



Ministero dell'Università  
e della Ricerca



Università degli Studi di  
Palermo

***Università degli Studi di Palermo***

---

**Facoltà di Farmacia**  
**Dipartimento di Scienze e Tecnologie Molecolari e Biomolecolari**

DOTTORATO DI RICERCA  
IN

***“Tecnologie delle Sostanze Biologicamente Attive”***

XXIII CICLO, A.A. 2008/2009

SSD CHIM/09

**SISTEMI D'INTERESSE FARMACEUTICO**  
**INTERAZIONE CON MODELLI DI BIOMEMBRANA MEDIANTE**  
**METODI CHIMICO-FISICI:**  
**TECNICHE CALORIMETRICHE E MONOLAYERS**

**Coordinatore:**

*Ch.mo Prof. Gaetano Giammona*

**Tesi di Dottorato di Ricerca di:**

*Maria Chiara Giuffrida*

**Tutor:**

*Ch.mo Prof. Francesco Castelli*

## INDICE

<b>PREMESSA</b>	pag. 1
<b>INTRODUZIONE</b>	pag. 2
Liposomi come modelli di membrana biologica	pag. 2
Tecniche impiegate per lo studio d'interazione con i modelli di biomembrana	
Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC)	pag. 8
Langmuir-Blodgett	pag. 13
<b>INTERAZIONE DI FARMACI CON MODELLI DI BIOMEMBRANA</b>	
1. Resveratrolo e suoi derivati	pag. 18
1.1. Materiali	pag. 21
1.2. Preparazione dei liposomi: MLV	pag. 22
1.3. Analisi DSC	pag. 23
1.4. Misure di tensione superficiale: Langmuir-Blodgett	pag. 25
1.5. Risultati e discussione	pag. 26
1.5.1. Analisi DSC	pag. 26
1.5.2. Misure di tensione superficiale: Langmuir-Blodgett	pag. 37
1.6. Conclusioni	pag. 50
2. Cumarine	pag. 52
2.1. Materiali	pag. 53
2.2. Preparazione dei liposomi: MLV	pag. 55
2.3. Analisi DSC	pag. 55
2.4. Misure di tensione superficiale: Langmuir-Blodgett	pag. 55
2.5. Risultati e discussione	pag. 56
2.5.1. Analisi DSC	pag. 56
2.5.2. Misure di tensione superficiale: Langmuir-Blodgett	pag. 66
2.6. Conclusioni	pag. 70
3. Terpeni	pag. 71
3.1. Materiali	pag. 75
3.2. Preparazione dei liposomi: MLV	pag. 75
3.3. Analisi DSC	pag. 76
3.4. Risultati e discussione	pag. 76

3.5. Conclusioni	pag. 83
------------------	---------

## **INTERAZIONE TRA DRUG DELIVERY SYSTEMS E MODELLI DI BIOMEMBRANA**

4. Sistemi nanoparticellari come Drug Delivery Systems	pag. 84
4.1. Nanoparticelle lipidiche	pag. 86
4.2. SLN come Drug Delivery System per il Sistema Nervoso Centrale	pag. 87
4.3. SLN profarmaco levodopa-acido caffeico	pag. 88
4.3.1. Materiali	pag. 88
4.3.2. Preparazione SLN	pag. 89
4.3.3. Contenuto di profarmaco disperso nelle SLN	pag. 89
4.3.4. Caratterizzazione delle SLN tramite Cryo-TEM	pag. 90
4.3.5. Analisi DSC	pag. 90
4.4. Risultati e discussione	pag. 91
4.4.1. Contenuto di profarmaco disperso nelle SLN	pag. 91
4.4.2. Caratterizzazione delle SLN tramite Cryo-TEM	pag. 91
4.4.3. Analisi DSC	pag. 91
4.5. Conclusioni	pag. 98
5. Aggregati Lipidici Supramolecolari	pag. 99
5.1. Idebenone	pag. 100
5.2. Materiali	pag. 101
5.2.1. Analisi dimensionale e di stabilità	pag. 102
5.2.2. Valutazione delle dimensioni mediante light scattering	pag. 103
5.2.3. Valutazione dei profili di rilascio e di permeazione percutanea	pag. 104
5.2.4. Determinazione analitica dell'Idebenone	pag. 105
5.2.5. Studi in vivo su volontari sani: la spettroscopia di riflettenza	pag. 105
5.2.6. Studi dell'interazione dei vari carrier con la pelle in vivo	pag. 106
5.2.7. Microscopia confocale	pag. 107
5.3. Preparazione dei liposomi: MLV	pag. 107
5.4. Analisi DSC	pag. 108
5.5. Risultati e discussione	pag. 110
5.5.1. Analisi dimensionale e di stabilità	pag. 110
5.5.2. Valutazione delle dimensioni mediante light scattering	pag. 112

5.5.3. Valutazione dei profili di rilascio e di permeazione percutanea	pag. 113
5.5.4. Studi dell'interazione dei vari carrier con la pelle in vivo	pag. 114
5.5.5. Analisi DSC	pag. 116
5.6. Conclusioni	pag. 129
6. Caratterizzazione di SLN come carrier per la veicolazione di filtri solari	pag. 130
6.1. Le radiazioni UV e gli effetti sulla cute umana	pag. 130
6.2. Materiali	pag. 138
6.3. Metodo di preparazione	pag. 138
6.4. Analisi dimensionale	pag. 141
6.5. Analisi DSC	pag. 141
6.6. Risultati e discussione	pag. 142
6.6.1. Analisi dimensionale	pag. 142
6.6.2. Analisi DSC	pag. 143
6.7. Conclusioni	pag. 149
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	pag. 151
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 152

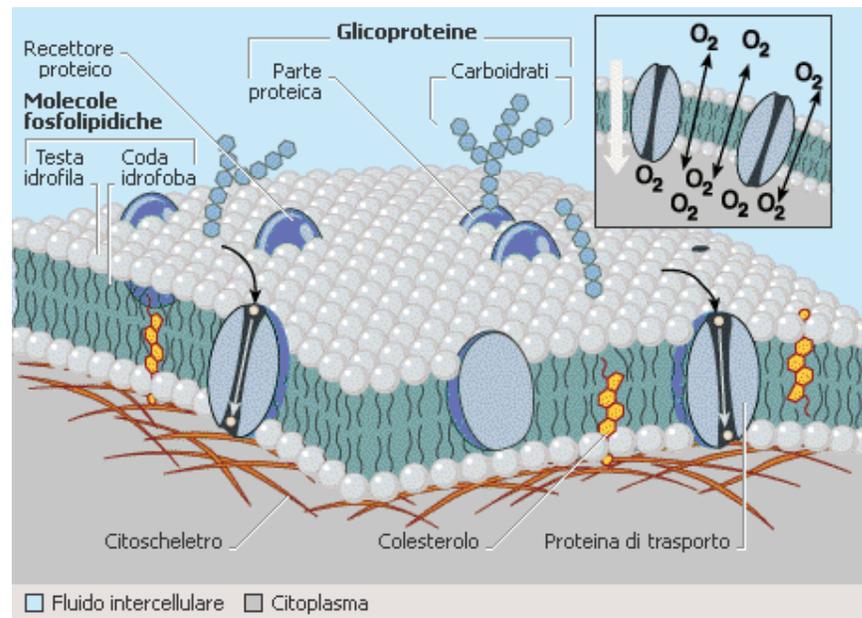
## PREMESSA

L'attraversamento della membrana cellulare è un requisito fondamentale per permettere, sia ai farmaci liberi che inglobati in "sistemi di interesse farmaceutico", di espletare la loro azione farmacologia. Per questo è importante riuscire a determinare l'entità dell'interazione con la membrana biologica e il profilo cinetico con cui questi composti interagiscono, per capire quali sono i fattori che influiscono su queste interazioni. Le forme farmaceutiche convenzionali presentano diversi inconvenienti tra cui una durata d'azione del principio attivo troppo breve che induce a frequenti somministrazioni che possono dar vita a fenomeni di accumulo e conseguente tossicità. Spesso sono necessarie dosi elevate a causa di una scarsa specificità d'organo e delle proprietà chimico-fisiche sfavorevoli del farmaco, come ad esempio un'eccessiva o insufficiente solubilità in acqua che ne limita la biodisponibilità. Per evitare questi problemi è possibile l'impiego di "*Drug Delivery Systems*" che migliorano l'effetto terapeutico di un farmaco modificandone la quota rilasciata e prolungandone l'effetto. Alla base di queste considerazioni assume notevole importanza riuscire a determinare la capacità di questi sistemi di rilascio di interagire con il layer fosfolipidico, quando sono posti a contatto con una membrana modello, e i fattori che possono influire su queste interazioni. L'insieme dei dati ottenuti dal lavoro di ricerca può quindi essere utile per prevedere la biodisponibilità e l'efficacia dei composti.

## INTRODUZIONE

### Liposomi come modelli di membrana biologica

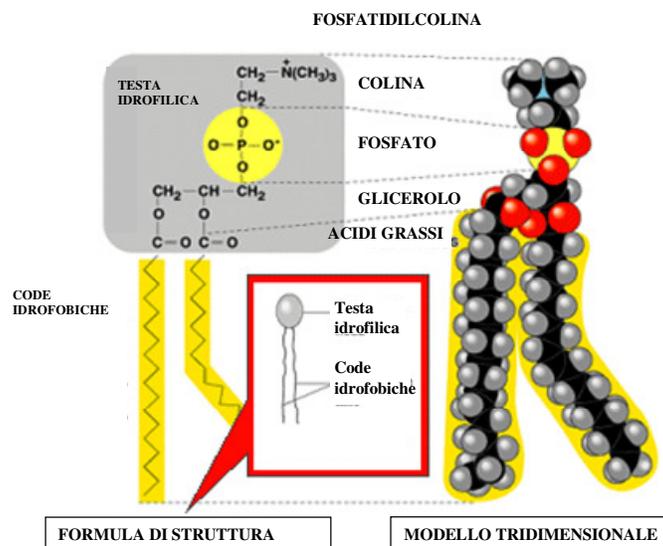
Ogni cellula è circondata da una membrana plasmatica (fig. 1), che definisce l'estensione cellulare e mantiene le differenze essenziali tra il contenuto e l'ambiente esterno permettendo la comunicazione intercellulare. La membrana plasmatica è composta essenzialmente da lipidi e proteine disposti in un modello a "mosaico fluido" proposto nel 1972 da Singer e Nicolson. Secondo tale modello, l'intelaiatura in cui le proteine sono immerse, è costituita da un doppio strato lipidico allo stato liquido-cristallino ed è proprio grazie alla fluidità della componente lipidica che le proteine presentano un notevole grado di mobilità, necessario per esplicare la gran parte delle funzioni di membrana.



**Fig. 1:** Organizzazione della membrana cellulare.

Il doppio strato lipidico non ha carattere omogeneo, ma all'interno del mosaico fluido sono presenti microdomini lipidici meno fluidi formati da sfingolipidi e colesterolo. Quindi il concetto iniziale del modello a mosaico fluido basato sull'ampia libertà di rotazione e di movimento laterale delle proteine, è

stato rivisto a favore di un modello in cui la mobilità delle proteine è ristretta sia dai legami lipidi-lipidi, proteina-proteina o proteina-lipidi, sia dalle interazioni delle proteine con il citoscheletro, con la matrice cellulare o con cellule adiacenti. I lipidi costituiscono circa il 50% della massa della membrana plasmatica e possono essere distinti in tre classi principali: fosfolipidi (70 % del peso lipidico totale), colesterolo (20 %) e glicolipidi (5 %). Esiste una gran varietà di fosfolipidi, la cui struttura si differenzia in base alla natura delle teste polari idrofile, formate da un gruppo fosfato legato mediante un legame estereo ad un alcol e ad una coda idrofobica costituita da catene carboniose di acidi grassi saturi e insaturi. La composizione in acidi grassi è tipica di ogni specie, ogni tessuto ed ogni organello; all'interno di un dato tipo cellulare influenza notevolmente la struttura, la funzione e le proprietà della membrana. In figura 2 è rappresentata in maniera schematica la struttura dei fosfolipidi: è possibile individuare: due catene idrocarburiche non polari esterificate con la posizione 1 e 2 del glicerolo, la posizione 3 è esterificata con un gruppo fosfato, a sua volta legato ad un alcool; se l'alcool legato è, per esempio, una colina si ottiene la fosfatidilcolina (PC), uno tra i costituenti principali dei fosfolipidi nelle membrane cellulari, a pH fisiologico, possiede una carica negativa sul gruppo fosfato e una carica positiva sul gruppo ammonio quaternario.



**Fig. 2:** Rappresentazione grafica della struttura di fosfolipidi: fosfatidilcolina.

Altri fosfolipidi hanno invece legato al gruppo fosfato l'etanolammina, costituendo la fosfatidiletanolammina (PE), un altro componente dei fosfolipidi di membrana che possiede una carica positiva sul gruppo amminico. Tale gruppo può essere deprotonato a pH 9-10 e dare un gruppo amminico non carico. La fosfatidilserina (PS) contiene, sul gruppo fosfato e sul gruppo carbossilico una carica negativa, mentre sul gruppo amminico è localizzata una carica positiva: questo lipide esibisce, perciò, a pH neutro una carica totale negativa. E' un fosfolipide acido perché contiene nella molecola un solo gruppo amminico, una funzione carbossilica acida dissociabile come anione ed un gruppo ossidrilico non esterificato dell'acido fosforico, anch'esso quindi dissociato in forma anionica.

Quando i due ossidrili in posizione 1 e 2 del glicerolo sono esterificati con due acidi grassi e l'ossidrilico in posizione 3 con l'acido fosforico, il fosfolipide è chiamato acido fosfatidico (PA).

I fosfolipidi, nel formare il doppio strato lipidico della membrana, si dispongono in modo tale da orientare la parte apolare, costituita dalle catene idrocarburiche degli acidi grassi, verso la zona più interna della membrana (strato idrofobico) e la testa polare, costituita da glicerolo fosfato e basi organiche, verso il mezzo acquoso all'esterno e all'interno della membrana. Questa disposizione determina la carica superficiale della membrana cellulare.

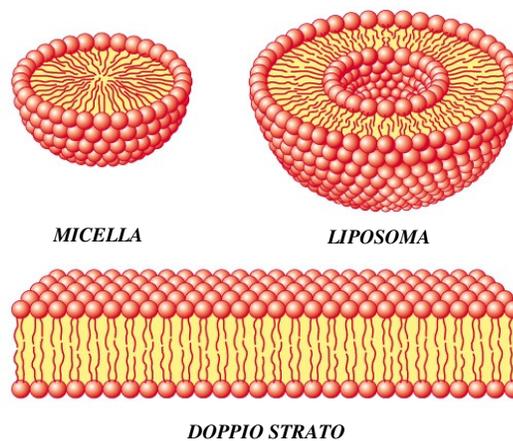
Nello studio delle proprietà delle membrane biologiche si ricorre spesso a sistemi modello ossia a *liposomi* preparati con fosfolipidi sia sintetici (dipalmitoilfosfatidilcolina, DPPC; dimiristoilfosfatidilcolina, DMPC; acido dimiristoilfosfatidico, DMPA; dilaurilfosfatidilcolina, DLPC) che naturali (fosfatidilcolina, PC; fosfatidilserina, PS; fosfatidilglicerolo, PG; etc.) (K.M.G. Taylor and R.M. Morris, 1995). Nel *core* idrofobico di queste membrane modello, i doppi legami delle catene aciliche dei fosfolipidi hanno una precisa disposizione che è regolata dall'arrangiamento sopramolecolare delle teste polari e delle code apolari. Il sistema liposomiale grazie alla sua duttilità è capace di adattarsi ad esigenze terapeutiche e formulative e per questo è stato possibile lo sviluppo di alcune linee di ricerca che vedono i liposomi come modelli di membrana utili per studiare i meccanismi e le cinetiche di trasporto di varie specie molecolari.

Considerando parametri come lo spessore, la capacità, la resistenza, il potenziale di rottura e la permeabilità all'acqua, è possibile notare come i liposomi siano strutturalmente simili alle membrane cellulari (tabella 1).

**Tabella 1.** Confronto tra membrane cellulari e doppi strati lipidici artificiali.

	<b>Spessore</b>	<b>Capacità</b>	<b>Resistenza</b>	<b>Potenziale di rottura</b>	<b>Permeabilità all'acqua</b>
<b>Membrana Cellulare</b>	6-10 nm	0.5-1.3 $\mu\text{F cm}^{-2}$	$10^2$ - $10^5$ $\Omega \text{ cm}^2$	>150 mV	$<10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$
<b>Membrana Artificiale</b>	4.5-8 nm	0.3-1.3 $\mu\text{F cm}^{-2}$	$10^6$ - $10^9$ $\Omega \text{ cm}^2$	100-200 mV	$4 \cdot 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$

I liposomi sono, già da tempo, largamente studiati come “carrier” per modificare e quindi migliorare il comportamento farmacocinetico di diversi farmaci (F. Castelli *et al.*, 1997; F. Castelli *et al.*, 1998, 2000a, 2000b; A. Raudino *et al.*, 1998). I fosfolipidi se dispersi in un mezzo acquoso hanno la capacità di formare spontaneamente doppi strati, aggregandosi in modi differenti (fig. 3).

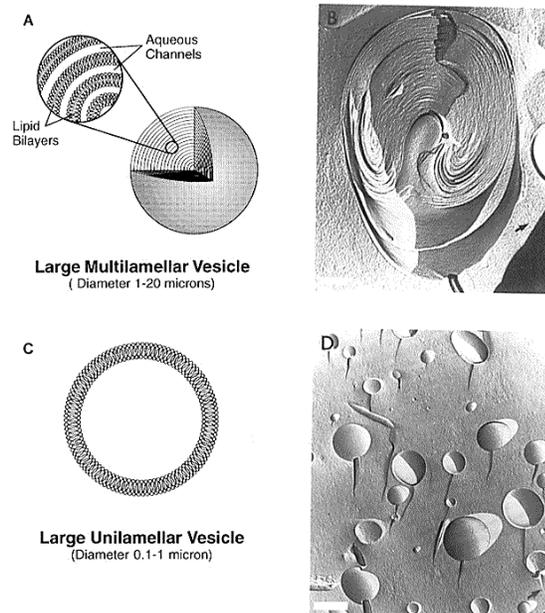


**Fig. 3:** Fosfolipidi in ambiente acquoso: micelle, vescicole chiuse a doppi strati e doppi strati.

Le strutture vescicolari, quindi sferoidali, delimitate da uno o più doppi strati fosfolipidici, aventi un diametro compreso tra 20 nm e 20  $\mu\text{m}$  sono dette "liposomi". In queste strutture i fosfolipidi sono arrangiati in modo tale da formare uno o più strati concentrici, detti *lamelle*, separati da uno o più strati acquosi (rispettivamente liposomi unilamellari e multilamellari). In base al metodo di preparazione si possono ottenere diversi tipi di liposomi, che possono essere così classificati:

- Multilamellar Vesicles (MLV);
- Large Unilamellar Vesicles (LUV);
- Small Unilamellar Vesicles (SUV).

