica, è stata eseguita per investigare la struttura interna delle MAD e valutare l'influenza del tensioattivo sulla nanostruttura della fase dispersa.

Le figure 12 e 13 riportano le immagini di cryo-TEM delle MAD prodotte con diversi tensioattivi. Nei pannelli A e B della figura 12, sono state riportate rispettivamente le immagini delle dispersioni MP in assenza e in presenza di curcumina. In entrambi i pannelli si osserva la copresenza di veicoli e cubosomi. I cubosomi appaiono come particelle con forme definite e con una struttura interna omogenea e ordinata. Alcuni cubosomi mostrano i veicoli attaccati sulla loro superficie. In aggiunta sono presenti i sistemi cubici sponge-like.

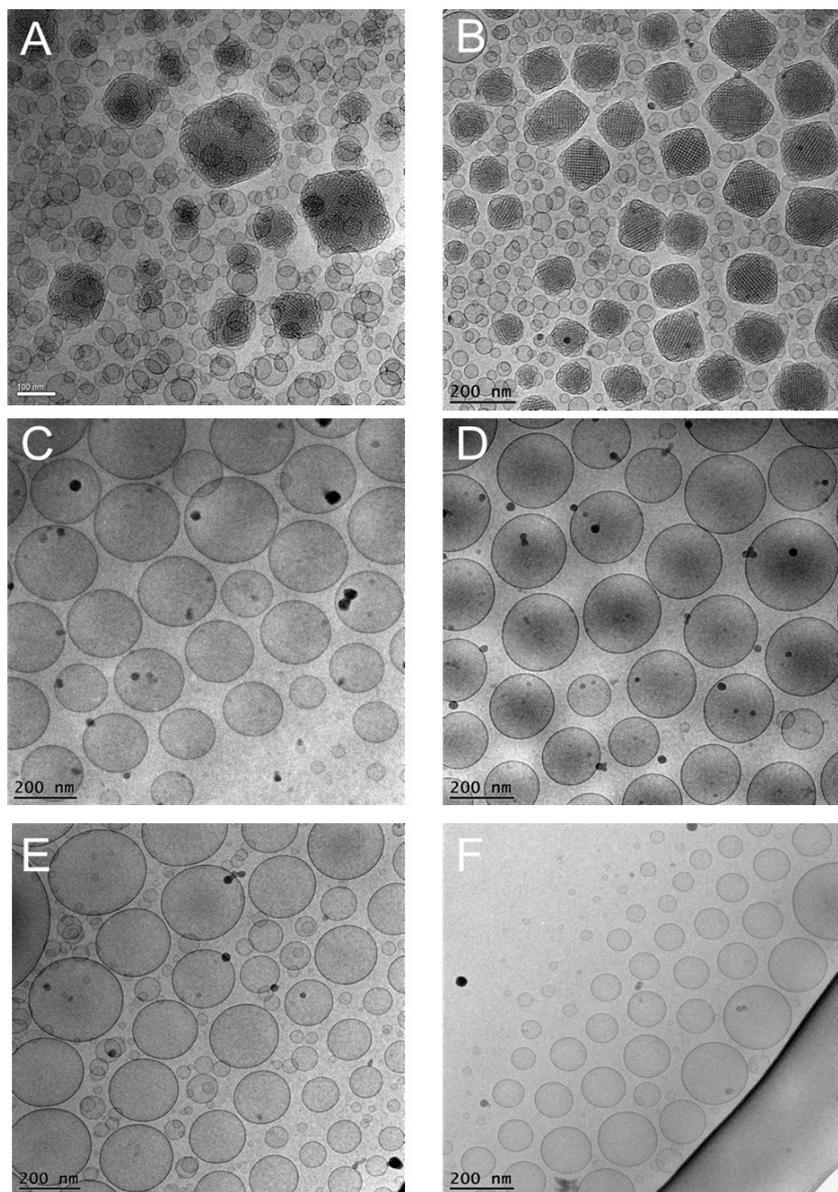


Figura. 12. Immagini di cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM) delle MAD prodotte in assenza e in presenza della CUR. Le MAD sono state stabilizzate da differenti tensioattivi chiamati polossamero 407 (MP) (pannelli A, B), sodio colato (MC) (pannelli C, D) e sodio colato-polossamero 407 (MCP) (pannelli E, F). I pannelli B, D e F si riferiscono alla CUR che contiene MAD.

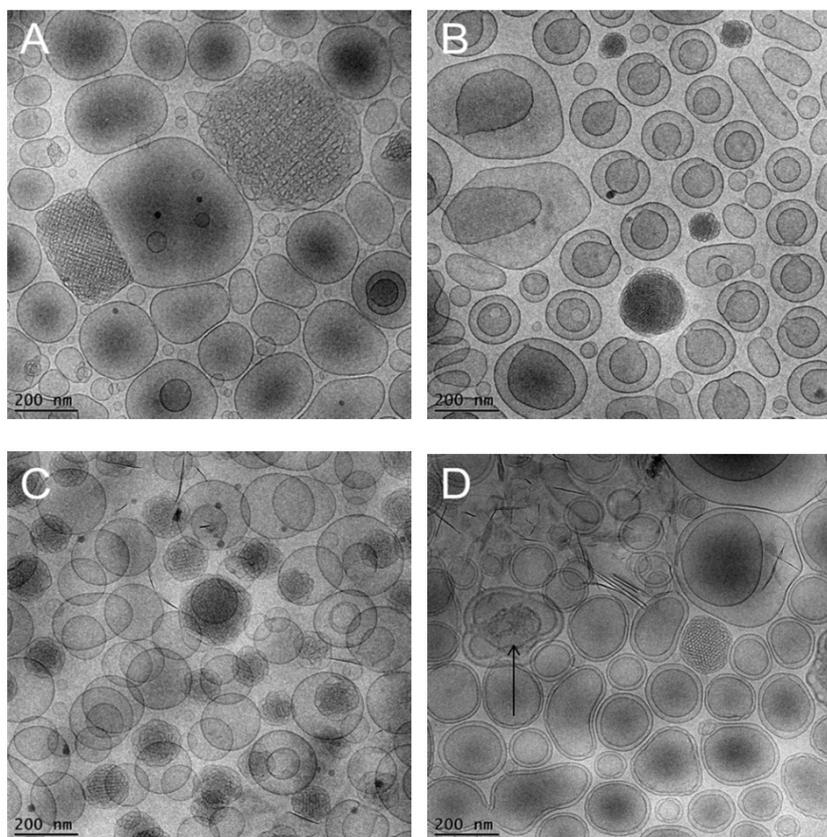


Figura 13. Immagini di cryo-transmission electron microscopy (cryo-TEM) delle MAD prodotte in assenza e in presenza di CUR. Le MAD sono state stabilizzate da diversi tensioattivi, chiamati: sodio colato–sodio caseinato (MCC) (pannelli A, B) and sodio colato–bentonite MCB (pannelli C, D). I pannelli B and D si riferiscono alle MAD caricate con CUR.

Le immagini mostrano le tipiche strutture trovate per le MAD formate da monoleina e polossamero [58,67].

Nel caso di MC (pannelli C e D) e MCP (pannelli E e F), sono presenti i veicoli unilamellari. I punti neri sono imputati alla contaminazione del cristallo di ghiaccio dovuta alla preparazione del campione. La presenza di CUR non sembra influenzare l'aspetto delle MAD. Dalle immagini di cryo-TEM si può affermare che l'uso di sodio colato come emulsificante, da solo o in miscela con polossamero, non permette la formazione delle strutture cubiche o sponge-like ma solo di veicoli unilamellari. Tuttavia altri autori hanno trovato che la monooleina nelle soluzioni micellari diluite di acidi biliari forma veicoli e diverse fasi cristalline liquide [94,95]. La figura 13 mostra le immagini di MCC (pannelli A e B) e di MCB (pannelli C e D). In figura 13A, sono

riportate le miscele di veicoli, cubosomi ed esasomi. I veicoli sono principalmente unilamellari o mostrano alcune invaginazioni, possono essere osservati anche alcuni sistemi di membrana più grandi come strutture cubiche (sponge-type). La figura 13B, riguarda un campione di una dispersione prodotta in presenza di CUR (CUR-MCC). In questo caso, i veicoli mostrano le invaginazioni miscelate con alcuni esasomi nella formazione di stati differenti. La caseina, essendo una proteina anfifilica, mostra una self-association all'interno degli aggregati micellari nell'acqua; la sua capacità di formare cubosomi in presenza di monooleina, è stata precedentemente dimostrata da altri autori [96-98].

Riguardo la dispersioni MCB, si possono notare strutture differenti. In figura 13C, si possono rilevare i cubosomi, le strutture sponge e i veicoli. Le linee scure indicano sottili fogli di bentonite. Infine la figura 13D, che riguarda CUR-MCB, mostra un sistema eterogeneo costituito da veicoli con invaginazioni, le particelle della fase sponge-type e le piastrine di bentonite simili ad aghi. La fase sponge è probabilmente costituita da queste invaginazioni e sviluppa la fase cubica. Inoltre, nello stesso campione sono presenti i cubosomi, i veicoli unilamellari e le aree di sistemi di membrana cubiche. Le osservazioni di cryo-TEM della figura 13, ci consentono di affermare che l'emulsione della monooleina da sodio colato nella miscela con sodio-caseinato o con bentonite permette la formazione delle strutture cubiche, sponge like e i veicoli con invaginazioni. La presenza di CUR sembra influenzare le nanostrutture MAD, infatti, a causa della sua natura anfifilica [99], la curcumina si comporta come surfattante che interagisce con la monooleina nella formazione di diverse strutture cristalline.

➤ Analisi PCS

Gli studi di PCS sono stati condotti per determinare la distribuzione dimensionale delle dispersioni di MAD. La tabella 7, riporta i parametri ottenuti tramite PCS dopo la produzione dei campioni CUR-MAD. Le dimensioni medie sono comprese tra 153.5 (quando MAD è emulsionato con sodio colato and polossamero, MCP) e 235.5 nm (quando il sodio colato è impiegato insieme alla bentonite, MCB). Gli indici di polidispersioni sono sempre inferiori a 0.3.

Tabella 7. Parametri PCS di CUR-MAD

Composizione MAD					
Parametri	MP Monooleina Polossamero 407	MC Monooleina sodio colato	MCP Monooleina sodio colato Polossamero 407	MCC Monooleina sodio colato sodio caseinato	MCB Monooleina sodio colato Bentonite
Dimensioni medie (nm)	200.3	206.8	153.5	219.0	235.5
Indice di polidispersione	0.26	0.27	0.29	0.28	0.25

La figura 14 riassume i risultati di dimensioni medie e indice di polidispersione delle MAD prodotte in assenza e in presenza di CUR. Come riportato nel pannello A, il range d'intensità dei diametri medi delle MAD è di 158.9 nm per MCP e 252.97 nm per MCB. MP e MC presentano misure pari a 208.7 e 206.9 nm. L'uso di sodio colato associato al polossamero (MCP) comporta una riduzione del diametro medio rispetto all'uso del solo polossamero (MP), mentre l'associazione di sodio colato con sodio caseinato (MCC) o bentonite (MCB) porta ad un incremento dei diametri medi. La presenza della CUR comporta una diminuzione nel diametro medio nelle MAD, tranne nel MC dove il diametro medio non è cambiato.

Le differenze nei diametri medi, tra la stessa formulazione prodotta in assenza e in presenza di CUR sono statisticamente significative ($p < 0.0001$).

Come mostrato in figura 14B, gli indici di polidispersione (PI) sono sempre uguali o inferiori 0.4. I più bassi valori di PI sono ottenuti con la formulazione MP, sia in assenza che in presenza di CUR, mentre MCP mostra più alti valori PI in assenza di CUR. La presenza di CUR induce un aumento dei valori PI, tranne in MCP, dove PI diminuisce da 0.4 a 0.24. Infine, MCB mantiene il valore di PI di 0.34, anche in presenza di CUR.

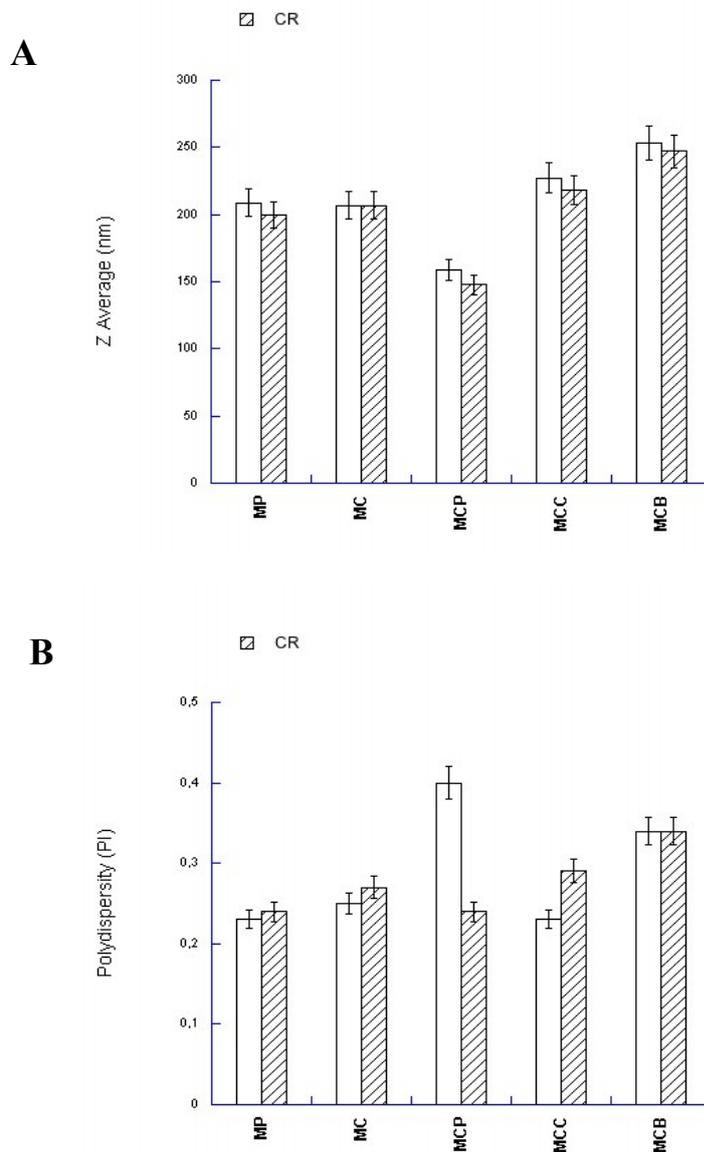


Figura 14. Indici di polidispersione (PI) e dimensioni medie delle MAD prodotte in assenza e in presenza di CUR (linee diagonali), come indicato dagli istogrammi. Le MAD sono state stabilizzate con differenti tensioattivi, chiamati polossamero 407 (MP), sodio colato (MC), sodio colato-polossamero 407 (MCP), sodio colato- sodio caseinato (MCC) and sodio colato-bentonite (MCB). I dati risultano dalle medie di 5 analisi su differenti batches dello stesso tipo di dispersioni.

➤ Contenuto di farmaco nelle dispersioni

Il metodo SdFFF è stato impiegato per ottenere informazione sull'incapsulazione della CUR e la sua distribuzione nelle dispersioni. Durante il frazionamento, alcune frazioni

sono state raccolte e analizzate tramite HPLC per quantificare la quantità di farmaco contenuta nelle diverse popolazioni particellari della fase dispersa.

Dagli studi effettuati, la distribuzione di farmaco all'interno delle differenti frazioni risultava simile per tutte le MAD. In particolare la frazione corrispondente ad un diametro medio di circa 70–80 nm (probabilmente formata da vescicole) contiene il 12–25% del farmaco totale. La più elevata quantità di CUR (48-60%) è contenuta nella porzione nanoparticelle/veicoli, con un diametro di circa 100 nm. Le particelle con diametri medi di circa 130 nm contengono il 7–18% di CUR. La rimanente CUR è associata con la popolazione rappresentativa delle particelle, avendo un diametro più grande. I valori di incapsulazione di CUR nelle MAD, ottenuti sommando la concentrazione di CUR nelle diverse frazioni, sono riportati in tabella 8.

Tabella 8. Efficienza di incapsulazione della CUR in MAD

Tipi di MAD					
	MP	MC	MCP	MCC	MCB
EE%	98.26 ±13	97.45 ±2.1	99.19 ±0.42	82.1 ±4.5	98.04 ±0.48

L'incapsulazione della CUR è abbastanza quantitativa per tutte le MAD, con un valore di incapsulazione ottenuto nel caso delle MCC pari a 82.14% w/w. La curcumina persa è stata trovata associata agli aggregati che si sono formati durante la produzione delle MAD. I dati di efficacia della curcumina incapsulata, sono stati determinati dalla diluizione di MAD in etanolo sotto agitazione, e risultavano sovrapponibili.

Riguardo alla stabilità della curcumina, è necessario sottolineare che la molecola in tampone fosfato 0.1 M, viene rapidamente decomposta ($t_{1/2} = 9.4$ min) [100].

L'instabilità della CUR è dovuta alla degradazione per idrolisi acida e alcalina, per ossidazione e fotodegradazione [101-103].

Dallo studio sul contenuto di CUR nelle diverse formulazioni come funzione del tempo, espresso come % della quantità totale usata per la preparazione, si possono apprezzare le differenze nelle cinetiche di stabilità mostrate nelle MAD. In particolare, MCP mantiene la stabilità della CUR in modo migliore rispetto alle altre MAD, infatti dopo 6

mesi dalla produzione la concentrazione residua della CUR è ancora del 98.3%. Nel caso di MP il contenuto residuo di CUR è del 80.78%. I nostri risultati mostrano che la stabilità della CUR nelle MAD sembra essere influenzata dal pH [104].

I più bassi valori di pH, corrispondono ad un più alto contenuto residuo della CUR dopo 6 mesi. Infatti i curcuminoidi sono noti essere stabili a valori di pH inferiori a 6.5. Si decompongono in modo pH-dipendente, con reazioni in condizioni basiche.

Riguardo all'aspetto macroscopico, CUR-MAD ha mantenuto il colore giallo e l'assenza di aggregati almeno dopo sei mesi dalla produzione.

➤ *Studi di assorbimento percutaneo in vitro*

Sulla base dei risultati ottenuti, le formulazioni che presentano le migliori caratteristiche da un punto di vista formulativo sono state ulteriormente valutate. In particolare sono state selezionate le formulazioni:

- MP (monooleina e polossamero 407)
- MCC (monooleina, sodio colato e sodio caseinato)

Nonostante i numerosi vantaggi terapeutici della CUR, la sua solubilità in acqua è solo di 11 ng/mL, così per gli esperimenti di diffusione della curcumina, è stato selezionato un opportuno solubilizzante, quale il labrasol (5%), che è stato aggiunto ad una soluzione acquosa contenente la curcumina (CONTROL). Sono state utilizzate le celle di franz per paragonare le cinetiche di diffusione della curcumina dalle formulazioni MP, MCC, CONTROL. L'uso di un tampone fisiologico come fase recettoriale porta ad una cinetica di diffusione trascurabile, a causa della scarsa solubilità della CUR. Quindi è stata usata una fase recettoriale non fisiologica con il 50% v/v di etanolo, per permettere lo stabilirsi delle sink conditions e mantenere la solubilizzazione del permeante.

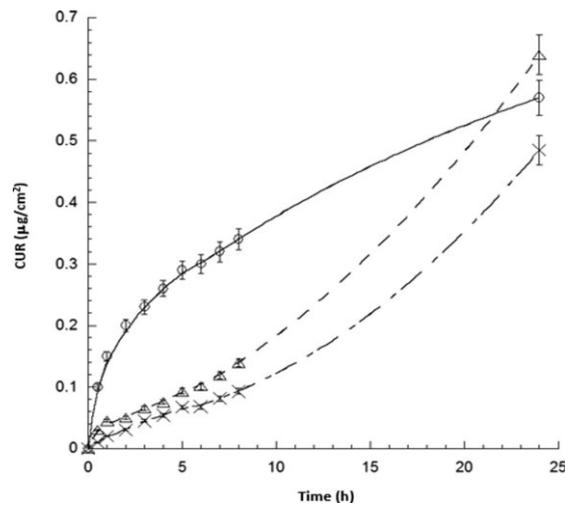


Figura 15. Studio in vitro sui profili di permeazione della CUR dal: CONTROL (cerchi), MP (croci), and MCC (triangoli). I dati rappresentano la media di sei esperimenti indipendenti \pm SD

La figura 15 riassume i risultati ottenuti. Si può osservare che la diffusione della CUR è funzione del veicolo impiegato: Il controllo induce una diffusione più veloce della CUR nelle prime ore, mentre la diffusione è più controllata nel caso delle MAD. Le differenze tra i dati di diffusione delle CUR mostravano una significatività ($p < 0.0001$). Dopo 24 h, la diffusione della CUR dal controllo era più lenta rispetto alla MCC, si può ipotizzare che le micelle della soluzione di labrasol possano aver interagito con i lipidi dello strato corneo, possibilmente formando un deposito di CUR da cui il farmaco viene rilasciato lentamente. Il flusso allo steady-state è stato calcolato dalla regressione lineare della porzione lineare della curva. I flussi di CUR (F_n) calcolati dalle formulazioni MP, MCC, e il CONTROL erano rispettivamente 0.066 , 0.098 , e 0.239×10^{-3} cm/h. Quindi, la CUR diffonde più lentamente dalla MP formata da veicoli e cubosomi, rispetto alle eterogenee MCC, dove è presente una miscela di esosomi e di differenti tipi di veicoli. Dal momento che alcuni autori hanno trovato una similarità tra la struttura della fase cubica e la struttura dello strato corneo [105], è ragionevole ipotizzare una interazione tra la monoleina cubosomiale e i lipidi della pelle. Inoltre, altri autori hanno dimostrato che una fase esagonale della nanodispersione, è efficace nel migliorare il delivery topico del peptide [101]. Le differenze nell'interazione tra la fase esagonale e cubica con la pelle potrebbero giustificare la differente diffusione della CUR dalle due MAD; ciò nonostante, ulteriori studi sono richiesti per chiarire meglio questa ipotesi.

➤ Stabilità della curcumina nelle MAD

La tabella 9 riporta il contenuto di curcumina in diverse formulazioni in funzione del tempo, espresso come percentuale della quantità totale usata per la preparazione. La stabilità Shelf-life è stata calcolata dal Log (CUR contenuto residuo, % rispetto al contenuto di farmaco al tempo 0), ottenendo la cinetica di primo ordine. Dalle curve (m), ottenute dalla regressione lineare, si evincono i valori di shelf-life (t_{90}) e half-life ($t_{1/2}$), cioè il tempo a cui la concentrazione del farmaco si è ridotta del 10 % e il 50% rispettivamente, sono stati calcolati e riportati in tabella 9.

Tabella 9. Contenuto di CUR nelle MAD in funzione del tempo

	<i>Contenuto di CUR (%)^a ± SD in MAD</i>			<i>Valori di Shelf life</i>		
	<i>30 day</i>	<i>90 days</i>	<i>180 days</i>	<i>K</i>	<i>t₉₀ (giorni)^b</i>	<i>t_{1/2} (giorni)^c</i>
MP	99.1 ± 1.30	83.54 ± 2.85	80.78 ± 5.82	0.0012	87.34	693.0
MCC	98.15 ± 1.70	78.18 ± 4.57	58.99 ± 2.62	0.0023	45.59	301.3

Tutti i dati sono statisticamente significativi ($p < 0.0001$). E' stato trovato che MP potrebbe mantenere la stabilità della curcumina per almeno 3 mesi (87.34 giorni), mentre nel caso della MCC, t_{90} supera 1 mese (45.59 giorni). I valori di $t_{1/2}$ raggiungono almeno 2 anni e almeno 10 mesi per MP e MCC. Si può ipotizzare che la stabilità della CUR sia migliore nel caso della MAD che contiene polossamero rispetto a quella basata solo su sodio caseinato-sodio colato.

Bisogna sottolineare che la curcumina nel tampone fosfato 0.1 M si decompone rapidamente ($t_{1/2}$ 9.4 min). L'instabilità della CUR è dovuta alla degradazione per idrolisi alcalina e acida, dall'ossidazione e dalla fotodegradazione. Molti studi hanno mostrato che i curcuminoidi si decompongono in modo pH-dipendente; è noto che sono stabili a pH inferiori a 6.5. In verità il pH delle MAD è di 6.49 nel caso delle MP, e di 7.18 nel caso delle MCC. Si può concludere che la stabilità della CUR nelle MAD è controllata sia dalle nanostrutture della fase dispersa sia dal pH delle dispersioni.

L'aspetto macroscopico delle MAD caricate con CUR non è cambiato nel tempo, infatti le dispersioni hanno mantenuto il colore giallo e l'assenza di aggregati dopo i 6 mesi dalla produzione.

➤ Saggio ORAC

L'attività antiossidante delle formulazioni è stata valutata utilizzando il saggio ORAC. È necessario sottolineare che oltre alle formulazioni MAD è stato valutato anche il potere antiossidante dei singoli componenti della formulazione.

Rispetto al Trolox, considerato il punto di riferimento, è possibile notare che la curcumina ha un valore ORAC alto, segno di un buon potere antiossidante.

La formulazione MP - CUR presenta un valore ORAC superiore a MP priva di attivo, nonostante questa possiede un'attività antiossidante più bassa della curcumina analizzata singolarmente. Dai risultati ottenuti il polossamero 407 ha dimostrato possedere una certa attività antiossidante superiore a quella mostrata da GMO.

Per quanto riguarda la formulazione MCC, i risultati esposti in tabella 10 dimostrano la già nota attività antiossidante del sodio caseinato; si evince inoltre la migliore attività della MCC contenente curcumina rispetto alla MCC che ne è priva, anche se i valori si mantengono inferiori al valore ORAC per la curcumina.

Tabella 10: Valori ORAC per i campioni MP e MCC in assenza e in presenza di curcumina e i relativi componenti

Componenti	Unità ORAC
Trolox	1
Curcumina	3.93
GMO	0.29
Poloxamer 407	2.49
Sodio colato	1.37
Sodio caseinato	11
MP (non caricato)	0.14
MCC (non caricato)	0.42
MP-CUR	0.37
MCC-CUR	0.71

Dall'analisi dei grafici riportati in figura 16 è possibile notare come fino alla 3h si abbia l'abbattimento della fluorescenza, mentre a partire dalla 4h le MAD che contengono la curcumina mantengono un certo livello di fluorescenza fino a 22 ore.

Sia la MAD contenente polossamero 407 (A) che quella formulata con sodio colato e sodio caseinato (B) sono in grado di mantenere un livello di fluorescenza maggiore di quello ottenuto con la curcumina libera. Questo significa che la veicolazione della curcumina nelle MP ed MCC protegge la sua attività antiossidante e la mantiene nel tempo. Le MP e MCC si possono quindi considerare sistemi per il rilascio controllato della curcumina.

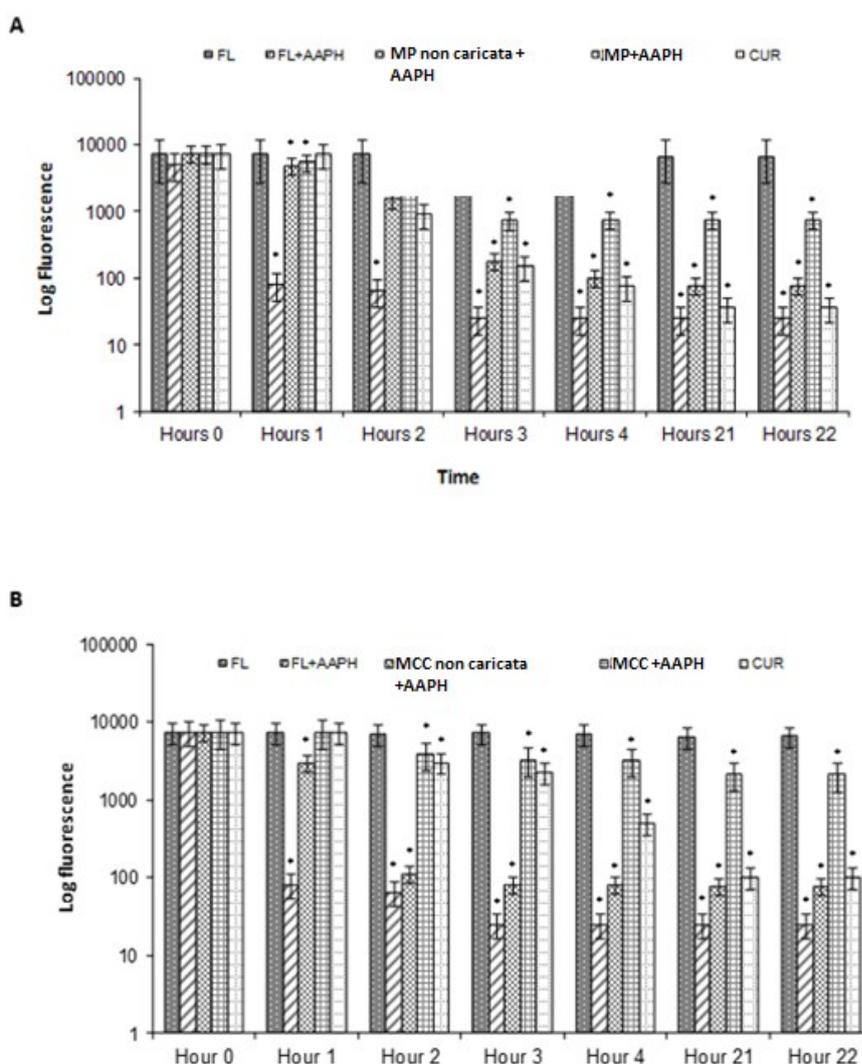


Figura 16. Saggi ORAC per le dispersioni MP (panello A) e MCC (panello B). I dati rappresentano la media di tre diversi esperimenti \pm S.D. FL = fluoresceina; FL+AAPH = soluzione di fluoresceina contenente AAPH; CUR = CUR in soluzione di tampone fosfato. * $p < 0.05$ valore significativo nei confronti del corrispondente valore a tempo 0.