Gli MLV sono costituiti da doppi strati concentrici separati da un compartimento acquoso; a seconda del numero di strati il diametro di questi liposomi varia da 0,4 a 3,5  $\mu\text{m}$ , quello della cavità acquosa da 0,10 a 0,15  $\mu\text{m}$ . I LUV sono liposomi unilamellari formati da un unico doppio strato lipidico, di dimensioni maggiori rispetto a quello che caratterizza i SUV, con un diametro compreso tra 0,1 e 1  $\mu\text{m}$ . I SUV sono piccoli liposomi unilamellari formati da un unico doppio strato fosfolipidico e da una sola cavità acquosa con un diametro compreso tra 20 e 50  $\mu\text{m}$ .



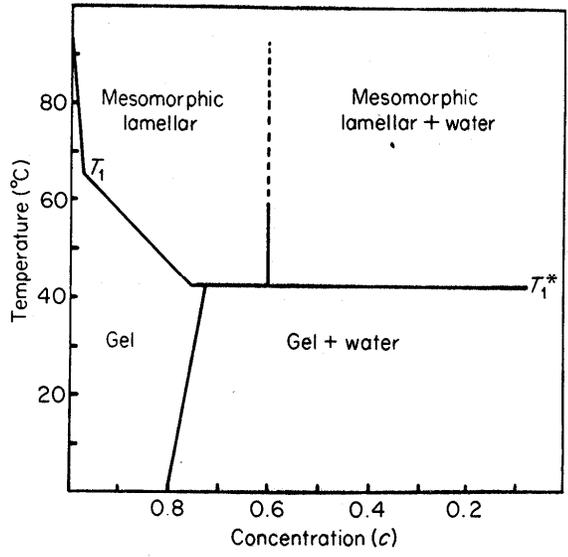
**Fig. 4:** Vescicole Multilamellari (MLV): (A) rappresentazione schematica; (B) MLV al microscopio elettronico. Vescicole Unilamellari (LUV): (C) rappresentazione schematica; (D) LUV al microscopio elettronico. La tecnica utilizzata è la *freeze fracture electron microscopy*.

La figura 4 mostra come appaiono gli MLV e i LUV al microscopio elettronico usando la tecnica di caratterizzazione dei liposomi chiamata *freeze fracture electron microscopy*, nella quale i campioni sono velocemente congelati, fratturati e replicati utilizzando platino e poi trattati con sodiododecilsolfato in modo da rimuovere il materiale biologico eccetto un sottile layer di molecole attaccato alla copia. L'ombreggiatura con il platino permette quindi di ottenere una "replica" che successivamente può essere sottoposta ad analisi microscopica. (H. Robenek and N.J. Severs, 2008). La natura anfifilica dei liposomi permette il loro uso come *Drug Delivery System*, dal momento che i principi attivi si possono collocare in maniera differente in funzione delle loro caratteristiche chimico-fisiche, infatti: le sostanze idrosolubili sono trattenute negli spazi acquosi tra le lamelle o nello spazio acquoso interno dei liposomi; le sostanze liposolubili trovano collocazione tra le catene idrofobiche degli acidi grassi; le sostanze anfotere si possono collocare con la parte idrofila all'esterno dei bilayer e con la parte idrofoba all'interno.

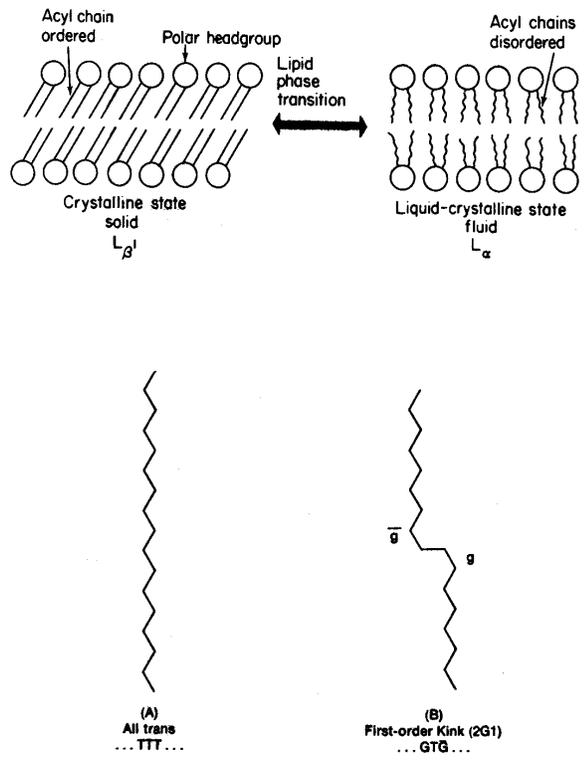
## TECNICHE IMPIEGATE PER STUDIARE L'INTERAZIONE CON MODELLI DI BIOMEMBRANA

### Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC)

La Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC) è una tecnica che consente di determinare, durante una scansione effettuata con incrementi lineari della temperatura, la variazione d'entalpia di processo ( $\Delta H$ ) mediante misura del flusso di calore necessario per mantenere il campione della sostanza in esame alla stessa temperatura di un campione di riferimento. Una sostanza quando subisce una modificazione fisica, sia essa una fusione o una transizione da uno stato cristallino ad un altro, o quando reagisce chimicamente, assorbe o libera energia, generalmente sotto forma di calore. La tecnica consente, inoltre, di eseguire misure di capacità termica, di emissività termica e di purezza di campioni solidi; inoltre essa consente lo studio di equilibri di fase e della cinetica dei processi (*D. Gao and J.H. Rytting, 1997*). La DSC, è stata largamente usata per studiare i sistemi liposomiali. I fosfolipidi, infatti, quando sono idratati presentano caratteristiche liotrope, cioè l'esistenza di differenti fasi, quali gel e cristallo liquido, in funzione della differente percentuale d'acqua e della temperatura (*K.M.G. Taylor and R.M. Morris, 1995*). Come riportato nel diagramma di fase (fig. 5), al variare della percentuale d'acqua si ha una transizione di fase gel-cristallo liquido, caratterizzata sia da una temperatura di transizione,  $T_m$ , sia da una variazione d'entalpia,  $\Delta H$ . Nei casi in cui la percentuale d'idratazione è superiore al 18 % in peso d'acqua si può osservare, per una temperatura inferiore alla temperatura di transizione della sostanza, l'esistenza di una fase gel (solido-cristallina), dove le catene alifatiche dei fosfolipidi si orientano parallelamente le une alle altre, con i gruppi metilenici in configurazione "tutta trans", come si può osservare in figura 6.



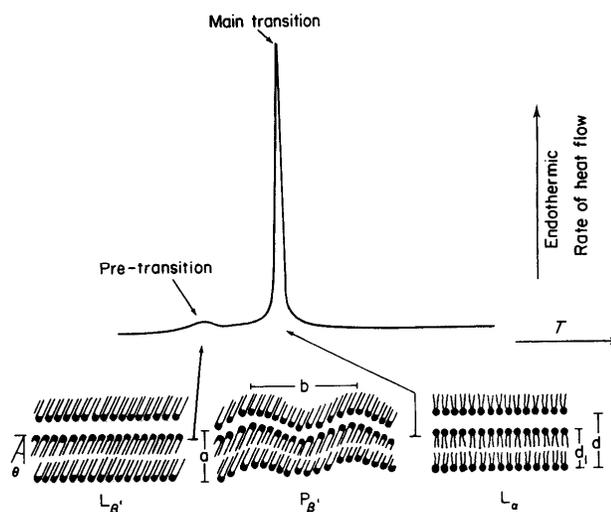
**Fig. 5:** Diagramma di fase del sistema 1,2-dipalmitoil-L-fofatidilcolina/H<sub>2</sub>O.



**Fig. 6:** Transizione di fase di fosfolipidi.

In questa fase le catene sono impaccate saldamente e la loro libertà di movimento è ristretta (fase  $L_{\beta}$ ). Al di sopra della temperatura di transizione, si osserva l'esistenza di una fase liquida cristallina (fase  $L_{\alpha}$ ), dove le catene alifatiche sono più mobili e presentano una conformazione "cis" causando la distruzione dell'orientamento ordinato del layer lipidico (fusione delle catene). La temperatura di transizione rappresenta un'importante caratteristica di tutte le membrane, costituite da fosfolipidi, ed è notevolmente influenzata dalla natura delle catene alifatiche e da quella del gruppo polare del fosfolipide.

La Calorimetria a Scansione Differenziale si è rivelata una tecnica particolarmente utile in quanto consente di determinare in modo accurato la temperatura, la natura (endotermica o esotermica) del processo e l'entità degli effetti termici associati alle transizioni di fase. Il passaggio da uno stato più ordinato ad uno meno ordinato richiede assorbimento di calore, che si manifesta nella curva DSC come un effetto endotermico (fig. 7).

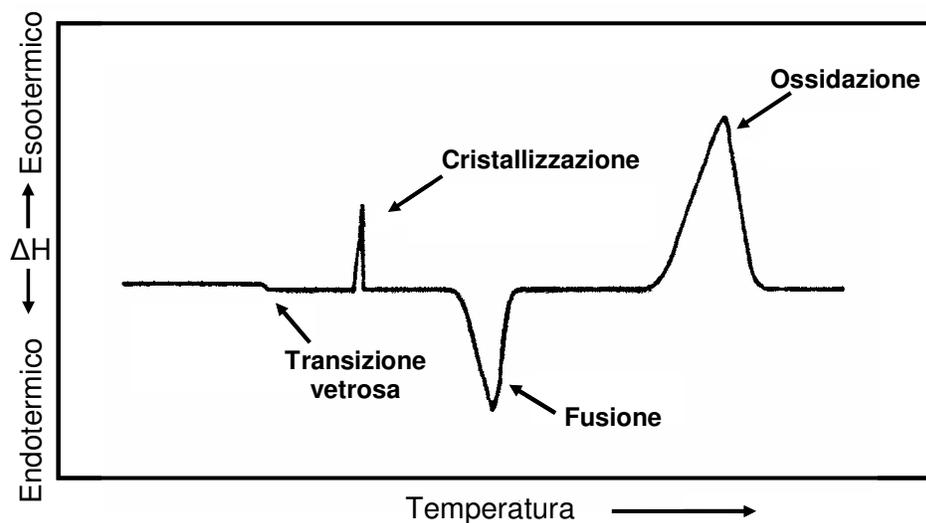


**Fig. 7:** Tracciato calorimetrico della transizione gel-cristallo liquido di liposomi di DPPC.

Dall'analisi DSC è possibile ricavare due parametri importanti che sono: la temperatura di transizione,  $T_m$ , e la variazione di entalpia,  $\Delta H$ . Nella figura 7 è riportato il picco endotermico della transizione gel-cristallo liquido  $L_{\beta} \rightarrow L_{\alpha}$  dei liposomi di DPPC. L'interazione di una sostanza con il bilayer fosfolipidico può causare la depressione della temperatura di transizione,  $T_m$ , gel-cristallo liquido,

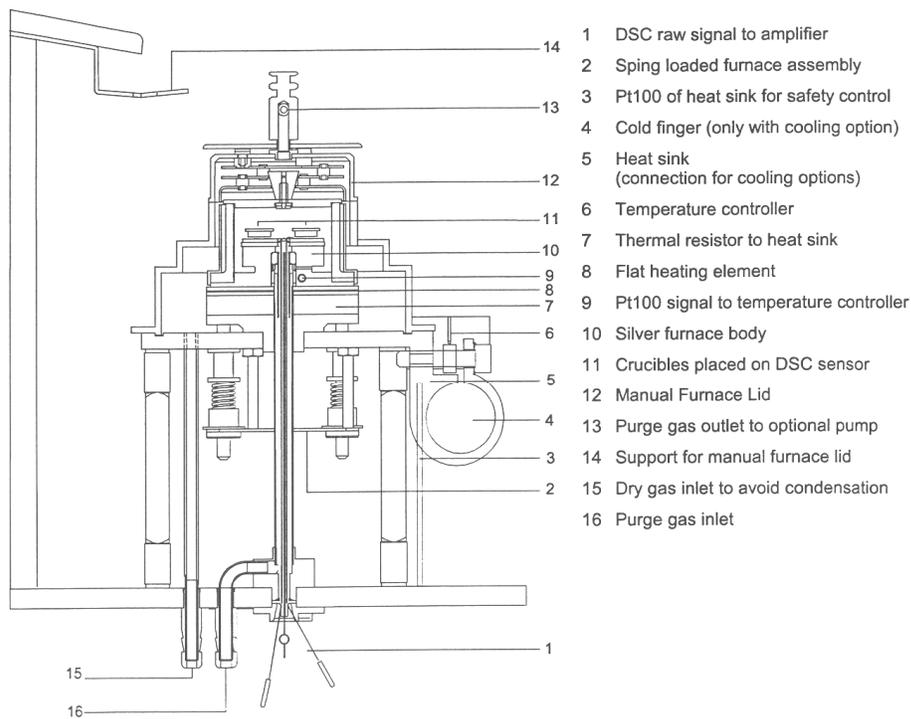
in accordo con il modello di Van't Hoff e questa variazione di  $T_m$  viene registrata calorimetricamente. La DSC permette, quindi, di calcolare le variazioni entalpiche ed entropiche che accompagnano le transizioni di fase di tipo gel-cristallo liquido grazie al fatto che le variazioni entalpiche possono essere ottenute dall'integrazione dell'area delle curve calorimetriche, mentre quelle entropiche possono essere ricavate partendo dall'assunto che il valore di  $T_m$  è uguale al rapporto  $\Delta H^0/\Delta S^0$ .

Ogni ciclo termico a cui è sottoposto il campione viene chiamato scansione e viene effettuato con incrementi lineari della temperatura nel tempo, in modo da determinare la variazione di entalpia di processo mediante misura del flusso di calore necessario per mantenere il campione della sostanza in esame alla stessa temperatura del campione di riferimento. Registrando il flusso di calore in funzione della temperatura,  $(\Delta H^0/\Delta T^0)$ , si ottiene il "termogramma" un grafico che indica la natura del processo, sia esso endotermico o esotermico, oltre alla temperatura e all'entità degli eventi termici (fig. 8).



**Fig. 8:** Tipico termogramma DSC che mostra i processi endotermici o esotermici della transizione vetrosa, della cristallizzazione, della fusione e dell'ossidazione.

Nella figura 9 è riportato lo schema del dispositivo per Calorimetria a Scansione Differenziale utilizzato nella nostra ricerca.



**Fig. 9:** Rappresentazione schematica del sistema di Calorimetria a Scansione Differenziale.

Il calorimetro utilizzato per caratterizzare i composti studiati è un sistema Mettler TA STAR<sup>e</sup> provvisto di cella DSC 822<sup>e</sup>, calibrato con indio. L'elaborazione dei dati è stata effettuata utilizzando il programma d'integrazione del sistema STAR<sup>e</sup>.

## Langmuir-Blodgett

All'inizio del ventesimo secolo Irving Langmuir, chimico e fisico Americano, fu il primo ad effettuare studi sulla capacità che hanno le sostanze anfifiliche, deposte su una superficie acquosa, di formare un monolayer, cioè un film di spessore monomolecolare (*I. Langmuir, 1917*) e nel 1932 fu insignito del premio Nobel per i suoi studi. Il monolayer è un sistema bidimensionale (*O. Albrecht et al., 1978*) che in seguito a variazioni di pressione superficiale, area e temperatura, fornisce utili informazioni sull'organizzazione dei fosfolipidi di membrana, sulla distribuzione e sull'orientazione molecolare (*M.C. Phillips and D. Chapman, 1968*) e possiede caratteristiche direttamente legate a quelle del bilayer lipidico (*D.A. Cadenhead, 1985*). Il monolayer può essere considerato come un gas bidimensionale. Quando l'area disponibile al monolayer è tale che la distanza tra le molecole adiacenti è elevata, le interazioni sono deboli e in queste condizioni il monolayer ha un piccolo effetto sulla tensione superficiale dell'acqua. Se l'area disponibile al monolayer è ridotta da un sistema di barriere, cominciano a manifestarsi effetti repulsivi tra le molecole del film.

Questo analogo bidimensionale di pressione è chiamata pressione di superficie ( $\pi$ ) ed è data dalla seguente relazione (*G.L. Gaines, 1996*):

$$\pi = \gamma^0 - \gamma$$

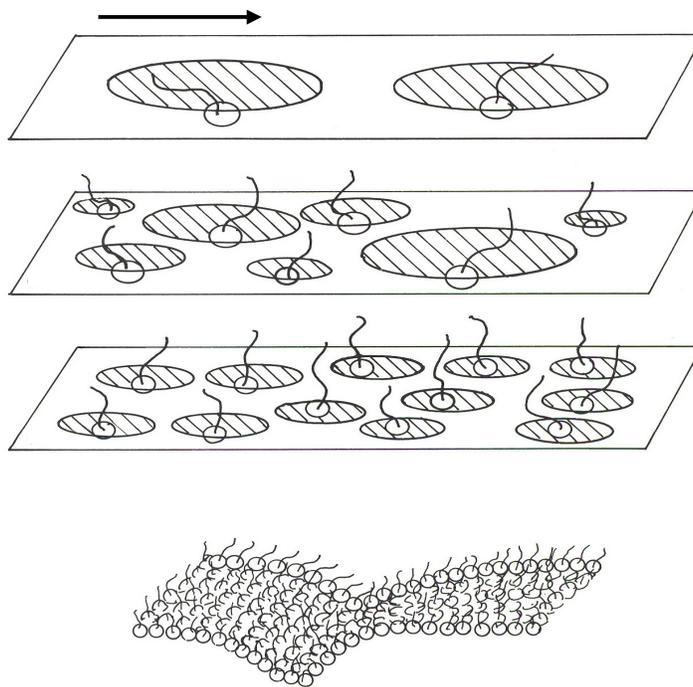
Dove  $\gamma^0$  è la tensione di superficie del liquido puro e  $\gamma$  è la tensione di superficie del film.

La tecnica prevede la deposizione del fosfolipide, sostanza anfifilica, mediante l'uso di un solvente adeguato, volatile ed immiscibile con l'acqua, su una superficie acquosa, in modo da permetterne una distribuzione monomolecolare ottimale ed una successiva variazione dell'area a disposizione. Il solvente deve essere in grado di portare in soluzione i composti, chimicamente inerte rispetto al film e facilmente purificabile. La deposizione della soluzione per formare il film si effettua depositando mediante una microsiringa gocce di dimensioni dell'ordine dei micron, sulla superficie da coprire (subfase) e si

attende per 10 minuti circa l'evaporazione del solvente. Applicando al monolayer compressioni via via maggiori si modifica la distribuzione superficiale delle molecole, forzandole a passare da uno stato a bassa densità "gassoso" o di "liquido espanso", ad uno stato a maggiore densità, detto "liquido condensato", e successivamente ad uno stato di "solido condensato" (fig. 10).