➤ *Analisi Western blot*

L'inflammation è un processo biologico indotto da una alterazione dell'omeostasi cutanea che ha come fine il recupero dell'integrità tissutale. I cheratinociti sono capaci di produrre diversi mediatori coinvolti nella cascata infiammatoria, come l'ossido nitrico (NO), le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e le molecole di adesione intracellulare-1 (ICAM-1) [101]. In particolare l'NO prodotto dall'enzima iNOS (inducibile nitric oxide synthase) gioca un ruolo importante nell'inflammation e nella riparazione tissutale. Infatti, è stato dimostrato che l'NO interagisce e attiva enzimi come la ciclo-ossigenasi-1 e 2, incrementando la produzione di prostaglandine che può esacerbare il processo infiammatorio [102]. Pertanto, l'utilizzo degli inibitori del NOS può rovesciare la sintomatologia infiammatoria dovuta alla produzione di NO. INOS, in particolare, catalizza la deaminazione ossidativa della L-arginina per produrre NO. Una incrementata espressione dell'iNOS e/o della sua attività catalitica è stata osservata in numerosi tumori dei tessuti umani e pure nei tumori indotti in animali così come nelle patologie infiammatorie.

Dai dati riportati in letteratura, INOS sembra essere uno dei target dell'effetto anti- infiammatorio della curcumina. CUR, infatti, è capace di inibire la produzione di NO e l'espressione di iNOS in cellule RAW264.7 stimulate con lipopolisaccaridi (LPSs) o interferon γ [103]. Chan e colleghi hanno riportato, in una recente pubblicazione, che la curcumina può inibire l'espressione del gene che codifica iNOS nei macrofagi peritoneali isolati da topi BALB/c e nel fegato di cavie trattate con LPS [106]. Il fattore nucleare kB (NF-kB) è uno dei fattori più ubiquitari di trascrizione per le cellule eucariote che regola l'espressione dei geni coinvolti nel controllare la crescita e la proliferazione cellulare, la risposta infiammatoria, l'adesione cellulare e altri meccanismi. E' stato dimostrato che lo stress ossidativo attiva il legame tra NF-kB e le catene del DNA. Pertanto gli effetti antiossidanti della curcumina potrebbero dipendere dall'inibizione del legame tra NF-kB e DNA. Infine la curcumina mostra una notevole attività antiossidante e antitumorale probabilmente mediata dalla regolazione dell'espressione di geni che richiedono l'attivazione della proteina attivatrice (AP1) e di NF-kB [107].

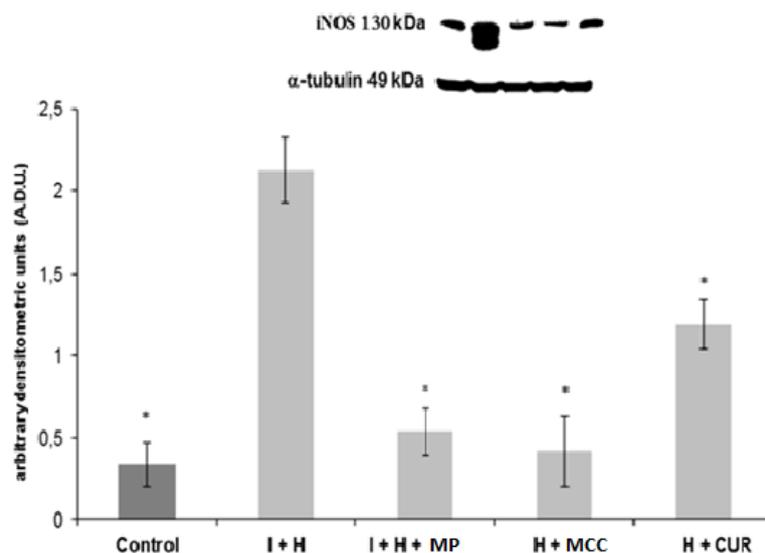


Figura 17. Effetto di CUR, MP e MCC sulla sintesi della proteina INOS indotta da interferon-gamma (IFN- γ) e istamina (H) su cellule NCTC 2544 dopo 48 ore.

*Control: cellule non trattate; I + H: cellule trattate con interferon-gamma e istamina; I+H+MP: cellule trattate con interferon-gamma, istamina e MP/CUR; I+H+MCC: cellule trattate con interferon gamma, istamina e MCC/CUR; I+H+CUR: cellule trattate con interferon gamma, istamina e CUR non caricata. * $p < 0.05$ valori significativi rispetto a I+H*

La figura 17 riporta gli effetti di CUR, MP e MCC sulla sintesi della proteina iNOS, indotta su colture cellulari NCTC 2544 tramite interferon-gamma (IFN- γ) e istamina (H). IFN- γ è una citochina e rappresenta uno dei più importanti mediatori coinvolti nell'amplificazione dell'infiammazione in patologie croniche. L'istamina, invece, è coinvolta durante i primi stadi dell'infiammazione, nel controllo della risposta infiammatoria agendo su linfociti, monociti e leucociti. In questo protocollo sperimentale, abbiamo utilizzato sia IFN- γ e H per attivare i cheratinociti perché essi utilizzano delle vie diverse di trasduzione del segnale e questo può portare ad una più consistente attivazione dei geni pro-infiammatori.

La figura 17 mostra che il trattamento delle cellule NCTC 2544 con IFN- γ e istamina (H), ha prodotto una significativa induzione della sintesi di iNOS dopo 48 ore.

Al contrario, l'aggiunta di curcumina non incapsulata e delle sospensioni MP/CUR e MCC/CUR ha prodotto una riduzione della sintesi di iNOS indotta da IFN- γ e H.

Questo risultato è in accordo con le evidenze riportate in letteratura, riguardanti l'efficacia e l'attività anti-ossidante della curcumina e dei suoi derivati [101].

4.1.2 Valutazione dell'ipoacetilazione istonica indotta dalla curcumina caricata in sistemi NLC, somministrati per via intraperitoneale nel topo.

In questo studio è stato valutato uno degli aspetti più interessanti della curcumina, che riguarda la sua capacità di fungere da potente inibitore della p300 acetiltransferasi (HAT) e indurre una riduzione del livello di acetilazione istonica [108-111]. Gli istoni sono le principali proteine strutturali della cromatina [112] che giocano un ruolo fondamentale sia nella packing nucleare del DNA sia nella regolazione della funzione genomica [113]. In particolare, l'acetilazione delle proteine istoniche è un processo reversibile e dinamico che regola molteplici funzioni cellulari, incluso il rimodellamento della cromatina e la regolazione trascrizionale [114-117]. Due classi di enzimi, HATs e l'istone deacetilasi (HDACs), catalizzano l'acetilazione e la deacetilazione, rispettivamente, delle proteine istoniche, portando al rimodellamento della struttura della cromatina. In particolare l'enzima HATs, è adibito al trasferimento di un gruppo acetile ai residui amino-terminali (lisina-K) negli istoni, inducendo una spansione locale della cromatina e aumentando l'accesso nei confronti delle proteine regolatorie al DNA.

Ne consegue che l'acetilazione dell'istone è associata all'attivazione trascrizionale [118]. Al contrario l'azione dell'enzima HDACs porta alla rimozione del gruppo acetile e quindi alla condensazione della cromatina (repressione trascrizionale) [119]. Tra gli enzimi HAT, il p300-HAT è un importante sottotipo, capace di acetilare tutte e quattro le proteine istoniche, ma in modo preferenziale H3 e H4 [120].

L'acetilazione dell'istone sito-specifica è stata associata a differenti funzioni cellulari [121]. In particolare, la de-regolazione dell'acetilazione dell'istone H4 al sito K12 (H4K12) è stata connessa ai disordini genetici (come neurodegenerativi e disturbi di memori [122]).

Studi in vitro dimostrano che la CUR è in grado di inibire l'acetilazione dei siti H3 e H4 p-300 mediata [109,123,124]. Dal momento che la mancanza di funzionalità dell'enzima HATs è stata associata a diverse patologie, la CUR che è un potente e specifico inibitore del p-300-HAT [109,123,124] potrebbe rappresentare una molecola di grande interesse.

In questo studio, è stato valutato il potenziale uso di NLC per la somministrazione parenterale di CUR e l'abilità del carrier di incrementare la biodisponibilità del farmaco. A questo scopo, le nanoparticelle lipidiche sono state preparate e caratterizzate in base alle loro proprietà chimico-fisiche. Sono stati effettuati studi di calorimetria a scansione differenziale (DSC) per ottenere informazioni riguardo la struttura cristallina della matrice lipidica. Inoltre sono stati condotti studi in vitro per valutare il rilascio della CUR dal sistema nanoparticellare. La curcumina inglobata nei sistemi NLC è stata iniettata per via sistemica, e tali sistemi sono stati comparati ad una formulazione controllo di CUR.

Gli effetti nel Sistema nervoso centrale (SNC) sono stati valutati dall'analisi del livello di acetilazione della proteina istonica H4 al livello della lisina 12 (H4K12) negli omogenati del cordone spinale del topo. I livelli dell'acetilazione H4K12 sono stati ottenuti tramite analisi Western blot nel topo trattato con NLC-CUR o con DMSO-CUR (dimetilsolfossido-CUR) e comparati con i rispettivi veicoli. Inoltre è stata valutata la potenziale tossicità motoria, indotta dai sistemi NLC tramite il rotarod test, eseguito negli animali trattati con un volume di dispersione nanoparticellare (10 ml/kg, i.p.) e con lo 0.05% di DMSO (10 ml/kg, i.p.).

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

I sistemi NLC caricati con CUR e il sistema non carico, sono stati preparati tramite il metodo agli ultrasuoni, secondo la procedura riportata di seguito [125]. Inizialmente il Precirol[®] ATO 5 (gliceril palmito-stearato 5.1 g) è stato fuso a 75°C, e poi sono stati aggiunti il Miglyol[®] 812 (trigliceride caprilico/caprico 2.25 g) e la CUR (300 mg). La fase lipidica fusa è stata dispersa nella soluzione calda di surfattante (75°C), costituita da Lutrol[®] F68 (polossamero 188) 4% w/w e dal Tween[®] 80 (polisorbato 80) 3% w/w, tramite agitazione ad elevata velocità (UltraTurrax T25, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany, 8000 rpm). La pre-emulsione così ottenuta è stata sottoposta all'azione dell'ultrasuoni, UP 400 S (Ultraschallprozessor, Dr. Hielscher GmbH, Germany) mantenendo la temperatura al massimo 5°C superiore al punto di fusione del lipide. La dispersione calda è stata raffreddata in un bagno di ghiaccio e dispersa in acqua fredda, contenente lo 0.1% di PVA (alcol polivinilico), sotto costante agitazione

(UltraTurrax T25, 8000 rpm) per 5 min, per permettere la solidificazione della matrice lipidica e la formazione dei sistemi NLC.

➤ Caratterizzazione

Determinazione delle dimensioni nanoparticellari

La dimensione media delle particelle contenute nelle dispersioni lipidiche e l'omogeneità della popolazione particellare sono stati misurati mediante spettroscopia di fotocorrelazione (PCS), come descritto nel capitolo precedente.

➤ Scanning electron microscopy (SEM)

La forma delle NLC è stata analizzata tramite microscopia a scansione elettronica (SEM) (XL-40 Philips, The Netherlands). Per studiare la struttura interna, i sistemi NLC sono stati incorporati in una resina epossidica (Taab epocure, TAAB Laboratories Equipment Ltd.), sezionati utilizzando un ultra-icrotome (Jang SM 2000R, Leitz, Wetzlar, Germany), rivestito con oro-palladio e quindi osservati tramite SEM.

➤ Studi di calorimetria a scansione differenziale

La calorimetria a scansione differenziale (DSC), è stata utilizzata per caratterizzare il comportamento termico delle nanoparticelle. In particolare è stata esaminata la depressione della temperatura di fusione lipidica delle nanoparticelle rispetto al lipide puro, dovuta alla formazione di una diversa struttura cristallina della matrice lipidica [126]. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando un calorimetro DSC821e (Mettler Toledo, Greifensee, Svizzera) equipaggiato con un sistema di raffreddamento ad azoto liquido. Un purge di azoto con una velocità di flusso di 50 /min è stato utilizzato per fornire un ambiente di gas inerte nella cella di misura. Il sistema è stato precedentemente calibrato usando l'indio, con crogiuoli vuoti sigillati ermeticamente come riferimento.

I crogiuoli di alluminio sono stati riempiti con 40 μ L di sospensione lipidica e sigillati ermeticamente.

I campioni sono stati sottoposti a due processi endotermici da 25 a 225°C. I crogiuoli sono stati sigillati ermeticamente e sottoposti ad un singolo riscaldamento da 25 a

225°C. Prima di effettuare il primo step di riscaldamento, tutti i campioni sono stati equilibrati a 10° C per 3 minuti e, in tutti i casi, è stata utilizzata una velocità di riscaldamento o raffreddamento di 5°C/min. I dati sono stati trattati con il software STARe (Mettler Toledo) ed i risultati sono stati espressi come media di due determinazioni.

➤ Determinazione della percentuale di carico

La percentuale di CUR intrappolata nella matrice lipidica è stata determinata secondo la seguente metodica: una quantità in peso nota di dispersione NLC è stata filtrata mediante un sistema di ultrafiltrazione tangenziale Pellicon XL™ (Millipore, Milan, Italy) dotato di una membrana polyethersulfone Biomax 1000 con un cut off di 1.000.000 (MWCO). Una quantità in peso nota di materiale ultrafiltrato è stato sottoposto a freeze-dried, dissolto in diclorometano, e analizzato con spettrofotometro UV ad una lunghezza di 425 nm (Lambda 52, PerkinElmer, MA, USA). Le curve di calibrazione sono state ottenute da sei soluzioni di concentrazione compresa tra 10–100 g/ml. Il coefficiente di correlazione è stato >0.99. Ogni punto è dato dalla medie di tre misure e l'errore è stato calcolato come deviazione standard (±SD).

L'efficienza di incorporazione della CUR è stata espressa come recupero attivo e calcolata usando l'equazione (2):

$$\text{Drug recovery} = \frac{\text{massa di attivo nelle nanoparticelle}}{\text{massa di attivo introdotto nel sistema}} \times 100$$

➤ Studio di rilascio in vitro

La quantità di CUR rilasciata dal sistema nanoparticellare è stata determinata come riportato da Nayak et al. [127]. Brevemente, una quantità pesata di sospensione NLC-CUR (corrispondente a 100 g/ml di CUR) è stata dispersa in una soluzione di tampone fosfato e successivamente separata in differenti aliquote in vials di vetro.

Le vials sono state poste in un bagno d'acqua termostato a 37°C. A predeterminati intervalli di tempo, i campioni sono stati centrifugati a 200 g per 5 minuti in modo da

separare la CUR rilasciata sottoforma cristallina dalla CUR presente nella dispersione di NLC.

Dopo la centrifugazione, il pellet di cristalli di CUR è stato disciolto in un 1 ml di metanolo. L'assorbanza è stata misurata tramite spettrofotometro UV alla lunghezza di 425 nm, usando una curva standard di CUR in metanolo.

➤ Studi in vivo

Animali

Durante l'esperimento sono stati usati topi maschi CD1, di età compresa tra le 8 e 9 settimane. Tutte le procedure sono state approvate dalla commissione istituzionale della cura e uso di animali (IACUC). Gli animali sono stati mantenuti in cicli luce/buio di 12 ore e con libero accesso a cibo e acqua. Per gli esperimenti di comportamento, i topi sono stati acclimatati alla stanza dell'esperimento, e i test sono stati eseguiti in cieco per quanto concerne il trattamento farmacologico degli animali.

Somministrazione in vivo

Per l'analisi Western blot, i campioni di NLC-CUR e DMSO-CUR sono stati somministrati per via intraperitoneale (i.p.) con una dose di 100 mg/kg in un volume finale di 4 ml/kg. Due differenti formulazioni di farmaco e dei rispettivi veicoli sono stati iniettati 90 minuti prima della rimozione delle corde spinali.

Per la valutazione della tossicità motoria, sono stati somministrati (i.p.) 10 ml/kg sia del campione contenente NLC che del veicolo standard (0.05% DMSO) trenta minuti prima della valutazione delle performances motorie.

➤ Valutazione della tossicità motoria

La performance motoria è stata valutata tramite un accelerating Rotarod treadmill (Ugo Basile, Comerio, Italy) come descritto in precedenza [128]. Trenta minuti dopo la somministrazione del campione con NLC (10 ml/kg, ip) o del veicolo controllo con lo 0.05% DMSO (10 ml/kg, ip), i topi sono stati collocati al rotarod per un massimo di 5 minuti per cinque prove consecutive con un intervallo di 15 minuti tra ogni prova. Un

animale è considerato avere una tossicità motoria se cade dal rotarod più volte rispetto al gruppo di controllo.

➤ Preparazione degli estratti nucleari dalla corda spinale dei topi

Dopo 90 minuti dalla somministrazione del farmaco, gli animali sono stati sacrificati ed è stato rimosso il midollo spinale di cinque topi per ogni gruppo. I tessuti sono stati omogeneizzati in un tampone contenente 20 mM HEPES a pH 7.9, 20 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, inibitori della proteasi (1 mM PMSF, 1 lg/ml aprotinin, and 1 lg/ml leupeptin) e inibitori della deacetilasi (10 mM nicotinamide, and 1 μM TSA). Gli omogenati sono stati incubati in un bagno di ghiaccio per 15 minuti. Dopo l'aggiunta di NP40 allo 0.2%, gli omogenati sono stati incubati in un bagno di ghiaccio per altri 15 minuti e risospesi tramite vortex per 15 secondi. I nuclei sono stati precipitati a 3000 g per 1 min e risospesi nel tampone di omogeneizzazione; la concentrazione proteica è stata misurata utilizzando il kit Bio-Rad Dc Protein Assay kit secondo il protocollo di lavorazione.

➤ Analisi Western blot

Sono state separate 30 μg di proteina nucleare 4–12% Novex Bis-Tris di gel elettroforetico (NuPAGE, Invitrogen, Italy). Le proteine sono state poi trasferite nelle membrane di nitrocellulosa (Invitrogen, Italy). Le membrane sono state bloccate per 1 h nel tampone fosfato salino (PBS) contenente lo 0.01% di Tween[®]-20 and 5% di latte non grasso e processati per immunodetenzione con i seguenti anticorpi: rabbit polyclonal anti Ac-Histone H4 (Lys 12) (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e anticorpi anti-actina (1:5000, Sigma, Milan, Italy). Gli anticorpi primari sono stati incubati tutta la notte alla temperature di 4°C. Sono stati rilevati anticorpi con rafano anticorpo secondario perossidasi-coniugato utilizzando il rilevamento chemiluminescente SuperSignal Occidente Pico Substrato Chemiluminescente (Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

Le bande sono state misurate densitometricamente e la densità relativa è stata calcolata in base alla densità delle bande di actina in ciascun campione. I valori sono espressi come unità arbitrarie densitometriche corrispondenti al segnale di intensità.

RISULTATI

➤ Preparazione e caratterizzazione del campione NLC-CUR

Le nanoparticelle NLC-CUR sono state preparate utilizzando quale lipide solido il Precirol[®] 5 ATO e come lipide liquido il Miglyol[®] 812, come tensioattivi sono stati utilizzati il Lutrol[®]F68 e il Tween[®] 80. Inizialmente è stato eseguito uno screening lipidico per l'identificazione della matrice più idonea per l'incorporazione della CUR. In particolare, è stato scelto il Precirol[®] 5 ATO per preparare le nanoparticelle lipidiche dal momento che negli studi preliminari, ha mostrato elevata affinità verso la CUR.

Nonostante il metodo di omogenizzazione ad elevata pressione (HPH) è considerato la tecnica più adatta alla produzione di nanoparticelle lipidiche per la sua facile scalabilità, il metodo ad ultrasuoni (US), usato in questo protocollo sperimentale, ha dato interessanti risultati come confermato dalle analisi di caratterizzazione e dalla determinazione della quantità di CUR caricata nel sistema nanoparticellare.

Le analisi di caratterizzazione (PCS) hanno mostrato che l'incapsulazione della CUR ha prodotto un moderato incremento nelle dimensioni (NLCCUR, **162.4 ± 10.5 nm**) rispetto alle nanoparticelle non cariche (NLC, **142.7 ± 11.3 nm**). NLC-CUR ha mostrato un'elevata efficienza di incapsulamento (**87% ± 1.2**) dovuta al carattere lipofilo e all'elevata affinità verso la fase oleosa interna. Le analisi al potenziale zeta hanno registrato una bassa riduzione dei valori del potenziale zeta nel caso delle NLC caricate con CUR (**15.70 ± 1.49 mV**) rispetto al sistema non carico (**10.70 ± 1.41 mV**). Questo risultato può essere spiegato ipotizzando un assorbimento parziale della CUR sulla superficie delle nanoparticelle e un conseguente mascheramento della carica superficiale negativa. L'analisi SEM ha dimostrato che le dimensioni delle particelle sono compatibili con quelle ottenute dall'analisi PCS e presentano una forma sferica, nonostante la presenza di alcuni aggregati probabilmente dovuti alla tecnica impiegata per la preparazione dei campioni (figura 18).

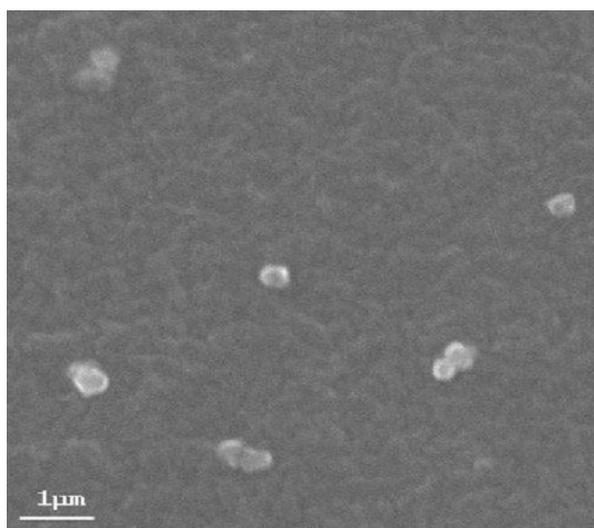


Figura 18. Scanning electron microscopy del campione NLC-CUR

I sistemi NLC carichi e non, sono stati caratterizzati tramite analisi DSC. Le nanoparticelle non cariche sono state analizzate per ottenere maggiori informazioni sul sistema. Per essere certi che il picco calorimetrico del sistema NLC può essere imputato solo ad un sistema ben definito, sono stati sottoposti all'analisi i singoli componenti usati per preparare le NLC.

La figura 19 mostra i termogrammi DSC dei componenti il sistema NLC non carico (pannello A) e di quello carico con CUR (pannello B). Come mostrato nel pannello A, la CUR è una molecola cristallina con un netto picco endotermico con un punto di fusione a 175.5°C, mentre i componenti solidi, Precirol® 5 ATO e Lutrol® F68, hanno mostrato un picco endotermico rispettivamente a 65.6°C e 56.3°C.

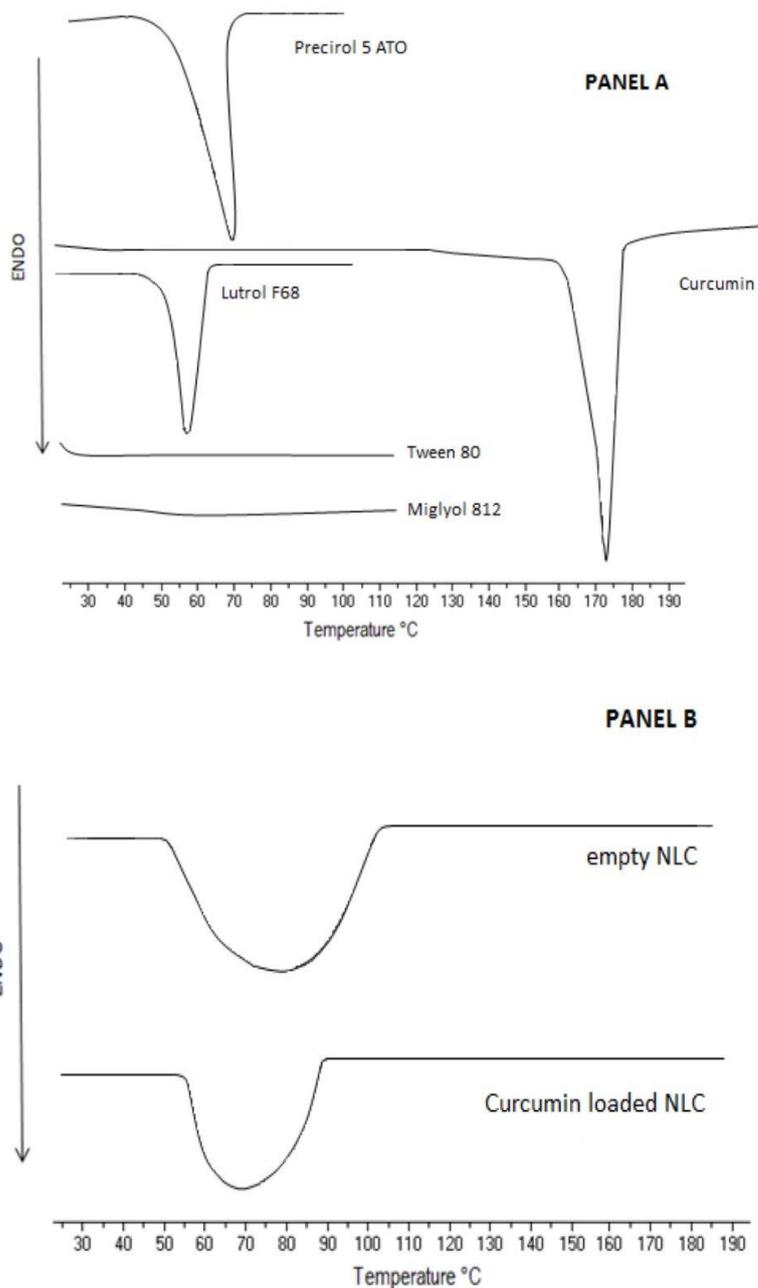


Figura 19. Termogrammi DSC dei componenti il sistema NLC (panel A) e dei sistemi NLC-CUR e non carico (panel B).

Quando le materie prime sono formulate sottoforma di nanoparticelle, il picco endotermico è piu' ampio e cade quasi alla stessa temperatura. In particolare, i sistemi NLC non carichi hanno mostrato un picco endotermico a 68.2°C, mentre le NLC-CUR hanno esibito una riduzione del picco endotermico a 64.0°C. E' evidente che la CUR ha

causato una riduzione nella temperatura e questo risultato, insieme all'assenza del picco di CUR, potrebbe suggerire l'incorporazione del farmaco all'interno della matrice lipidica.

➤ Studio di rilascio in vitro

La figura 20 mostra il profilo di rilascio della CUR dal sistema nanoparticellare (NLC-CUR). Lo studio è stato eseguito utilizzando un tampone fosfato come mezzo di rilascio per mimare le condizioni in vivo. Il rilascio della CUR dalla soluzione acquosa è stata favorita dalla scarsa solubilità del farmaco. La CUR rilasciata sembra seguire due trend differenti.

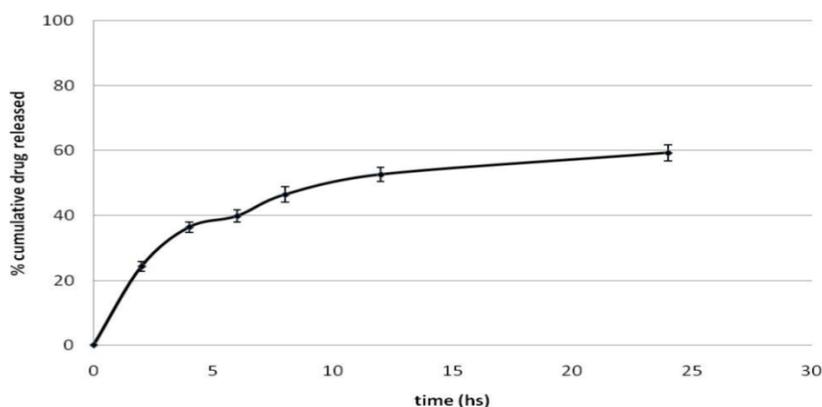


Figura 20. Profilo di rilascio in vitro della CUR dal campione NLC-CUR. Ogni punto rappresenta il valore medio \pm S.D. (n = 3).

Un iniziale “burst effect” per le prime 4–5 ore e un rilascio del farmaco “sustained” dal sistema NLC per il rimanente tempo di monitoraggio. Questo risultato è in linea con i risultati di altri ricercatori per quanto riguarda il rilascio di curcumina dalle nanoparticelle lipidiche [127,129,130]. Anche se i componenti utilizzati per formulare le nanoparticelle lipidiche caricate con CUR, erano diversi da quelli utilizzati nel presente protocollo sperimentale, i risultati ottenuti sembrano avere una spiegazione comune: l'effetto “burst” può essere attribuito al farmaco adsorbito sulla superficie della NLC (come osservato dai risultati delle analisi del potenziale zeta), mentre il rilascio prolungato “sustained” è probabilmente dovuto al tempo necessario per il farmaco di diffondere dal sistema NLC al mezzo di rilascio [131].

➤ Analisi sulla tossicità motoria

Il test rotarod è stato utilizzato come procedura sperimentale per valutare se la somministrazione sistemica di NLC provocava tossicità motoria. Questo test determina la capacità del topo di sostenere il suo peso corporeo in rotazione su un'asta. La perdita di grip (impugnatura, aderenza) muscolare è indicativa sia del rilassamento muscolare sia della tossicità al SNC, pertanto la diminuzione nel tempo di caduta tra gli animali trattati rispetto ai controlli è indicativa di una tossicità motoria [132].