Ad ognuno dei passaggi di fase riscontrabili durante la compressione del monolayer, corrispondono variazioni strutturali correlabili a quelle che avvengono nei modelli di membrana biologica.

Con il metodo del film-balance si ottengono delle curve isoterme pressione superficiale/area per molecola ( $\pi / \text{Å}^2$ ), cioè dei *diagrammi di fase* dei fosfolipidi attraverso i quali è possibile studiarne il comportamento e l'orientazione molecolare.



**Fig. 10:** Rappresentazione schematica del riarrangiamento molecolare durante la compressione del monolayer.

Maggiori compressioni del monolayer provocano ulteriori diminuzioni dell'area effettiva per molecola, portando ad un collasso del film. Fino al punto di collasso, le molecole fosfolipidiche sono stabilizzate da interazioni fra i gruppi metilenici delle catene idrofobiche e da interazioni elettrostatiche nelle zone dei gruppi polari (*J. Miñones et al., 1981*). Al punto di collasso le repulsioni molecolari vincono sulle forze attrattive, creando una situazione energeticamente sfavorevole che porta i fosfolipidi ad uscire dal piano del monolayer ed a formare multilayer ed isole. L'area molecolare misurata alla pressione di collasso rappresenta la minore area superficiale che una molecola in un monolayer può occupare ed è pertanto detta "area limite". Si può anche incorrere in "super-compressioni" del monolayer. Le curve di compressione, infatti, possono sviluppare una pressione massima dopo che il collasso è iniziato, a causa di susseguenti processi di rilassamento (*U.J. Krull et al., 1985*).

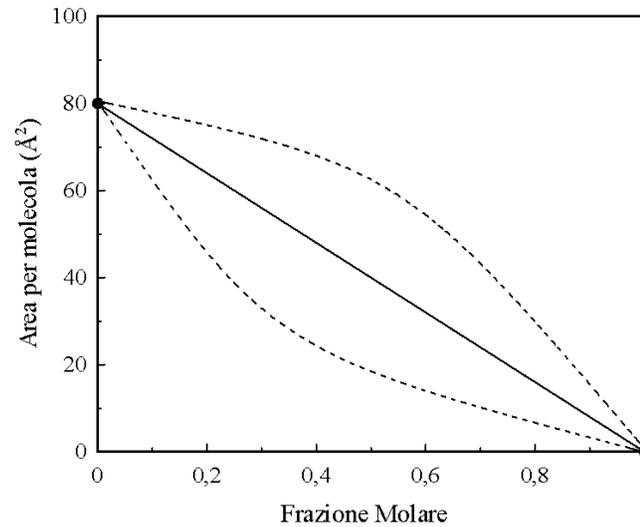
Oltre a studiare il monolayer di fosfolipidi puri, è possibile anche studiare monolayer misti (fosfolipide/farmaco), correlando l'area media per molecola ( $\text{\AA}^2$ ) con la frazione molare ( $X$ ) del composto in esame, in modo da avere informazioni sull'impaccamento molecolare, sulla miscibilità, e sulle interazioni tra le molecole componenti monolayer misti (*H. Bader et al., 1985*).

L'area per molecola di una miscela binaria può essere calcolata utilizzando la seguente equazione:

$$A = A_1 X_1 + (1 - X_1) A_2$$

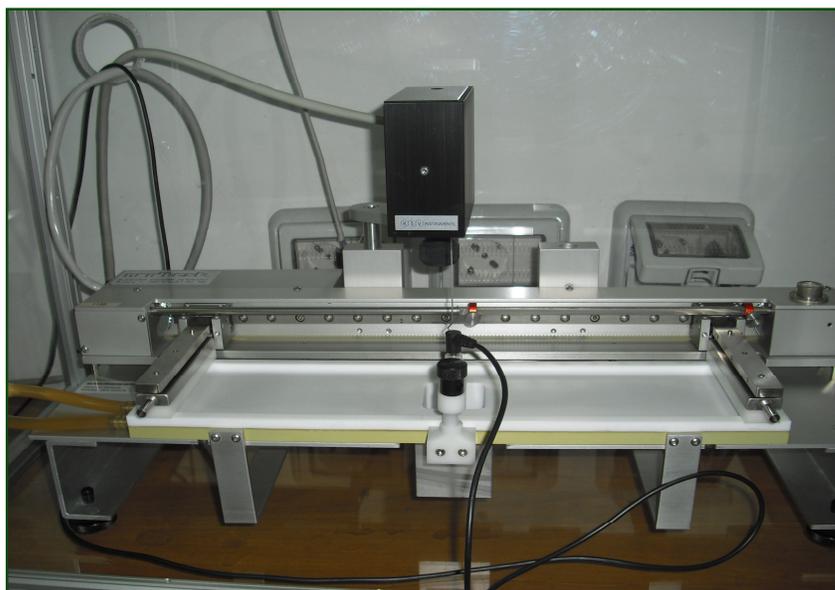
dove,  $A$  è l'area media per molecola,  $X_1$  è la frazione molare di un componente,  $A_1$  e  $A_2$  sono le aree parziali dei due componenti puri, alla stessa pressione superficiale.

Riportando su un grafico  $A/X_1$  (fig. 11) si ottiene una retta se i due componenti del monolayer sono completamente immiscibili o possiedono una miscibilità ideale. Qualunque deviazione da questa relazione lineare indica interazione tra le molecole, cioè una miscibilità non ideale.



**Fig. 11:** Grafico rappresentante l'andamento dell'area media per molecola rispetto alla frazione molare, a pressione costante, per monolayer completamente immiscibili o a miscibilità ideale (linea continua) e monolayer a comportamento non ideale (linea tratteggiata).

Le misure sono state eseguite con un Minitrough in Teflon (fig. 12) dotato di un sistema di misura della pressione superficiale costituito da una lamina di platino platinato (sonda di Wilhelmy), fornito dalla KSV Instruments LTD, (Finlandia). Il bagno, in materiale idrofobico, e le barriere idrofiliche (Delrin, poliacetale), assicurano che l'area superficiale occupata dal film fosfolipidico sia sempre quella compresa fra le barriere, evitando qualunque allontanamento di molecole dal film.

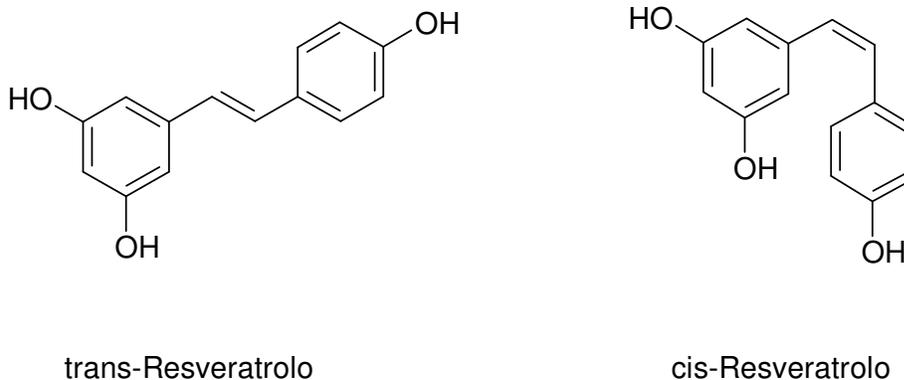


**Fig. 12:** Fotografia dello strumento utilizzato per le misure su monolayers.

# INTERAZIONE DI FARMACI CON MODELLI DI BIOMEMBRANA

## 1. RESVERATROLO E SUOI DERIVATI

Il resveratrolo (3,5,4'-triidrossi-*trans*-stilbene) è una fitoalessina naturale, sintetizzata in grosse quantità da molte piante ed alcuni frutti, quali uva, arachidi e pinoli, in risposta a danni meccanici o fisici quali radiazioni UV ed infezioni come quella da funghi (*J. Garcia-Garcia et al., 1999*). Esiste in due forme, *cis* e *trans* e la conversione da una forma all'altra avviene per esposizione alla luce e all'ossigeno (*E.C. Cantos et al., 2000*). La forma *trans*, quella maggiormente presente nel vino, sembra essere quella più biologicamente attiva (fig.13).

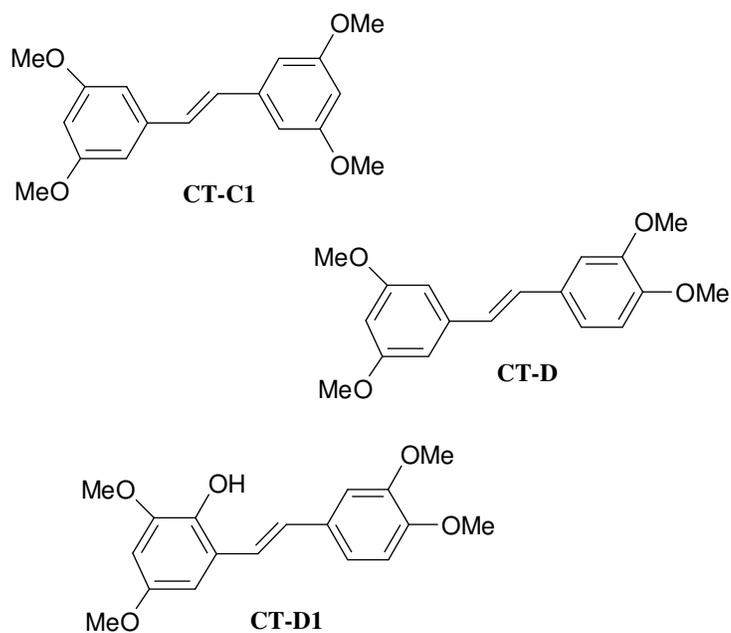


**Fig. 13:** Struttura del resveratrolo.

Questa molecola è nota sin dall'inizio degli anni '90, quando un importante studio epidemiologico noto come "*Paradosso Francese*", dimostrò come la bassa incidenza di malattie cardiache nella popolazione francese che consuma notoriamente una dieta ricca di grassi, fosse legata al consumo di vini rossi che, come noto, contengono resveratrolo (*E.B. Rimm et al., 1991; A. Klastsky et al., 1992; D.M. Goldber et al., 1995*). Studi biologici hanno dimostrato che il resveratrolo svolge un ruolo protettivo per l'aterosclerosi e patologie coronariche; ha una forte azione antiossidante ed antinfiammatoria tale da essere paragonato ad antinfiammatori non steroidei quali aspirina ed indometacina (*J. Garcia-Garcia et al., 1999*). Il resveratrolo presenta inoltre un'azione preventiva come agente

antitumorale attraverso l'inibizione di molecole target come le chinasi, le cicloossigenasi, i recettori per gli ormoni steroidei, la ribonucleotide reduttasi, e la DNA polimerasi (P. Saiko. *et al.*, 2008). Il resveratrolo ha però una breve emivita, è soggetto a veloce metabolizzazione ed ha quindi una scarsa biodisponibilità. Allo scopo di migliorarne la farmacocinetica, bisogna identificare nuovi analoghi attivi che abbiano un migliore profilo farmacocinetico.

I derivati che abbiamo preso in considerazione sono: il 3,5,3',5'-tetrametossistilbene (CT-C1), il 3,5,3',4'-tetrametossistilbene (CT-D) e il 2-idrossi-3,5,3',4'-tetrametossistilbene (CT-D1) (fig. 14) e sono stati studiati gli effetti esercitati da tali composti sul comportamento termotropico di vescicole multilamellari (MLV) di 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) per ottenere informazioni sulla lipofilia e sulla solubilità di queste molecole nei lipidi, tutti fattori che modulano la loro interazione con la membrana cellulare e la loro penetrazione nella membrana stessa mediante DSC.



**Fig. 14:** Formule di struttura dei derivati del resveratrolo studiati.

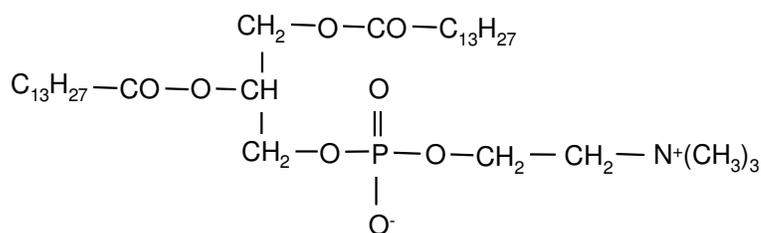
La Calorimetria a Scansione Differenziale permette di investigare gli effetti esercitati da composti biologicamente attivi sul doppio strato fosfolipidico durante processi di riscaldamento o raffreddamento (*D. Trombetta et al., 2005; F. Castelli et al., 2006a, 2006b; M.G.Sarpietro et al., 2007; M. Cristiani et al., 2007; F. Castelli et al., 2007a, 2007b*). Sono state inoltre studiate le modificazioni indotte dai composti in esame sul comportamento termotropico delle vescicole liposomiali poste a contatto con i composti stessi (*cinetica di contatto*) al fine di valutare la capacità di migrare attraverso un mezzo acquoso e di interagire con i layers lipidici; infine per valutare la capacità dei composti di essere trasportati da un mezzo lipofilo, superare uno strato acquoso e interagire con i layers lipidici per essere da loro assorbiti è stato studiato il comportamento dei liposomi lasciati, a tempi crescenti, a contatto con liposomi di DMPC in precedenza caricati con i diversi composti (*cinetica di trasferimento*).

Inoltre, sono state eseguite anche misure di Lagmuir-Blodgett (LB). La tecnica contribuisce a fornire utili informazioni sulla distribuzione molecolare, sulla miscibilità e sulle interazioni tra molecole capaci di formare dei monolayers (*F. Castelli et al., 2007a, 2007b*) permettendo di valutare le interazioni tra i componenti di una miscela mediante le isoterme di pressione superficiale in funzione dell'area media per molecola ( $\pi/\text{Å}^2$ ).

Questo lavoro mira a valutare la diversa interazione che si ottiene a causa della differente posizione dei gruppi funzionali sulla struttura dello stilbene basandosi anche su precedenti studi (*M.G. Sarpietro et al., 2007*) che hanno dimostrato la capacità del resveratrolo di interagire con la struttura fosfolipidica destabilizzandola, probabilmente a causa della presenza nella sua struttura di gruppi idrossilici, capaci di formare legami ad idrogeno con le teste polari dei fosfolipidi.

## 1.1. Materiali

La 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) è stata acquistata dalla Genzyme Pharmaceuticals (Liestal, Svizzera), (fig.15) con purezza del 99,9%, determinata tramite cromatografia su strato sottile ad alta pressione (HPTLC). La concentrazione lipidica è stata determinata tramite l'analisi del fosforo (G. Rouser *et al.*, 1970) ed è pari a 0,7 mg/ml. L'acqua utilizzata è acqua ultra pura con resistività di 18.2 MΩ cm ottenuta mediante un sistema Simplicity 185 Millipore. Per formare i liposomi è stata utilizzata una soluzione di TRIS (idrossimetil-amminometano) 50 mM portata a pH=7,4 mediante HCl.



**Fig. 15:** DMPC (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina).

La subfase utilizzata per gli studi di Langmuir Blodgett consiste di un tampone TRIS (idrossimetil-amminometano), fornito dalla Merck e portato a pH fisiologico di 7,4 mediante acidificazione con HCl. Il resveratrolo è stato fornito dalla Sigma Aldrich (Svizzera). I composti analizzati, derivati del resveratrolo, sono stati sintetizzati dal gruppo di ricerca del Prof. Corrado Tringali (Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Catania).

## 1.2. Preparazione dei liposomi: MLV

I liposomi contenenti 3,5,3',5'-tetrametossistilbene, 3,5,3',4'-tetrametossistilbene e 2-idrossi-3,5,3',4'-tetrametossistilbene sono stati preparati seguendo la seguente procedura:

- appropriate quantità di DMPC e dei composti in esame sono stati solubilizzati in cloroformio;
- aliquote a concentrazione nota di DMPC (7 mg, 0,010325 mmoli) e di ognuno dei composti sono state miscelate in tubi da saggio per ottenere una esatta frazione molare del composto rispetto alla DMPC;
- i solventi sono stati allontanati sotto flusso di azoto;
- i film fosfolipidici così ottenuti sono stati essiccati sotto vuoto.

I film sono stati, quindi, idratati con tampone TRIS pH 7,4 e posti a 37 °C per 1 minuto; agitati per 1 minuto; per tre volte, e infine lasciati a 37 °C per 60 minuti. Si ottengono in tal modo liposomi in cui il farmaco è omogeneamente disperso in tutti i bilayers (fig. 16).

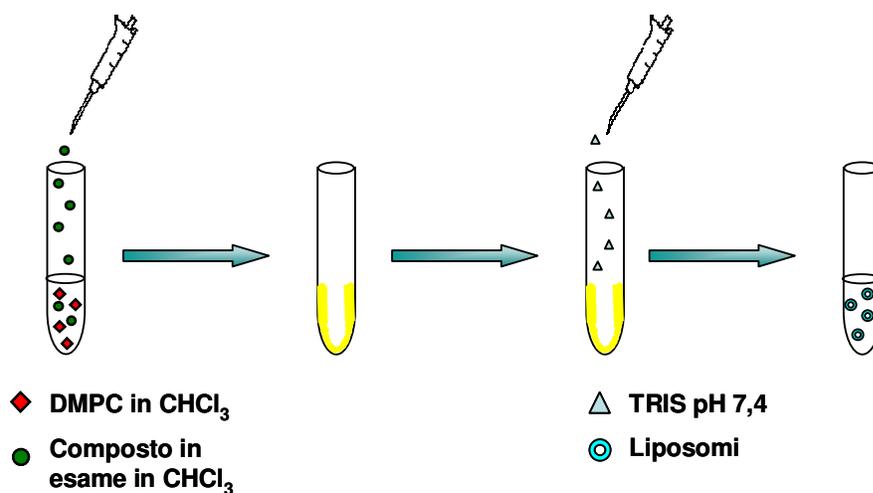


Fig. 16: Preparazione MLV in presenza di CT-C1, CT-D e CT-D1.