I topi sono stati posti al rotarod (Ugo Basile, Milano, Italia) 30 minuti dopo la somministrazione, per un massimo di 5 minuti (300 s) per cinque prove consecutive con un intervallo di 15 minuti tra ciascuna prova [128]. Sono state confrontate le prestazioni rotarod di topi iniettati per via intraperitoneale sia con NLC (10 ml / kg, ip) sia con un veicolo standard (0,05% DMSO, 10 ml / kg, ip). La figura 21 mostra che i dati ottenuti dal sistema NLC e dal gruppo control sono stati significativamente differenti. Infatti, la somministrazione sistemica di NLC non ha ridotto l'abilità dei topi sulla rotating rod.

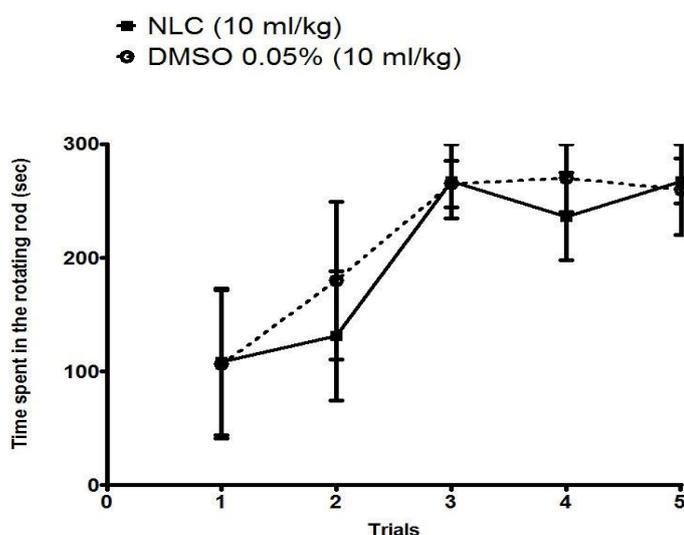


Figura 21. Rotarod Motor Toxicity Test. Sono stati valutati i campioni NLC (10 ml/kg, ip) e il veicolo controllo con lo 0.05% di DMSO (10 ml/kg, ip), per la tossicità motoria nel test accelerating rotarod. Ogni punto rappresenta la media \pm S.E.M. da sei animali

La prova che la somministrazione sistemica di un elevato volume di NLC (10 ml / kg, ip) non ha prodotto una compromissione delle funzioni motorie nel rotarod test, è indicativa di una mancata tossicità motoria e ha suggerito che le formulazioni contenenti NLC possono essere adatte per la somministrazione sistemica.

➤ Ipoacetilazione dell'istone H4

Nel presente esperimento, è stato analizzato il livello di acetilazione di H4 nella lisina 12 (H4K12) mediante analisi Western Blot nel sistema nervoso centrale di topi iniettati per via sistemica con CUR. Studi *in vitro* hanno dimostrato che CUR è un inibitore potente e selettivo dell'attività della p300-HAT [108,109]. Per valutare gli effetti della CUR nel sistema nervoso centrale dopo somministrazione sistemica, è stato valutato il livello di acetilazione nel midollo spinale dopo 90 minuti dall'iniezione. In particolare, con questo esperimento, si è cercato di studiare se il sistema NLC-CUR può influenzare in modo diverso l'acetilazione di H4 nel SNC a fronte di una formulazione standard (DMSO-CUR). Poiché la CUR ha mostrato indurre *in vitro* l'ipoacetilazione di proteine istoniche, l'ipoacetilazione dell'istone H4 nel SNC è stata considerata una misura di permeazione della CUR nel SNC. In figura 22 è riportata l'analisi Western Blot dell'espressione H4K12 acetilata nel midollo spinale del topo dopo l'iniezione intraperitoneale di entrambi NLC-CUR e DMSO-CUR. Il trattamento con DMSO-CUR (100 mg / kg, ip) non differiva dal solo veicolo (DMSO).

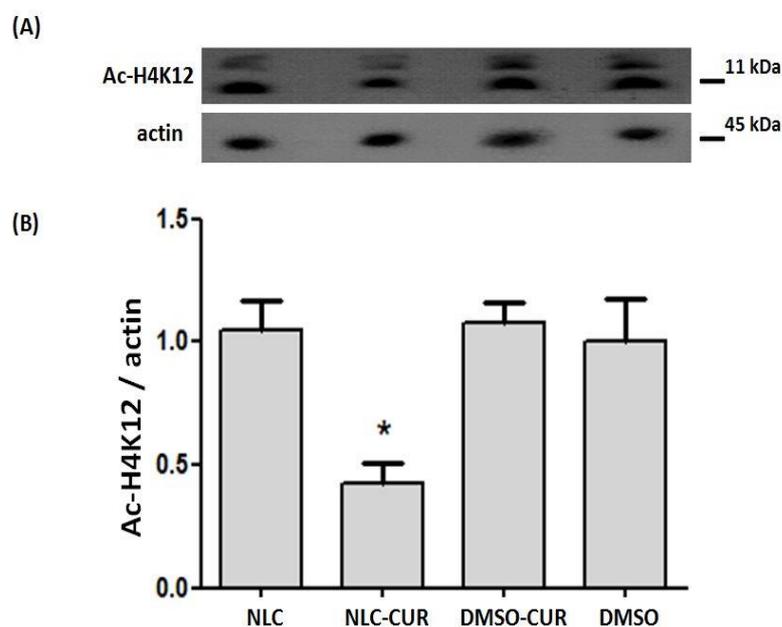


Figura 22. Analisi Western blot dell'acetilazione del H4K12 nella corda spinale del topo. Nel pannello in alto sono rappresentati i livelli di acetilazione H4K12 nel topo dopo somministrazione intraperitoneale delle formulazioni contenenti CUR e dei rispettivi veicoli. In basso le analisi densitometriche del H4K12 acetilato, normalizzato dall'actina. I dati sono la media \pm S.E.M. di 5 animali, $p < 0.05$ (One-way analysis of variance \pm Fisher's protected least significant difference) versus i valori ottenuti negli animali trattati con il rispettivo veicolo.

Tuttavia, quando la CUR è stata inclusa nella NLC (NLC-CUR), è stata osservata una marcata ipoacetilazione di H4K12. Questo è indicativo di una permeazione migliore nel sistema nervoso centrale della CUR quando inclusa nel NLC piuttosto di quando la sostanza è sospesa nel veicolo rappresentato dal DMSO.

4.2 Valutazione dell'inclusione della capsaicina nei sistemi SLN al fine di prevenire la defunzionalizzazione del recettore TRPV1 indotta dalla molecola

La capsaicina (CPS) è un alcaloide derivato dal metabolismo di un acido grasso monoinsaturo. La sua struttura chimica deriva dall'acido vanillico:

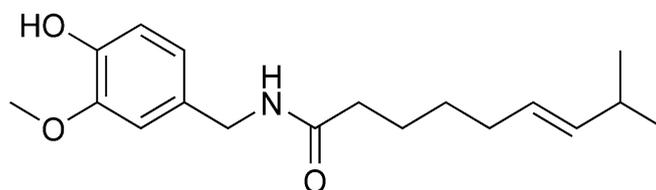


Figura 23. Struttura della capsaicina. Nomenclatura IUPAC: (*E*)-N-(4-idrossi-3-metossibenzil)-8-metil-6nonenamamide.

Dal punto di vista farmacologico la capsaicina è una sostanza molto interessante perché esercita diversi effetti sul nostro organismo [7].

Sebbene la capsaicina sia dotata di un'azione antidolorifica, tuttavia è una sostanza altamente irritante; infatti ad essa è associata una forte sensazione di bruciore dovuta alla stimolazione del recettore vanilloide (TRPV1). Questo è un problema che limita molto l'uso della capsaicina ai fini terapeutici.

Al fine di superare questo inconveniente, durante parte del mio dottorato, mi sono occupata di formulare la capsaicina all'interno di nanoparticelle lipidiche SLN, che sono state caratterizzate mediante spettroscopia di fotocorrelazione (PCS), calorimetria a scansione differenziale (DSC) e microscopia a forza atomica (AFM), quest'ultima tecnica è stata eseguita in collaborazione con l'Università di Modena e Reggio Emilia (CIGS). Inoltre è stata valutata l'efficacia di incapsulamento (EE%), al fine di stabilire la quantità di capsaicina realmente incapsulata.

Nella parte finale del mio lavoro mi sono dedicata alla valutazione dell'attività farmacologica della capsaicina (agonista del recettore vanilloide TRPV1), veicolata mediante i carrier formulati in precedenza.

I motivi che mi hanno spinto alla valutazione di questo aspetto farmacologico della capsaicina risiedono nelle caratteristiche del recettore TRPV1.

Il TRPV1, infatti, è un recettore ampiamente espresso sia nel sistema nervoso centrale che periferico nelle aree coinvolte nella trasmissione del dolore. Durante i processi infiammatori si manifesta un up-regulation dei recettori TRPV1, mentre la down-regulation recettoriale avviene in presenza di dolore neuropatico causato da lesioni.

In seguito ad esposizione cronica alla capsaicina, il recettore TRPV1 va incontro ad un processo di fosforilazione/defosforilazione che contribuisce alla desensitizzazione del recettore, fenomeno noto come "nociceptor defunctionalization" [133,134].

Sebbene, la defunzionalizzazione del TRPV1 venga utilizzata per il trattamento dell'iperalgia termica nelle condizioni di dolore cronico, esistono prove per un ruolo fisiologico del recettore in cui un blocco a lungo termine o la down-regulation di questo potrebbero avere effetti dannosi.

Perciò, risulta interessante formulare la capsaicina all'interno di drug delivery system, come SLN (LN), capaci di indurre un lento rilascio in modo da prevenire l'internalizzazione del recettore e quindi la sua degradazione.

Sulla base di quanto esposto ho valutato in vivo il rilascio di capsaicina inclusa nelle nanoparticelle lipidiche con l'intento di migliorarne il profilo farmacocinetico e di garantirne un lento rilascio, in modo da attivare TRPV1 impedendone l'internalizzazione (down regulation).

L'attivazione dei recettori TRPV1, dopo la somministrazione delle SLNs contenenti capsaicina, è stata valutata misurando il dolore spontaneo indotto dall'iniezione locale nella superficie plantare della zampa posteriore del topo. Inoltre è stata valutata l'espressione del TRPV1 nella pelle del topo trattato con CPS-LN e paragonata ad una soluzione standard di capsaicina tramite analisi western blot.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

➤ Preparazione delle SLN

La tecnica da noi impiegata per la produzione di SLN è stata quella dell'iniezione del solvente [135,136]. È stato inizialmente eseguito uno studio di preformulazione per stabilire il lipide e il tensioattivo da utilizzare. I lipidi testati sono stati: Softisan[®] 100 (coco-gliceridi idrogenati) e Dynasan[®] 116 (tripalmitina); i tensioattivi invece: Lutrol[®] F68 e Tween[®] 80. Dopo un'accurata analisi di dimensioni e PDI, è stato visto che il Softisan[®] 100 e il Tween[®] 80 possedevano le migliori proprietà.

Altri studi di preformulazione hanno riguardato la percentuale di tensioattivo da utilizzare. Anche in questo caso sono stati valutati: PDI (indice di polidispersione), dimensione e potenziale zeta e dai risultati ottenuti la percentuale più idonea di tensioattivo da impiegare è risultata essere l'1,5% di Tween[®] 80.

La tecnica impiegata ha previsto la preparazione di due differenti soluzioni: una acquosa e una lipidica.

Fase acquosa: si misurano 50 ml di acqua a cui vengono aggiunti 0,903 g di Tween[®] 80; fase lipidica: 0,2 g di Softisan[®] 100 vengono aggiunti a 9 ml di etanolo. Le due fasi vengono poste sotto agitazione magnetica (stirrer), la fase lipidica è portata ad una temperatura di 33°C e la fase acquosa rimane a temperatura ambiente. Non appena il lipide sta per fondere viene aggiunto 1 ml di soluzione di capsaicina alla fase lipidica.

La soluzione di capsaicina è stata preparata diluendo 160 mg di capsaicina in 10 ml di etanolo; questa costituisce la soluzione madre da cui viene prelevata la sostanza.

La sostanza aggiunta viene dissolta in maniera ottimale, infatti la formazione di una soluzione omogenea è un requisito primario per il proseguo del processo. La fase lipidica ottenuta, contenente l'attivo, viene prelevata con una siringa e fatta gocciolare lentamente nella fase acquosa in agitazione.

Si ottiene una nanoemulsione che viene lasciata sotto agitazione per 4 minuti.

Dopo di ciò l'intera soluzione viene sottoposta per 2 minuti all'azione degli ultrasuoni utilizzando un sistema ad alta efficienza UP 400 S Ultraschallprozessor (Dr.Hielscher GmbH, Teltow, Germania) che garantisce una elevata intensità di propagazione delle onde sonore.

Il prodotto viene posto su piastra agitatrice (Variomag 500) per circa 24 ore, con l'obiettivo di favorire l'evaporazione del solvente. Dopo l'evaporazione il prodotto ottenuto viene filtrato e conservato a 4°C.

La preparazione finale ha una concentrazione di capsaicina dello 0,026%.

La preparazione del veicolo non caricato è sovrapponibile a quella appena descritta e si distingue solo per l'assenza della capsaicina.

➤ Caratterizzazione

Determinazione delle dimensioni nanoparticellari

La dimensione media delle particelle contenute nelle dispersioni lipidiche e l'omogeneità della popolazione particellare sono stati misurati mediante spettroscopia di fotocorrelazione (PCS), come descritto nei capitoli precedenti.

➤ Studi di calorimetria a scansione differenziale

La calorimetria a scansione differenziale (DSC), è stata utilizzata per caratterizzare il comportamento termico delle nanoparticelle (protocollo descritto precedentemente).

I campioni sono stati sottoposti a due processi endotermici da 10 a 85°C. I crogioli sono stati sigillati ermeticamente e sottoposti ad un singolo riscaldamento da 10 a 85°C. Prima di effettuare il primo step di riscaldamento, tutti i campioni sono stati equilibrati a 10° C per 3 minuti e, in tutti i casi, è stata utilizzata una velocità di riscaldamento o raffreddamento di 5°C/min. I dati sono stati trattati con il software STARe (Mettler Toledo) ed i risultati sono stati espressi come media di due determinazioni.

➤ Determinazione della percentuale di carico

La percentuale di inclusione per la capsaicina nella matrice lipidica della nanoparticelle è stata determinata secondo il protocollo descritto precedentemente.

L'analisi quantitativa (HPLC) dei campioni è stata effettuata mediante curva di calibrazione ottenuta analizzando nelle stesse condizioni analitiche soluzioni di standard capsaicina a concentrazioni variabili tra 10-1000 µg/ml (coefficiente di calibrazione 0.999). L'efficienza di incorporazione della capsaicina è stata espressa come recupero attivo e calcolata usando l'equazione (2).

➤ Analisi morfologica

I campioni sono stati caratterizzati utilizzando il microscopio a forza atomica (AFM AUTOPROBE, Park Instruments, Sunnyvale, CA, USA), presso il centro Interdipartimentale Grandi Strumenti dell'Università di Modena e Reggio Emilia (CIGS). Il principio generale di questo microscopio è quello di rilevare e misurare le forze che intercorrono tra una sonda, costruita da una piccola leva a sbalzo (cantilever) recante una punta acuminata in silicio o nitruro di silicio all'estremità libera, ed il campione. La punta viene collocata nelle strette vicinanze della superficie del campione. Le forze di Van der Waals che agiscono tra la punta e la superficie del campione provocano una deflessione della microleva (la cui costante elastica è nota) in accordo con la legge di Hooke. Il sistema di rivelazione della deflessione della leva è costituito da un fascio laser che foceggia sulla leva stessa e riflette a quattro fotorivelatori. Nella fase iniziale il laser viene centrato in modo che a ciascun rivelatore arrivi una quantità uguale di luce. Durante la scansione ogni perturbazione o avvallamento del campione fa muovere la leva in alto o in basso. Queste variazioni inducono uno spostamento del fascio laser sui rivelatori. Le analisi sono state effettuate "per non contatto", a forza costante. La posizione del campione viene regolata da un piezoelemento capace di muoversi nella direzione Z. Quando ai fotodiodi arriva un segnale di variazione il piezoelemento viene mosso così da riportare la distanza tra campione e leva ad un valore costante e il fascio laser nuovamente foceggiato nella posizione originale. Lo spostamento del piezoelemento viene convertito in segnale topografico del campione. La frequenza di risonanza del sistema punta-cantilever impiegata per l'analisi dei campioni è di 180-190 KHz. Il sistema lavora in aria, con movimento del campione, impiegando uno scanner 100x100 μm . I campioni, diluiti con acqua MilliQ filtrata con filtri 0.22 μm (dil 1:100 v/v), sono stati analizzati senza essere sottoposti a nessun trattamento; una goccia d'ogni preparato è stata posta su un sottile strato di mica (1cm x 1cm c.a.); asportato l'eccesso di liquido, il campione è stato analizzato. Si ottengono due immagini: quella topografica e quella definita "error signal". In questo ultimo caso, l'immagine è ottenuta dal confronto tra due segnali, quello che arriva all'amplificatore, che rappresenta l'ampiezza di vibrazione del cantilever, e un'ampiezza di riferimento prestabilita (set point). L'"error signal", proporzionale alla differenza dei

due segnali, influenza il movimento in z. L'immagine così ottenuta mette in evidenza in modo netto anche piccole variazioni superficiali.

➤ Studio in vivo

Animali

Sono stati utilizzati topi maschi CD1 di età compresa tra le 8 e 9 settimane. Tutte le procedure sono state approvate dalla commissione istituzionale della cura e uso di animali (IACUC). Gli animali sono stati mantenuti in cicli luce/buio di 12 ore e con libero accesso a cibo e acqua. Per gli esperimenti di comportamento, i topi sono stati acclimatati alla stanza dell'esperimento, e i test sono stati eseguiti in cieco per quanto concerne il trattamento farmacologico degli animali.

Somministrazione in vivo

Per la valutazione del dolore spontaneo, sono stati somministrati con iniezione sottocutanea dieci microlitri di una soluzione standard di farmaco (CPS-STD), di una dispersione di SLN contenente capsaicina (CPS-LN), e dei rispettivi veicoli (VEH-STD e VEH-LN). CPS-STD è stata formulata usando il Tween[®] 80 (10% w/w), etanolo (10% w/w), CPS (0.026% w/w) e acqua distillata (79,97% w/w). L'iniezione sub-cutanea è stata eseguita nella zampa posteriore destra (somministrazione intra-plantare, i.pl) del topo immediatamente prima della valutazione comportamentale.

Dolore spontaneo

I topi CD1 che hanno ricevuto l'iniezione intra-plantare delle due differenti formulazioni di farmaco (CPS-STD e CPS-LN) e dei rispettivi veicoli (VEH-STD e VEH-LN), sono stati posti in un gabbia in plexiglas immediatamente dopo l'iniezione, è stata inoltre misurata la durata del lifting della zampa posteriore e del licking durante i primi 5 minuti. Tutti i test comportamentali sono stati analizzati da un osservatore ignaro al trattamento degli animali.

Preparazione degli estratti delle proteine dalla pelle del topo

Dopo 7 giorni dall'iniezione i.pl, gli animali sono stati sacrificati e sono state rimosse le biopsie della pelle dal sito di iniezione. Gli omogenati di pelle sono stati ottenuti come

descritto precedentemente [137]. La concentrazione delle proteine è stata misurata usando il kit Bio-Rad Dc Protein secondo il protocollo di lavorazione.

Analisi western blot

Sono stati separati 10 µg della proteina totale dal 10% di gel elettroforetico di poli-acrilamide (SDS) e trasferiti elettroforeticamente nelle membrane di nitrocellulosa proteina-sensibili (Criterion blotter; Bio-Rad laboratories, Hercules, CA). Le membrane sono state bloccate in Odyssey blocker (LI-COR Biosciences, Lincon, NE) per 1 h; sono stati usati i seguenti anticorpi primari: anticorpo policlonale anti-TRPV1 (1:1000, Santa Cruz); anticorpo monoclonale anti-actina (1:1000, Sigma).

Sono stati usati come anticorpi secondari: “goat anti-rabbit” (IRD800CW) e “goat anti-mouse” (Alexa 680, LI-COR, Bioscience). Le proteine sono state rilevate con sistema Odyssey Infrared Fluorescence Imaging (LI-COR). I valori sono stati espressi come intensità integrate.

RISULTATI

➤ Caratterizzazione e preparazione delle SLN

Dagli studi di preformulazione (PCS), effettuati per individuare la migliore combinazione tra tensioattivo e lipide da utilizzare, sono stati ottenuti i risultati riportati nella tabella seguente:

Lipide-Tensioattivo	Capsaicina	Dimensioni (nm)	PDI
Softisan[®] 100/Lutrol[®] F68	Sì	290,2	0,199
Softisan[®] 100/Lutrol[®] F68	No	299,5	0,258
Softisan[®] 100/Tween[®] 80	Sì	242,2	0,188
Softisan[®] 100/Tween[®] 80	No	218,9	0,214
Dynasan[®] 116/Tween[®] 80	Sì	714,8	0,300
Dynasan[®] 116/Lutrol[®] F68	Sì	296,0	0,366

Tabella 11. Dimensioni e PDI di varie combinazioni tensioattivo/lipide.

Dai risultati ottenuti, le nanoparticelle formulate utilizzando Softisan[®] 100 come lipide solido e Tween[®] 80 come tensioattivo, hanno presentato un basso indice di polidispersione.

Le dimensioni particellari ottenute utilizzando questi eccipienti sono simili sia in presenza che in assenza della capsaicina, variando da 218 nm a 242 nm.

Il nostro studio ha previsto la valutazione della concentrazione di Tween[®] 80 più idonea ai nostri scopi. Anche in questo caso i parametri valutati sono stati i valori dimensionali e la distribuzione della popolazione.

In questo studio le concentrazioni di tensioattivo variavano dal 2,25% all'1% e le SLN erano non caricate.

Dai risultati ottenuti, le migliori preparazioni risultavano essere quelle con una concentrazione di tensioattivo dell'1,5%, come dimostrato dai seguenti grafici:

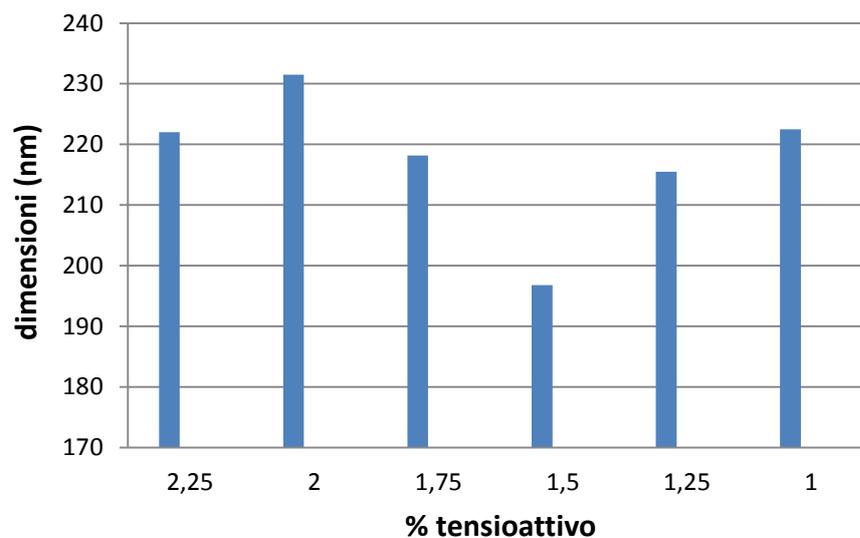


Figura 24. Dimensioni in funzione della quantità di tensioattivo.

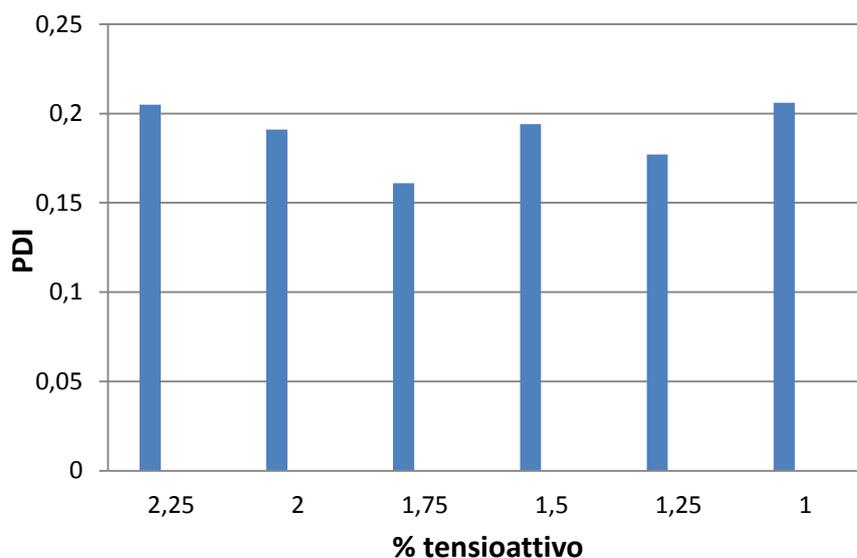


Figura 25. PDI in funzione della quantità di tensioattivo.

Una volta stabilite le materie prime e la percentuale di tensioattivo, si è proceduto ad effettuare la caratterizzazione delle SLN contenenti capsaicina:

Tensioattivo		Dimensioni (nm)	PDI
%	Grammi		
1,5	0,903	238,8	0,228

Tabella 12. Dimensioni, PDI, potenziale zeta di un SLN contenente capsaicina.

Anche in questo caso i risultati hanno confermato che la concentrazione all'1,5% risultava essere la più idonea per la formulazione di SLN, caratterizzate da validi parametri nanotecnologici.

Infatti le SLN cariche avevano una dimensione media di circa **238±9.8 nm** e un indice di polidispersione (**0,228**) congruo alle aspettative. Come si può notare, rispetto alle nanoparticelle vuote, il caricamento delle nanoparticelle con la capsaicina ha indotto un aumento delle dimensioni medie: da **219.16±10,9 nm** a **238±9.8 nm**.

Le nostre SLN ottenute, hanno perciò dato dei dati positivi riguardo alle dimensioni medie; PDI, il cui valore ha confermato l'omogeneità delle nanoparticelle.

Per quanto concerne l'efficacia di caricamento delle nanoparticelle, è stato osservato che la percentuale di capsaicina incapsulata risultava essere di **97,3%**. L'elevata efficienza di incapsulazione dimostrava quindi che la capsaicina si prestava bene ad essere veicolata dalle SLN.

Le nostre preparazioni sono state analizzate mediante microscopia a forza atomica, ottenendo immagini che hanno confermato l'ottimo indice di polidispersione e le dimensioni medie precedentemente ricavate tramite studio in PCS.

Dalle analisi visive delle fotografie in microscopia AFM, è risultato che le nanoparticelle presentavano una forma prossima alla sfericità.

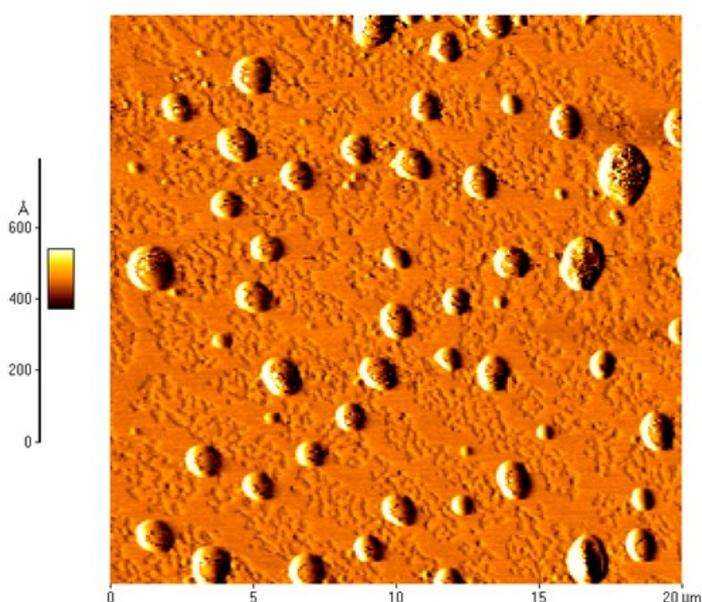


Figura 26. Immagine delle SLN caricate ottenuta con AFM.

Tale indicazione è piuttosto importante, in quanto, come riportato in letteratura, le particelle sferiche hanno una scarsa tendenza ad aggregarsi.

Per stabilire il comportamento di fusione della matrice lipidica sia come materia prima che come SLN, sono stati effettuati studi tramite DSC [131,138].

Come si nota dalla figura 27, il lipide puro ha un punto di fusione di 40°C. Le curve di riscaldamento delle SLN cariche e non cariche differiscono molto da quelle del lipide puro, dal momento che il picco presente è molto più piccolo. Inoltre il punto di fusione

è osservato a valori più bassi rispetto al Softisan[®] 100 (shift del melting point); questo abbassamento è dovuto al basso punto di ebollizione dei componenti delle SLN.

Questi dati ci consentono di capire che la struttura cristallina del Softisan[®] 100 è stata modificata dalla formulazione in SLN, con conseguente formazione di una nuova fase che presentava un ordine minore [139].

Questo è dovuto all'interazione del lipide con le altre componenti del sistema. Se così non fosse stato, il lipide non si sarebbe integrato nel sistema e avremmo trovato differenti picchi.

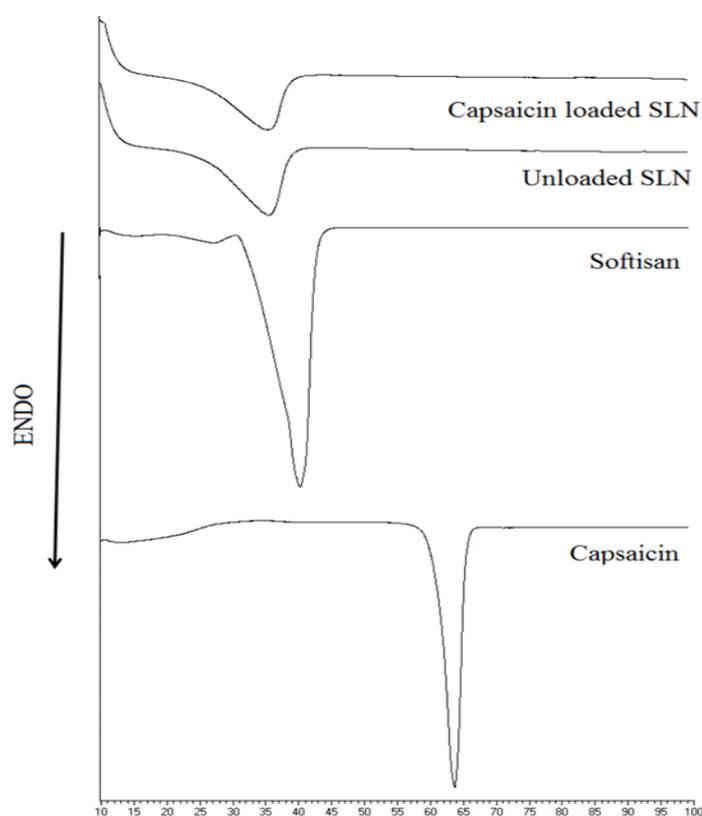


Figura 27. Termogramma DSC di materie prime, SLN caricate, SLN non caricate.

Il punto di fusione della capsaicina è di 64°C. La curva di riscaldamento delle SLN cariche differisce da quella della capsaicina pura: anche in questo si è verificato uno shift del melting point ed un picco nettamente meno pronunciato rispetto alla sostanza pura. Questo conferma che la capsaicina ha interagito con il sistema lipidico nanoparticellare.

Possiamo quindi concludere che i risultati di DSC hanno confermato le nostre attese, attestando la formazione delle SLN.

➤ Studio in vivo

L'attivazione acuta dei recettori TRPV1 indotta dalla capsaicina porta ad una soglia del dolore più bassa [140]. Il dolore spontaneo indotto dall'iniezione intra-plantare della capsaicina è stato valutato nel topo per 5 minuti dopo la somministrazione e misurato in funzione del liking e del comportamento di shaking della zampa in cui è stata effettuata l'iniezione della formulazione (figura 28).

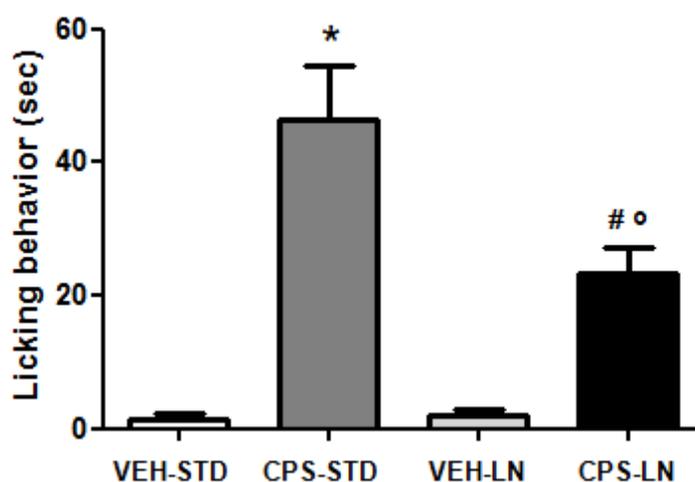


Figura 28. Dolore spontaneo dopo iniezione intraplantare di CPS.

L'inclusione della capsaicina nella matrice lipidica delle nanoparticelle lipidiche induce una più bassa risposta al dolore paragonata al farmaco disciolto in un veicolo standard (CPS-STD). Il risultato di questo esperimento dimostra che il farmaco incluso nella matrice lipidica è stato rilasciato in modo controllato e ritardato. Non sono state osservate differenze nel comportamento al dolore dopo somministrazione dei veicoli VEH-STD e VEH-LN (figura 28).

➤ Espressione nella pelle del recettore TRPV1

L'esposizione prolungata alla capsaicina può desensitizzare il recettore TRPV1 o indurre l'internalizzazione e la degradazione [141]. Coerente con i dati in letteratura, l'iniezione i.pl. della CPS-STD induce una significativa riduzione dell'espressione del TRPV1 nella pelle del topo come mostrato in figura 29.

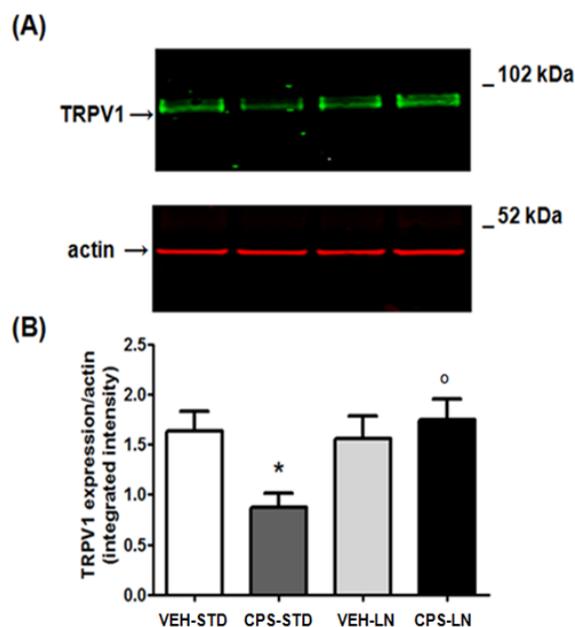


Figura 29. Analisi western blot dei recettori TRPV1 nella pelle del topo. Risulta abbastanza interessante come l'inclusione della CPS nelle nanoparticelle sembrerebbe prevenire la down-regulation del recettore TRPV1 presente nella pelle, un effetto che probabilmente è riconducibile ad un lento rilascio del farmaco che in questo modo previene l'internalizzazione del TRPV1 e la sua degradazione [142].

4.3 Valutazione della stabilità del Coenzima Q₁₀ in veicoli nanoparticellari a matrice lipidica di ultima generazione (NLC)

Il coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀) ha una struttura chimica simile alla vitamina K: consta di un nucleo centrale, il 2,3-dimetossi-5-metilbenzochinone, e di una catena laterale in posizione 6 costituita da unità isopreniche, tutte in configurazione *trans* e con un solo doppio legame [143]. La lunghezza della catena laterale varia nelle diverse specie animali, e nell'uomo è caratterizzata da 10 unità isoprenoidi, da cui il nome di coenzima Q₁₀ (figura 30).

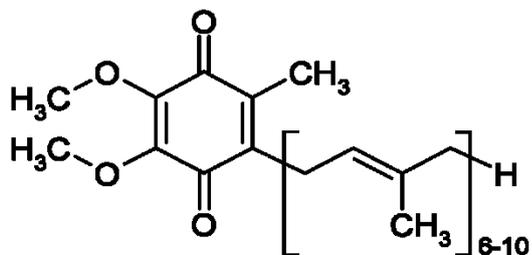


Figura 30. Struttura chimica del Coenzima Q₁₀.

Il coenzima Q10, oltre ad essere contenuto nei cereali, soia ed olii vegetali, è presente in tutte le membrane cellulari. Grazie alla sua struttura lipofila è in grado di diffondere rapidamente all'interno del doppio strato fosfolipidico. Nei mitocondri svolge un ruolo di fondamentale importanza in quanto è implicato nei processi energetici della cellula.

Il CoQ10 espleta le sue attività bioenergetiche e antiossidanti anche a livello cutaneo.

Come è noto, l'esposizione della pelle alle radiazioni ultraviolette provoca numerosi effetti dannosi: la foto-irradiazione è una delle cause primarie della formazione di ossigeno singoletto e anione superossido. Questi ROS (*Reactive Oxygen Species*) sono altamente instabili e promuovono il foto-invecchiamento (*photoaging*). Diversi esperimenti sono stati condotti al fine di valutare l'efficacia del CoQ10 nel prevenire o ritardare gli effetti del *photoaging* dovuto ai raggi UV-A/UV-B.

Un altro fattore che contribuisce al foto-invecchiamento è la degradazione delle fibre di collagene ad opera delle collagenasi; infatti è stato osservato che il trattamento cellulare con 10 µg/mL di CoQ10 è in grado di ridurre del 50% l'espressione dell'mRNA delle collagenasi [144].

Uno dei problemi principali nelle preparazioni a base di Coenzima Q10 sta nella sua struttura altamente sensibile alla luce e al calore, che determina il passaggio dalla forma ridotta a quella ossidata (Figura 31; 33), per perdita di un protone e formazione di un intermedio radicale semichinonico (Figura 32).

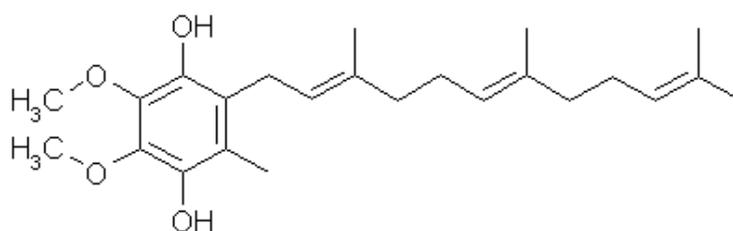


Figura 31. Forma ridotta del Q10

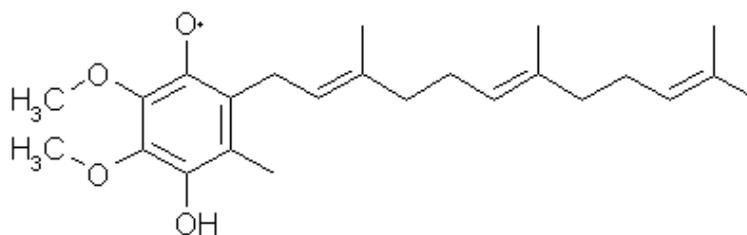


Figura 32. Forma semichinonica del Q10

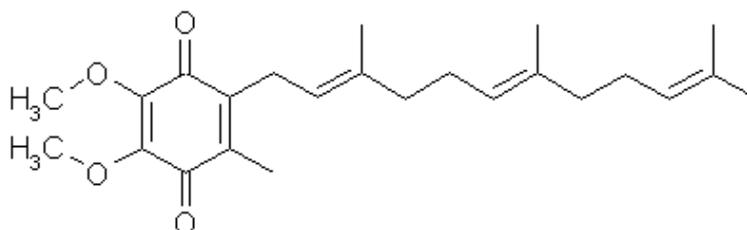


Figura 33. Forma ossidata del Q10

Per questo motivo è necessaria la conservazione al riparo da fonte di luce e di calore e la scelta di un opportuno veicolo risulta cruciale per le preparazioni a base di coenzima Q10. Sulla base delle considerazioni finora esposte, parte del mio progetto di ricerca ha riguardato la preparazione e la caratterizzazione di nanoparticelle a struttura lipidica (NLC) contenenti il Coenzima Q10, con lo scopo di ottimizzare il profilo di stabilità e garantire una efficace somministrazione di questo principio attivo.

A tale proposito le preparazioni di NLC contenenti il Coenzima Q10 nella forma ridotta (CoQ10-red) o in quella ossidata (CoQ10-ox), sono state formulate mediante tecnica ad ultrasuoni (US) e successivamente caratterizzate mediante PCS (spettroscopia di fotocorrelazione) al fine di determinare le dimensioni medie della sospensione nanoparticellare (MD), la sua omogeneità mediante valutazione dell'indice di polidispersione (PDI) e le caratteristiche di stabilità nel tempo del sistema, tramite misure di potenziale Zeta.

Lo studio ha inoltre previsto la determinazione dell'efficacia di incapsulamento del sistema (EE%) mediante tecnica di ultrafiltrazione tangenziale e la valutazione della stabilità del sistema in seguito a liofilizzazione e successiva risospensione del pellet lipidico.

Infine la validità del complesso Q10-red e NLC è stata testata *in vitro* su una coltura primaria di fibroblasti di derma umano, isolati e acquistati presso il laboratorio centro substrati cellulari dell'istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Brescia.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

➤ Preparazione NLC-Q10

Il lipide solido, Precirol[®] ATO 5 (gliceril palmitostearato)/ Compritol[®] 888 ATO (gliceril dibehenate) (10 gr) è stato fuso a 70°C e ad esso sono stati aggiunti il Miglyol[®] 812 (trigliceride caprilico/caprico) (4 gr) e il CoQ₁₀ (1 gr). La fase lipidica fusa è stata fatta gocciolare in 93 mL di una soluzione acquosa di Lutrol[®] F68 (4 gr) e Tween[®] 80 (3 gr) mantenuta alla stessa temperatura. La pre-emulsione così ottenuta è stata agitata con un turbomixer da banco (UltraTurrax T25) a 8000 rpm per 10 minuti verificando che la temperatura durante tale processo sia mantenuta a 70°C. Essa è successivamente sottoposta all'azione degli ultrasuoni per 10 minuti utilizzando un sistema ad alta efficienza UP 400 S Ultraschallprozessor che garantisce una elevata intensità di propagazione delle onde sonore. L'emulsione prodotta è stata successivamente raffreddata in un bagno ghiacciato dopo essere stata diluita in 800ml di acqua fredda sotto l'agitazione di un mescolatore ad elevata velocità (Silverson) per 5 minuti per garantire la rapida solidificazione della dispersione nanoparticellare. La preparazione viene quindi conservata a 4°C in un recipiente opaco. Si ottiene un valore di concentrazione di CoQ₁₀ pari a :

$$1000 \text{ mg} / 915 \text{ ml} = 1,09 \text{ mg/ml}$$

La preparazione del veicolo non caricato (bianco) è stata simile alla procedura precedentemente descritta.

➤ Distribuzione delle dimensioni particellari

La dimensione media, l'indice di poidispersione, il potenziale zeta e la percentuale di Q₁₀ intrappolata nella matrice lipidica della nanoparticella sono stati determinati con le stesse metodiche descritte in precedenza.

Al fine di valutare la stabilità della formulazione, è stato eseguito uno studio sulla liofilizzazione, previo congelamento del campione, e sulla risospensione del campione liofilizzato in acqua.

Un'aliquota di 50 mL della sospensione nanoparticellare è stata trattata con percentuali differenti di crioprotettore.

L'aggiunta del crioprotettore è necessaria per diminuire l'aggregazione delle NLC e ottenere una migliore ridispersione del prodotto secco. Tipici agenti crioprotettivi sono il sorbitolo, il mannosio, il trealosio, il glucosio e il polivinilpirrolidone. Essi diminuiscono l'attività osmotica dell'acqua e la sua cristallizzazione favorendo il passaggio allo stato vetroso del campione congelato. Gli agenti crioprotettori si dispongono in modo tale da evitare che le distinte nanoparticelle entrino in contatto, inoltre interagiscono con le teste polari del tensioattivo portando alla formazione di uno "pseudo guscio di idratazione".

La procedura di congelamento influenzerà così la struttura del cristallo e conseguentemente le proprietà del liofilizzato [145].

Il crioprotettore da noi usato è stato il glucosio. In una prima indagine è stata valutata la concentrazione allo 0.1% di glucosio. Il sistema risultante dalla liofilizzazione e risospensione in acqua è stato analizzato al *light scattering* quindi scartato, in quanto non ha mostrato adeguate proprietà crioprotettive.

Per tale motivo, abbiamo usato altre due differenti concentrazioni di glucosio: 0.5% e 1%.

Il liofilizzato è stato pesato, successivamente diluito in acqua bidistillata fino al raggiungimento dell'aliquota di 50 mL di campione iniziale.

Questo campione è stato caratterizzato mediante analisi PCS e potenziale Zeta.

La risospensione in acqua bidistillata ha permesso di valutare l'effetto sulla stabilità della preparazione in seguito alla liofilizzazione, rapportando i principali parametri di caratterizzazione ottenuti (MD, PDI e potenziale Zeta) a quelli del campione originario.

➤ Studio in vitro su cellule

Al fine di valutare l'azione delle nanoparticelle vuote e caricate con Q10 ossidato e ridotto, sono stati condotti numerosi esperimenti su colture primarie di fibroblasti di derma umano.

Le cellule sono state coltivate in un terreno MEM (*Minimum Essential Medium*), contenente glucosio, amminoacidi, sali minerali e vitamine, rosso fenolo come indicatore di pH e arricchite con siero bovino fetale, penicillina e glutammina. Le cellule sono state mantenute in CO₂ al 5% in incubatore a 37°C. Una volta raggiunta la confluenza, la crescita cellulare si arresta e si procede al distacco e al trasferimento delle cellule in nuove piastre con un'opportuna quantità di Tripsina-EDTA 25%. Sulla coltura primaria di fibroblasti, una volta raggiunta la senescenza di linea, è stato possibile condurre le diverse procedure sulle subcolture cellulari.

Viene eseguita l'incorporazione del Coenzima Q10 nei fibroblasti in coltura. Il mezzo di crescita, sotto cappa sterile e a flusso laminare, viene arricchito con aliquote di NLC vuote e contenenti Q10 nelle due forme, ossidata e ridotta. L'attenzione è stata focalizzata sugli effetti del Q10 a concentrazione di 15 µg/mL. Una volta preparati i mezzi supplementati, le NLC sono state dispensate nelle piastre multipozzetto contenenti fibroblasti. Successivamente sono state incubate per 24 ore a 37°C in CO₂ al 5%. Trascorse 24 ore dall'incorporazione con il Q10 le cellule sono state irradiate con UV-A per un tempo stabilito, usando una lampada commerciale UV di tipo 3.

Tra i saggi eseguiti vi sono: *MTT assay*, un saggio colorimetrico che permette di valutare la vitalità cellulare sfruttando un agente ossidante cromogeno (*MTT, sale di tetrazolio*) che viene ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali delle cellule vive a un composto cromogeno insolubile, impermeabile alle membrane; ne viene permessa così l'entrata nella cellula se le catene di trasporto elettronico sono ancora metabolicamente attive.

L'analisi DCFH-DA sfrutta la diclorofluoresceina diacetato come sonda per specie ossidanti e permette la determinazione della formazione di ROS (*Reactive Oxygen Species*) a seguito dell'esposizione dei fibroblasti a raggi UV-A. In presenza di specie reattive all'ossigeno, la DCFH viene ossidata a 2,7-diclorofluoresceina (DCF), una molecola fortemente fluorescente. La fluorescenza della DCF intracellulare può essere usata come riferimento per quantificare lo stress ossidativo totale delle cellule. Questa verrà poi valutata grazie alla lettura dei risultati al citofluorimetro che rileva ogni singola cellula vitale, ottenendo con precisione la percentuale di cellule con livelli di ROS aumentati.

L'analisi JC-1, dal nome del colorante cationico di natura lipofila JC-1, permette di valutare la caduta del potenziale mitocondriale, dovuta alla formazione nelle cellule di ROS, responsabili della transizione della permeabilità mitocondriale (*MPT*), uno dei primi eventi che avviene durante l'apoptosi cellulare e nel quale il gradiente elettrochimico della membrana mitocondriale collassa.

Il *Comet Assay* consente di determinare il danno indotto al DNA endogeno o esogeno, rilevato come lesione del singolo o del doppio filamento. Viene eseguita l'elettroforesi del DNA, se rimane integro migra in modo compatto e assume forma sferica, se danneggiato si sposta più velocemente verso l'anodo e appare come una cometa con una testa e una coda. Infine viene colorato con bromuro di etidio e visualizzato con microscopio a fluorescenza. Sarà inoltre possibile registrare quantitativamente l'alterazione del DNA. Questo saggio permette di valutare il danno ossidativo al DNA indotto da radiazione UV-A su fibroblasti in coltura supplementati con Q10.

L'estrazione dello RNA totale dalla coltura, trattata con Q10 ossidato e ridotto, incubata e poi esposta agli UV-A per 15 minuti e la susseguente retrotrascrizione RealTime PCR ci ha permesso di quantificare in tempo reale il prodotto di PCR nella fase esponenziale della reazione di amplificazione.

➤ *Determinazione HPLC*

Il sistema HPLC utilizzato nel corso della sperimentazione era equipaggiato con un sistema di pompe Beckman modello 126, un detector Beckman modello 166 (Beckman Instruments, San Ramon, CA) e un iniettore equipaggiato con loop da 200 μ L (Rheodyne 7725i, ottenuto da Sepulco, Milano, Italia). La colonna utilizzata è stata una Supelcosil LC18 (Sepulco) 25 x 0,46 cm i.d. 5 μ m, precolonna LC18S, 2cm (Sepulco). Tra l'iniettore e la precolonna è stato posto un filtro in linea A-701 (Upchurch, Scientific, Inc., Oak Harbor, WA). Il rivelatore a fotodiodi per l'analisi dello spettro UV del picco del Q10 è un SPD-M (Shimadzu, Tokyo). La fase mobile era composta da una miscela metanolo/acqua (65:35). La velocità di flusso è stata fissata a 1 mL/min, la rivelazione è stata effettuata a 275 nm.

RISULTATI

➤ Caratterizzazione e preparazione delle NLC ossidate e ridotte

Le analisi effettuate mediante spettrofotometria di fotocorrelazione (PCS) hanno permesso di ricavare informazioni sulle dimensioni e sulla omogeneità della popolazione nanoparticellare oggetto del presente studio. Per valutare la migliore affinità del lipide nei confronti dell'attivo abbiamo eseguito due differenti preparazioni, una contenente il lipide Compritol® 888 ATO, l'altra il Precirol® ATO 5.

Dopo la preparazione abbiamo eseguito la caratterizzazione delle NLC non caricate, in termini di MD, PDI e potenziale Zeta.

Al fine di valutare la stabilità del sistema in seguito a liofilizzazione, abbiamo aggiunto alla sospensione nanoparticellare lo 0.5% e l'1% di crioprotettore, rappresentato dal glucosio. Abbiamo così creato quattro differenti campioni, due di questi a base di Compritol® 888 ATO e due a base di Precirol® ATO 5, ciascuno con concentrazioni allo 0.5% e all'1% di crioprotettore.

I campioni liofilizzati sono stati risospesi in H₂O fino a 50 mL e trattati con un bagno ad ultrasuoni per 10 minuti a una temperatura di 30°C.

La caratterizzazione delle NLC vuote, prima e dopo liofilizzazione, ha fornito i valori mostrati nelle figure 34, 35. (tabella 13).

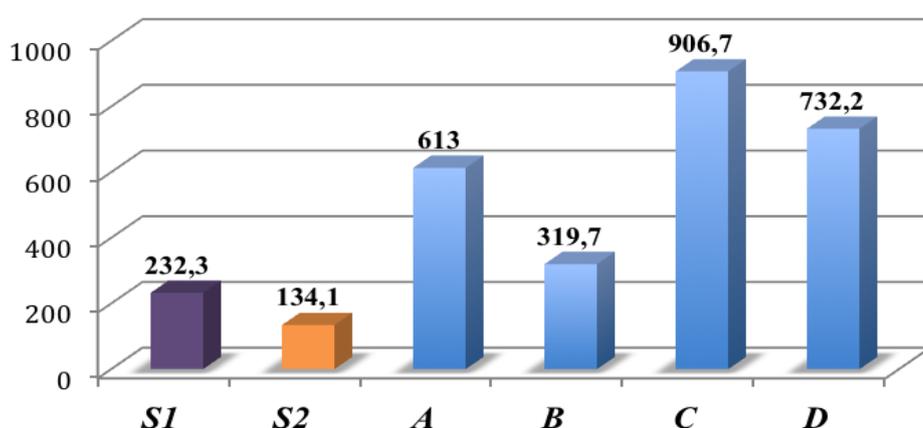


Figura 34. Dimensioni medie

Il campione S1 rappresenta lo standard Precirol[®] ATO 5, il campione S2 lo standard Compritol[®] 888 ATO, il campione A la preparazione a base di Precirol[®] ATO 5 con lo 0.5% di glucosio, il campione B la preparazione a base di Precirol[®] ATO 5 con lo 1% di glucosio, il campione C la preparazione a base di Compritol[®] 888 ATO con lo 0.5% di glucosio, il campione D la preparazione a base di Compritol[®] 888 ATO con lo 0.1% di glucosio.

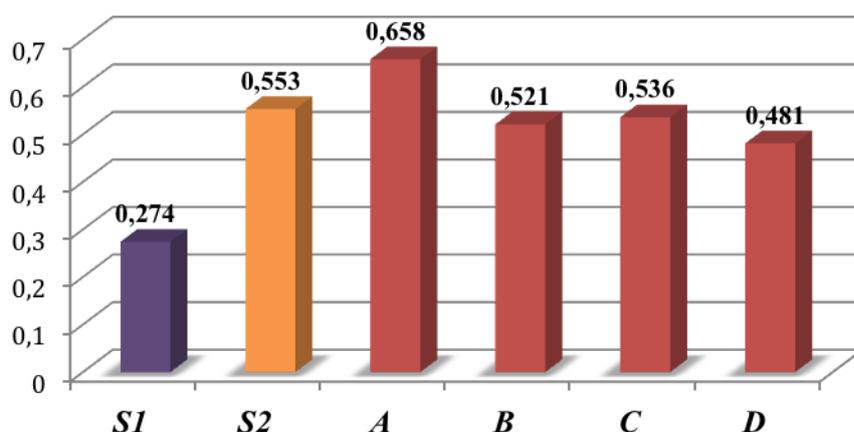


Figura 35. Indice di polidispersione

S1	S2	A	B	C	D
-26,2	-26,7	-33,8	-30,9	-30,9	-28,3

Tabella 13. Potenziale Zeta

Come si evince dai seguenti grafici e dalla tabella, il campione B è quello che presenta i migliori valori in termini di MD, PDI e potenziale Zeta e in particolare questo campione mostra valori di MD di **319,7 nm**; di PDI **0,521**; potenziale Zeta **-30,9 mV**.

Per questo motivo è stato scelto come campione modello del caricamento dell'attivo.

Dai valori riportati sopra, notiamo che i campioni contenenti Compritol[®] 888 ATO, alle percentuali di glucosio 0.5% e 1% non trovano corrispondenza rispetto al campione originario. E' per questo che la preparazione a base di Compritol[®] 888 ATO è stata scartata. Inoltre dai risultati derivanti dalla caratterizzazione di questi campioni, si è concluso che la concentrazione all'1% di crioprotettore è la più adeguata ai fini della stabilizzazione del sistema liofilizzato.

Successivamente abbiamo caricato le NLC a base di Precirol[®] ATO 5 con il Q10 ossidato e con il Q10 ridotto. E' stata anche qui eseguita la stessa indagine compiuta sulle NLC non caricate, valutando i parametri di caratterizzazione forniti dall'analisi di PCS e potenziale Zeta come mostrato nelle seguenti figure:

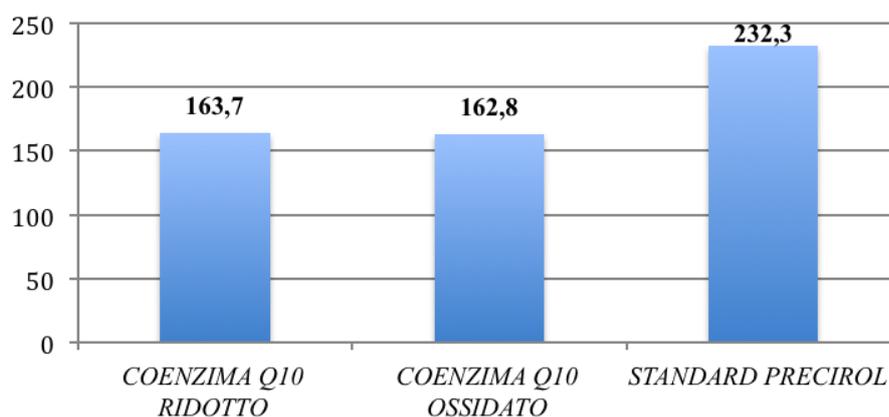
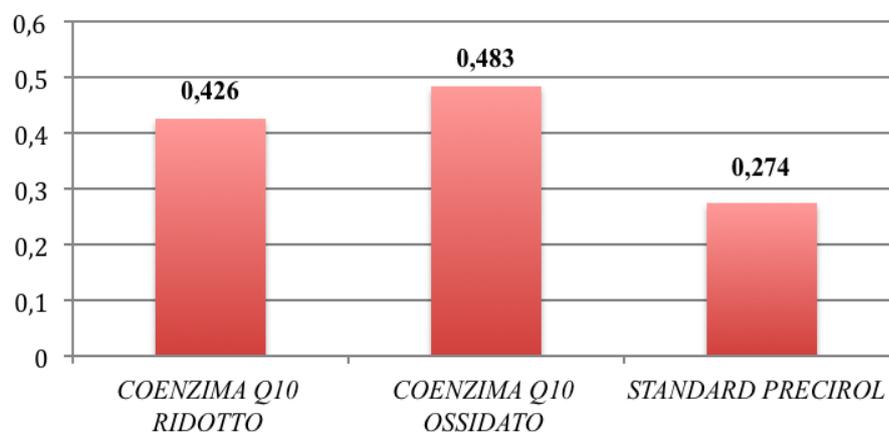


Figura 36. Dimensioni Medie del campione NLC-Precirol[®] ATO 5

A



B

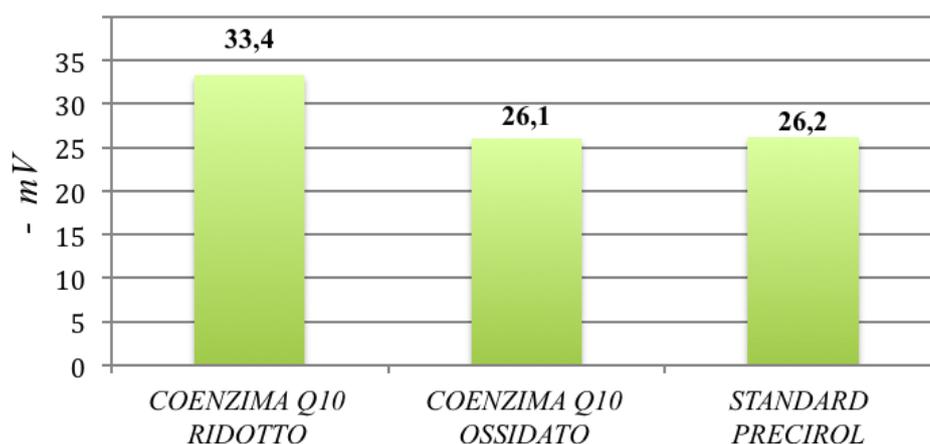


Figura 37. Indice di polidispersione (A) e Potenziale zeta (B) del campione NLC-Precirol® 5 ATO

➤ Efficacia di incapsulamento

Dalle analisi condotte tramite lo studio in HPLC, sono stati riscontrati i seguenti valori di percentuale di incluso, come riportato nella seguente tabella:

Formulazione	Drug Recovery %
NLC+ Q ₁₀ ox	86,8
NLC+ Q ₁₀ red	88,1

Tabella 14. Valori di percentuale di incluso

Come si evince dalla tabella, i valori di incluso sono molto simili sia nel caso delle NLC caricate con CoQ10 ossidato che ridotto. Inoltre partendo dal presupposto che le NLC formulate, erano costituite da una matrice solida lipidica contenente dei nanocompartimenti di Miglyol[®] 812 [146], è stato appurato che la presenza del Miglyol[®] 812 fosse utile al fine di incrementare il contenuto del coenzima all'interno del sistema nanoparticellare. Questi risultati sono sicuramente riconducibili alla elevata solubilità dei due attivi nei confronti del lipide oleoso (Miglyol[®] 812).