### 1.3. Analisi DSC

Mediante calorimetria è stata valutata l'entità dell'interazione tra i composti con i modelli di membrana attraverso le seguenti prove sperimentali:

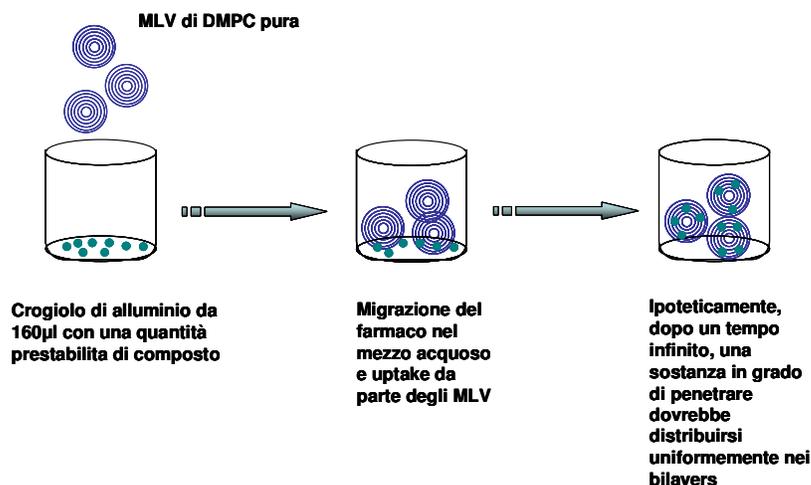
#### A) ANALISI DSC DEI CAMPIONI PREPARATI IN FASE ORGANICA:

120  $\mu\text{l}$  di dispersioni acquose liposomiali preparate in assenza e in presenza dei composti studiati sono state poste in crogioli di alluminio da 160  $\mu\text{l}$ . I crogioli sono stati chiusi ermeticamente e sottoposti ad una scansione in riscaldamento da 5 a 37°C a 2°C/min e ad una scansione in raffreddamento da 37 a 5°C a 4°C/min, per tre volte. I valori di  $T_m$  e  $\Delta H$  (rispetto al fosfolipide puro) che si ottengono sono i parametri di riferimento per indicare l'effetto che una determinata frazione molare di composto causa sui liposomi di DMPC.

#### B) CINETICHE DI CONTATTO:

queste misure sono state effettuate per verificare la capacità dei composti di attraversare il mezzo acquoso, interagire con le membrane modello ed eventualmente penetrare nelle stesse. Tali esperienze sono state eseguite ponendo aliquote di 120  $\mu\text{l}$  di sospensione acquosa di MLV in DMPC in crogioli di alluminio da 160  $\mu\text{l}$ , sul cui fondo era presente una quantità pesata dei composti tali da avere una frazione molare  $X=0,09$  dei campioni rispetto ai fosfolipidi. I crogioli, dopo essere stati sigillati, sono stati sottoposti a leggera agitazione per 10 secondi, e quindi a cicli calorimetrici consistenti di tre steps:

- 1) una scansione calorimetrica in riscaldamento da 5 a 37 °C con un incremento di temperatura di 2 °C/min. al fine di investigare l'interazione fra i composti e il modello di membrana, durante una prima fase di riscaldamento che porta i campioni ad una temperatura di 37 °C, superiore alla  $T_m$ ;
- 2) un periodo di incubazione isoterma per 60 minuti a 37 °C per permettere ai composti di permeare il layer lipidico, il quale si trova in uno stato di disordine ad una temperatura maggiore di quella di transizione;
- 3) una fase di raffreddamento del campione dalla temperatura di incubazione (37 °C) alla temperatura di 5 °C ad una velocità di 4°C/min per poi poter ripetere il ciclo dal primo step (fig. 17).

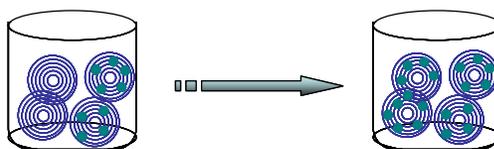


**Fig. 17:** Steps della cinetica di contatto.

**C) CINETICHE DI TRASFERIMENTO TRANSMEMBRANA:**

questi esperimenti sono stati effettuati ponendo in contatto 60 µl di sospensione di MLV di DMPC pura (MLV senza composti incorporati, vuoti) e 60 µl di una sospensione equimolare di MLV di DMPC contenenti il composto in esame alla frazione molare 0,09 (MLV pieni) in crogiole di alluminio da 160 µl. I crogiole, dopo essere stati sigillati, sono stati sottoposti a cicli calorimetrici consistenti di tre steps descritti nella sezione precedente.

Lo scopo di questi esperimenti è stato quello di verificare l'eventuale capacità dei composti di migrare dagli MLV pieni a quelli vuoti per avere indicazioni sull'effetto esercitato da un mezzo lipofilo su questo trasporto. Se i composti sono capaci di esser trasferiti dagli MLV pieni a quelli vuoti si avrà un flusso di composto che si arresterà allorché un equilibrio di concentrazione dei composti stessi (equivalente alla frazione molare 0,045) sarà raggiunto (fig. 18).



**Fig. 18:** Steps della cinetica di trasferimento.

#### 1.4. Misure di tensione superficiale: Langmuir-Blodgett

Le misure di tensione superficiale sono state eseguite con un sistema KSV Minitrough fornito dalla KSV Instruments LTd (Finlandia), dotato di un bagno in Teflon (75x323 mm), due barriere mobili in Delrin, di un sistema di misura della tensione superficiale, costituito da una lamina di platino platinato (sonda di Wilhelmy). Prima di ogni misura la vaschetta di Teflon è stata accuratamente pulita con miscela cromica, lavata con etanolo e successivamente con acqua ultrapura e riempita con tampone (Tris 5 mM; pH 7,4), preparato in acqua ultrapura con resistività di 18.2 M $\Omega$  cm ottenuta mediante un sistema Simplicity 185 Millipore. Il menisco che l'acqua forma sopra la vaschetta deve essere convesso in modo che le barriere, scivolandovi sopra, riescano a comprimere la superficie.

Per formare il monolayer sono state preparate soluzioni di DMPC, 3,5,3',5'-tetrametossi-*trans*-stilbene (CT-C1), 3,5,4',5'-tetrametossi-*trans*-stilbene (CT-D) e 2-idrossi-3,5,3',4'-tetrametossi-*trans*-stilbene (CT-D1), in cloroformio in modo da avere soluzioni equimolari. Le miscele di DMPC con i diversi composti sono state preparate a partire dalle distinte soluzioni in modo da ottenere le seguenti frazioni molari: 0,0; 0,015; 0,03; 0,045; 0,06; 0,09; 0,12; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0.

Prima di ogni misura è stato controllato che il valore di tensione superficiale della sola subfase non superi  $\pm 0,1$  mN/m. Le miscele di DMPC-CT-C1, DMPC-CT-D e CT-D1, sono state depositate sulla superficie della subfase mediante una microsiringa Hamilton previamente pulita per tre volte con cloroformio, avvinata con la soluzione in esame e riempita fino ad un volume di 30  $\mu$ l delle soluzioni dei componenti puri e delle soluzioni miste. Si è lasciato riposare il monolayer per permettere l'evaporazione del solvente. Il volume di soluzione impiegata è tale da compiere tutte le esperienze deponendo lo stesso numero di molecole sulla subfase. Per garantire la riproducibilità del lavoro l'esperienza è stata ripetuta per almeno 3 volte. Le misure sono state eseguite alle temperature di 10 °C e 37 °C, in modo da monitorare il comportamento della DMPC (sia pura sia in presenza dei composti) a temperature inferiori e superiori alla transizione di fase gel-cristallo liquido della DMPC (24,4 °C). La variazione dell'area superficiale a

disposizione delle molecole deposte è ottenuta grazie al movimento delle barriere, poste sul frame della vaschetta, che si muovono simmetricamente con una velocità di 10 mm/minuto. Anche in questo caso i vengono riportati anche i dati relativi al resveratrolo relativi ad uno studio precedente.

## **1.5. Risultati e discussione**

### **1.5.1. Analisi DSC**

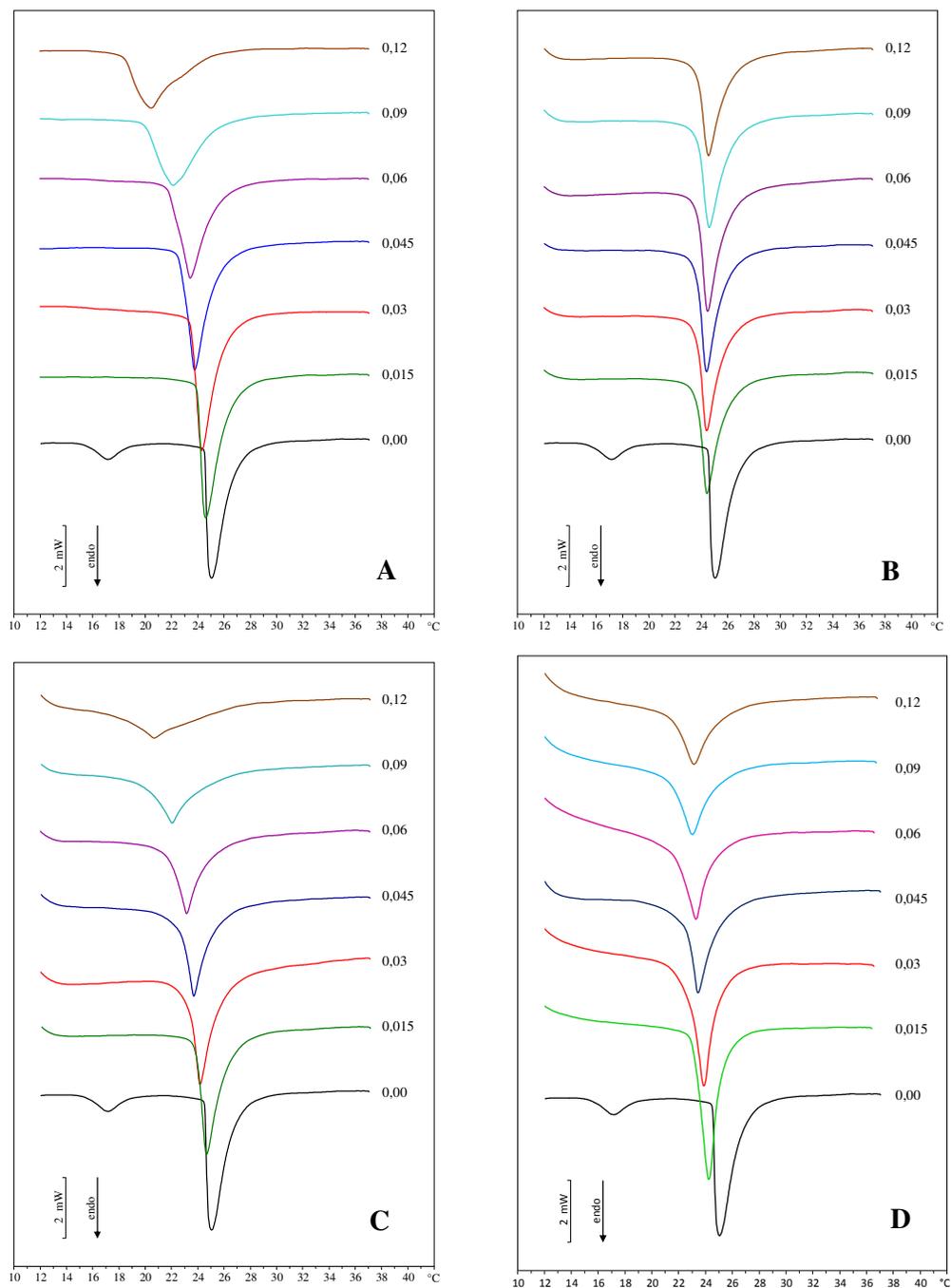
#### *Interazione fra i composti e gli MLV di DMPC*

In figura 19 sono mostrate le curve calorimetriche degli MLV di DMPC preparati in assenza e in presenza di resveratrolo, di CT-C1, di CT-D e di CT-D1 a varie frazioni molari. Per tutti i composti si nota la scomparsa del picco di pretransizione, caratteristico della DMPC, già alla frazione molare più bassa ( $X=0,015$ ). Nel caso del resveratrolo, il picco calorimetrico principale si sposta verso valori più bassi di temperature e si allarga all'aumentare della frazione molare di stilbene presente. A frazioni molari più elevate le curve calorimetriche risultano di forma irregolare suggerendo la comparsa di una separazione di fase.

Il 3,5,3',5'-tetrametossistilbene (CT-C1), provoca un leggero spostamento del picco principale verso temperature più basse mentre la forma rimane pressoché invariata per tutte le frazioni molari.

Il 3,5,3',4'-tetrametossistilbene (CT-D), all'aumentare della frazione molare, provoca uno spostamento graduale del picco verso temperature più basse e si assiste anche ad uno slargamento del picco molto evidente alla frazione molare 0,12 inducendo disordine nelle catene fosfolipidiche da parte del CT-D.

Per quanto riguarda il 2-idrossi-3,5,3',4'-tetrametossistilbene CT-D1 all'aumentare della frazione molare è evidente un graduale spostamento della temperatura del picco principale verso valori più bassi rispetto a quella della DMPC a cui si associa uno slargamento dei picchi calorimetrici.



**Fig. 19:** Curve calorimetriche, in riscaldamento, di liposomi di DMPC pura ed in presenza di differenti frazioni molari di resveratrolo (A), CT-C1 (B), CT-D (C) e CT-D1 (D).

La figura 20 (A) mostra l'andamento della temperatura di transizione degli MLV di DMPC preparati in presenza di resveratrolo, CT-C1, CT-D e CT-D1 riportata come  $\Delta T/T_m^0$  in funzione della frazione molare di composto presente nella dispersione acquosa degli MLV in virtù della relazione:

$$\Delta T = T_m - T_m^0$$

dove:

$T_m$  = temperatura di transizione degli MLV di DMPC in presenza di ognuno dei composti esaminati;

$T_m^0$  = temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura.

Tutti i composti provocano la diminuzione della  $T_m$  e quindi la destabilizzazione dei doppi strati lipidici degli MLV. La destabilizzazione provocata dal 3,5,3',4'-tetrametossiresveratrolo (CT-D), aumenta all'aumentare della frazione molare, comportamento simile ha anche il resveratrolo (dati non riportati). Gli effetti esercitati dal 3,5,3',5'-tetrametossiresveratrolo (CT-C1) sono molto bassi anche ad alte frazioni molari. Il 2-idrossi-3,5,3',4'-tetrametossiresveratrolo (CT-D1) determina una destabilizzazione del doppio strato fosfolipidico fino alla frazione molare 0,06, infatti, per le più alte frazioni molari il valore della  $T_m$  rimane pressoché invariato.

Analogamente a quanto avviene per la temperatura di transizione, anche nel caso dell'entalpia i derivati del resveratrolo hanno un comportamento differente come mostrato nella figura 20 (B).

La variazione dell'entalpia è riportata, come  $\Delta\Delta H/\Delta H^0$ , in funzione della frazione molare di composto presente nella dispersione acquosa degli MLV in base alla relazione:

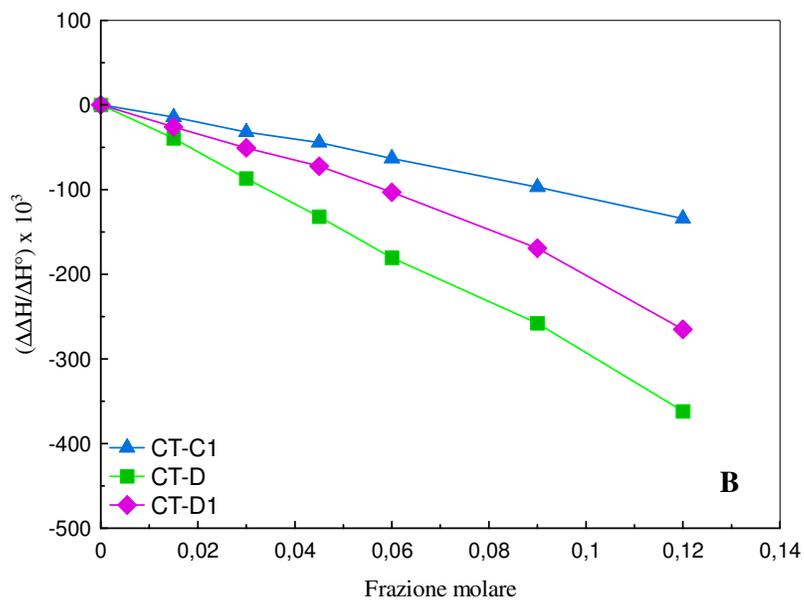
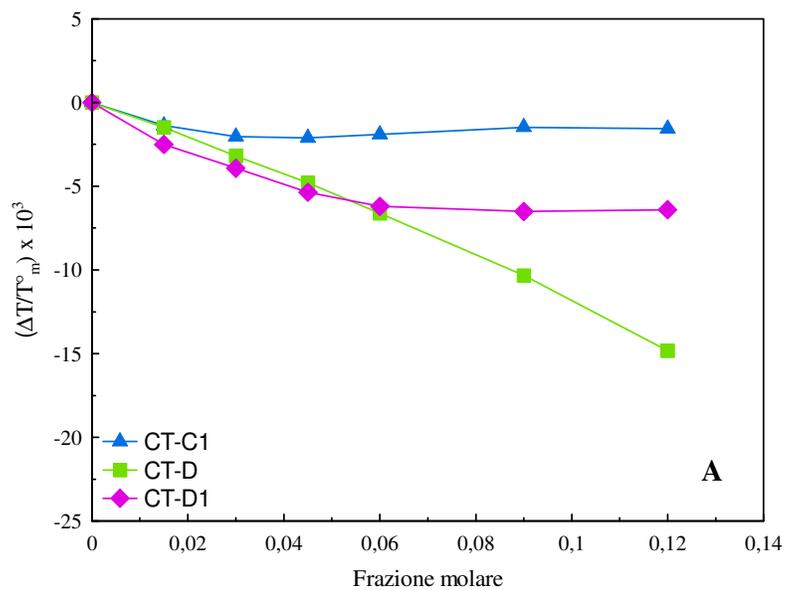
$$\Delta\Delta H = \Delta H - \Delta H^0$$

dove:

$\Delta H$  = entalpia degli MLV di DMPC in presenza di ognuno dei composti esaminati;

$\Delta H^0$  = entalpia degli MLV di DMPC pura.

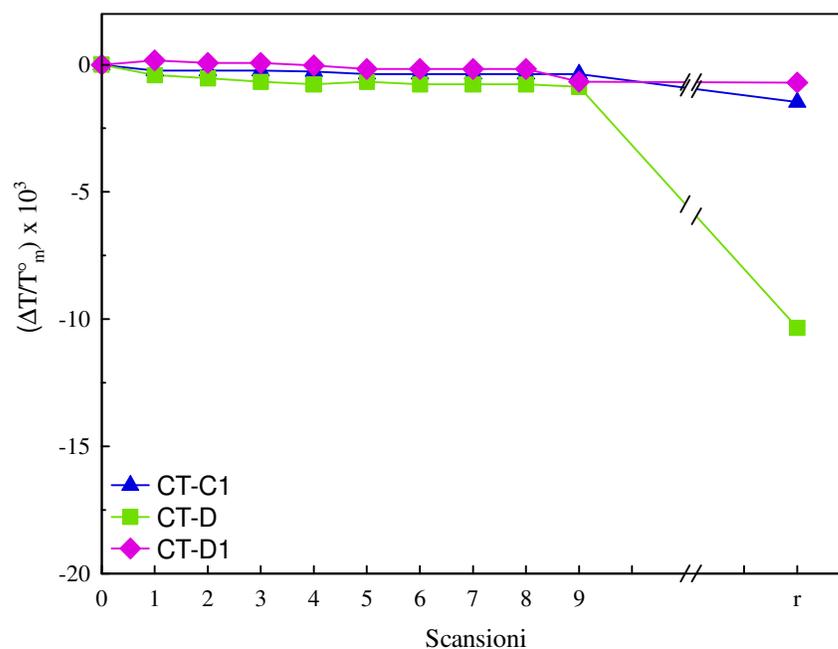
Tutti e tre i composti determinano il decremento dell'entalpia. Il CT-C1 causa delle variazioni poco significative dell'entalpia degli MLV di DMPC. Il CT-D provoca invece una maggiore e significativa variazione dell'entalpia che aumenta con l'aumentare delle frazioni molari. La presenza del composto rende meno cooperative le interazioni delle catene idrofobiche dei fosfolipidi, di conseguenza l'intensità del picco calorimetrico diminuisce e il picco stesso si allarga, come è possibile evincere anche dall'analisi delle curve calorimetriche. Il CT-D1 provoca un decremento dell'entalpia che si colloca tra quello degli altri due derivati non idrossilati. Il confronto dei risultati ottenuti permette di concludere che tutti e tre i composti esaminati, sono solubili all'interno del doppio strato fosfolipidico ed esercitano una forte perturbazione della struttura lipidica che si traduce in una variazione dell'entalpia e che il maggiore effetto è dato dal CT-D.