➤ *Studio in vitro su colture cellulari*

Nell'ambito del progetto sono stati usati raggi UV-A per promuovere una condizione di stress ossidativo nelle colture di fibroblasti di derma umano. E' stato valutato l'eventuale effetto antiossidante/foto-protettivo del Q10 mettendo a confronto la forma ossidata (ubichinone) con quella ridotta (ubichinolo).

Nelle nostre condizioni sperimentali, sono state preparate sospensioni di NLC-/+ ubichinone/ubichinolo alla concentrazione di 15 µg/mL in MEM, partendo da concentrazioni *stock* di 1 mg/mL. E' stata scelta questa concentrazione finale per tutti gli esperimenti svolti. Come primo parametro, è stata valutata l'eventuale citotossicità indotta dalle NLC con e senza il CoQ10 sulle cellule alle concentrazioni impiegate, utilizzando il saggio MTT. I fibroblasti sono stati incubati con NLC-/+ ubichinone/ubichinolo per 24 ore e in seguito irraggiati per 15 minuti, apportando una dose UV-A pari a 27.5 J/cm² (pari a quella determinata da un'ora e mezza di esposizione solare). Il saggio MTT è stato effettuato 24 ore dopo l'irraggiamento.

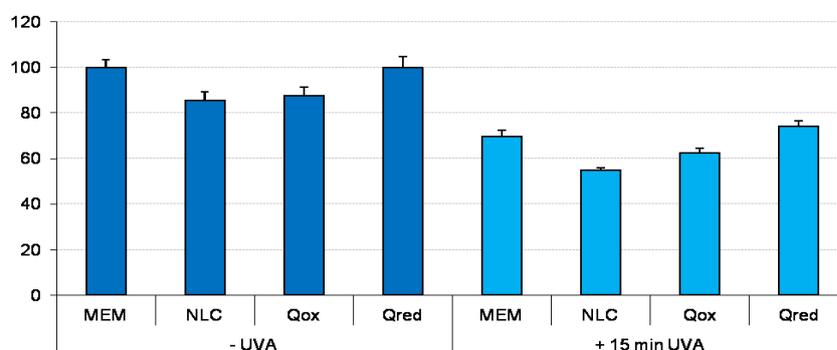


Figura 38. Vitalità cellulare nei campioni non irradiati e trattati con UV-A, analizzati 24 ore dopo l'irraggiamento

Per verificare la tossicità o meno delle NLC sui fibroblasti, è stato utilizzato come controllo il mezzo di coltura per la crescita cellulare (MEM). Come mostrato in figura 38, si può notare che, rispetto alle cellule non irradiate, impostate per definizione al 100% di vitalità, nei fibroblasti incubati con le NLC la percentuale di cellule vitali diminuisce (intorno all'85%). Ciò dimostra che le nanoparticelle, pur non essendo tossiche per le cellule, in quanto la vitalità rimane comunque alta, hanno in qualche modo compromesso alcune funzioni cellulari, determinando circa il 15% di cellule morte o metabolicamente non attive. L'aggiunta di un antiossidante come il CoQ10 è stata rilevante per riportare la vitalità a più alti livelli, in particolare la forma ridotta (ubichinolo), che è quella attiva nei sistemi biologici (vitalità del 100%). L'aumento della vitalità in presenza di CoQ10 ridotto, sia nelle cellule irraggiate che non irraggiate, sottolinea un effetto protettivo nei confronti delle NLC, ma l'ubichinolo non è stato tuttavia in grado di proteggere le cellule dal danno indotto dai raggi UV-A. Abbiamo inoltre valutato la produzione dei livelli intracellulari di ROS, monitorando la produzione di specie radicaliche a tempi diversi di esposizione UV-A. L'analisi del citogramma, ottenuto da cellule irradiate per 10, 15, 20 minuti e subito analizzata, ci mostra un notevole aumento dei ROS dopo 15 e 20 minuti di irraggiamento (Figura 39).

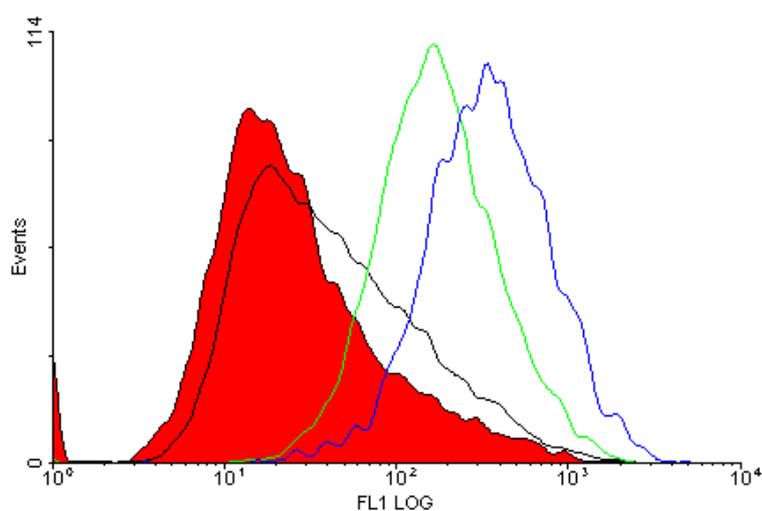


Figura 39. Citogramma di cellule esposte a UV-A. In blu, verde, nero: 10, 15, 20 minuti

Ciò è confermato da un considerevole incremento di ROS dopo 20 minuti di irraggiamento; successivamente questi diminuiscono gradualmente nell'arco di 60 minuti (Figura 40).

Da questi dati si è deciso di irraggiare i fibroblasti per 15 minuti (dose UV-A di 27.5 J/cm²), per le analisi da effettuare a 24 ore dopo l'irraggiamento, e per 20 minuti (dose UV-A di 36.4 J/cm²) per gli esperimenti in acuto.

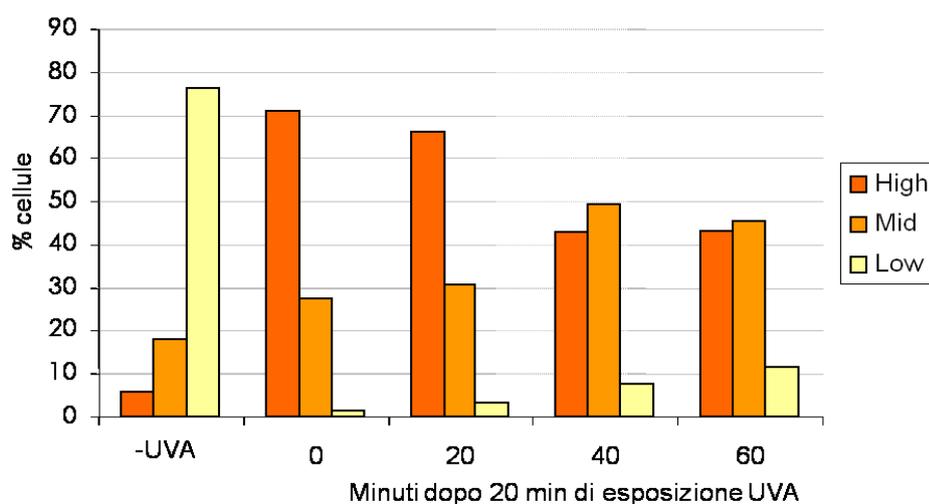


Figura 40. Distribuzione delle cellule in base al contenuto di ROS (specie radicaliche distinte in High, Mid e Low ROS a livello intracellulare)

I dati ottenuti al citofluorimetro sono stati elaborati con uno specifico software, mediante un'analisi della distribuzione per densità (*density plot*) relativamente alla morfologia cellulare.

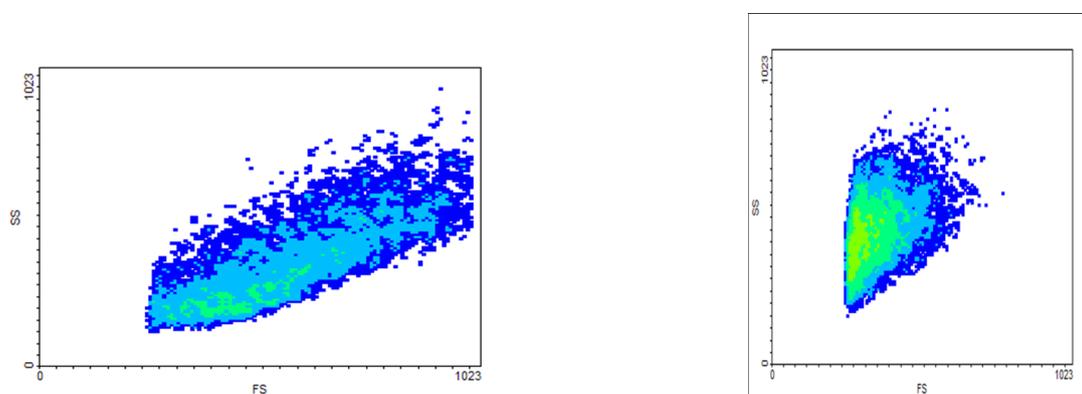
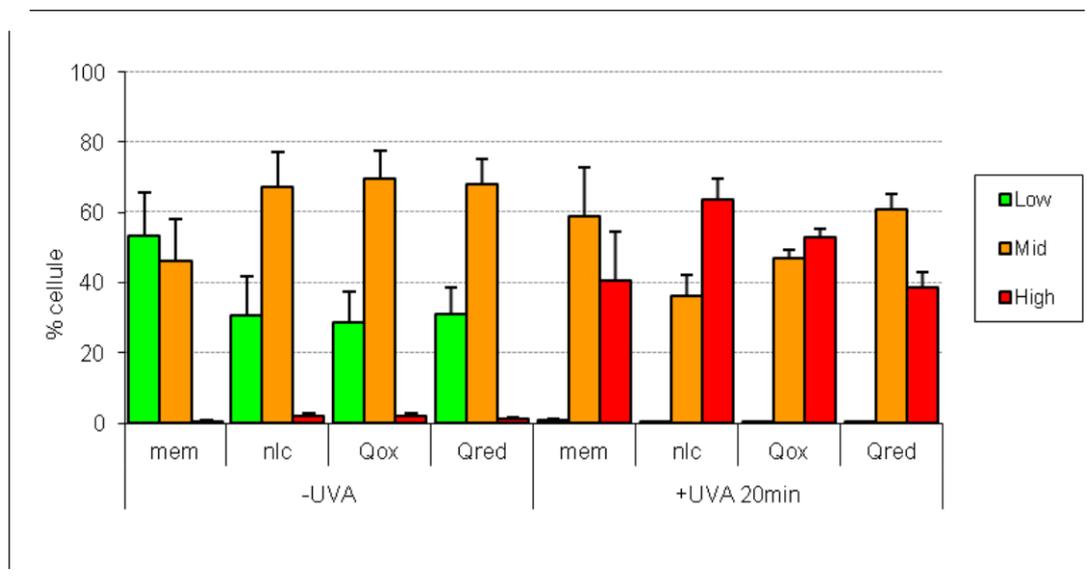


Figura 41. Morfologia cellulare per density plot.

Nel campione di cellule irradiato per 20 minuti (Figura 41), si può notare una diminuzione delle dimensioni e un aumento della complessità cellulare. Il trattamento con UV-A ha determinato quindi un importante cambiamento nella distribuzione e nella morfologia delle cellule in esame.

Il dato significativo emerso da questi esperimenti è che le NLC non possono essere definite un veicolante neutro, in quanto sembrano alterare lo stato *redox* intracellulare sia a livello basale che dopo esposizione ai raggi UV-A. Il probabile effetto pro-ossidante delle NLC è messo in evidenza nella figura 40. Questi dati sono in accordo con quanto osservato riguardo la vitalità cellulare.

Figura 42. Valutazione della produzione di ROS tramite DCFH-DA.



I risultati sono stati analizzati tramite l'applicazione di *markers*: *Low ROS*, *Mid ROS* e *High ROS* (specie radicaliche a basso, medio e alto livello). Nei campioni non trattati con UV-A si nota una graduale diminuzione delle *Low ROS*, accompagnata da un incremento delle *Mid ROS* in tutti i campioni contenenti le NLC caricate o meno con CoQ10.

L'esposizione UV-A ha determinato un significativo aumento delle *High ROS* in tutti i campioni: tanto l'ubichinone quanto l'ubichinolo non sembrano in grado di abbassare in modo significativo i livelli di ROS prodotti dopo 20 minuti di irraggiamento rispetto al controllo MEM.

Tuttavia rispetto alle NLC non caricate, i campioni caricati con ubiquinolo riducono in maniera significativa i livelli di *High ROS* e aumentano in modo significativo i livelli di *Mid ROS*: la presenza di Q10 ridotto contrasta l'aumento di ROS, indotto da UV-A in presenza di NLC vuote.

A livello basale la supplementazione dei fibroblasti con Q10 ossidato/ridotto caricato in NLC non ha influito in maniera significativa sulla funzionalità mitocondriale, vista l'alta percentuale di cellule vitali con elevato potenziale di membrana.

Il sistema antiossidante NLC-Q10 si è mostrato particolarmente efficace a livello mitocondriale, è in grado di sostenere e preservare il metabolismo energetico poiché direttamente coinvolto nel processo di respirazione cellulare come *shuttle* di elettroni e/o protoni, tuttavia l'effetto protettivo è manifestato solamente dalla sua forma ridotta.

Nelle ultime indagini, quelle a livello molecolare, è stato determinato il danno al DNA e sull'espressione genica, in risposta allo stress ossidativo indotto da radiazione UV-A.

A livello basale le NLC sia vuote che caricate con CoQ10ox e CoQ10red non sono risultate genotossiche per le cellule in coltura e non hanno nessun effetto nel proteggerle dal danno al DNA causato dall'irraggiamento UV-A.

Il sistema antiossidante NLC-Q10 non è stato in grado di proteggere i fibroblasti dal danno al DNA, in termini di rotture al singolo o al doppio filamento e di ossidazione delle basi puriniche.

Nell'analisi di espressione genica si è cercato di confermare l'effetto del Q10 nel modulare l'espressione genica, visto il noto ruolo di tale molecola implicata nei meccanismi di inibizione di enzimi degradanti le fibre di collagene, prevenendo così il foto-invecchiamento a livello cutaneo [144,147,148].

E' stato dimostrato che le NLC vuote e caricate con l'attivo portano ad una over-espressione dei geni coinvolti nella degradazione del collagene, questa è una conferma dell'influenza delle nanoparticelle sulla vitalità cellulare in termini di stress ossidativo.

4.4 Valutazione dell'attività infiammatoria della palmitoiletanolamide (PEA), veicolata mediante carriers lipidici di ultima generazione

La palmitoiletanolamide (PEA), che come descritto precedentemente è stata isolata dalla frazione lipidica del tuorlo d'uovo, dell'olio di arachidi e della lecitina di soia, è una molecola caratterizzata da ampio spettro di attività farmacologica: anti-tumorale [149], anti-infiammatoria [150], neuroprotettiva [151], utile nel trattamento del dolore neuropatico periferico [152], anti-flogistica [153], anti-epilettica [154], infine si è dimostrata utile nel trattamento di patologie cutanee quali eczema atopico, dermatite atopica e prurito cronico [155].

La somministrazione topica di PEA potrebbe sostituire quella dei corticosteroidi o di anti-istaminici per uso topico e ridurre gli effetti collaterali da essi derivanti.

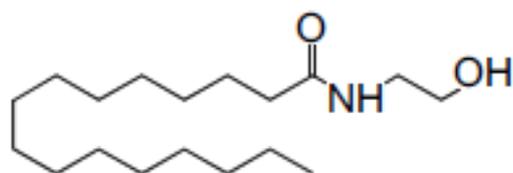


Figura 43. Formula di struttura della N-palmitoiletanolamide (PEA)

Tuttavia la palmitoiletanolamide (PEA) presenta uno scarso profilo di assorbimento per via delle sue caratteristiche altamente lipofile.

La palmitoiletanolamide (PEA) è veicolata tramite creme ed emulsioni, ad oggi non esistono in letteratura studi che dimostrano l'impiego di carrier innovativi, quali sistemi liposomiali o nanoparticellari, per la veicolazione di PEA.

PEA presenta uno scarso profilo di assorbimento percutaneo per via della sua elevata lipofilia, pertanto, lo scopo del lavoro è stato quello di ottimizzare la permeazione cutanea mediante carriers lipidici nanoparticellari di ultima generazione "NLC". La concentrazione di PEA utilizzata in tutti i sistemi formulati, in accordo con quanto riportato in letteratura è stata quella dello 0,5%.

Le preparazioni nanoparticellari sono state viscosizzate e valutate attraverso studi di assorbimento percutaneo *in vitro* per determinare la capacità delle NLC di ottimizzare il

profilo di permeazione cutanea di PEA rispetto a dei veicoli di riferimento contenenti PEA allo 0,5%. Le NLC sono state caratterizzate mediante spettroscopia di fotocorrelazione (PCS) in termini di dimensioni medie (M.D.), indice di polidispersione (PDI) e potenziale zeta (PZ); inoltre lo studio di caratterizzazione ha previsto la valutazione del comportamento termico delle nanoparticelle tramite DSC (calorimetria a scansione differenziale) e studi microscopici di morfologia (TEM), in collaborazione con il Dott. Paolo Blasi del Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco dell'Università degli studi di Perugia. Infine l'efficacia farmacologica è stata verificata mediante modelli animali di infiammazione ed iperalgesia.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

➤ Prove di solubilità di palmitoiletanolamide

In una prima fase, sono state eseguite prove di solubilità al fine di valutare il lipide più idoneo per la formulazione di NLC caricati con PEA.

I lipidi testati per le prove di solubilità sono stati:

1. Compritol® 888 ATO, il cui intervallo di fusione è pari a 69- 74°C.
2. Cetil palmitato, il cui punto di fusione è pari a 54°C.
3. Geleol mono e digliceride, il cui intervallo di fusione è pari a 54- 64°C.
4. Miglyol® 812, lipide liquido a temperatura ambiente.

Una quantità pesata di ciascun lipide si porta a temperatura di fusione, a questa si aggiunge una quantità nota di PEA verificando la solubilità dell'attivo.

➤ Preparazione NLC

Le NLC sono state preparate con la tecnica di “*high shear homogenization*”(HSH). Tale metodo prevede l'iniziale formazione a caldo di una pre- emulsione olio/acqua, la quale viene trasformata in nano-emulsione mediante omogeneizzazione; tale dispersione così ottenuta è convertita per successivo raffreddamento nel sistema nanoparticellare.

Il lipide liquido (Miglyol® 812, 0,375 g), il lipide solido (Compritol® 888 ATO, 1,5 g) e la fase acquosa di tensioattivo (Lutrol® F68, 0,1 g) vengono portati alla temperatura di 80°C ± 5°C, mantenendoli in agitazione magnetica; si noti che questa temperatura è circa 10°C superiore rispetto al punto di fusione del Compritol® 888 ATO. Al

raggiungimento della temperatura, la palmitoiletanolamide (0,26 g, corrispondenti allo 0,5% del volume totale) viene aggiunta al lipide liquido e quando si è completamente solubilizzata in esso segue il trasferimento nel lipide solido; Miglyol® 812 e Compritol® 888 ATO formano, a questo punto, un'unica fase lipidica. Quest'ultima viene trasferita alla fase acquosa di tensioattivo, si mantiene in agitazione magnetica per qualche minuto per favorire la formazione dell'emulsione olio/acqua. È importante verificare costantemente il mantenersi della temperatura. Quindi la preparazione così ottenuta viene sottoposta all'azione dell'omogeneizzatore ad alta prestazione (Ultra- Turrax T25 Basic) ad una velocità di 13500 rpm per 10 min e a temperatura costante. L'ultimo passaggio consiste nel trasferire la nanoemulsione in 25 ml di acqua alla temperatura di 4°C, all'interno di un bagno di ghiaccio, agitando costantemente la preparazione. Il raffreddamento (cooling) permette la solidificazione del Compritol® 888 ATO e la conseguente formazione del sistema nanoparticellare.

➤ Caratterizzazione

La dimensione media delle nanoparticelle, il potenziale zeta e l'indice di polidispersione e il comportamento termico delle nanoparticelle sono stati determinati secondo i protocolli descritti nei capitoli precedenti.

In particolare, per l'analisi calorimetrica una certa quantità di campione liofilizzato (10 mg) è stata inserita in un pan di capienza pari a 150 µl.

Nella fase di riscaldamento la temperatura va da 20°C a 150°C alla velocità di 5°C/ min, nella successiva fase di raffreddamento la temperatura passa da 150°C a 20°C alla velocità di 10°C/ min.

Sono state eseguite misure calorimetriche per i seguenti campioni:

- NLC empty
- NLC caricata con PEA
- NLC con PEA out

Materie prime:

- Lutrol® F68
- Compritol® 888 ATO
- Palmitoiletanolamide (PEA)

➤ Analisi di microscopia elettronica di trasmissione (TEM)

Le analisi sono state effettuate con un microscopio elettronico a trasmissione (TEM) 120kV Philips EM 400T (Philips, DE). Il campione, adeguatamente diluito (1000 x) con tampone fosfato 0.1M è stato depositato su un retino di rame coperto da una pellicola di formvar[®] (TAAB Laboratories Equipment Ltd, UK). Dopo fissazione con una soluzione di uranil acetato (2% p/v), il solvente è stato fatto evaporare a temperatura ambiente per tutta la notte, prima di procedere all'osservazione a differenti ingrandimenti [156].

➤ Preparazione delle formulazioni in gel

Per la preparazione dei gel, le sospensioni nanoparticellari precedentemente formulate sono state viscosizzate utilizzando xantan gum e glicerolo in un rapporto 1:10 (w/w).

Il gel idroalcolico è stato ottenuto invece, impiegando Carbopol[®] e una soluzione idroalcolica (80:20), che ha consentito la solubilizzazione di PEA.

In tutti i gel ottenuti la concentrazione di palmitoiletanolamide (0,5%) è stata mantenuta costante.

➤ Studi di assorbimento percutaneo in vitro

Su questi campioni sono stati eseguiti studi di assorbimento percutaneo in vitro, secondo i protocolli descritti nei precedenti capitoli.

➤ HPLC (Cromatografia liquida ad alta prestazione)

Le aliquote ottenute dagli esperimenti di permeazione cutanea sono state sottoposte a liofilizzazione per allontanare completamente l'acqua ed i residui alcolici derivanti dal ricevente.

Ogni frazione liofilizzata è stata accuratamente pesata e sottoposta ad un processo di derivatizzazione pre-colonna, così come descritto, in precedenza, da Yagen e Burnstein [157]. Brevemente, il liofilizzato è stato disciolto in 1 ml di acetone dry, a cui sono stati aggiunti Dimetiaminopiridina (Dmap) e Cloruro di Dansile in rapporto 1:5 e 1:10 (p/p) rispettivamente. La miscela è stata, quindi, portata a 55°C per 2h. La reazione è stata staccata e il derivato dansilato della PEA isolato mediante TLC semipreparativa

adoperando, come miscela eluente 6/3/1 esano /cloroformio /metanolo (v/v/v). Lo schema di reazione ed il prodotto ottenuto sono mostrati in figura 44.

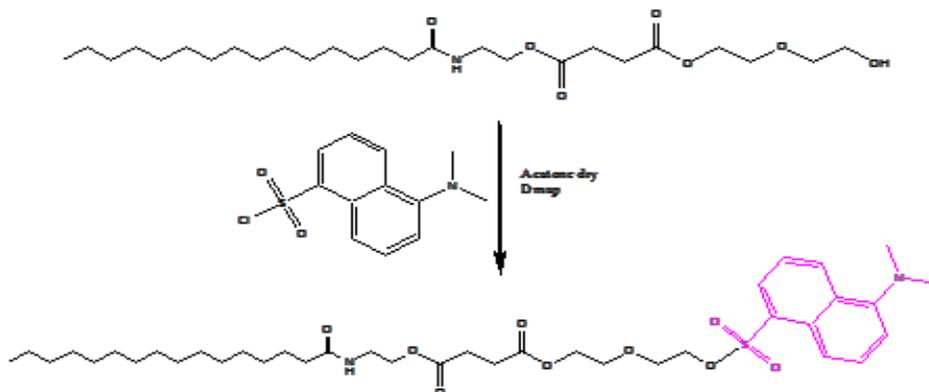


Figura 44. Schema sintetico di derivatizzazione pre-colonna della PEA

La PEA dansilata è stata, quindi, sottoposta ad analisi quantitativa mediante HPLC, per la quale è stata impiegata un'apparecchiatura Jasco (Jasco inc., Easton, MD, USA) formata da pompe a gradiente quaternario (PU 2089 Plus), una valvola di iniezione rheodyne da 25 µl ed un rivelatore UV a serie di diodi (MD 2010 Plus). La lunghezza d'onda è stata selezionata a 255 nm. La fase stazionaria era costituita da una colonna C18 (Phenomenex Luna250x4.6 mm, 5 mm), il flusso selezionato era di 1 ml/min, mentre la fase mobile era costituita da metanolo e da una soluzione acquosa di acido acetico all'1% (v/v). L'eluizione in gradiente ha previsto l'incremento della concentrazione di metanolo dal 40% all'86% nei primi 12 minuti, al 90.5% nei successivi 7 minuti ed al 99% negli ultimi 15 minuti. Le condizioni iniziali sono state ristabilite nei successivi 5 minuti e mantenute per 10 minuti prima dell'iniezione successiva. La specificità del metodo, intesa come assenza di picchi interferenti derivanti dalla cute, è stata verificata mediante esperimenti in bianco, in cui una quantità nota di PEA è stata aggiunta ad aliquote di soluzione ricevente in presenza di soluzione fisiologica come compartimento donatore. Del metodo sono stati verificati anche taluni parametri di validazione quali: linearità, coefficiente di regressione lineare, tempo di ritenzione e percentuale di recupero dell'analita.

I valori ricavati sono indicati in tabella 15.

<i>Derivato</i>	<i>Tr (min)</i>	<i>Range di linearità (µg/ml)</i>	<i>R²</i>	<i>% di recupero</i>
PEA dansilata	28,5	0,32-10,00	0,988	95-115

Tabella 15. Parametri di validazione del metodo analitico

➤ Farmacologia

Esperimenti in vivo

Per gli esperimenti *in vivo* sono stati adoperati topi maschi tipo Swiss, dal peso di 25-30g (Harlan laboratories, IT). Gli animali sono stati stabulati in gabbie di acciaio inox, in ambiente a temperatura controllata ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), con un ciclo buio/luce di 12h. Gli animali sono stati acclimatati in questo ambiente per 1 settimana precedente agli esperimenti, mantenendo accesso a piacere ad acqua potabile e cibo.

Il protocollo adoperato ha previsto l'iniezione sub-plantare delle nanoparticelle. Nello specifico, 30 minuti dopo l'iniezione di 0.5 µl di soluzione sterile salina contenente l'1% di λ-carragenina, sono stati iniettati, nella stessa zampa 0.5 µl di solo veicolo (n=6), di una soluzione contenente PEA (0.5% p/v, n=6), di NLC vuote (0.5% p/v) e di NLC caricate con PEA (0.5% p/v).

Ad intervalli predeterminati successivi all'iniezione il volume della zampa (edema, n=6) e l'iperalgia meccanica (n=6) sono stati misurati. Il volume della zampa è stato misurato mediante pletismometro (Ugo Basile, IT), a differenti intervalli di tempo. L'incremento del volume è stato valutato come differenza tra il volume misurato ad ogni intervallo temporale ed il volume basale, misurato al tempo 0, prima dell'applicazione topica delle molecole e dell'iniezione di carragenina. L'iperalgia meccanica è stata, invece, stabilita attraverso la misurazione del tempo di latenza tra l'applicazione di una pressione meccanica costante e la ritrazione della zampa da parte della cavia. Un cilindro di vetro dal diametro di 10 mm, con un'estremità conica del diametro di 3 mm, e dal peso calibrato di 15 g è stato adoperato per esercitare la pressione meccanica. Il peso è stato sospeso verticalmente tra due anelli, a loro volta fissati ad un asta, ed era libero di muoversi verticalmente. Un tempo di cut-off di 90s è stato adoperato nelle misurazioni

RISULTATI

➤ Caratterizzazione NLC

Le materie prime impiegate per la formulazione dei carrier oggetto di studio sono state selezionate dopo un attento screening di numerosi eccipienti comunemente utilizzati per la preparazione di NLC. Il Compritol[®] 888 ATO è risultato presentare le migliori caratteristiche in termini di solubilità e di affinità nei confronti di PEA. I sistemi NLC formulati presentano dimensioni dell'ordine di nanometri, sono inoltre caratterizzati da una buona omogeneità, come si evince dai valori di PDI riportati in tabella 16, e da una notevole stabilità nel tempo. Quest'ultima indicazione è funzione del valore di potenziale zeta.

Formulazione NLC	M.D. (nm)	PDI	PZ (mV)
vuota	155,7	0,234	-50,7
PEA	149,5	0,175	-39,1

Tabella 16 Risultati della caratterizzazione

I risultati ottenuti in termini dimensionali per le NLC sono riconducibili a scelte formulative e al processo di produzione. Dai valori di potenziale zeta emerge quanto già noto dalla letteratura: i sistemi nanoparticellari a matrice lipidica e, le NLC in particolare, sono abbastanza stabili e non tendono ad aggregare.

L'agente stabilizzante scelto per i nostri studi è stato il Lutrol[®] F68, sia perché facilmente reperibile in commercio sia perché il suo elevato valore di HLB ci consente di avere un effetto stabilizzante sull'emulsione olio/acqua. Dagli esperimenti condotti in precedenza, si evince che la migliore quantità di tenside nelle nostre formulazioni è pari a 0,1 g. Per la caratterizzazione, comprendente lo studio delle dimensioni medie delle particelle e del PDI (indice di polidispersione), sono state utilizzate cuvette contenenti la sospensione nanoparticellare (NLC) e acqua in un rapporto 1:1.

➤ Analisi termocalorimetrica: Calorimetria differenziale a scansione

Per stabilire il comportamento di fusione della matrice lipidica sia come materia prima sia come NLC, sono stati effettuati studi tramite DSC. In particolare sono stati eseguiti diversi cicli di riscaldamento, ottenendo i risultati riportati in figura 45.

Come si evince dal termogramma, il lipide puro ha un punto di fusione intorno ai 75°C. Le curve di riscaldamento delle NLC cariche e non cariche differiscono molto da quelle del lipide puro. Il punto di fusione del tensioattivo sia nella NLC vuota che carica è osservato a valori leggermente più bassi rispetto al Lutrol® F68 (shift del melting point). Questi dati hanno permesso di stabilire come la struttura cristallina del Compritol® 888 ATO sia stata modificata dalla formulazione in NLC, con conseguente formazione di una nuova fase che presentava un ordine minore [139]. Questo è dovuto all'interazione del lipide con le altre componenti del sistema. Se così non fosse stato, il lipide non si sarebbe integrato nel sistema e avremmo trovato differenti picchi.

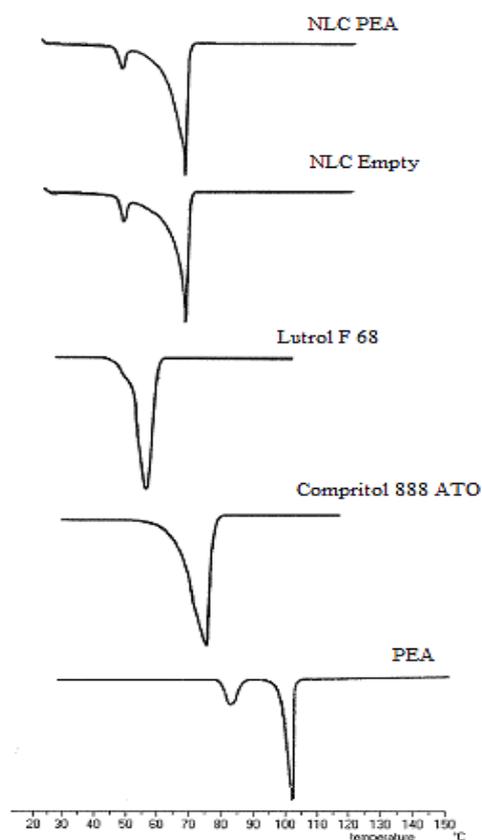


Figura 45. Termogramma DSC delle materie prime, NLC PEA e NLC Empty

Il punto di fusione della palmitoiletanolamide è di 103°C. La curva di riscaldamento delle NLC cariche differisce da quella della palmitoiletanolamide pura: anche in questo caso si è verificato uno shift del melting point. Questo conferma che la palmitoiletanolamide ha interagito con il sistema lipidico nanoparticellare.

Possiamo quindi concludere dicendo che gli studi DSC hanno permesso di confermare i dati da noi attesi, attestando l'inglobamento di PEA all'interno delle nanostrutture lipidiche. Un' ulteriore conferma dell'avvenuta inclusione dell'attivo nel sistema nanoparticellare è fornita dal confronto delle curve di calorimetria tra il sistema caricato con PEA (NLC PEA) e quello in cui l'attivo è al di fuori (NLC PEA OUT) come mostrato dalla fig. 46.

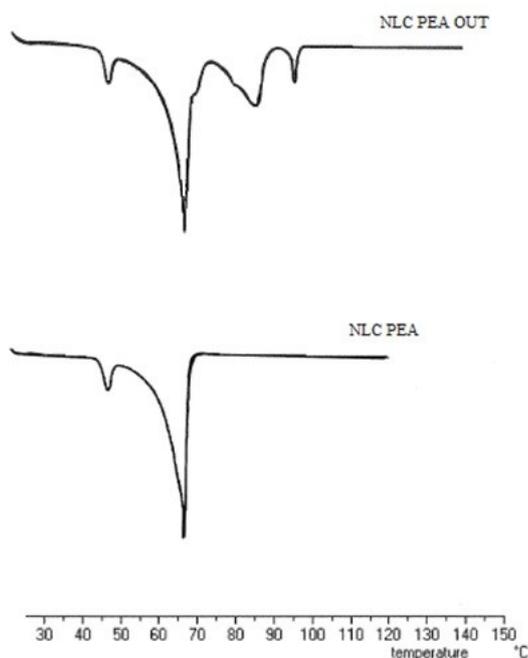


Figura 46. Termogramma DSC dei campioni NLC PEA e NLC PEA OUT

➤ Analisi di microscopia elettronica di trasmissione (TEM)

Benché gli studi DSC confermassero i dati attesi, attestando l'inglobamento di PEA all'interno delle nanostrutture lipidiche, restava da dimostrare l'aspetto morfologico delle nanoparticelle, al fine di confermare i dati dimensionali e verificare la reale esistenza di compartimenti interni di minori dimensioni. Per questo motivo sono stati

effettuati i saggi al TEM, i cui risultati sono mostrati nella figura 47. Da una prima analisi a basso ingrandimento, le fotografie delle NLC ottenute al TEM hanno mostrato particelle con dimensioni compatibili con quelle stimate attraverso spettroscopia di fotocorrelazione. A tali ingrandimenti non è stato possibile osservare, in maniera evidentissima, tutti i particolari della struttura interna (figura 47 A e B).

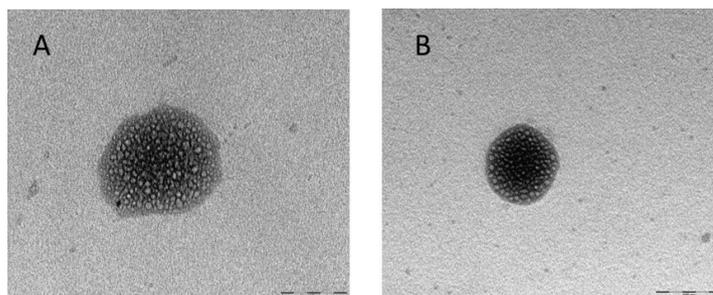


Figura 47. TEM a basso ingrandimento delle nanoparticelle NLC vuote (panel A) ed NLC caricate con PEA (Panel B)

Aumentando l'ingrandimento fino ad arrivare al massimo consentito dallo strumento (180.000 X) è stato possibile invece evidenziare, anche in maniera abbastanza netta, la presenza dei nano-compartimenti di olio, da sempre ipotizzati ma mai evidenziati in modo così chiaro. Come si può osservare dalla figura 48 la presenza di olio disperso sotto forma di goccioline di pochi nanometri all'interno della matrice lipidica solida è chiara ed evidente in più campi.

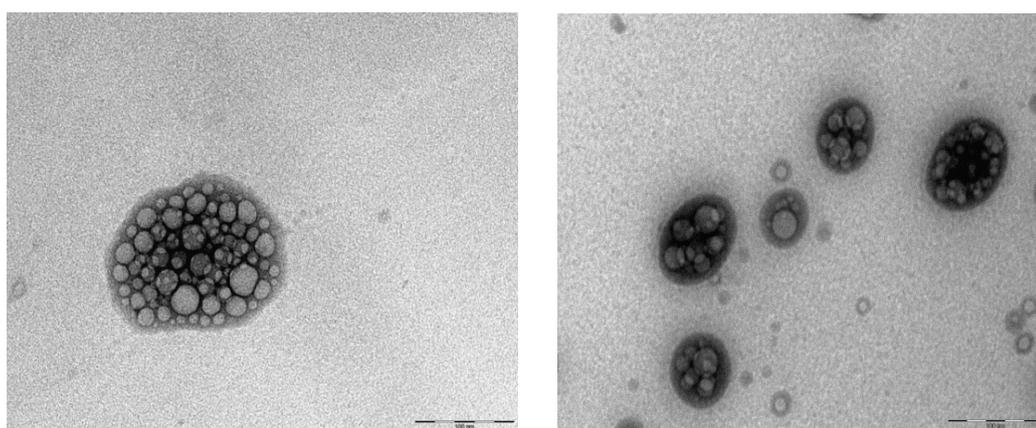


Figura 48. TEM ad alto ingrandimento delle nanoparticelle NLC vuote (panel A) e delle NLC caricate con PEA (Panel B)

➤ Studi di assorbimento percutaneo in vitro

Dopo gli studi di caratterizzazione, il lavoro è proseguito con gli studi di assorbimento percutaneo *in vitro* che hanno riguardato quattro formulazioni contenenti PEA:

1. NLC con PEA inclusa viscosizzata
2. NLC con PEA out viscosizzata
1. GEL IDROALCOLICO con PEA
2. IDROGEL con PEA

I risultati ottenuti (figura 49), espressi come quantità cumulativa di PEA permeata dopo 24 ore dall'inizio del monitoraggio, dimostrano che le NLC hanno favorito la permeazione di PEA attraverso le membrane SCE a differenza degli altri veicoli oggetto di studio, che non sono riusciti a garantire, nel corso dello studio di assorbimento monitorato su celle di Franz, un apprezzabile passaggio della sostanza nel tempo.

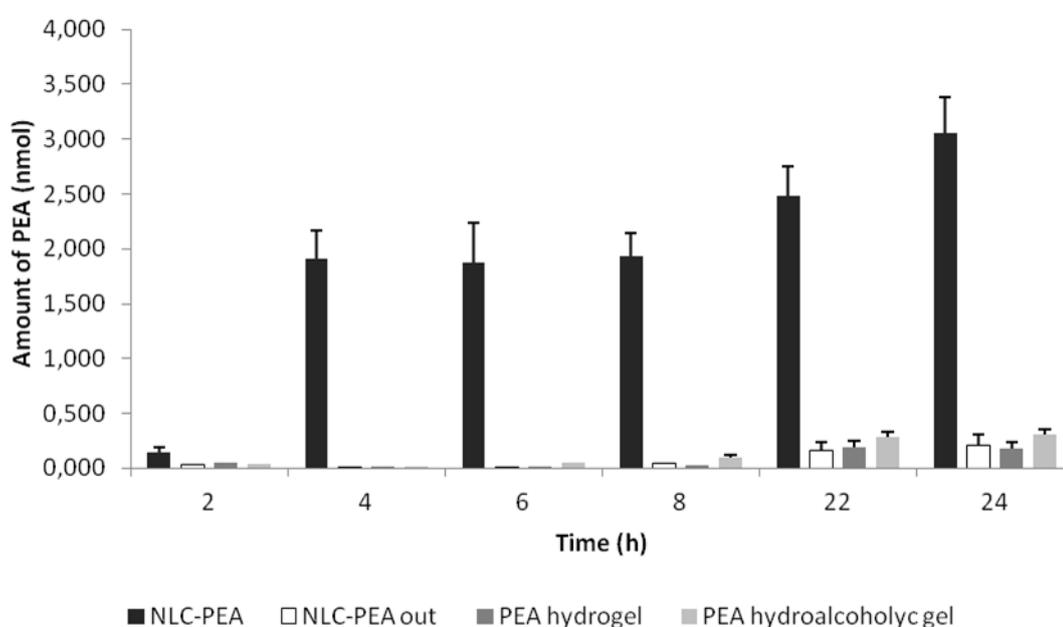


Figura 49. Quantità di palmitoiletanolamide (PEA) permeata nell'arco delle 24 h.

Dall'analisi dei profili le NLC sono risultate in grado non solo di incrementare il "crossing" di PEA attraverso la pelle, ma sono state capaci di produrre un rilascio prolungato dell'attivo nel tempo.

Una possibile spiegazione del fenomeno osservato potrebbe essere riconducibile all'interazione tra NLC e lipidi fisiologici costituenti le membrane SCE. Infatti, una volta applicate le NLC, formate da lipidi altamente biocompatibili, hanno interagito con la matrice dello strato corneo (lipidico), dando vita ad un sistema reservoir contenente l'attivo che è stato da questo rilasciato in maniera graduale nel tempo.

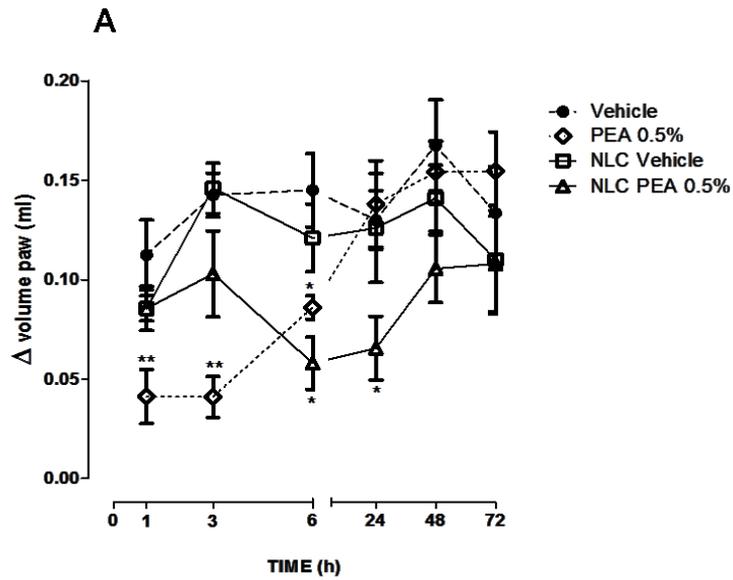
➤ Saggi farmacologici

I risultati ottenuti dai saggi farmacologici sulle NLC sono mostrati in figura 50. Anche in questo caso, si può notare come la somministrazione di carragenina provoca un marcato aumento del volume della zampa (Figura 50A), ed una forte diminuzione dell'intervallo di ritrazione della zampa rispetto al tempo zero (Figura 50B), in presenza del solo veicolo, così come in presenza delle NLC vuote. Non ci sono differenze statistiche tra i due gruppi, nei saggi farmacologici effettuati, il che esclude l'influenza dei componenti la formulazione nell'attività farmacologica dei nanocarriers.

La PEA in soluzione allo 0.5%, somministrata per iniezione subplantare, invece, mostra una marcata riduzione dell'edema e un aumento degli intervalli di ritrazione della zampa. L'attività farmacologica è, però, ancora una volta temporalmente confinata, esplicandosi tra 1h e 3h successive alla somministrazione.

Le NLC, dall'altro lato, dimostrano efficacia terapeutica paragonabile alla PEA, sia dal punto di vista dell'infiammazione, sia dal punto di vista dell'iperalgia meccanica, con una differenza fondamentale: l'insorgenza di azione è rallentata (6h) e la durata d'azione prolungata (24h). Tra le 24h e le 48h l'attività delle NLC svanisce completamente.

Paw oedema



Randall-Selitto (mechanical hyperalgesia)

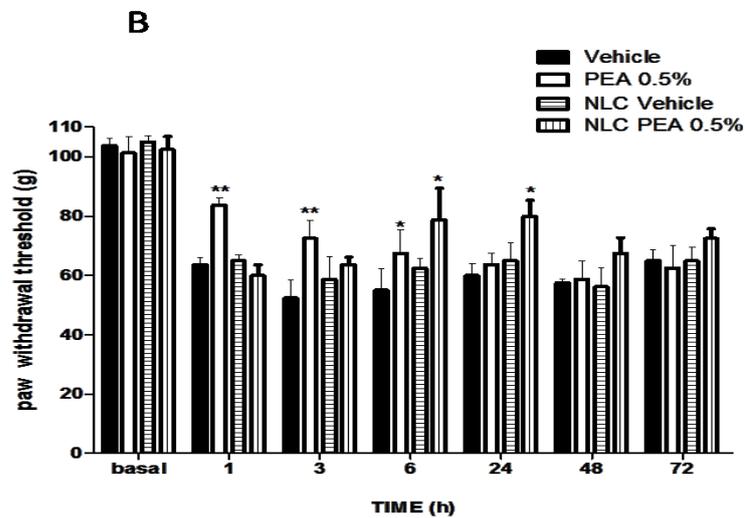


Figura 50. Effetti dell'applicazione del veicolo (CTR), della soluzione di PEA allo 0.5%, delle NLC vuote e delle NLC contenenti PEA sull'edema (panel A) e sull'iperalgia meccanica (B). I dati sono riportati come media \pm SEM (n=6). *p<0.05, **p<0.01 e ***p<0.001 vs CTR

4.5 Valutazione della biocompatibilità di formulazioni NLC su colture cellulari di fibroblasti cutanei umani (HDF)

In ultima analisi, durante il corso del mio dottorato mi sono occupata di un aspetto di sempre maggiore interesse per la comunità scientifica che riguarda la valutazione della bioaccettabilità dei sistemi nanoparticellari a matrice lipidica.

Le proprietà innovative uniche che hanno reso le nanoparticelle lipidiche interessanti e, quindi, ampiamente utilizzate nel settore industriale e della biomedicina, come la loro composizione chimica, la loro geometria, la solubilità, le piccole dimensioni e l'estesa area superficiale, hanno contribuito al loro potenziale profilo tossicologico non soltanto verso i sistemi biologici e l'ambiente ma, soprattutto, verso l'organismo umano.

La disciplina che si occupa dello studio dei rischi associati all'esposizione alle nanotecnologie, dei meccanismi alla base della loro tossicità e delle vie di somministrazione impiegate per il loro ingresso all'interno dell'organismo prende il nome di "nanotossicologia" [158]. La tossicità delle nanoparticelle rappresenta una delle problematiche più importanti del loro impiego, specialmente se queste devono essere destinate ad un uso medico. In particolar modo, si presta la massima attenzione alle nanoparticelle di più piccole dimensioni, quelle che non raggiungono i 100 nm.

Fermo restando che gli usi a cui sono destinate le nanoparticelle lipidiche, sia nel settore farmaceutico che in quello cosmetico, impongono il requisito fondamentale della loro sicurezza, il presente progetto sperimentale ha previsto la realizzazione di diverse formulazioni particellari lipidiche nanostrutturate, al fine di valutarne la biocompatibilità su colture cellulari di fibroblasti cutanei umani (HDF). Diversi lotti di NLC sono stati preparati utilizzando una formula comune, inserendo come variabile la tipologia di lipide solido. Sono stati scelti lipidi solidi con caratteristiche chimiche e fisiche differenti e facili da reperire. Dopo aver preparato tali formulazioni, le NLC sono state caratterizzate mediante spettroscopia di fotocorrelazione (PCS) in termini di dimensioni medie (M.D.), indice di polidispersione (PDI) e potenziale zeta (PZ). A tal proposito, in collaborazione con il Dott. Luca Tiano dell'Università Politecnica delle Marche, i carriers formulati sono stati incubati in presenza di colture di fibroblasti umani in modo da valutarne gli effetti sulla vitalità delle cellule e sulla produzione intracellulare delle specie radicaliche dell'ossigeno, conducendo saggi appropriati.

Ulteriori esperimenti sono stati effettuati sottoponendo il sistema ad irraggiamento con UV-A, in modo da valutare il comportamento delle nanoparticelle testate in presenza di stimoli ambientali che potrebbero promuovere l'instabilità dei composti oggetto di studio.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

➤ Preparazione

Gruppi di sospensioni NLC, contenenti lipidi solidi diversi (tabella 17), sono stati preparati utilizzando la tecnica che prevede l'accoppiamento dell'omogeneizzazione ad elevate prestazioni e degli ultrasuoni. Brevemente, il lipide liquido, Miglyol[®] 812 (4,5 g), è stato riscaldato alla temperatura di fusione del lipide solido (Dynasan[®] 118, Geleol[®] Mono Digliceride, Compritol[®] 888 ATO, Precirol[®] ATO 5, Softisan[®] 100 10,5 g) e pipettato, goccia a goccia, all'interno di quest'ultimo. La miscela lipidica formata, raggiunta la temperatura di fusione del lipide solido più 10°C, è stata pipettata all'interno della fase acquosa composta da H₂O distillata (99,5 ml) e dal Lutrol[®] F68 (0,5 g). La dispersione ottenuta è stata trattata con un agitatore ad alta velocità (UltraTurrax T25, IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germania) a 8000 giri. La pre-emulsione ottenuta è stata sottoposta agli ultrasuoni con un UP 400 S (Ultraschallprozessor, Dr. Hielscher GmbH, Germania) per 2 minuti. Poi, la dispersione è stata raffreddata in un bagno di ghiaccio e dispersa in acqua fredda, ad alta velocità con un omogenizzatore ad elevata prestazione (tipo UltraTurrax T25) a 8000 rpm per 5 minuti, al fine di consolidare la matrice lipidica e permettere la formazione delle NLC.

	Formulations				
	A	B	C	D	E
Compritol[®] 888 ATO	-----	-----	1.15	-----	-----
Dynasan[®] 118	1.15	-----	-----	-----	-----
Geleol[®] Mono Diglyc.	-----	1.15	-----	-----	-----
Precirol[®] ATO 5	-----	-----	-----	1.15	-----
Softisan[®] 100	-----	-----	-----	-----	1.15
Miglyol[®] 812	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Lutrol[®] F68	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Distilled water	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3

Tabella 17. Composizione (%) delle sospensioni di NLC A-E

➤ Caratterizzazione

Per lo studio di caratterizzazione sono stati determinati: dimensione media, indice di polidispersione e potenziale zeta, secondo i protocolli descritti nei precedenti capitoli.

➤ Colture cellulari

Le cellule HDF sono state coltivate nel terreno *Minimum Essential Medium* (MEM) contenente glucosio, aminoacidi, sali minerali e vitamine, come elementi nutritivi di base, e rosso fenolo, come indicatore di pH. Il MEM (terreno di base) è stato arricchito con:

- ✓ Siero Bovino Fetale (FBS al 10%, GENENCO, Sud America Origin), nel quale sono presenti diversi fattori che promuovono la crescita cellulare, tra cui il fattore di crescita piastrinico (PDGF), il fattore di crescita epidermico (EGF) e il fattore di crescita insulino-simile (IGF)
- ✓ Penicillina (100 U/ml) e Streptomicina (100 µg/ml), antibiotici aggiunti al terreno di coltura allo scopo di prevenire eventuali contaminazioni batteriche
- ✓ Glutamina (2 mM), aminoacido essenziale per la crescita delle cellule.

Le colture cellulari sono state mantenute in CO₂ al 5%, in incubatore a 37°C con sistema di controllo dell'atmosfera e il mezzo è stato cambiato ogni 2-3 giorni. Per la propagazione dei fibroblasti (cellule aderenti) sono state utilizzate fiasche e/o piastre multipozzetto sterili ed adeguatamente trattate per colture cellulari. Per le colture aderenti, la superficie delle piastre è trattata chimicamente per renderla idrofila e carica negativamente in modo da legare la fibronectina presente nel siero. L'adesione è quindi un fenomeno che richiede l'interazione di proteine di membrana (integrine) con proteine adesive (come la fibronectina), adsorbite sulla superficie delle piastre di coltura.

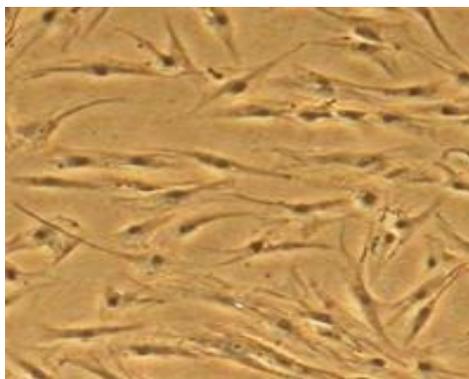


Figura 51. Fibroblasti in coltura

Le cellule aderenti crescono fino ad occupare l'intera superficie disponibile: questo stadio si definisce coltura confluyente. Una volta raggiunta la confluenza, la crescita si arresta e si procede al distacco e al trasferimento delle cellule in nuove piastre. Il numero di piastre che si possono generare da una coltura confluyente e il tempo necessario per ottenere nuove piastre confluenti dipendono da:

1. Efficienza di semina
2. Tempo di duplicazione; ad ogni duplicazione il numero di cellule raddoppia e quindi la popolazione cresce in maniera esponenziale.

Quando il monostrato cellulare ha ricoperto in modo uniforme tutta la superficie della fiasca di crescita, arrivando ad una confluenza dell'80-90%, si è provveduto a staccare lo strato cellulare con un'opportuna quantità di Tripsina-EDTA 25%. Per gli esperimenti, le cellule sono state utilizzate tra il 14[^] e il 16[^] passaggio e sono state seminate in piastre da 24 pozzetti ad una densità ottimale di $8,5 \times 10^4$ cellule/cm².

➤ *Inserimento delle NLC nelle colture cellulari*

Le cellule che hanno raggiunto il 75% della confluenza sono state incubate in presenza di cinque differenti formulazioni di NLC, fino a raggiungere una concentrazione finale di 15 µg/ml all'interno del terreno di coltura. In parallelo è stato allestito un controllo costituito da cellule incubate con il solo terreno (controllo). Dopo 24 ore di incubazione a 37°C ed in presenza del 5% di CO₂, le cellule sono state testate sia immediatamente che dopo l'esposizione ai raggi UV-A in modo da effettuare ulteriori determinazioni.

➤ *Esposizione agli UV-A*

Per l'irraggiamento delle colture cellulari con UV-A è stata utilizzata una lampada solare commerciale "Philips" *Original Home Solarium* (modello 406/A; Philips, Groningen, Olanda, con lampadina Philips HPA, UV tipo 3), in grado di fornire un flusso di 23 mW/cm² tra 300-400 nm.

Prima di procedere all'irraggiamento bisogna accendere la lampada e farla riscaldare per 5-10 minuti, per garantire un'emissione uniforme. Dopo la fase di preriscaldamento, le cellule sono state irradiate in PBS (tampone fosfato salino): la piastra è stata posta su un supporto con del ghiaccio, per non surriscaldare i campioni, e coperta

da una lastra di quarzo, per evitare l'evaporazione della sospensione cellulare. Per la determinazione del flusso citometrico, le cellule sono state irradiate per 10 minuti (18 J/cm^2) ed incubate in presenza di un fluorocromo per l'analisi di citometria a flusso. Il tempo di esposizione agli UV-A ha ricoperto un range tra 10-60 minuti e le dosi selezionate per raggiungere un effetto significativo sono state più basse rispetto a quelle impiegate per le cellule non esposte, fungenti da controllo. La dose di UV-A è stata misurata con un Radiometro UV Power Pack (EIT Inc., Sterling, USA), mentre lo spettro di emissione è stato valutato utilizzando uno spettroradiometro portatile Stellar-Net (Tampa, FL, USA) [159].

➤ Analisi DCFH-DA

La formazione di ROS a livello intracellulare, a seguito dell'esposizione dei fibroblasti ai raggi UV-A, è stata determinata mediante l'utilizzo della 2,7-diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA) come sonda per specie ossidanti. In presenza di cellule intatte, la DCFH-DA, che è una molecola non polare, attraversa le membrane cellulari e viene idrolizzata dalle esterasi intracellulari che rimuovono i gruppi acetati con formazione di un composto polare, DCFH, non fluorescente. In presenza di specie reattive dell'ossigeno, la DCFH viene ossidata a 2,7-diclorofluoresceina (DCF), una molecola altamente fluorescente che emette ad una lunghezza d'onda di 532 nm.

La fluorescenza prodotta dalla DCF intracellulare può essere usata come indice per quantificare lo stress ossidativo complessivo nelle cellule.

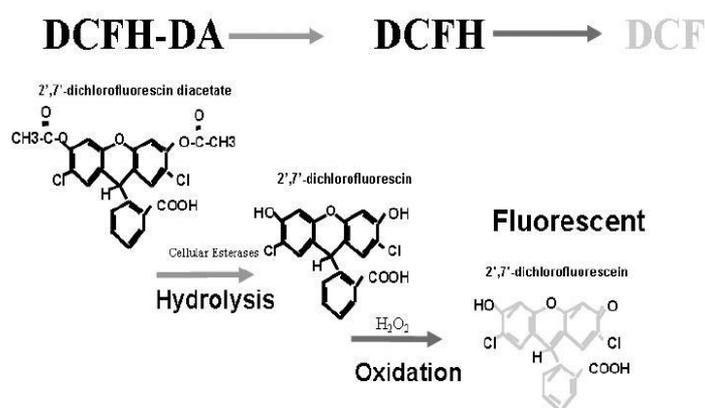


Figura 52. Idrolisi ed ossidazione della diclorofluoresceina (DCFH-DA)

Dati recenti indicano che l'ossidazione di DCFH è dovuta principalmente al perossido di idrogeno (H_2O_2); per questo l'intensità di fluorescenza emessa è considerata proporzionale alla quantità di H_2O_2 prodotto dalle cellule (figura 53).