**Fig. 20°:**(A) Variazione della temperatura di transizione dei picchi calorimetri degli MLV di DMPC preparati in presenza di CT-C1, CT-D e CT-D1 a frazioni molari crescenti.(B) Variazione dell'entalpia dei picchi calorimetri degli MLV di DMPC preparati in presenza di resveratrolo, CT-C1, CT-D e CT-D1 a frazioni molari crescenti.

### *Cinetiche di contatto*

La tecnica DSC è stata usata anche per studiare la capacità dei composti di solubilizzarsi nel mezzo acquoso circostante e, successivamente, di raggiungere e attraversare i doppi strati lipidici dei liposomi. Il campione preparato come descritto a pag.23 è stato sottoposto ad analisi calorimetrica. La figura 21 mostra la variazione di temperatura di transizione dei picchi calorimetrici dei liposomi di DMPC lasciati incubare a tempi crescenti con i composti alla frazione molare 0,09 rispetto al fosfolipide. Il valore  $r$  rappresenta la variazione della  $T_m$  dei liposomi di DMPC contenenti i composti alla frazione molare 0,09; e corrisponde alla massima interazione possibile fra il composto e i liposomi. Dal grafico si evince che per tutti e tre i composti la temperatura di transizione rimane pressoché invariata e il valore  $r$  non è raggiunto indicando un'incapacità dei composti di migrare attraverso il mezzo acquoso, raggiungere la superficie degli MLV ed essere assorbiti dal bilayer. Per quanto riguarda il resveratrolo (dati non riportati) si ha un maggiore abbassamento della temperatura di transizione rispetto ai derivati analizzati dimostrando una maggiore capacità dello stilbene di attraversare il mezzo acquoso e interagire con i bilayers lipidici degli MLV di DMPC.



**Fig. 21:** Variazione della temperatura di transizione dei picchi calorimetri degli MLV di DMPC lasciati in contatto con CT-C1, CT-D e CT-D1 alla frazione molare 0,09 a diversi tempi di incubazione. La variazione della temperatura di transizione è riportata come  $\Delta T/T_m^\circ$  ( $\Delta T = T_m - T_m^\circ$ , dove  $T_m$  = temperatura di transizione di MLV di DMPC in presenza dei composti esaminati e  $T_m^\circ$  è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura) in funzione del tempo di incubazione. **r** rappresenta il valore relativo ai liposomi di DMPC e stilbene, alla frazione molare 0,09.

### ***Cinetiche di trasferimento transmembrana***

Questi esperimenti sono stati condotti per verificare se i composti in esame possano essere rilasciati da un carrier liposomiale ai modelli di biomembrana.

MLV di DMPC preparati in presenza del composto in esame (carrier) alla frazione molare 0,09 sono stati messi a contatto con MLV di sola DMPC (modello di biomembrana), a tempi di incubazione crescenti. Le curve calorimetriche sono confrontate con: le curve degli MLV di DMPC pura; le curve degli MLV di DMPC preparati in presenza di composto alla frazione molare 0,09 e le curve degli MLV di DMPC preparati in presenza di composto alla frazione molare 0,045 (curva r). La curva r rappresenta la curva che si dovrebbe ottenere se il composto migrasse dagli MLV pieni ( $X=0,09$ ) agli MLV vuoti ( $X=0,00$ ) fino al

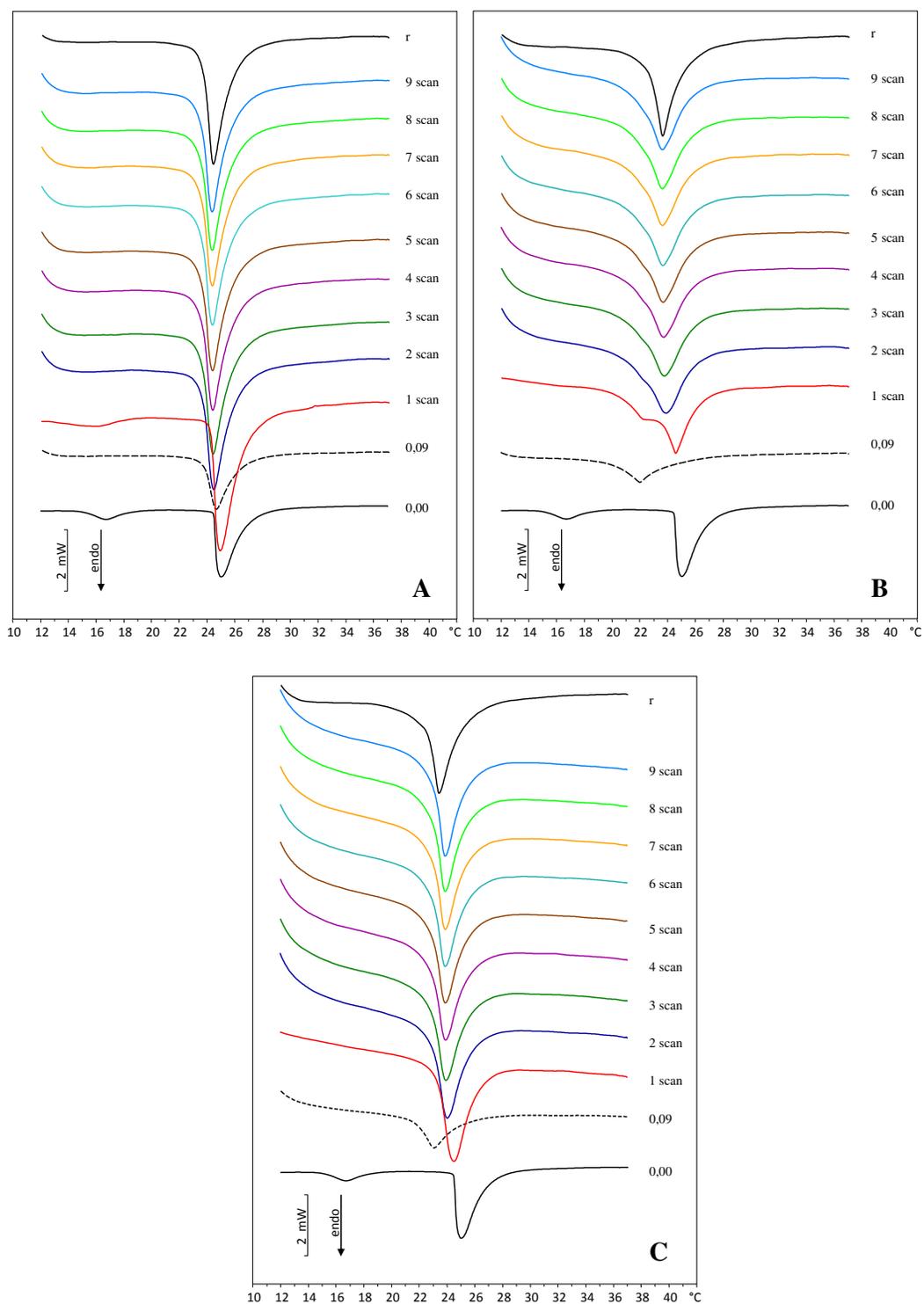
raggiungimento dello stato di equilibrio in cui è possibile ipotizzare che in tutti gli MLV ci sia un valore medio di concentrazione pari a una frazione molare 0,045.

In figura 22 sono mostrate le curve calorimetriche degli MLV di DMPC lasciati in contatto, a crescenti tempi di incubazione, con una quantità equimolare di MLV di DMPC contenenti CT-C1, CT-D e CT-D1 alla frazione molare 0,09.

Nel caso del CT-C1 il picco di pretransizione scompare dopo la prima scansione; il picco principale si sposta gradualmente verso temperature più basse raggiungendo il picco degli MLV preparati in presenza del composto alla frazione molare 0,045 (curva r).

Nella prima curva calorimetrica, riferita alla cinetica di trasferimento del CT-D si osserva una spalla intorno a 21,92 °C e un picco a 24,51 °C. Il picco a temperatura più bassa rappresenta gli MLV ricchi di farmaco mentre quello a temperature più alte rappresenta gli MLV di DMPC pura che dovrebbero ricevere il farmaco. All'aumentare del tempo di incubazione la spalla e il picco si uniscono formando un unico picco che si sposta verso più basse temperature quasi raggiungendo il picco principale della curva di riferimento (r).

Per quanto riguarda il CT-D1, alla frazione molare 0,09, il picco di pretransizione scompare dopo la prima scansione e il picco principale non subisce evidenti variazioni durante tutto il tempo di incubazione non raggiungendo la temperatura del picco degli MLV preparati in presenza del composto alla frazione molare 0,045 (curva r).



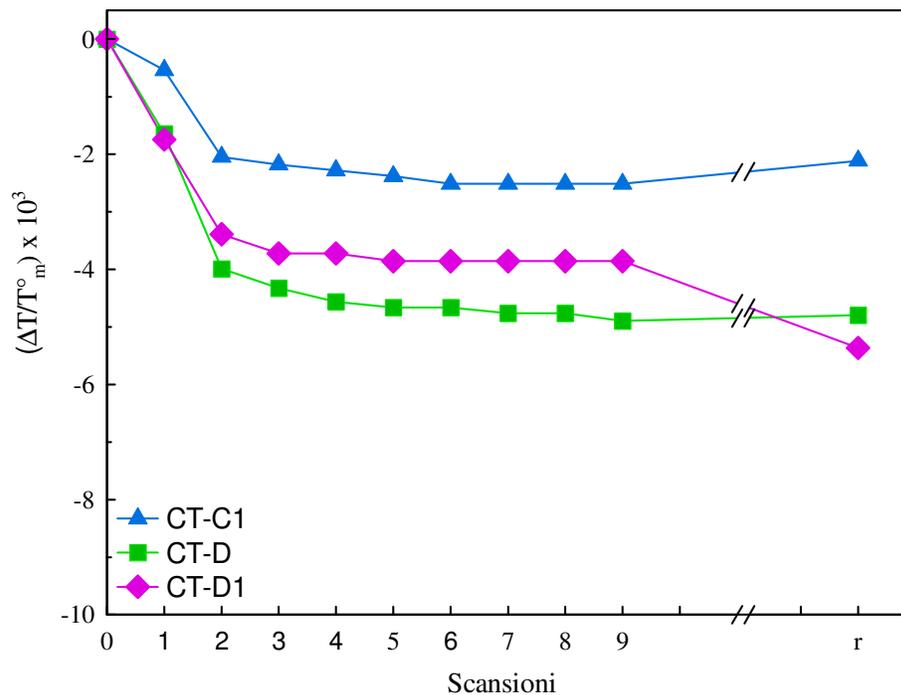
**Fig. 22:** Curve calorimetriche di MLV di DMPC pura lasciati in contatto con MLV di DMPC contenenti CT-C1 (A), CT-D (B) e CT-D1 (C) alla frazione molare 0,09 a differenti tempi d'incubazione.

r = MLV di DMPC preparati in presenza dei composti alla frazione molare 0,045.

In grafico, (figura 23) sono mostrati i valori relativi al trasferimento transmembrana. La variazione della temperatura di transizione dei picchi calorimetrici è riportata in funzione del tempo di incubazione ed è comparata con la variazione della temperatura di transizione dei liposomi di DMPC contenenti i differenti composti alla frazione molare 0,045 (valore  $r$ ). Per tutti i composti si osserva un abbassamento della  $T_m$  durante le prime ore di incubazione, mentre nelle ore successive la diminuzione dei valori di  $T_m$  è molto più e graduale.

Sembra quindi che tutti e tre i composti siano capaci di migrare dagli MLV pieni a quelli di sola DMPC pura. Per il CT-C1 e il CT-D il valore di riferimento è raggiunto, indicando che i due composti si trasferiscono completamente finché non si raggiunge un equilibrio e in tutti gli MLV si ha una quantità di composto pari alla frazione molare 0,045. Per il CT-D1 il valore di riferimento non è raggiunto e quindi il composto non riesce a trasferirsi completamente agli MLV di DMPC vuoti e a raggiungere l'equilibrio di concentrazione.

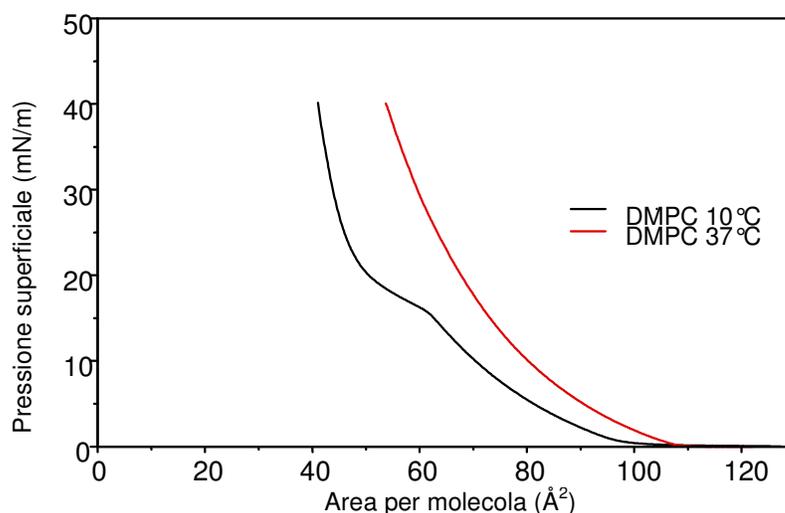
Dallo studio precedente si è evidenziato che il resveratrolo ha una veloce cinetica di trasferimento che avviene soprattutto durante la prima scansione indicata anche dalla presenza di un solo picco ad una temperatura di transizione notevolmente più bassa rispetto a quella degli MLV di DMPC.



**Fig. 23:** Variazione della temperatura di transizione dei picchi calorimetri degli MLV di DMPC lasciati in contatto con MLV di DMPC contenenti CT-C1, CT-D e CT-D1 alla frazione molare 0,09 a diversi tempi di incubazione. La variazione della temperatura di transizione è riportata come  $\Delta T/T_m^\circ$  ( $\Delta T = T_m - T_m^\circ$ , dove  $T_m$  = temperatura di transizione degli MLV di DMPC in presenza di CT-C1, CT-D e CT-D1 e  $T_m^\circ$  è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura) in funzione del tempo di incubazione.

### 1.5.2. Misure di tensione superficiale: Langmuir-Blodgett

La figura 24 mostra le isoterme della DMPC pura a 10 e a 37°C. Si osserva uno spostamento verso valori più elevati d'area per molecola all'aumentare della temperatura.



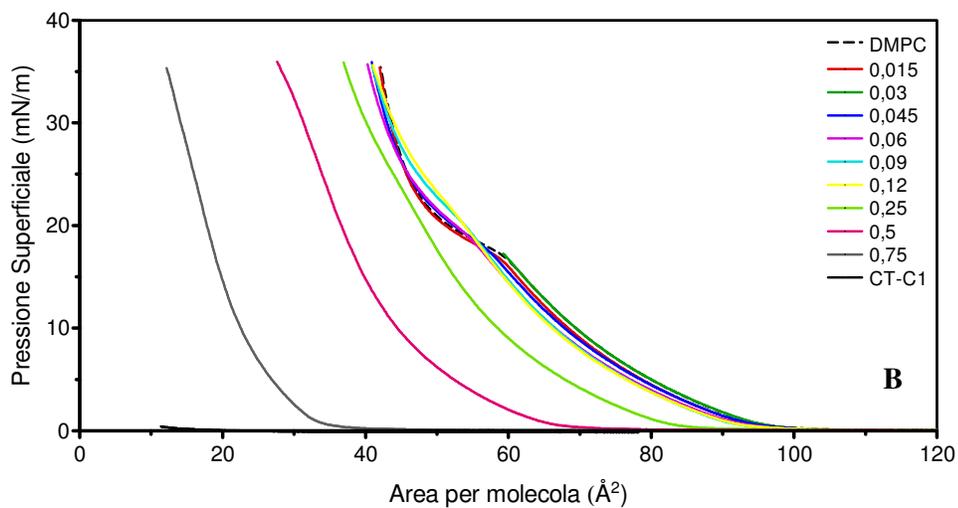
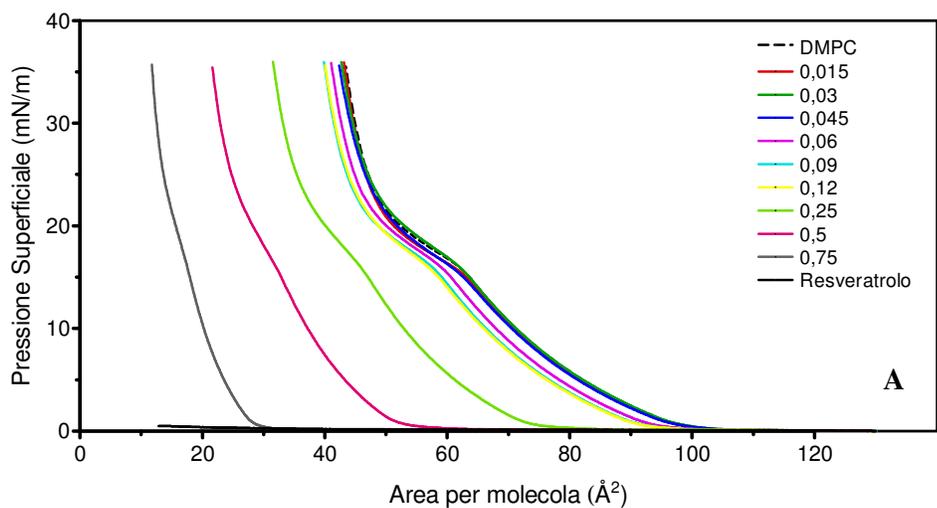
**Fig. 24:** Curve isoterme di pressione superficiale/area media per molecola dei monolayers di DMPC alle temperature di 10 °C e 37 °C.