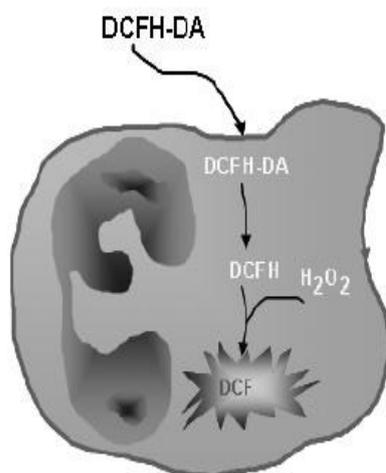


Figura 53. Ossidazione di DCFH a DCF in presenza di H_2O_2

Una soluzione di carboxy-H₂DCFDA (carboxy 2,7-diclorofluoresceina diacetato) 10 μ M in PBS è stata aggiunta su ciascun pozzetto contenente sia i campioni non irradiati che i campioni UVA-irradiati. L'incubazione è stata realizzata al buio per 30 minuti alla temperatura di 37°C.

Dopo aver staccato le cellule dai pozzetti, queste sono state centrifugate a 600 g per 5 minuti ed il pellet cellulare è stato risospeso in circa 50 μ l di terreno di coltura. Un'aliquota di 20 μ l di campione è stato aggiunto a 180 μ l di una soluzione di Guava Via-count assay (Merck, Millipore), una formulazione colorata fluorescente che prevede una sensibile ed accurata rilevazione delle cellule vive, apoptotiche e morte tramite citometria a flusso. L'intensità di fluorescenza è stata registrata su una media di 5.000 cellule per ciascun campione. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato ed i risultati sono stati analizzati utilizzando un software In-cyte. Sono stati calcolati il valore medio e la deviazione standard. Tutti i dati sono stati analizzati utilizzando il t-test di Student. Un $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo e un $p < 0.01$ altamente significativo.

RISULTATI

➤ Preparazione e caratterizzazione delle NLC

Le formulazioni di NLC A-E sono state preparate usando differenti eccipienti riportati nella tabella 17. I lipidi solidi, in particolare, sono stati selezionati tra gli eccipienti più impiegati per la produzione delle nanoparticelle lipidiche [135].

La strategia formulativa è rappresentata dall'accoppiamento del metodo di omogenizzazione ad elevata prestazione e degli ultrasuoni, rapido ed economico largamente utilizzato per formulare particelle omogenee e di dimensioni nanometriche.

Le analisi condotte tramite PCS hanno mostrato come tutte le formulazioni di NLC presentassero dimensioni nel range dei nanometri ed una buona omogeneità (tabella 18). Inoltre, la formulazione E (Softisan[®] 100) ha mostrato un trend differente con un incremento di dimensioni ed un'omogeneità piuttosto bassa (PDI>0.3).

Per quello che riguarda le formulazioni A-E, le analisi riportano valori di potenziale zeta compresi tra **-30 mV** e **-40 mV**. Questo è un indice di buona stabilità nel tempo per tutte le formulazioni testate.

	A	B	C	D	E
Particle size (nm)	56.8 ± 8.3	55.4 ± 7.2	69.0 ± 8.7	42.9 ± 5.9	122.1 ± 10.9
Polydispersity index	0.25 ± 0.1	0.3 ± 0.08	0.26 ± 0.09	0.18 ± 0.04	0.44 ± 0.07
Zeta Potenzial (mV)	-29.4 ± 1.3	-36.3 ± 1.8	-32.1 ± 1.5	-40.5 ± 2.6	-33.3 ± 2.1

Tabella 18. Dimensioni particellari, indice di polidispersione (PDI) e potenziale zeta delle formulazioni NLC studiate

➤ Saggio sulla biocompatibilità cellulare

La biocompatibilità/citotossicità delle NLC testate è stata valutata sia sugli HDF esposti agli UV-A, sia su quelli non esposti utilizzando il saggio Guava Via-Count. Questo saggio impiega una miscela di due filamenti di DNA colorati: un filamento, membrana

permeabile, colora tutte le cellule nucleate lasciando fuori i detriti in modo da identificare le cellule integre; l'altro filamento, impermeabile alla membrana cellulare, colora solo le cellule danneggiate, permettendo l'identificazione di cellule apoptotiche e di cellule morte.

Come mostrato in figura 54, tutte le nanoparticelle testate mostrano una bassa citotossicità con valori di vitalità compresi tra l'80% e il 90% rispetto al campione impiegato come controllo (CTRL). Tuttavia, nei limiti della biocompatibilità, tutte le nanoparticelle testate, tranne le NLC-C (Compritol[®] 888 ATO), mostrano un significativo decremento nella vitalità cellulare ($p < 0.05$) ed un parallelo aumento delle cellule apoptotiche, a paragone con le cellule impiegate come controllo. Tra queste, la NLC-C è stata l'unica formulazione nanoparticellare a portare una bassa ed addirittura insignificante citotossicità ($p > 0.05$). Inoltre, in presenza di NLC-B (Geleol[®] Mono Digliceride), è stato osservato un aumento significativo ($p < 0.01$) del numero di cellule morte ed una diminuzione di cellule vive, con aumento dei fenomeni apoptotici.

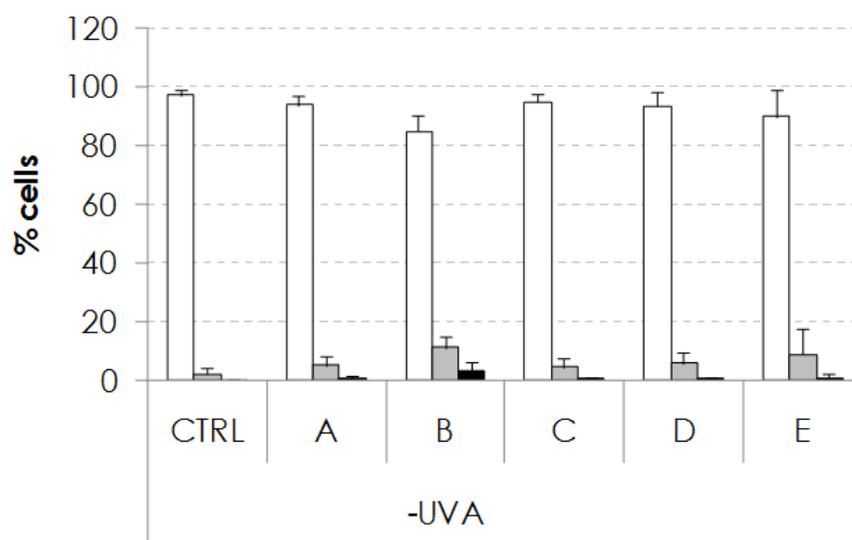


Figura 54. Percentuale di vitalità (bianco), apoptosi (grigio) e morte (nero) degli HDF non irradiati

Dopo 10 minuti di esposizione agli UV-A, diventa evidente la comparsa di effetti citotossici (figura 55). In particolare, nel campione di controllo è stata osservata una differenza sostanziale nella distribuzione delle cellule vive, apoptotiche e morte rispetto

alle cellule non esposte. In relazione all'esposizione alle particelle lipidiche nanostrutturate, tutti i composti testati, con l'eccezione delle NLC-C, traducono la citotossicità indotta dall'esposizione ai raggi ultravioletti in percentuale di cellule morte. In particolare, le cellule apoptotiche sono aumentate significativamente nella formulazione NLC-A che possiede come lipide solido il Dynasan[®] 118 ($p < 0.05$), tuttavia la percentuale di cellule morte è aumentata significativamente ($p < 0.01$) per le NLC-B (Geleol[®] Mono Digliceride), NLC-A (Dynasan[®] 118) e NLC-E (Softisan[®] 100). Le NLC-D (Precirol[®] ATO 5) influenzano la percentuale di cellule morte in misura minore ($p < 0.05$), mentre nessun incremento significativo è stato osservato per le NLC-C (Compritol[®] 888 ATO) ($p > 0.05$).

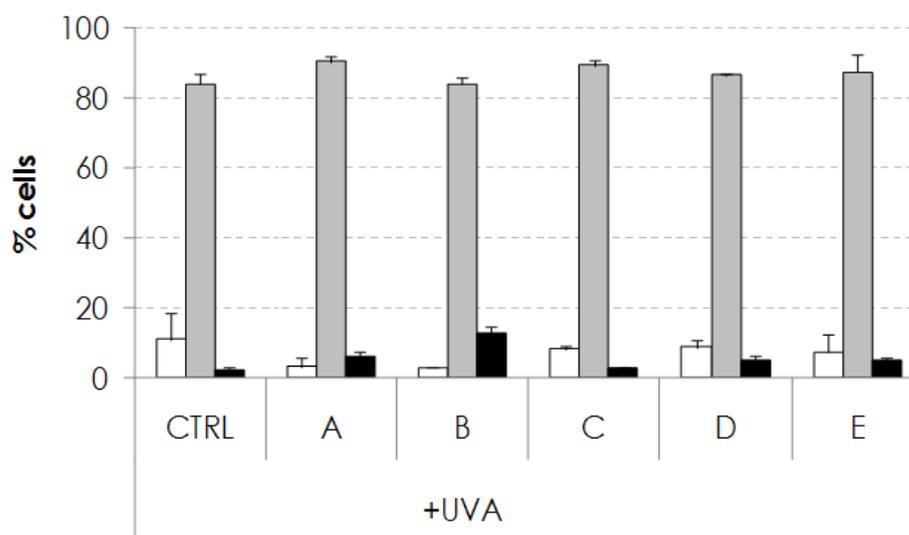


Figura 55. Percentuale di vitalità (bianco), apoptosi (grigio) e morte (nero) degli HDF esposti agli UV-A per 10 minuti

➤ Determinazione dei livelli intracellulari di ROS

La figura 56A mostra i livelli intracellulari di ROS per i campioni non irradiati incubati con NLC, paragonati con le cellule di controllo. Al fine di quantificare l'entità della formazione di ROS, sono state definite tre regioni a bassa, media ed alta fluorescenza ed è stata calcolata la percentuale cellulare. L'incubazione con le NLC ha portato ad una riduzione della percentuale di cellule contenenti bassi livelli di ROS e ad un aumento della percentuale di cellule con elevati livelli di ROS.

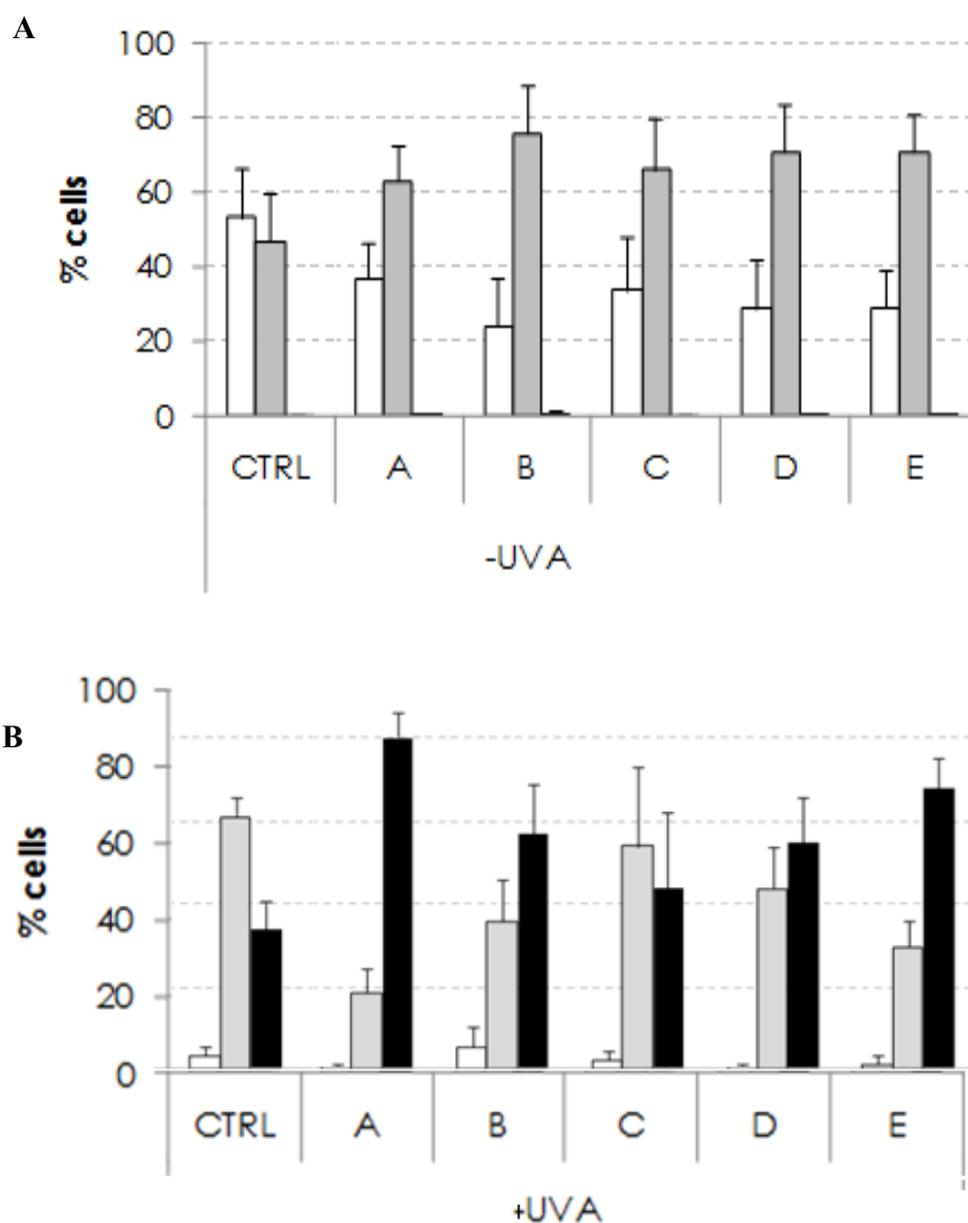


Figura 56. Percentuale bassa di ROS (bianco), media di ROS (grigio) ed alta di ROS (nero) negli HDF non irradiati (A) ed esposti agli UV-A per 10 minuti (B).

Dieci minuti di esposizione agli UV-A influenzano significativamente la distribuzione cellulare in relazione al loro contenuto intracellulare di ROS. Inoltre, tutte le formulazioni testate, ad eccezione delle NLC-C, mostrano una maggiore percentuale di cellule con un alto contenuto in ROS, le NLC-A e le NLC-E in misura maggiore, mentre le NLC-B in misura minore (figura 56 B).

5. Conclusioni

Alla luce dei risultati ottenuti negli studi sperimentali condotti durante il dottorato, si possono fare importanti considerazioni sulla potenziale applicazione dei sistemi nanoparticellari lipidici (SLN, NLC, MAD) per la veicolazione di sostanze biologicamente attive presenti in natura (Curcumina, Capsaicina, Coenzima Q10, Palmitoiletanolamide).

In una prima fase del protocollo sperimentale, l'interesse è stato rivolto all'impiego delle dispersioni acquose di monooleina (MAD) come veicolo per la somministrazione topica di curcumina (CUR).

Durante lo studio è stato possibile evidenziare che la formulazione MP (monooleina e polossamero 407), costituita di vescicole e cubosomi, è in grado di controllare la degradazione della CUR nel tempo, a differenza di quanto avviene nel caso della formulazione MCC (monooleina, sodio caseinato, sodio colato), formata da una miscela di esosomes e di diversi tipi di vescicole, in cui si sono ottenuti bassi valori di shelf-life. Comunque entrambi i veicoli sono capaci di controllare la diffusione della curcumina, di potenziare gli effetti antiossidanti e antinfiammatori della molecola e di svolgere un'azione protettiva nei confronti dell'instabilità chimica della stessa. Infatti, sembra evidente che l'inclusione della curcumina nelle MAD ha un effetto positivo sull'attività inibitoria della curcumina nei confronti della produzione di iNOS. Questo effetto potrebbe essere spiegato considerando sia un effetto protettivo del veicolo nei confronti dell'instabilità chimica della curcumina e sia dal rilascio prolungato dell'attivo dal veicolo durante le 48 ore di monitoraggio.

Inoltre abbiamo osservato che MP e MCC, sebbene mostrino un simile comportamento, presentano una attività scavenger nei confronti del radicale DPPH e un effetto inibitore nei confronti di iNOS, superiore a quello della curcumina non caricata.

Sulla base dei risultati ottenuti la curcumina, inclusa nei sistemi MAD, presenta caratteristiche importanti, e potrebbe dimostrarsi utili nel trattamento di numerose patologie.

Nel secondo protocollo sperimentale la curcumina è stata incapsulata all'interno di sistemi nanoparticellari di ultima generazione "NLC". Come abbiamo precedentemente

accennato, l'acetilazione delle proteine istoniche, e probabilmente anche di altri substrati, è un processo dinamico regolato da due classi di enzimi antagonisti HATs e HDACs, che a sua volta alterano la struttura compatta della cromatina trasferendo o rimuovendo un gruppo acetile ai gruppi amino dei residui di lisina all'interno delle code degli istoni. Si tratta di un meccanismo epigenetico, molto importante, che regola numerosi processi e l'insorgenza di numerose patologie. Per questo motivo c'è un crescente interesse nei confronti dei così detti "modulatori epigenetici", cioè quelle molecole in grado di regolare il processo di rimodellamento della cromatina, modulando l'attività degli enzimi HDACs e HATs. La maggior parte degli sviluppi in campo terapeutico si è focalizzata sull'HDACs, con l'utilizzo di piccole molecole che fungono da inibitori [160,161].

Risultano, invece, poche le molecole conosciute per la loro funzione target nei confronti degli enzimi HAT. La CUR è un composto naturale, conosciuto come potente e specifico inibitore della p300-HAT che induce l'ipoacetilazione degli istoni, come dimostrato da diversi studi *in vitro* [109,123,124].

Il nostro studio dimostra per la prima volta come l'iniezione sistemica delle nanoparticelle caricate con CUR (NLC-CUR), induce l'ipoacetilazione dell'istone 4, in particolare al residuo di lisina 12, nel SNC.

Dal momento che la disfunzione degli enzimi HATs o HDACs, può alterare l'espressione genica e indurre varie patologie, i risultati ottenuti possono fornire le basi per ulteriori esperimenti al fine di indagare il ruolo dell'acetilazione istonica nel SNC.

Come è noto la permeazione attraverso il SNC, è un'importante problematica per molti farmaci epigenetici, inclusi gli inibitori HDAC come MS-275 che sono attualmente in fase di sviluppo clinico per il trattamento di vari tipi di tumore compresi alcuni tumori cerebrali e per il trattamento di disturbi neurologici [162].

Come per molti farmaci, dove la penetrazione al cervello è di importanza fondamentale, la CUR ha dimostrato possedere un profilo farmacocinetico che limita il suo utilizzo per lo studio degli effetti nel sistema nervoso centrale [163].

Pertanto, aumentando la disponibilità di CUR nel cervello, come avviene nei sistemi NLC-CUR, si possono eseguire studi *in vivo* volti ad indagare il ruolo dell'attività p300-HAT nel SNC.

Inoltre, l'identificazione di H4K12 come obiettivo per i sistemi NLCCUR nel SNC può aprire nuove strategie per lo studio delle condizioni patologiche, in cui è stata dimostrata la de-regolazione dei livelli H4K12 (deterioramento della memoria età-dipendente).

Altra sostanza naturale oggetto del mio dottorato è stata la Capsaicina (CPS). Come descritto precedentemente, dagli studi di letteratura risulta che i recettori TRPV1 sono coinvolti nella regolazione delle vie del dolore [140]. La defunionalizzazione dei recettori TRPV1 indotta dagli agonisti è sottolineata da un meccanismo di desensitizzazione dei nocicettori a lungo termine. La down-regulation indotta dalla capsaicina a livello dei recettori TRPV1 delle membrane, è stata usata come strategia per il trattamento del dolore in diverse formulazioni come creme, lozioni o patches ad elevate concentrazioni di capsaicina [142].

Inizialmente la CPS è in grado di attivare i recettori TRPV1, portando alla percezione del dolore. Tuttavia l'esposizione prolungata alla capsaicina può desensibilizzare il recettore TRPV1 o indurre l'internalizzazione e la sua degradazione.

In questo studio la capsaicina è stata inclusa nella matrice lipidica di sistemi SLN, che ne hanno permesso un lento e controllato rilascio impedendo la down-regulation del recettore TRPV1. Risulta quindi, che i veicoli SLN potrebbero rappresentare una valida alternativa ai veicoli convenzionali.

Importanti risultati si sono ottenuti anche con l'incapsulazione del Coenzima Q10 (CoQ10) all'interno di sistemi NLC. Infatti lo studio ha evidenziato che dal punto di vista formulativo il lipide più idoneo alla veicolazione del coenzima Q10, sia nella forma ossidata che nella ridotta, risulta essere il Precirol[®] 5 ATO in virtù degli studi condotti sulla caratterizzazione della sospensione nanoparticellare in termini di MD, PDI e potenziale Zeta. Inoltre, la formulazione a base di Precirol[®] 5 ATO si conferma essere la più stabile in seguito a liofilizzazione della preparazione rispetto al campione contenente il Compritol[®] 888 ATO. Gli studi di caratterizzazione condotti sulle NLC caricate con Q10 ossidato e ridotto, hanno portato a risultati analoghi a quelli riscontrati sulle nanoparticelle non caricate, confermandoci l'evidenza che il sistema nanoparticellare mantiene le proprie peculiarità anche con l'inclusione dell'attivo.

Dagli studi in vitro sui fibroblasti si è evidenziato che le NLC caricate con Q10 ridotto aumentano la vitalità cellulare rispetto alle cellule trattate con le NLC vuote, contrastando in maniera significativa l'aumento di ROS indotto da UV-A.

Per quanto riguarda il protocollo sperimentale della palmitoiletanolamide (PEA), i risultati ottenuti hanno dimostrato e confermato la capacità delle NLC nella veicolazione di PEA.

Gli studi di caratterizzazione hanno dimostrato un'ottima coerenza con quanto riportato in letteratura. Dai risultati ottenuti dagli studi di permeazione cutanea si è osservato un effetto promotore dei sistemi nanoparticellari nel favorire l'assorbimento percutaneo di PEA. E' degna comunque di nota la capacità di questi veicoli di produrre un rilascio prolungato dell'attivo nel corso delle 24 ore di monitoraggio. Le NLC formulate si sono dimostrate stabili, con una ridotta ed accettabile dispersione dimensionale e morfologicamente strutturate secondo le attese. I saggi calorimetrici, il calcolo del potenziale zeta e l'analisi dimensionale hanno dimostrato questi assunti.

Un valore particolare deriva, però, dall'analisi morfologica via TEM effettuata in questo studio. L'uso del TEM, come strumento di valutazione morfologica delle NLC è ampiamente diffuso ed è considerato una pratica standard [164]. Lo scopo dell'analisi TEM è solitamente quello di verificare le indicazioni dimensionali derivanti dall'analisi mediante z-sizer. Difficilmente si riescono ad ottenere indicazioni ulteriori. In tutti i lavori relativi alle nanoparticelle ed alle NLC, in particolare, la presenza di nano-compartimenti oleosi, dispersi in una fase lipidica solida, era stata dimostrata, finora, mediante metodi "indiretti" e piuttosto laboriosi [165]. Per la prima volta, attraverso una tecnica microscopica, per quanto accurata, questa presenza è palesemente dimostrata. E' possibile che un approccio diverso all'analisi TEM abbia favorito questo inatteso sviluppo. In particolare, è da notare come, nella figura 48, sia possibile osservare bene i compartimenti in particelle di dimensioni ridotte (≤ 100 nm). Lo stesso tipo di osservazione non è garantito, nel momento in cui si passa all'analisi di particelle di dimensioni maggiori. E' probabile che il tentativo di osservare le particelle di dimensioni maggiori, nell'ipotesi che proprio in queste fosse più facilmente rilevabile la presenza dei nano-compartimenti, abbia determinato la difficoltà ad osservarli. Le particelle più piccole, infatti, sono, nel complesso, meno elettrondense e presentano uno

spessore ridotto, che consente un'osservazione più accurata delle strutture interne, rispetto alle particelle di dimensioni maggiori, più elettrondense e con spessori più elevati. Altro aspetto, direttamente legato a questo, è rappresentato dai dati di rilascio e farmacologici ottenuti sulle NLC. E' stato dimostrato come, indipendentemente dalla sensibilità più o meno alta, del metodo analitico adoperato, le NLC caricate con PEA favoriscono il passaggio delle membrane SCE, che non avviene, o avviene in misura estremamente ridotta nel caso delle NLC caricate esternamente con PEA e nel caso della soluzione idroalcolica di PEA. Come ci si attendeva, anche dai dati presenti in letteratura, le NLC svolgono un ruolo di promotori di assorbimento rispetto al farmaco. Questo effetto è tanto più evidente quanto più la molecola di interesse presenta problemi di solubilità in ambiente acquoso e di eccessiva lipofilia, come, oggettivamente, avviene nel caso della PEA. Tant'è vero che la soluzione idroalcolica allo 0.5% di PEA praticamente non permea le membrane SCE. E' evidente dai dati ricavati che l'adesione cutanea, ed il conseguente effetto oclusivo, unite alle dimensioni ridotte delle NLC ed al loro effetto carrier, garantiscono un enorme incremento di penetrazione cutanea della PEA. A questo si associa un meccanismo di rilascio graduale del farmaco, in grado di favorire un effetto long-acting. Come rilevato dai saggi farmacologici, le NLC contenenti PEA rallentano l'insorgenza dell'azione fino a 6h, per prostrarla, almeno, fino a 24h. La sola PEA, nelle medesime condizioni sperimentali, ha un'azione immediata, ma estremamente breve, limitata alle prime 3h successive alla somministrazione. Resta inteso che il modello adoperato non è assimilabile ad un'applicazione topica vera e propria. Infatti le NLC sono state iniettate a livello sub-plantare, ma risulta dimostrato, sicuramente un rilascio graduale del farmaco, derivante dalla progressiva fuoriuscita dai nanocompartimenti oleosi delle NLC che rallentano l'effetto biologico, ma sono in grado di prolungarlo nel tempo. Bisogna considerare, poi, che la somministrazione sub-plantare determina una maggiore velocità di degradazione e assorbimento sistemico delle NLC, rispetto alla somministrazione topica, il che vuol dire che, al di là delle evidenze raccolte, le NLC caricate con PEA potrebbero presentare ulteriore prolungamento dell'effetto locale, in un modello di somministrazione topica.

In ultima analisi mi sono occupata di valutare la citotossicità dei sistemi carrier di ultima generazione (NLC), valutando l'effetto della formulazione nanoparticellare su

colture cellulari di fibroblasti umani sottoposti ad irraggiamento UVA. Sulla base dei risultati ottenuti, è possibile affermare che la formulazione con il migliore profilo di biocompatibilità è stata la NLC-C a base di Compritol® 888 ATO. Questa ha portato ad un'insignificante citotossicità nelle cellule non esposte agli UV-A, nessun incremento significativo della mortalità delle cellule esposte agli UV-A e nessun incremento del numero di cellule con alti livelli di ROS, sia esposte che non esposte agli UV-A. La formulazione peggiore è risultata la NLC-B a base di Geleol® Mono Digliceride che ha portato ad un incremento significativo della mortalità cellulare, sia nelle cellule esposte che nelle cellule non esposte agli UV-A. Inoltre, ha condotto ad un incremento delle cellule con alti livelli di ROS, specie se non esposte agli UV-A. La formulazione NLC-E (Softisan® 100) ha, invece, mostrato un trend variabile.

Si può, dunque, concludere che le particelle lipidiche nanostrutturate hanno mostrato un buon profilo di biocompatibilità con le colture cellulari di fibroblasti umani, non provocando effetti indesiderati sulla vitalità cellulare ed alterazioni dei livelli intracellulari delle specie radicaliche dell'ossigeno, come dimostrato dai saggi eseguiti. La scarsa citotossicità ha evidenziato che le preparazioni formulate hanno manifestato un buon margine di sicurezza sugli HDF, dimostrando un'ottima coerenza con quanto riportato in letteratura.

Bibliografia

- [1] Aggarwal BB, Sung B. 2009. **Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets.** Trends Pharmacol Sci 30: 85-94.
- [2] Jurenka JS. 2009. **Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research.** Altern Med Rev 14: 141-153.
- [3] Capella GL, Finzi AF. 2003. **Complementary therapy for psoriasis.** *Dermatol Ther.*,16, 164-174.
- [4] Yano S. 1958. **Experiment on the essentials of corticoid activity of glycyrrhizin.** J. Jpn. Assoc. Endoc., 34, 745-751.
- [5] Puglia C, Rizza L, Offerta A, Gasparri F, Giannini V, Bonina F. 2013. **Formulation strategies to modulate the topical delivery of anti-inflammatory compounds** J Cosmet Sci. Sep-Oct;64(5):341-53.
- [6] Kerube M. 1970. **Study on mechanism of anti-inflammatory action of glycyrrhetic acid.** *J. Keio Med. Soc.*, 47, 331-344.
- [7] Rains C, Bryson HM. 1995. **Topical capsaicin: A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in post-herpetic neuralgia, diabetic neuropathy and osteoarthritis.** *Drugs & Aging.* Oct;7(4):317-28.
- [8] Korać RR, Khambholja KM. 2011. **Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation.** *Pharmacogn Rev.* Jul;5(10):164-73.
- [9] Kalpana P, Mahendra K, Vipin S. 2013. **Solid dispersion: concept, BCS classification and role of carrier in improvising drug solubility.** *Novel Science International Journal of Pharmaceutical Science*, 2(5-6): 104-108.
- [10] Genevieve G, Prashant S, Marie-Christine J, Alexandra F, Jean- Christophe L. **Polymeric micelles for oral drug delivery.** 2010. *European J. of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 76: 147–158.