A 10 °C la DMPC si trova in uno stato di liquido espanso (LE) per valori di area per molecola che vanno da 100 a circa 65 Å<sup>2</sup>. Da 65 a circa 50 Å<sup>2</sup> si ha la transizione dallo stato di liquido espanso a quello di liquido condensato (LE/LC); da 50 Å<sup>2</sup> a valori più bassi di area per molecola si trova in uno stato di liquido condensato (LC) in quanto la pressione superficiale aumenta velocemente al diminuire dell'area molecolare.

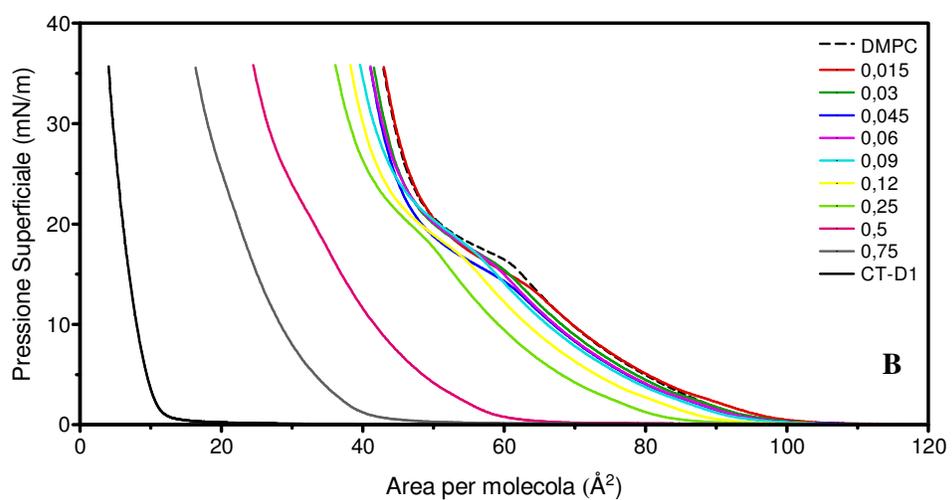
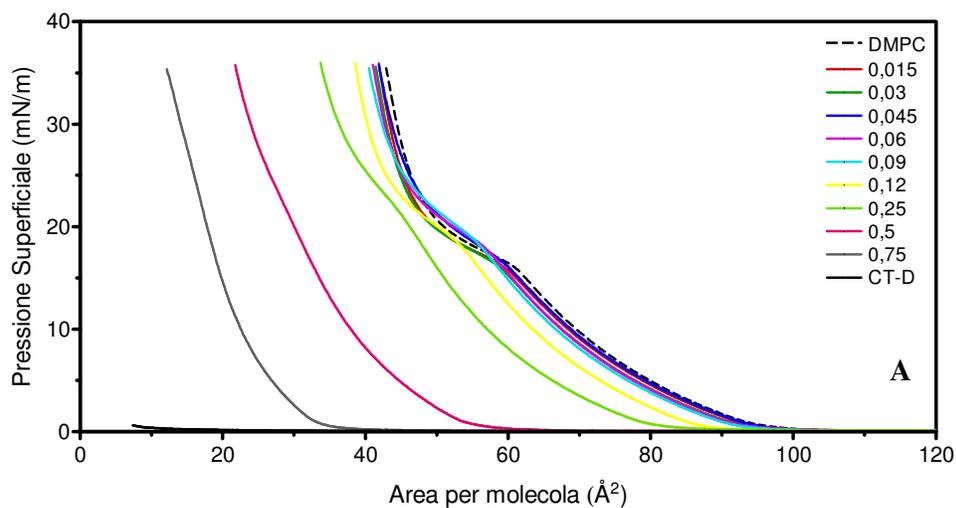
L'isoterma a 37 °C presenta due regioni: la prima, da 130 a circa 115 Å<sup>2</sup>, è caratteristica di uno stato gassoso; la seconda zona, che va da 115 Å<sup>2</sup> a valori più bassi d'area per molecola, è caratteristica di uno stato liquido-espanso, infatti, al diminuire dell'area per molecola si ha un graduale aumento della pressione superficiale. Nella figura 25 (A) sono riportate le curve isoterme pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (Å<sup>2</sup>) della DMPC, del resveratrolo e delle miscele DMPC/resveratrolo a varie frazioni molari di resveratrolo, registrate

a 10 °C. Tali misure sono state effettuate in un precedente lavoro e vengono riportate come confronto rispetto agli analoghi esaminati. Il resveratrolo non riesce a formare un monolayer. Rispetto all'isoterma della DMPC l'aggiunta del resveratrolo a basse frazioni molari non provoca delle variazioni nell'andamento delle isoterme pressione superficiale/area per molecola del solo fosfolipide; mentre dalla frazione molare 0,06 provoca uno spostamento delle isoterme a valori sempre più bassi di area per molecola. La transizione LE/LC tende a spostarsi verso valori poco più elevati di pressione superficiale e a diventare sempre meno evidente. La figura 25 (B) riporta le curve isoterme di pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola ( $\text{\AA}^2$ ) a 10 °C della DMPC, del CT-C1 e delle miscele DMPC/ CT-C1 a varie frazioni molari di CT-C1. Il composto puro non riesce a formare un monlayer. Esaminando le curve isoterme dei monolayers misti, si nota che a partire dalla frazione molare 0,09 le isoterme non presentano la transizione liquido espanso/liquido condensato, tipica della DMPC, e si spostano gradualmente verso valori più bassi di area per molecola.

Nella figura 26 (A) sono riportate le curve di pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola ( $\text{\AA}^2$ ) della DMPC, del CT-D e delle miscele DMPC/CT-D a varie frazioni molari, registrate a 10 °C. Non si ha isoterma del CT-D puro, e solo a partire dalla frazione molare 0,06 le isoterme si spostano verso valori più bassi di area per molecola e la transizione liquido espanso/liquido condensato si sposta verso valori di pressione superficiale più alti rispetto a quelli della DMPC e diventa sempre meno evidente sino a scomparire. La figura 26B mostra le curve isoterme pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola ( $\text{\AA}^2$ ) della DMPC, del CT-D1 e delle miscele DMPC/CT-D1 per frazioni molari crescenti alla temperatura di 10°C. Il composto si trova in uno stato gassoso fino a circa  $15 \text{\AA}^2$ , mentre, a valori più bassi d'area molecolare, si trova in uno stato di liquido condensato. Le isoterme delle miscele DMPC/CT-D1, già a partire dalla frazione molare 0,015 del composto, mostrano un andamento differente rispetto all'isoterma della DMPC pura; infatti, si spostano verso valori di area per molecola più bassi e ciò si nota in particolare per le frazioni molari successive alla 0,25; inoltre la transizione liquido espanso/liquido condensato diventa sempre meno pronunciata sino a scomparire per le frazioni molari più alte (0,5-0,75).



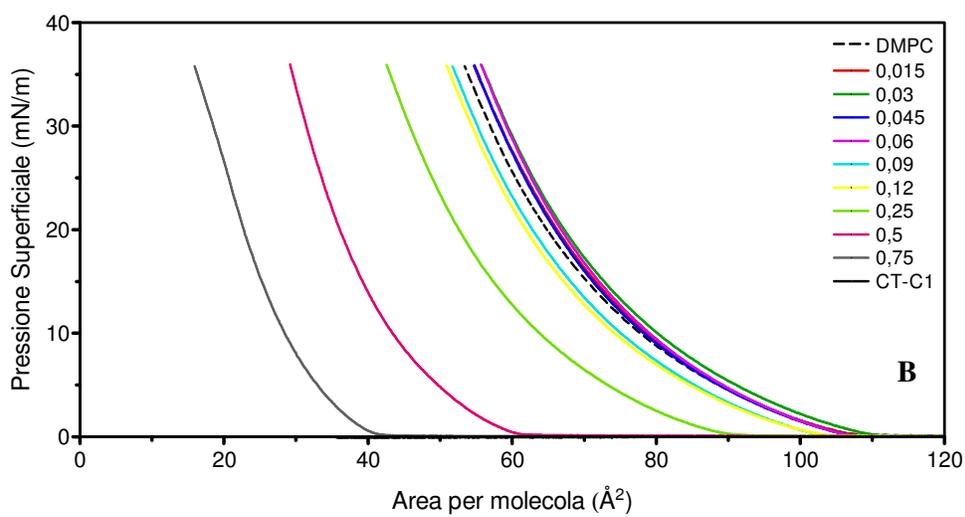
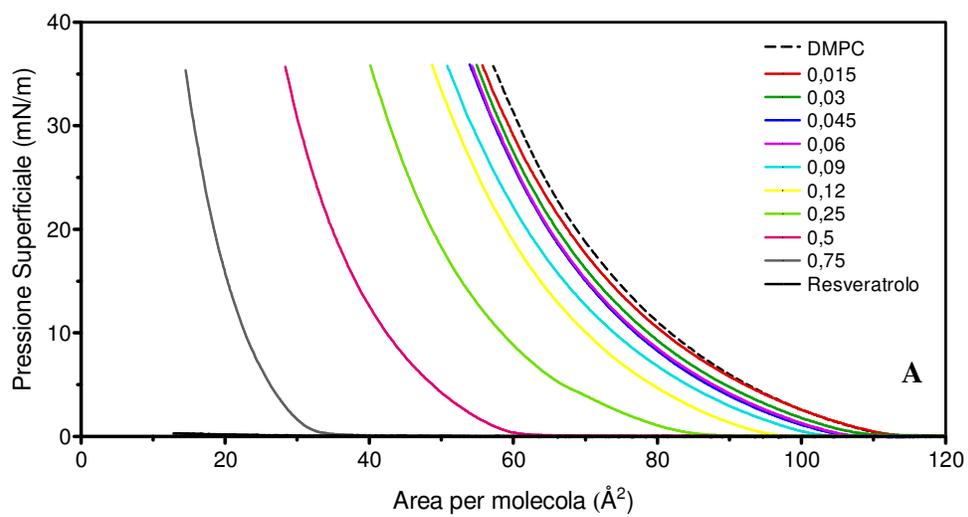
**Fig. 25:** Curve isoterme pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola ( $\text{\AA}^2$ ), alla temperatura di  $10\text{ }^\circ\text{C}$  dei monolayers di DMPC in presenza di resveratrolo (A) e CT-C1 (B) a diverse frazioni molari.



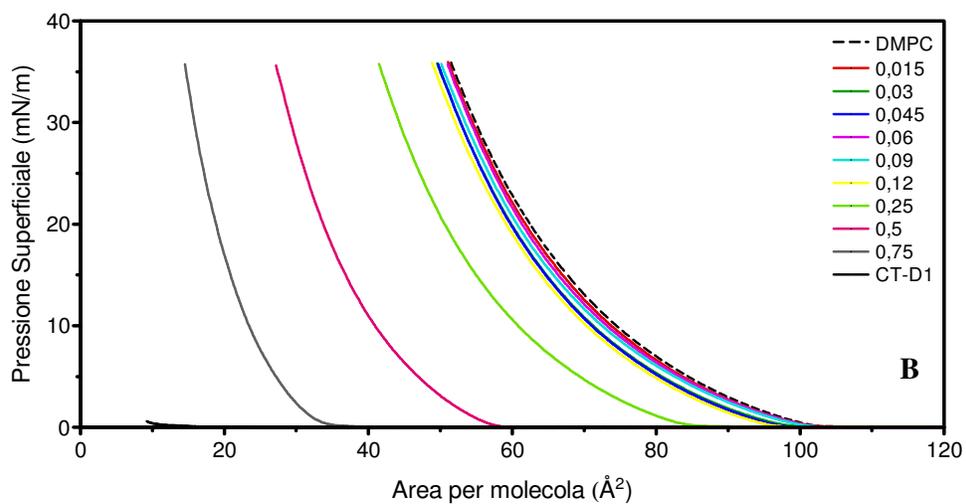
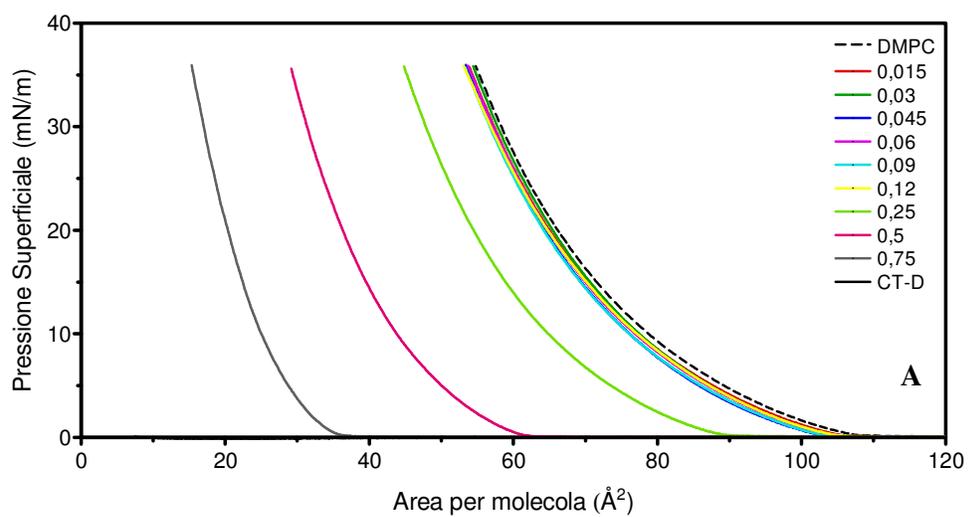
**Fig. 26:** Curve isoterme pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola (Å<sup>2</sup>), alla temperatura di 10 °C dei monolayers di DMPC in presenza di CT-D (A) e CT-D1 (B) a diverse frazioni molari.

Nella figura 27 (A) sono riportate le curve isoterme pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola ( $\text{\AA}^2$ ) della DMPC, del resveratrolo e delle miscele DMPC/resveratrolo a varie frazioni molari di resveratrolo condotte a 37 °C. Anche a questa temperatura il resveratrolo non forma un monolayer e all'aumentare delle frazioni molari, si ha uno spostamento delle isoterme verso valori d'area per molecola minori, rispetto all'isoterma della DMPC. Nella figura 27 (B) sono riportate le curve pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola ( $\text{\AA}^2$ ) della DMPC, del CT-C1 e delle miscele DMPC/CT-C1 a varie frazioni molari di CT-C1 a 37 °C. Le isoterme della miscela, per frazioni molari comprese tra 0,015 e 0,06 risultano leggermente spostate verso valori più alti d'area per molecola rispetto all'isoterma della DMPC; per frazioni molari comprese fra 0,09 e 0,12 si spostano leggermente verso valori più bassi, mentre per le frazioni molari più alte lo spostamento è maggiore. Per il CT-C1 puro non si osserva alcuna isoterma.

La figura 28 (A) mostra le curve di pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola ( $\text{\AA}^2$ ) della DMPC, del CT-D e delle miscele DMPC/CT-D a varie frazioni molari a 37 °C. Il farmaco, nel monolayer misto, solo per le frazioni molari più alte induce notevoli spostamenti delle isoterme verso valori di area per molecola più bassi rispetto all'isoterma della sola DMPC. Il solo composto non forma il monolayer. La figura 28 (B) mostra le curve di pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola ( $\text{\AA}^2$ ) della DMPC, del CT-D1 e delle miscele DMPC/CT-D1 a varie frazioni molari a 37 °C. Il CT-D1 puro non riesce a formare il monolayer e le isoterme delle miscele DMPC/CT-D1, partire dalla frazione molare 0,25 si spostano verso valori di area per molecola più bassi.



**Fig. 27:** Curve isoterme pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola ( $\text{\AA}^2$ ), alla temperatura di 37 °C dei monolayers di DMPC in presenza di resveratrolo (**A**) e di CT-C1 (**B**) a diverse frazioni molari.



**Fig. 28:** Curve isoterme pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola ( $\text{\AA}^2$ ), alla temperatura di 37 °C dei monolayers di DMPC in presenza di CT-D (**A**) e CT-D1 (**B**) a diverse frazioni molari.

Nei grafici a seguire si riportano i dati relativi all'area media per molecola, a differenti valori di pressione superficiale (10 mN/m; 20 mN/m e 30 mN/m) in funzione delle frazioni molari di resveratrolo, CT-C1, CT-D e CT-D1. La retta tratteggiata, riportata nelle figure, indica i valori di area per molecola ad un determinato valore di pressione superficiale per un monolayer a due componenti con comportamento ideale. Si ottiene congiungendo il valore dell'area per molecola di DMPC pura (frazione molare pari a 0,0 del composto) al valore ottenuto per il composto puro (frazione molare pari a 1 del composto) ai valori di pressione superficiale considerati.

Le figure 29 (A) e 29 (B) mostrano i valori di area per molecola dei monolayers delle miscele DMPC/resveratrolo in funzione della frazione molare di resveratrolo a tre diverse pressioni superficiali, (10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m) registrati a 10 e a 37°C. A 10 °C il resveratrolo (fig.29A) provoca una lieve deviazione positiva rispetto ai valori ideali. Quest'effetto all'aumentare della pressione superficiale diviene meno evidente. A 37 °C (fig.29B) a basse frazioni molari, non si ha alcuna deviazione rispetto alla retta ideale; indicando che i due componenti del monolayer sono miscibili. Alla frazione molare 0,25 si ha una deviazione negativa rispetto alla retta tratteggiata, indice di lievi interazioni attrattive tra la DMPC e il resveratrolo. Piccole deviazioni positive si hanno solo a elevate frazioni molari che indicano lieve interazioni repulsive tra le molecole del monolayer.

Le figure 30 (A) e 30 (B) mostrano l'andamento dell'area per molecola delle miscele DMPC/CT-C1 in funzione della frazione molare di CT-C1 alla temperatura di 10 °C e di 37 °C e alla pressione superficiale di 10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m.

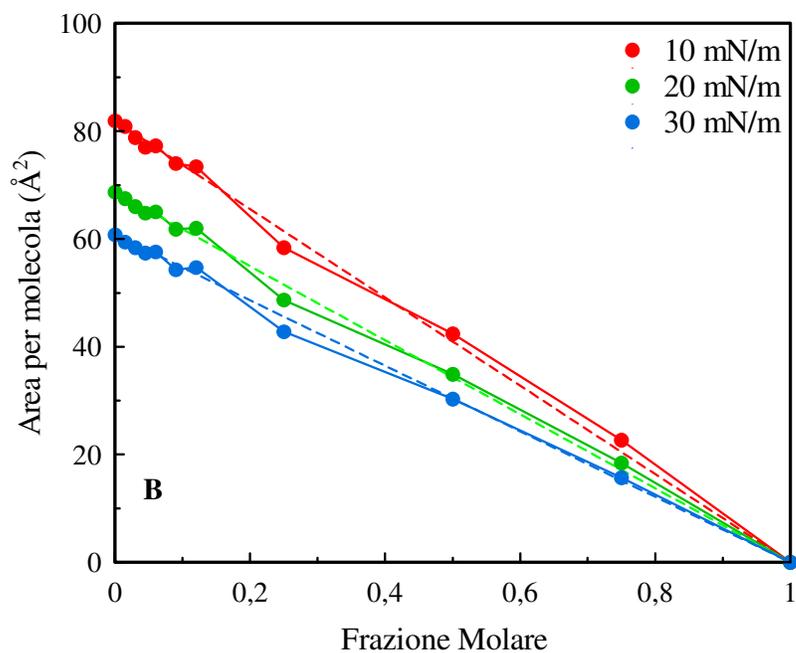
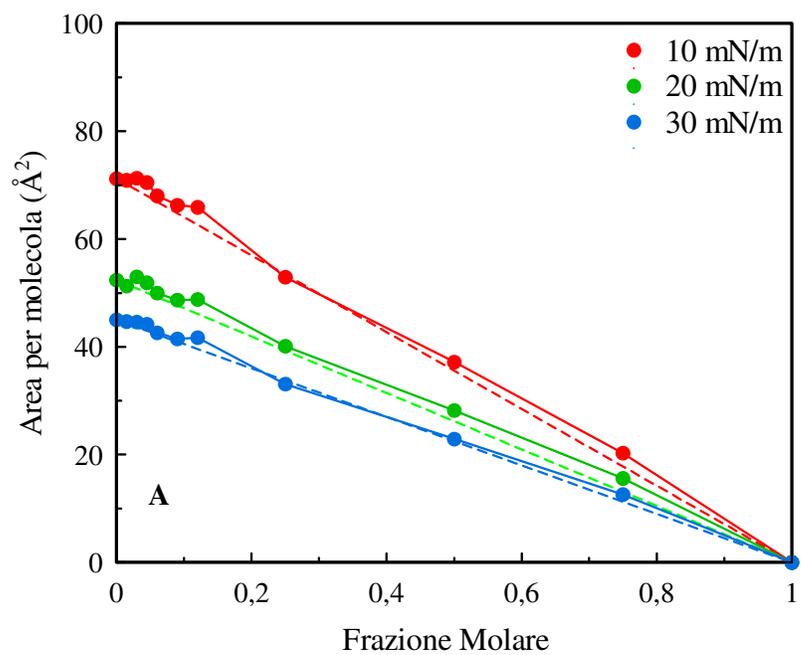
Alla temperatura di 10 °C (fig.30 A), alla pressione di 10 mN/m e di 30 mN/m, fino alla frazione molare 0,09 si osserva la sovrapposizione dei valori sperimentali a quelli ideali, dalla frazione molare 0,12 si osserva una deviazione positiva rispetto alla retta ideale. A 20 mN/m si osserva una deviazione positiva rispetto alla retta ideale per tutte le frazioni molari, ad eccezione della 0,015. Alla temperatura di 37 °C (fig.30 B), a 10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m si nota una deviazione positiva dei valori di area molecolare rispetto alla retta ideale per tutte le frazioni molari suggerendo che fra le molecole di CT-C1 e DMPC si instaurano interazioni repulsive.

Le figure 31 (A) e 31 (B) mostrano l'andamento dell'area per molecola delle miscele DMPC/CT-D in funzione della frazione molare di CT-D alla temperatura di 10 °C e di 37 °C e alla pressione superficiale di 10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m.

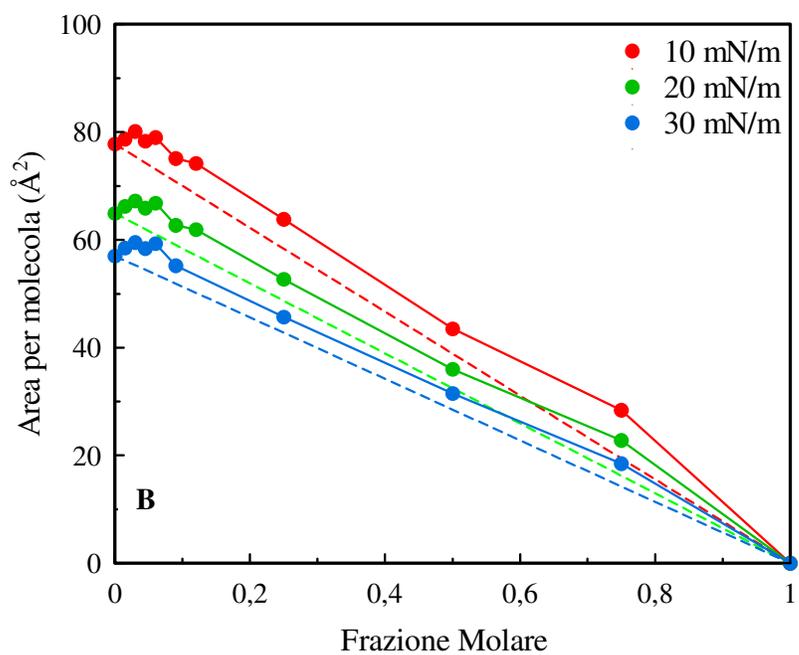
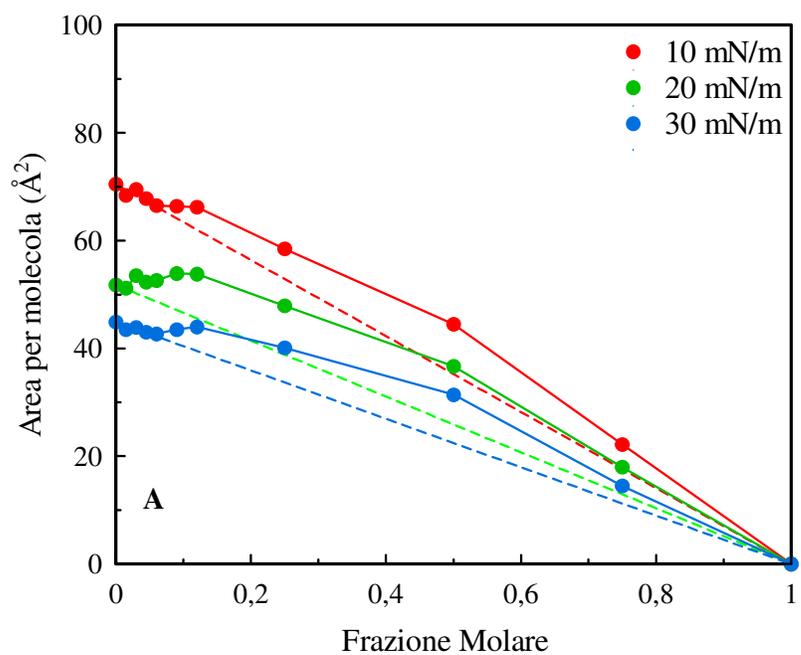
In fig.31 (A), i valori sperimentali registrati per le frazioni molari più basse si sovrappongono a quelli della retta ideale e a partire dalla frazione molare 0,045 si hanno deviazioni positive, più evidenti a 20 mN/m. Alla temperatura di 37 °C (fig. 31 B) a 10 mN/m, 20 mN/m, 30 mN/m solo a partire dalla frazione molare 0,06 si osserva una deviazione positiva dovuta alla repulsione fra le molecole di CT-D e quelle di DMPC.

Le figure 32 (A) e 32 (B) mostrano l'andamento dell'area per molecola delle miscele DMPC/CT-D1 in funzione della frazione molare di CT-D1 alla temperatura di 10 °C e di 37 °C e alla pressione superficiale di 10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m.

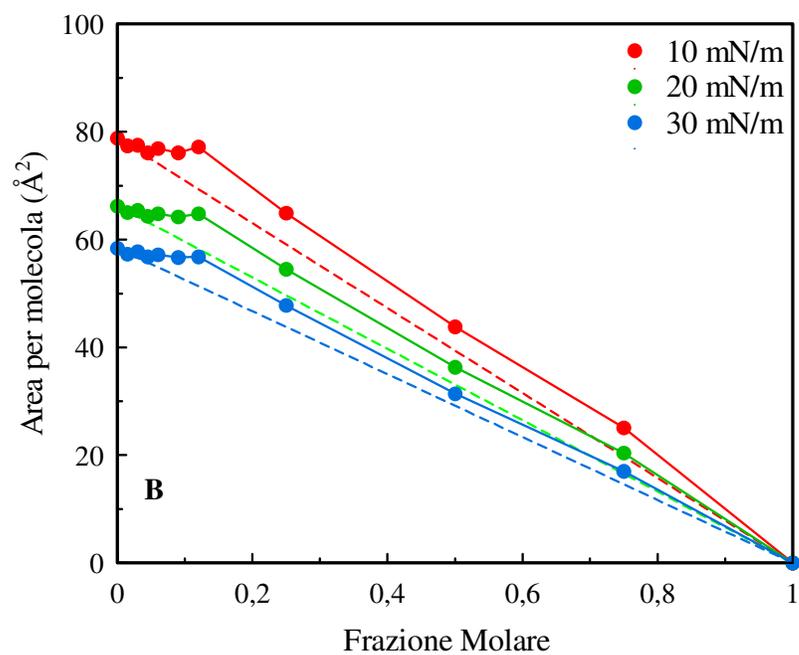
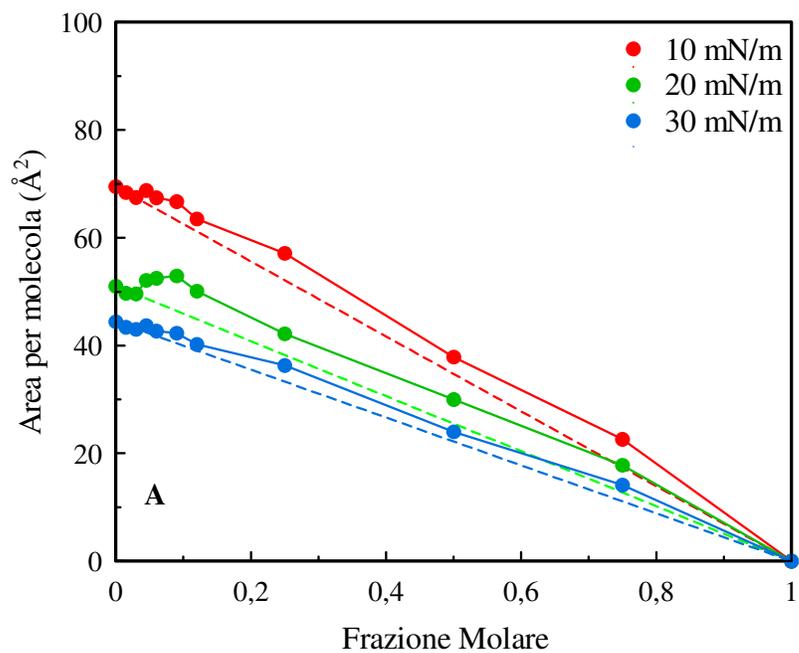
Il composto, alla temperatura di 10 °C (fig. 32 A), a partire dalla frazione molare 0,25 alla pressione superficiale di 10 mN/m e 30 mN/m mostra una piccola deviazione positiva rispetto alla retta ideale. Alla pressione di 20 mN/m tale deviazione si presenta già alla frazione molare 0,09. Alla temperatura di 37 °C (fig. 32 B) a 10 mN/m, 20 mN/m e 30 mN/m, i valori sperimentali sono sovrapponibili a quelli ideali per le frazioni molari più basse; a partire dalla frazione molare 0,06 si osserva una piccola deviazione positiva.



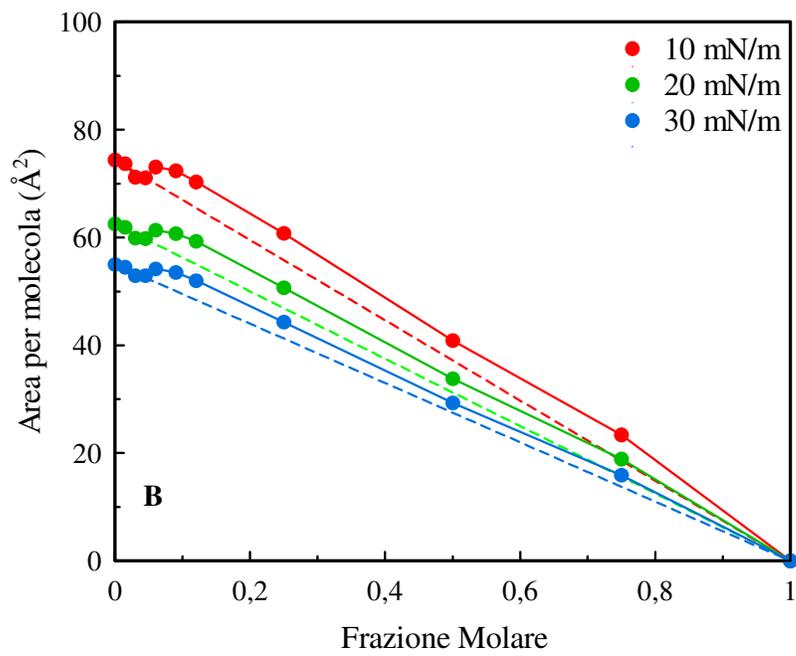
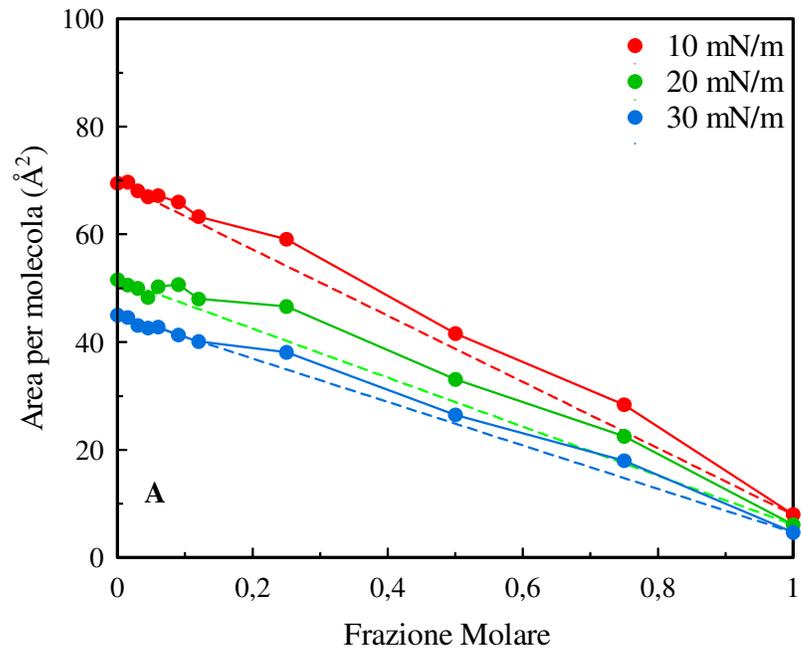
**Fig. 29:** Area media per molecola ( $\text{\AA}^2$ ) per miscele di DMPC/resveratrolo a frazioni molari crescenti di resveratrolo, a  $10^\circ\text{C}$  (A) e a  $37^\circ\text{C}$  (B).



**Fig. 30:** Area media per molecola (Å<sup>2</sup>) per miscele di DMPC/CT-C1 a frazioni molari crescenti di CT-C1 a 10°C (A) e a 37°C (B).



**Fig. 31:** Area media per molecola (Å<sup>2</sup>) per miscele di DMPC/CT-D a frazioni molari crescenti di CT-D a 10°C (A) e a 37°C (B).



**Fig. 32:** Area media per molecola ( $\text{\AA}^2$ ) per miscele di DMPC/CT-D1 a frazioni molari crescenti di CT-D1 a  $10^\circ\text{C}$  (A) e a  $37^\circ\text{C}$  (B).

## 1.6. Conclusioni

Esaminando i risultati ottenuti relativi agli esperimenti di calorimetria si evince che i tre composti: CT-C1, CT-D e CT-D1, interagiscono con gli MLV di DMPC causando la fluidificazione del bilayer fosfolipidico. Il CT-D esercita l'effetto maggiore, il CT-C1 quello minore, mentre il CT-D1 esercita un effetto intermedio tra gli altri due composti.

Per quanto riguarda le cinetiche di contatto i risultati ottenuti dimostrano che il mezzo acquoso non favorisce l'uptake dei prodrugs da parte dei modelli di biomembrana. Dai dati ottenuti dagli esperimenti di trasferimento transmembrana si osserva, che tutti e tre i composti sono capaci di migrare dagli MLV pieni a quelli di sola DMPC pura ed in particolare il CT-D segue una cinetica veloce ma mostra un trasferimento più graduale rispetto al CT-C1, mentre il CT-D1 ha una velocità di trasferimento intermedia rispetto agli altri due composti e non riesce a trasferirsi completamente agli MLV di DMPC vuoti.

Alla luce dei risultati ottenuti con l'applicazione della tecnica di Langmuir-Blodgett è possibile rilevare come tutti i composti presi in esame siano capaci di interagire con i modelli di biomembrana.

Dalle curve isoterme pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola ( $\text{\AA}^2$ ), si evince che l'analogo ossidrilato dello stilbene, il 2-idrossi-3,5,4',5'-tetrametossistilbene (CT-D1) riesca a formare un monolayer alla temperatura di 10°C.

E' possibile ipotizzare che l'ossidrilato in posizione 2 nella struttura stilbenica, conferisca al composto la capacità di formare il monolayer grazie all'instaurarsi di legami ad idrogeno tra le stesse molecole.

Tale capacità si evidenzia a 10°C, poiché a questa temperatura, scelta perché al di sotto della temperatura di transizione della DMPC, le molecole hanno una minore libertà di movimento. Alla temperatura di 37°C, infatti, né il resveratrolo, né i suoi derivati sono capaci di formare un monolayer.

Le interazioni intermolecolari che si instaurano nei monolayers misti di DMPC/derivati del resveratrolo, riportati nei grafici area media per molecola ( $\text{\AA}^2$ ) frazione molare, registrati a 10, 20 e 30 mN/m, sono maggiori rispetto all'interazione del resveratrolo con la DMPC sia a 10 che a 37°C. Il CT-C1, il CT-D e il CT-D1, mostrano, infatti, deviazioni positive rispetto ai valori della retta ideale, anche per le frazioni molari più basse, con un andamento simile per tutti e tre i valori di pressione

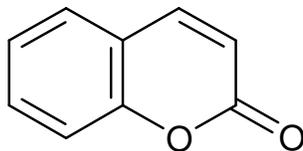
superficiale. Tali deviazioni sono da attribuire ad interazioni repulsive tra i composti e la DMPC dovute alla capacità che hanno molecole simili di aggregarsi tra loro. Per quanto riguarda invece le interazioni tra il resveratrolo e la DMPC, per tutti e tre i valori di pressione considerati, si notano piccole deviazioni negative rispetto alla retta ideale, soprattutto alla frazione molare 0,25, dovute ad interazioni attrattive tra il resveratrolo e la DMPC, probabilmente causate dalla formazione di legami ad idrogeno tra i gruppi idrossilici dello stilbene e le teste polari dei fosfolipidi.