- [11] FDA. 2000. **Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms based on a Biopharmaceutics Classification System**, Guidance for Industry.
- [12] Kawabata Y, Wada K, Nakatani M, Yamada S, Onoue S. 2011. **Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications**. *Int. J. Pharm.* 420 1–10.
- [13] Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P. 2007. **Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs**. *Drug Discovery Today* 12 1068–1075.
- [14] Berge SM, Bighley LD, Monkhouse DC. 1977. **Pharmaceutical salts**. *J. Pharm. Sci.* 66, 1–19.
- [15] Rautio J, Kumpulainen H, Heimbach T, Oliyai R, Oh D, Jarvinen T. 2008. **J. Savolainen, Prodrugs: design and clinical applications**. *Nat. Rev. Drug Discovery* 7, 255–270.
- [16] Rabinow BE. 2004. **Nanosuspensions in drug delivery**. *Nat. Rev. Drug Discovery* 3, 785–796.
- [17] Loftsson T, Duchene D. 2007. **Cyclodextrins and their pharmaceutical applications**. *Int. J. Pharm* 329, 1–11.
- [18] Lavasanifar A, Samuel J, Kwon GS. 2002. **Poly (ethylene oxide)-block-poly (lamino acid) micelles for drug delivery**. *Adv. Drug Delivery Rev* 54, 169–190.
- [19] Mueller EA, Kovarik JM, van Bree JB, Tetzloff W, Grevel J, Kutz K. 1994. **Improved dose linearity of cyclosporine pharmacokinetics from a microemulsion formulation**. *Pharm. Res* 11, 301–304.
- [20] Fatouros DG, Deen GR, Arleth L, Bergenstahl B, Nielsen FS, Pedersen JS, Mullertz A. 2007. **Structural development of self nano emulsifying drug delivery systems (SNEDDS) during in vitro lipid digestion monitored by small-angle Xray scattering**. *Pharm. Res* 24, 1844–1853.

- [21] Muller RH, Peters K. 1998. **Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs: I. Preparation by a size-reduction technique.** *Int. J. Pharm*, 160, 229–237.
- [22] Potta SG, Minemi S, Nukala RK, Peinado C, Lamprou DA, Urquhart A, Douroumis D. 2010. **Development of solid lipid nanoparticles for enhanced solubility of poorly soluble drugs.** *J. Biomed. Nanotechnol*, 6, 634–640.
- [23] Chiou WL, Riegelman S. 1971. **Pharmaceutical applications of solid dispersion systems.** *J. Pharm. Sci.* 60, 1281–1302.
- [24] Vasanthavada M, Tong W-Q, Joshi Y, Kislalioglu MS. 2004. **Phase behavior of amorphous molecular dispersions I: determination of the degree and mechanism of solid solubility.** *Pharm. Res.* 21, 1598–1606.
- [25] Chauhan B, Shimpi S, Paradkar A. 2005. **Preparation and evaluation of glibenclamide-polyglycolized glycerides solid dispersions with silicon dioxide by spray drying technique,** *Eur. J. Pharm. Sci.* 26, 219–230.
- [26] Pokharkar VB, Mandpe LP, Padamwar MN, Ambike AA, Mahadik KR, Paradkar A. 2006. **Development, characterization and stabilization of amorphous form of a low Tg drug.** *Powder Technol.* 167, 20–25.
- [27] Van den Mooter G, Weuts I, De Ridder T, Bleton N. 2006. **Evaluation of Inutec SP1 as a new carrier in the formulation of solid dispersions for poorly soluble drugs.** *Int. J. Pharm.* 316.
- [28] Vauthier C, Bouchemal K. 2009. **Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles.** *Pharm Res*, 26: 1025-1058.
- [29] Vega-Villa K, Takemoto JK, Yáñez JA, et al. 2008. **Clinical toxicities of nanocarrier systems.** *Adv Drug Deliver Rev*, 60: 929-938.
- [30] Müller RH, Mehnert W, Lucks JS, et al. 1995. **Solid lipid nanoparticles (SLN)—an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery.** *Eur J Pharm Biopharm*, 41: 62–69.
- [31] Gasco MR. 1993. **Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution.** USA Patent 188, 837.

- [32] Schwarz C, Mehnert W, Lucks JS, Müller RH. 1994. **Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery: I. Production, characterization and sterilization.** *J Control Release*, 30: 83-96.
- [33] Freitas C, Müller RH. 1999. **Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase.** *Eur J Pharm Biopharm*, 47: 125-132.
- [34] Müller RH, Radtke M, Wissing SA. 2002. **Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs.** *Int J Pharm*, 242: 121-128.
- [35] Müller RH, Radtke M, Wissing SA, 2002. **Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 54,131–S155.
- [36] Pardeike J, Hommoss A, Müller RH. 2009. **Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products.** *Int J Pharm*, 366: 170-184.
- [37] Mehnert W, Mäder K. 2001. **Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications.** *Adv Drug Deliv Rev*, 47: 165-96.
- [38] Ricci M, Puglia C, Bonina F, et al. 2005. **Evaluation of indomethacin percutaneous absorption from nanostructured lipid carriers (NLC): In vitro and in vivo studies.** *J Pharm Sci*, 94: 1149-1159.
- [39] Lippacher A, Müller RH, Mäuder K. 2000. **Investigation on the viscoelastic properties of lipid based colloidal drug carriers.** *Int J Pharm*, 196: 227–230.
- [40] Zur Muhlen A, Mehnert W. 1998. **Drug release and release mechanism of prednisolone loaded solid lipid nanoparticles.** *Pharmazie*, 53: 552–555.
- [41] Zur Muhlen A, Schwarz C, Mehnert W. 1998. **Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery — Drug release and release mechanism.** *Eur J Pharm Biopharm*, 45: 149–155.
- [42] Lander R, Manger W, Scouloudis M, Ku A, Davis C, Lee A. 2000. **Gaulin homogenization: a mechanistic study.** *Biotechnol Prog*, 16: 80–85.

- [43] Jahnke S. 1998. **The theory of high pressure homogenization**, in: **R.H. Muller, S. Benita, B. Bohm (Eds.), Emulsions and nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs**. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, 177– 200.
- [44] Siekmann B, Westesen K. 1994. **Melt-homogenized solid lipid nanoparticles stabilized by the nonionic surfactant tyloxapol. I. Preparation and particle size determination**. Pharm Pharmacol, 3: 194–197.
- [45] Bunjes H, Siekmann B, Westesen K. 1998. **Emulsions of super-cooled melts — a novel drug delivery system**, in: **S. Benita (Ed.), Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery**. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 175– 204.
- [46] Zur Muhlen A. 1996. **Feste Lipid-Nanopartikel mit prolongierter Wirkstoffliberation: Herstellung, Langzeitstabilitat, Charakterisierung, Freisetungsverhalten und mechanismen**. Ph.D. Thesis, Free University of Berlin.
- [47] Sjostrom B, Bergenstahl B. 1992. **Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions. I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate**. Int J Pharm, 88: 53–62.
- [48] Siekmann B, Westesen K. 1996. **Investigations on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsions**. Eur J Pharm Biopharm, 43: 104–109;
- [49] Gasco MR. 1997. **Solid lipid nanospheres from warm micro emulsions**. Pharm Tech Eur, 9: 52–58.
- [50] Boltri L, Canal T, Esposito PA, Carli F. 1993. **Lipid nanoparticles: Evaluation of some critical formulation parameters**. Proc Intern Symp Control Rel Bioact Mater, 20: 346–347.
- [51] De Labouret A, Thioune O, Fessi H, Devissaguet JP, Puisieux F. 1995. **Application of an original process for obtaining colloidal dispersions of some coating polymers. Preparation, characterization, industrial scaling up**. Drug Dev Ind Pharm, 21: 229–241.
- [52] Gasco MR, Morel S, Carpigno R. 1992. **Optimization of the incorporation of desoxycortisone acetate in lipospheres**. Eur J Pharm Biopharm, 38: 7–10.

- [53] Speiser P. 1990. **Lipid nanopellets als Trägersystem für Arzneimittel zur peroralen Anwendung.** European Patent EP 0167825.
- [54] Domb AJ. 1993. **Lipospheres for controlled delivery of substances.** United States Patent, USS 188837.
- [55] Schwarz C. 1995. **Feste Lipidnanopartikel: Herstellung, Charakterisierung, Arzneistoffinkorporation und -freisetzung, Sterilisation und Lyophilisation.** Ph.D. Thesis, Free University of Berlin.
- [56] Siekmann B, Bunjes H, Koch MHJ, Westesen K. 2002. **Preparation and structural investigations of colloidal dispersions prepared from cubic monoglyceride/water phases.** Int J Pharm., 244, 33–43.
- [57] Esposito E, Cortesi R, Drechsler M, Paccamiccio L, Mariani P, Contado C, Stellin E, Menegatti E, Bonina F, Puglia C. 2005. **Cubosome dispersions as delivery systems for percutaneous administration of indomethacin.** Pharm Res., 22, 2163–2173.
- [58] Larsson K. 2000. **Aqueous dispersion of cubic lipid/water phases.** Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 5:64-69.
- [59] Landh T and Larsson K. 1996. **Particles, method of preparing said particles and uses thereof.** US patent no. 5531925.
- [60] Kim JS, Kim HK, Chung H, Sohn YT, Kwon IC, and Jeong SY. 2000. **Drug formulations that form a dispersed cubic phase when mixed with water.** Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater., 27:1118Y1119.
- [61] Spicer PT and Hayden KL. 2001. **Novel process for producing cubic liquid crystalline nanoparticles (cubosomes).** Langmuir 17:5748Y5756.
- [62] Gustafsson J, Ljusberg-Wharen H, Almgren M, and Larsson K. 1996. **Cubic lipid water phase dispersed into submicron particles.** Langmuir 12:4611Y4613.
- [63] De Campo L, Yaghmur A, Sagalowicz L, Leser ME, Watzke H, Glatter O. 2004. **Reversible phase transitions in emulsified nanostructured lipid systems.** Langmuir;20:5254.

- [64] Abraham T, Hato M, Hirai M. 2005. **Polymer-dispersed bicontinuous cubic glycolipid nanoparticles.** *Biotechnol Prog.*, 21:255.
- [65] Barauskas J, Johnsson M, Johnson F, Tiberg F. 2005. **Cubic phase nanoparticles (Cubosome): principles for controlling size, structure, and stability.** *Langmuir*, 21:2569.
- [66] Esposito E, Eblovi N, Rasi S, Drechsler M, Di Gregorio GM, Menegatti E, Cortesi R. 2003. **Lipid-based supramolecular systems for topical application: a preformulatory study.** *AAPS PharmSci.* 5(4) article 30.
- [67] Yaghmur A, Glatter O. 2009. **Characterization and potential applications of nanostructured aqueous dispersions.** *Adv Colloid Interface Sci.*, 147, 333–342.
- [68] Bunjes H. 2010. **Lipid nanoparticles for the delivery of poorly water-soluble drugs.** *J Pharm Pharmacol.*, Nov;62(11):1637-45.
- [69] Yang SC et al. 1999. **Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain.** *J Control Release*, 59: 299–307.
- [70] Chen DB et al. 2001. **In vitro and in vivo study of two types of long-circulating solid lipid nanoparticles containing paclitaxel.** *Chem Pharm Bull*, 49: 1444–1447.
- [71] Koziara JM et al. 2004. **Paclitaxel nanoparticles for the potential treatment of brain tumors.** *J Control Release*, 99: 259– 269.
- [72] Koziara JM et al. 2006. **In-vivo efficacy of novel paclitaxel nanoparticles in paclitaxel-resistant human colorectal tumors.** *J Control Release*, 112: 312–319.
- [73] Lee MK et al. 2007. **Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of paclitaxel-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles.** *Biomaterials*, 28: 2137–2146.
- [74] Xu Z et al. 2009. **The performance of docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles targeted to hepatocellular carcinoma.** *Biomaterials*, 30: 226–232.

- [75] Harivardhan Reddy L et al. 2005. **Influence of administration route on tumor uptake and biodistribution of etoposide loaded solid lipid nanoparticles in Dalton's lymphoma tumor bearing mice.** *J Control Release*, 105: 185–198.
- [76] Fontana G et al. 2005. **Solid lipid nanoparticles containing tamoxifen. Characterization and in vitro antitumoral activity.** *Drug Delivery*, 12: 385–392.
- [77] Naksuriya O, Okonogi S, Schiffelers RM, Hennink WE. 2014. **Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment.** *Biomaterials*, Mar;35(10):3365-83.
- [78] Hu L et al. 2004. **Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs.** *J Pharm Pharmacol*, 56: 1527–1535.
- [79] Luo Y et al. 2006. **Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability.** *J Control Release*, 114: 53–59.
- [80] Esposito E, Ravani L, Mariani P, Huang N, Boldrini P, Drechsler M, Valacchi G, Cortesi R, Puglia C. 2014. **Effect of nanostructured lipid vehicles on percutaneous absorption of curcumin.** *Eur J Pharm Biopharm*, Feb;86(2):121-32.
- [81] Arora R, Kuhad A, Kaur IP, Chopra K. 2014. **Curcumin loaded solid lipid nanoparticles ameliorate adjuvant-induced arthritis in rats.** *Eur J Pain.*, Nov 17.
- [82] Doktorovova S, Souto EB, Silva AM. 2014. **Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers - a systematic review of in vitro data.** *Eur J Pharm Biopharm.*, 2014 May;87(1):1-18.
- [83] Puglia C, Frasca G, Musumeci T, Rizza L, Puglisi G, Bonina F, Chiechio S. 2012. **Curcumin loaded NLC induces histone hypoacetylation in the CNS after intraperitoneal administration in mice.** *European Journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics.*, 81(2):288-93.
- [84] Esposito E, Mariani P, Ravani L, Contado C, Volta M, Bido S, Drechsler M, Mazzoni S, Menegatti E, Morari M, Cortesi R. 2012. **Nanoparticulate lipid dispersions for bromocriptine delivery: characterization and in vivo study.** *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 80, 306–314.

- [85] Pecora R. 2000. **Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids.** J. Nanoparticle Res., 2, 123–131.
- [86] Esposito E, Ravani L, Contado C, Costenaro A, Drechsler M, Rossi D, Menegatti E, Grandini A, Cortesi R. 2013. **Clotrimazole nanoparticle gel for mucosal administration.** Mater Sci Eng C Mater Biol Appl., Jan 1;33(1):411-8.
- [87] Kligman AM, Christophers E. 1963. **Preparation of isolated sheets of human stratum corneum.** Arch Dermatol., 88,702–705.
- [88] Swarbrick J, Lee G, Brom J. 1982. **Drug permeation through human skin. I. Effects of storage conditions of skin.** J Invest Dermatol., 78,63–66.
- [89] Bronaugh RL, Stewart RF, Simon M. 1986. **Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies VII: Use of excised human skin.** J Pharm Sci., 75,1094–1097.
- [90] Touitou E, Fabin B. 1988. **Altered skin permeation of a highly lipophilic molecule: Tetrahydrocannabinol.** Int J Pharm., 43,17–22.
- [91] Siewert M, Dressman J, Brown CK, Shah VP. 2003. **FIP/ AAPS guidelines to dissolution/*in vitro* release testing of novel/ special dosage forms.** AAPS PharmSciTech., 4:E7.
- [92] Wells JI. 1988. **Pharmaceutical Preformulation: The Physicochemical Properties of Drug Substances.** Chichester, UK: Ellis Horwood.
- [93] Merrell JG, McLaughlin SW, Tie L, Laurencin CT, Chen AF, Nair LS. 2009. **Curcumin-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanofibres: Diabetic wound dressing with anti-oxidant and anti-inflammatory properties.** Clin Exp Pharmacol Physiol., 36,1149–1156.
- [94] Lindstrom M, Ljusberg-Wahren H, Larsson K, Borgstrom B. 1981. **Aqueous lipid phases of relevance to intestinal fat digestion and absorption.** Lipids., 16,749–754.

- [95] Caboi F, Borne J, Nylander T, Khan A, Svendsen A, Patkar S. 2002. **Lipase action on a monoolein/sodium oleate aqueous cubic liquid crystalline phase—a NMR and X-ray diffraction study.** *Colloids Surf. B: Biointerfaces.*, 16,159–171.
- [96] Buccheim W, Larsson K. 1987. **Cubic lipid–protein–water phases.** *J. Colloid Interface Sci.*, 117,582–583.
- [97] Golding M, Sein A. 2004. **Surface rheology of aqueous casein-monoglyceride dispersions.** *Food Hydrocoll.*, 18,451–461.
- [98] Zhai J, Waddington L, Wooster TJ, Aguilar M-I, Boyd BJ. 2011. **Revisiting β -casein as a stabilizer for lipid liquid crystalline nanostructured particles.** *Langmuir.*, 27,14757–14766.
- [99] Began G, Sudharshan E, Udaya Sankar K, Appu Rao AG. 1999. **Interaction of curcumin with phosphatidylcholine: a spectrofluorometric study.** *J. Agric. Food Chem.*, 47,4992–4997.
- [100] Wang YJ, Pan M-H, Cheng A-L, Lin L-I, Ho Y-S, Hsieh C-Y, Lin J-K. 1997. **Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products.** *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15, 1867–1876.
- [101] Price LC, Buescher RW. 1996. **Decomposition of turmeric curcuminoids as affected by light, solvent and oxygen.** *J. Food Biochem.*, 20, 125–133.
- [102] Price LC, Buescher RW. 1997. **Kinetics of alkaline degradation of the food pigments curcumin and curcuminoids.** *J. Food Sci.*, 62, 267–269.
- [103] Tonnesen HH, Masson M, Loftsson T. 2002. **Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability.** *Int. J. Pharm.*, 244, 127–135.
- [104] Puglia C, Cardile V, Panico AM, Crascì L, Offerta A, Caggia S, Drechsler M, Mariani P, Cortesi R, Esposito E. 2013. **Evaluation of monooleine aqueous dispersions as tools for topical administration of curcumin: characterization, in vitro and ex-vivo studies.** *J. Pharm. Sci.*, 102, 2349–2361.

- [105] Lars N, Ashraf A. 2004. **Stratum corneum keratin structure, function, and formation: The cubic rod-packing and membrane templating model.** *J Invest Dermatol.*, 4, 715–732.
- [106] Gallet G, Carroccio S, Rizzarelli P, Karlsson S. 2002. **Thermal degradation of poly(ethylene oxide-propylene oxide-ethylene oxide) triblock copolymer: comparative [study by SEC/NMR, SEC/MALDI-TOF-MS and SPME/GC-MS.** *Polymer.*, 43, 1081-1094.
- [107] O' Dwyer SP, O' Beirne D, Eidhin DN, O' Kennedy BT. 2013. **Effects of sodium caseinate concentration and storage conditions on the oxidative stability of oil-in-water emulsions.** *Food Chem.*, 138, 1145-1152.
- [108] Miquel J, Bernd A, Sempere JM, Diaz-Alperi J, Ramirez A. 2002. **The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use.** *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 34, 37–46.
- [109] Balasubramanyam K, Varier RA, Altaf M, Swaminathan V, Siddappa NB, Ranga SU, Kundu TK. 2004. **Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein – specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription.** *J. Biol. Chem.* 279, 51163–51171.
- [110] Mai A, Rotili D, Tarantino D, Ornaghi P, Tosi F, Vicidomini C, Sbardella G, Nebbioso A, Miceli M, Altucci L, Filetici P. 2006. **Small-molecule inhibitors of histone acetyltransferase activity: identification and biological properties.** *J. Med. Chem.*, 49, 6897–6907.
- [111] Morimoto T, Sunagawa Y, Kawamura T, Takaya T, Wada H, Nagasawa A, Komeda M, Fujita M, Shimatsu A, Kita T, Hasegawa K. 2008. **The dietary compound curcumin inhibits p300 histone acetyltransferase activity and prevents heart failure in rats.** *J. Clin. Invest.*, 118, 868–878.
- [112] Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. 1997. **Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution.** *Nature* 389, 251–260.
- [113] Felsenfeld G, Groudine M. 2003. **Controlling the double helix.** *Nature* 421, 448–453.

- [114] Davie JR, Spencer VA. 1999. **Control of histone modifications.** *J. Cell. Biochem.*, S32– S33, 141–148.
- [115] Nightingale KP, O’Neill LP, Turner BM. 2006. **Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code.** *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 16, 125–136.
- [116] Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A. 2007. **Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis.** *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 14, 1008–1016.
- [117] Kouzarides T. 2007. **Chromatin modifications and their function.** *Cell* 128, 693–705.
- [118] Dekker FJ, Haisma HJ. 2009. **Histone acetyl transferases as emerging drug targets.** *Drug Discov. Today*, 14, 942–948.
- [119] Yang XJ, Seto E. 2007. **HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention.** *Oncogene* 26, 5310–5318,
- [120] Roth SY, Denu JM, Allis CD. 2001. **Histone acetyltransferases.** *Ann. Rev. Biochem.*, 70, 81–120.
- [121] Strahl BD, Allis CD. 2000. **The language of covalent histone modifications.** *Nature* 403, 41–45.
- [122] Peleg S, Sananbenesi F, Zovoilis A, Burkhardt S, Bahari-Javan S, Agis- Balboa RC, Cota P, Wittnam JL, Gogol-Doering A, Opitz L, Salinas-Riester G, Dettenhofer M, Kang H, Farinelli L, Chen W, Fischer A. 2010. **Altered histone acetylation is associated with age-dependent memory impairment in mice.** *Science* 328, 753–756.
- [123] Kang J, Chen J, Shi Y, Jia J, Zhang Y. 2005. **Curcumin-induced histone hypoacetylation: the role of reactive oxygen species.** *Biochem. Pharmacol.* 69, 1205–1213.

- [124] Sun H, Yang X, Zhu J, Lv T, Chen Y, Chen G, Zhong L, Li Y, Huang X, Huang G, Tian J. 2010. **Inhibition of p300-HAT results in a reduced histone acetylation and down-regulation of gene expression in cardiac myocytes.** *Life Sci.*, 87, 707–714.
- [125] Puglia C, Sarpietro MG, Bonina F, Castelli F, Zammataro M, Chiechio S. 2011. **Development, characterization, and in vitro and in vivo evaluation of benzocaine- and lidocaine-loaded nanostructured lipid carriers.** *J. Pharm. Sci.*, 100, 1892–1899.
- [126] Bunjes H, Unruh T. 2007. **Characterization of lipid nanoparticles by differential calorimetry, X-ray and neutron scattering.** *Advanced drug delivery reviews.*, 59:379–402.
- [127] Nayak AP, Tiyaboonchai W, Patankar S, Madhusudhan B, Souto EB. 2010. **Curcuminoids-loaded lipid nanoparticles: novel approach towards malaria treatment.** *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 81, 263–273.
- [128] Chiechio S, Zammataro M, Morales ME, Busceti CL, Drago F, Gereau RW, Copani A, Nicoletti F. 2009. **Epigenetic modulation of mGlu2 receptors by histone deacetylase inhibitors in the treatment of inflammatory pain.** *Mol. Pharmacol.*, 75 1014–1020.
- [129] Tiyaboonchai W, Tungpradit W, Plianbangchang P. 2007. **Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles.** *Int. J. Pharm.* 337, 299–306.
- [130] Mulik RS, Mönkkönen J, Juvonen RO, Mahadik KR, Paradkar AR. 2010. **Transferrin mediated solid lipid nanoparticles containing curcumin: enhanced in vitro anticancer activity by induction of apoptosis.** *Int. J. Pharm.* 398, 190–203.
- [131] Castelli F, Puglia C, Sarpietro MG, Rizza L, Bonina F. 2005. **Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry.** *Int. J. Pharm.* 304, 231–238.
- [132] Dunham NW, Miya TS. 1957. **A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice.** *J. Am. Pharm. Assoc. (Baltim)* 46, 208–209.

- [133] Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Kinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. 1998. **The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli.** *Neuron.*, 21, 531-543.
- [134] Caterina MJ. 2007. **Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 292, R64–R76.
- [135] Puglia C and Bonina F. 2012. **Lipid nanoparticles as novel delivery systems for cosmetics and dermal pharmaceuticals.** *Expert opinion on drug delivery.*, 9(4):429-441.
- [136] Schubert MA, Muller-Goymann CC. 2003. **Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles-evaluation of the method and process parameters.** *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics.*, Jan;55(1):125-31.
- [137] Jin L, Miyamoto O, Toyoshima T, Kobayashi R, Murakami TH, Itano T. 1997. **Localization of calbindin-D28k in normal and incised mouse skin: immunohistochemical and immunoblot analysis.** *Arch Dermatol Res.*, 289, 578-584.
- [138] Zimmermann E, Souto EB, Müller RH. 2005. **Physicochemical investigations on the structure of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) by means of DSC and 1H NMR.** *Pharmazie*, 60:508–513.
- [139] Siekmann B, Westesen K. 1994. **Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles.** *Colloids and surfaces, B Biointerfaces*, 3:159–175.
- [140] Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. 2000. **Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor.** *Science*, 288, 306–313.
- [141] Holzer P. 2008. **The pharmacological challenge to tame the transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) nocisensor.** *Br J Pharmacol.*, 155, 1145–1162.

- [142] Ellison N, Loprinzi CL, Kugler J, Hatfield AK, Miser A, Sloan JA, Wender DB, Rowland KM, Molina R, Cascino TL, Vukov AM, Dhaliwal HS, Ghosh C. 1997. **Phase III placebo-controlled trial of capsaicin cream in the management of surgical neuropathic pain in cancer patients.** *J Clin Oncol.*, 15, 2974-2980.
- [143] Littarru GP, Tiano L. 2007. **Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: recent developments.** *Mol Biotechnol.*, Sep;37(1):31-7.
- [144] Hoppe U, Bergemann J, Diembeck W, Ennen J, Gohla S, Harris I, Jacob J, Kielholz J, Mei W, Pollet D, Schachtschabel D, Sauermann G, Schreiner V, Stäb F, Steckel F. 1999. **Coenzyme Q10, a cutaneous antioxidant and energizer.** *BioFactors*, 9:371-378.
- [145] Schwarz C, Mehnert W. 1997. **Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN).** *Int J Pharm.* Nov 28;157(2):171-179.
- [146] Jennings V, Thünemann A, Gohla SH. 2000. **Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids.** *Int. J. Pharm.*, 199,167-177.
- [147] Inui M, Ooe M, Fujii K, Matsunaka H, Yoshida M, Ichihashi M. 2008. **Mechanisms of inhibitory effects of CoQ10 on UVB-induced wrinkle formation in vitro and in vivo.** *Biofactors*, 32:237-243.
- [148] Svobodová A, Walterová D, Vostálová J: 2006. **Ultraviolet light induced alteration to the skin.** *Biomed papers Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, 150:25-38.
- [149] De Petrocellis L, Bisogno T, Ligresti A, Bifulco M, Melck D, Di Marzo V. 2002. **Effect on cancer cell proliferation of palmitoylethanolamide, a fatty acid amide interacting with both the cannabinoid and vanilloid signalling systems.** *Blackwell Science Fundamental & Clinical Pharmacology* 16, 297–302.
- [150] De Filippis D, D'Amico A, and Iuvone T, 2008. **Cannabinomimetic Control of Mast Cell Mediator Release: New Perspective in Chronic Inflammation.** *Journal of Neuroendocrinology* 20, 20–25.

- [151] Scuderi C, Valenza M, Stecca C, Esposito G, Carratù R.M. and Steardo L, 2012. **Palmitoylethanolamide exerts neuroprotective effects in mixed neuroglial cultures and organotypic hippocampal slices via peroxisome proliferator-activated receptor- α** . *Journal of Neuroinflammation* 9, 1-7.
- [152] Keppel JM, Hekker TH, 2012. **Therapeutic utility of palmitoylethanolamide in the treatment of neuropathic pain associated with various pathological conditions: a case series**. *Journal of Pain Research* 5, 437–442.
- [153] D'Agostino G, La Rana G, Russo R, Sasso O, Iacono A, Esposito E, Raso G, Cuzzocrea S, Lo Verme J, Piomelli D, Meli R, and Calignano A, 2007. **Acute Intracerebroventricular Administration of Palmitoylethanolamide, an Endogenous Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Agonist, Modulates Carrageenan-Induced Paw Edema in Mice. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 322, 1137–1143.
- [154] Sheerin A.H, Zhang X, Saucier D. and Corcoran M, 2004. **Selective Antiepileptic Effects of *N*-Palmitoylethanolamide, a Putative Endocannabinoid**. *Epilepsia* 45, 1184–1188.
- [155] Eberlein B, Eicke C, Reinhardt HW, Ring J., 2008. **Adjuvant treatment of atopic eczema: assessment of an emollient containing *N*-palmitoylethanolamine (ATOPA study)**. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 22, 73-82.
- [156] Almeida JS, Lima F, Ros SD, Bulhoes LO, de Carvalho LM, Beck RC. 2010. **Nanostructured Systems Containing Rutin: In Vitro Antioxidant Activity and Photostability Studies**. *Nanoscale Res Lett*, 5, 1603-1610.
- [157] Yagen B, Burnstein S, 2000. **Novel and sensitive method for the detection of anandamide by the use of its dansyl derivative**. *J Chromatog, B* 740, 93-9.
- [158] Lewinski N, Colvin V, Drezek R, 2008. **Cytotoxicity of Nanoparticles**. *Small* 4, 26-49.
- [159] Venditti E, Spadoni T, Tiano L, Astolfi P, Greci L, et al., 2008. **In vitro photostability and photoprotection studies of a novel 'multi-active' UV-absorber**. *Free Radic Biol Med*, 45: 345–354.

- [160] Khan N, Jeffers M, Kumar S, Hackett C, Boldog F, Khramtsov N, Qian X, Mills E, Berghs SC, Carey N, Finn PW, Collins LS, Tumber A, Ritchie JW, Jensen PB, Lichenstein HS, Sehested M. 2008. **Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors.** *Biochem. J.* 409, 581–589.
- [161] Myzak MC, Dashwood RH. 2006. **Histone deacetylases as targets for dietary cancer preventive agents: lessons learned with butyrate, diallyl disulfide, and sulforaphane.** *Curr. Drug Targets* 7, 443–452.
- [162] Hooker JM, Kim SW, Alexoff D, Xu Y, Shea C, Reid A, Volkow N, Fowler JS. 2010. **Histone deacetylase inhibitor, MS-275, exhibits poor brain penetration: PK studies of [C]MS-275 using positron emission tomography.** *ACS Chem. Neurosci.* 1, 65–73.
- [163] Pan MH, Huang TM, Lin JK. 1999. **Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice.** *Drug Metab. Dispos.* 27, 486–494;
- [164] Muller RH, Radtke M, Wissing SA. 2002. **Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations.** *Adv Drug Deliv Rev*, 54 Suppl 1, S131-155.
- [165] Jores K, Mehnert W, Drechsler M, Bunjes H, Johann C, Mader K. 2004. **Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy.** *J Control Release*, 95, 217-227.