In conclusione, sia il resveratrolo che i suoi derivati mostrano un comportamento fluidificante sul bilayer fosfolipidico, in quanto provocano deviazioni positive rispetto alla retta ideale (che indica la completa miscibilità tra i composti e la DMPC). Questo comportamento è maggiore per gli analoghi del resveratrolo ed è dovuto ad una riduzione della densità dei monolayers causata da una maggiore area occupata dalle molecole che lo formano.

## 2. CUMARINE

Le molecole appartenenti alla classe delle cumarine rappresentano un gruppo eterogeneo di molecole con attività farmacologiche e terapeutiche molto diverse. Il prototipo di questa famiglia è rappresentato dalla *cumarina*, una sostanza estratta per la prima volta nel 1820 dai semi della *Dipteryx odorata*, una leguminosa tropicale originaria del sud America nota anche come *Coumarouna odorata*, da cui si ottiene la fava tonka ed un tipo di legno (cumarù). Questo albero era chiamato dagli indigeni “coumarou”, da qui il nome della cumarina. (J. Bruneton, 1999). Attualmente le cumarine sono state isolate da più di 700 specie diverse. Le famiglie più ricche di questi composti sono le *Apiaceae* e le *Poaceae* (S. Ricciuti and C. Cardini, 2004). Sono state trovate cumarine sia in forma libera che eterosidica in molte famiglie dicotiledoni, comprese le *Asteraceae*, *Fabiaceae*, *Moraceae*, *Rosaceae*, *Rubiaceae*, *Rutaceae* e *Solanaceae* (I. Weinmann, 1997; U. Matern et al., 1999). Il fatto che le cumarine si trovino in una così vasta gamma di piante, sembra essere correlato alla loro capacità di agire come *fitoalessine*, vale a dire sostanze che si formano, nel corso del processo di appassimento, in risposta ad una lesione traumatica delle piante, si accumulano sulla superficie delle foglie, frutti e semi e inibiscono la crescita e la sporulazione dei funghi patogeni e agiscono come repellenti contro gli scarafaggi e altri invertebrati terrestri. Le cumarine sono attive anche nel metabolismo vegetale partecipando alla regolazione della crescita della pianta (I. Weimann, 1997; U. Matern et al., 1999).

Le cumarine appartengono ad un gruppo di composti noti come benzopirani, ognuno dei quali è costituito da un anello benzenico unito ad un pirone. (G. J. Keating and R. O'Kennedy, 1997). Tutte le cumarine presenti in natura derivano dall'1-benzopirano-2-pirone (fig.33) e sono presenti sia in forma libera che glicosidica (eterosidi). Sono contenute in diverse parti della pianta, soprattutto nelle foglie, nei frutti, nei semi e nelle radici.



**Fig. 33:** 1-benzopirano-2-one (cumarina).

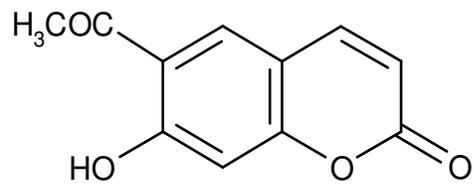
Studi sulla farmacocinetica delle cumarine hanno dimostrato che la cumarina ha una biodisponibilità assoluta molto ridotta nell'uomo (<5%), a causa di un esteso metabolismo epatico di primo passaggio (*W. Ritschel et al., 1979*).

Nel fegato la cumarina va incontro ad una reazione di ossidazione a 7-idrossicumarina, seguita dalla coniugazione con acido glucuronico (*J. R. Hoult and M. Paya, 1996*) abbondantemente presente a livello del fegato e capace di legarsi ai farmaci, mediante reazione di coniugazione, come UDP-glucuronato (uridinadifosfato-glucuronato), producendo metabolici inattivi e solubili in acqua facilmente eliminabili dal rene. Le cumarine hanno dimostrato di possedere una varietà di attività farmacologiche e terapeutiche tra loro anche molto diverse quali un'azione flebotonica, antinfiammatoria, spasmolitica, antiossidante, antibatterica, antivirale, anticoagulante, antitumorale, antimalarica e foto sensibilizzante (*T. O. Soine, 1964*). Studi farmacocinetici condotti sull'uomo hanno dimostrato che le cumarine sono completamente assorbite nel tratto gastrointestinale dopo somministrazione orale (*A. Lacy and R. O'Kennedy, 2004*) e per questo le misure sono state condotte a pH 4 scelto poiché è il pH più vicino a quello gastrico considerando che, in un ambiente fortemente acido ( $\text{pH} \leq 3$ ), l'impacchettamento delle catene del fosfolipide (DMPC) si modifica (*J. F. Tocanne and J. Teissière, 1990*).

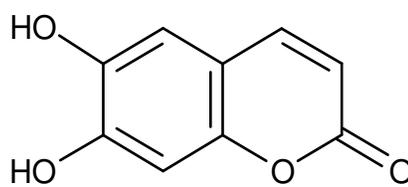
## 2.1. Materiali

La 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) è stata ottenuta dalla Genzyme Pharmaceuticals (Liestal, Svizzera). La Scopoletina, l'Esculetina e l'Esculina sono state ottenute dalla Sigma-Aldrich (fig. 34). Per formare i liposomi è stata utilizzata una soluzione di idrossimetil-aminometano (Tris) 50 mM portata a pH 4 mediante HCl. La subfase per gli studi di Langmuir-Blodgett consiste di un tampone Tris 5 mM, portato a pH 4 mediante HCl. L'acqua utilizzata è acqua ultra pura con resistività di 18.2 M $\Omega$ ·cm ottenuta mediante un sistema Simplicity 185 Millipore. I coefficienti di ripartizione (logP) delle tre cumarine sono stati ottenuti da Chem Bank : Scopoletina logP 1,641; Esculetina logP 1,41; Esculina logP -0,514.

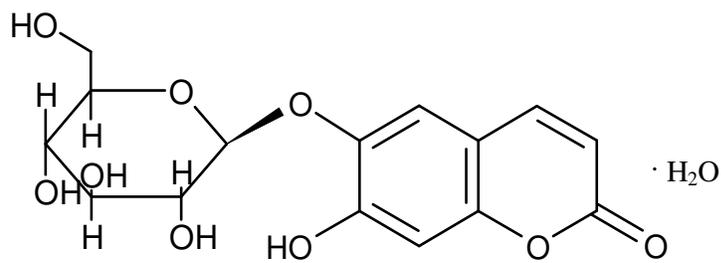
Per la preparazione dei liposomi sono state utilizzate vescicole multilamellari (MLV) di DMPC, sia come riferimento, che in presenza di Scopoletina, Esculetina ed Esculina a diverse frazioni molarali (0,015; 0,03; 0,045; 0,06; 0,09).



**Scopoletina**



**Esculetina**



**Esculina**

**Fig. 34:** Scopoletina, Esculetina ed Esculina.

## **2.2. Preparazione dei liposomi: MLV**

La procedura seguita per la preparazione dei liposomi contenenti Scopoletina, Esculetina ed Esculina è la medesima riportata a pag 22:

I film sono stati idratati con tampone Tris pH 4 e posti a 37 °C per 1 minuto; agitati per 1 minuto; per tre volte, e infine lasciati a 37 °C per 60 minuti. Si ottengono in tal modo liposomi in cui il farmaco è omogeneamente disperso in tutti i bilayers.

## **2.3. Analisi DSC**

L'entità dell'interazione tra i composti con i modelli di membrana, è stata determinata attraverso:

**a) analisi DSC dei campioni preparati in fase organica**

**b) cinetiche di contatto**

**c) cinetiche di trasferimento transmembrana**

come descritto a pagina 23; 24.

## **2.4. Misure di tensione superficiale: Langmuir-Blodgett**

Per formare il monolayer sono state preparate soluzioni di DMPC, Scopoletina, Esculetina ed Esculina in solvente organico, e miscele di DMPC/Scopoletina, DMPC/Esculetina, DMPC/Esculina, in opportune frazioni molari (0,0; 0,024; 0,048; 0,09; 0,17; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0.). Il volume di soluzione impiegata è tale da compiere tutte le esperienze deponendo lo stesso numero di molecole sulla subfase. Per assicurarsi della riproducibilità del lavoro l'esperienza è stata ripetuta per almeno 3 volte. Le misure sono state eseguite alle temperature di 10 °C e 37 °C.

## 2.5. Risultati e discussione

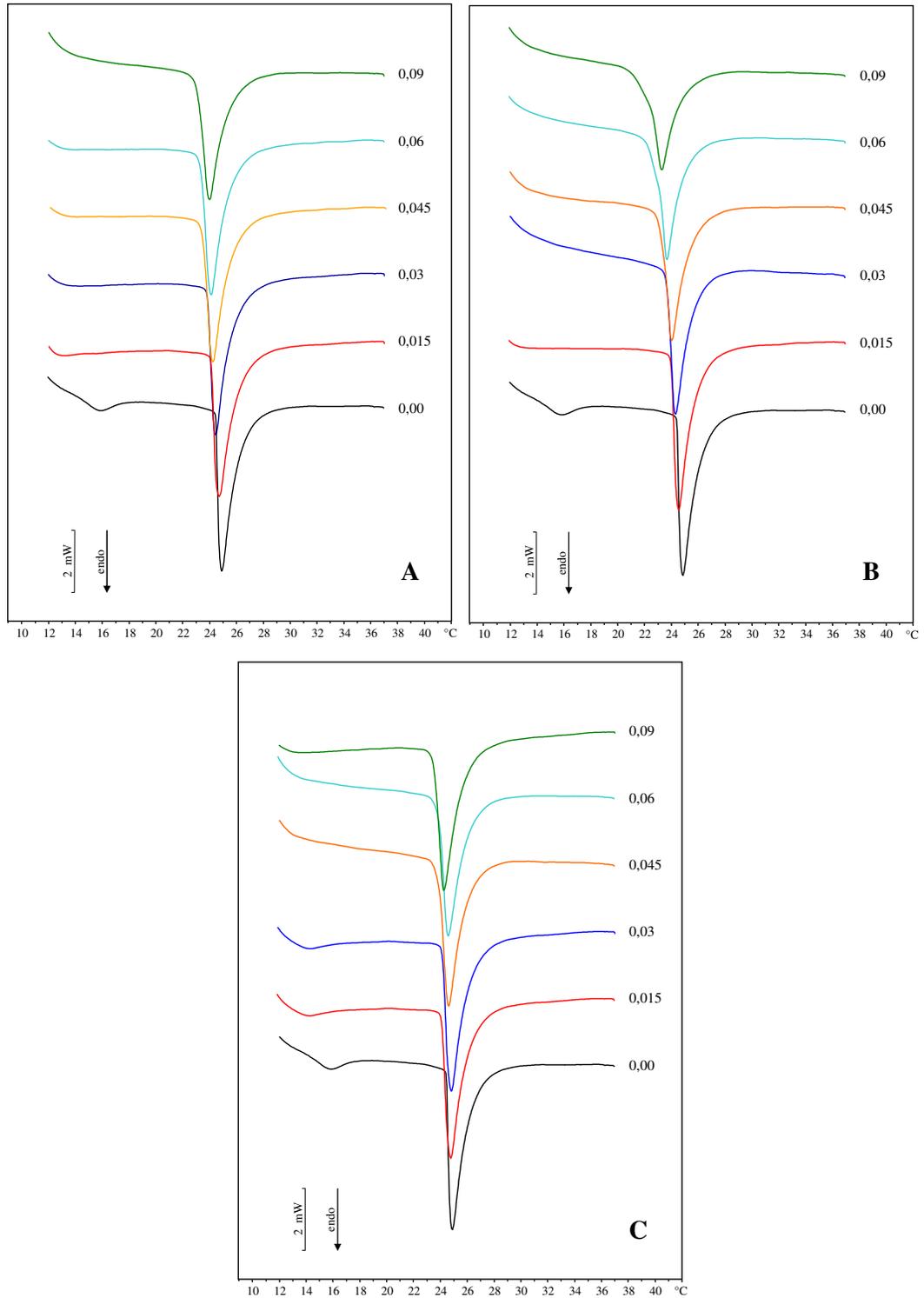
### 2.5.1. Analisi DSC

#### *Interazione fra i composti e gli MLV di DMPC*

È stato studiato l'effetto della Scopoletina, dell'Esculetina e dell'Esculina sul comportamento termotropico di vescicole multilamellari di DMPC mediante la Calorimetria a Scansione Differenziale. Le curve DSC delle vescicole di DMPC pura sono state confrontate con le curve delle vescicole preparate in presenza di differenti frazioni molari dei composti come mostrato in figura 35.

Sia in presenza di Scopoletina che di Esculetina il picco di pretransizione scompare già alla più bassa frazione molare dei composti. Com'è possibile evincere dalle curve, la Scopoletina, determina dei piccoli spostamenti del picco calorimetrico principale verso più basse temperature e un'altrettanto piccola variazione dell'entalpia del sistema all'aumentare della frazione molare. Nel caso della Esculetina all'aumentare della frazione molare lo spostamento del picco principale verso temperature più alte è più evidente e a tale spostamento si associa uno slargamento dei picchi calorimetrici.

Alla frazione molare 0,09 si nota inoltre una separazione di fase che indica una distribuzione non uniforme dell'Esculetina negli MLV di DMPC con la formazione di zone più ricche e di zone meno ricche di composto. In presenza di Esculina il picco di pretransizione, all'aumentare della frazione molare, si attenua fino a scomparire alla frazione molare 0,045. L'Esculina, provoca un leggero spostamento del picco principale verso temperature più basse e la forma dei picchi calorimetrici rimane pressoché invariata per tutte le frazioni molari.

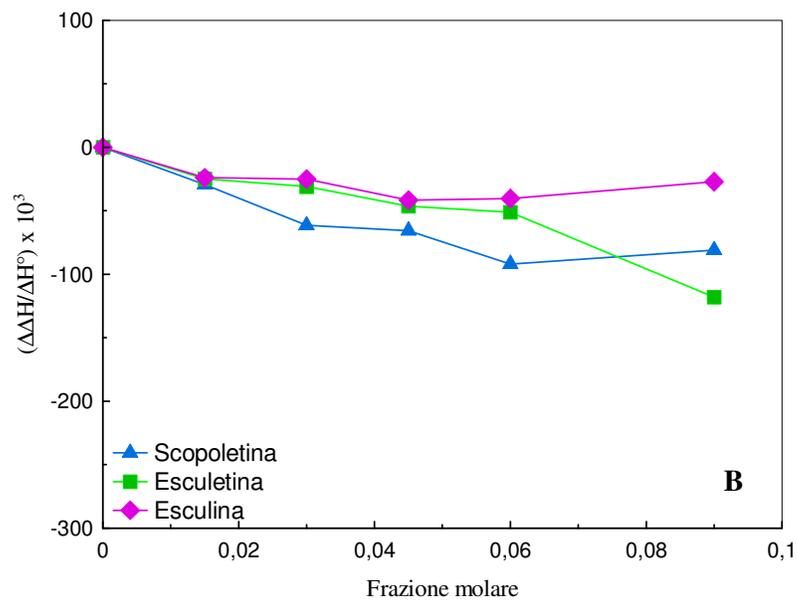
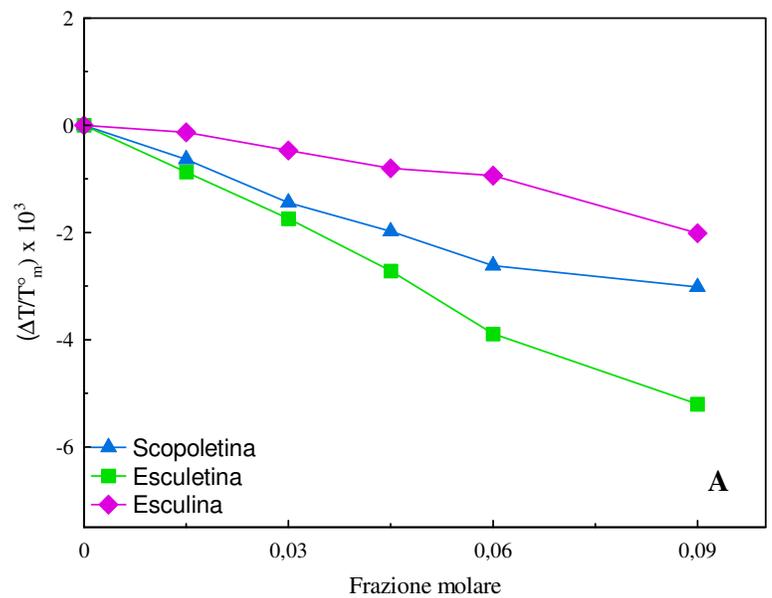


**Fig. 35:** Curve calorimetriche di MLV di DMPC preparati in presenza di Scopoletina (A) Esculetina (B) ed Esculina (C) a diverse frazioni molari.

La figura 36 (A) mostra la variazione della temperatura di transizione degli MLV di DMPC preparati in presenza di Scopoletina, Esculetina ed Esculina riportata come  $\Delta T/T_m^0$  in funzione della frazione molare di composto presente nella dispersione acquosa degli MLV in base alla relazione:  $\Delta T = T_m - T_m^0$  ( $T_m$  = temperatura di transizione degli MLV di DMPC in presenza di ognuno dei composti esaminati;  $T_m^0$  = temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura).

Tutti i composti determinano un decremento della temperatura di transizione degli MLV di DMPC, all'aumentare della loro frazione molare e l'Esculetina è quella che provoca la maggiore variazione dei parametri termotropici, mentre l'Esculina è quella che destabilizza meno il bilayer fosfolipidico di DMPC. Dai dati relativi al coefficiente di ripartizione delle tre molecole si evince che la Scopoletina e l'Esculetina, con  $\log P$  simile, e con una maggiore lipofilia, destabilizzano maggiormente il bilayer fosfolipidico, tuttavia l'Esculina che è la più idrofila tra le tre, provoca comunque un effetto destabilizzante sugli MLV di DMPC.

La variazione dell'entalpia (fig. 36 B) è riportata, come  $\Delta\Delta H/\Delta H^0$ , in funzione della frazione molare di composto presente nella dispersione acquosa degli MLV in base alla relazione:  $\Delta\Delta H = \Delta H - \Delta H^0$  ( $\Delta H$  = entalpia degli MLV di DMPC in presenza di ognuno dei composti esaminati;  $\Delta H^0$  = entalpia degli MLV di DMPC pura), tutte e tre le cumarine provocano un abbassamento dell'entalpia, comportamento caratteristico di composti che interagiscono e destabilizzano il bilayer fosfolipidico degli MLV di DMPC.



**Fig. 36:** (A) Variazione della temperatura di transizione dei picchi calorimetri degli MLV di DMPC preparati in presenza di Scopoletina, Esculetina ed Esculina a frazioni molari crescenti. (B) Variazione dell'entalpia dei picchi calorimetri degli MLV di DMPC preparati in presenza di Scopoletina, Esculetina ed Esculina a frazioni molari crescenti.

### *Cinetiche di contatto*

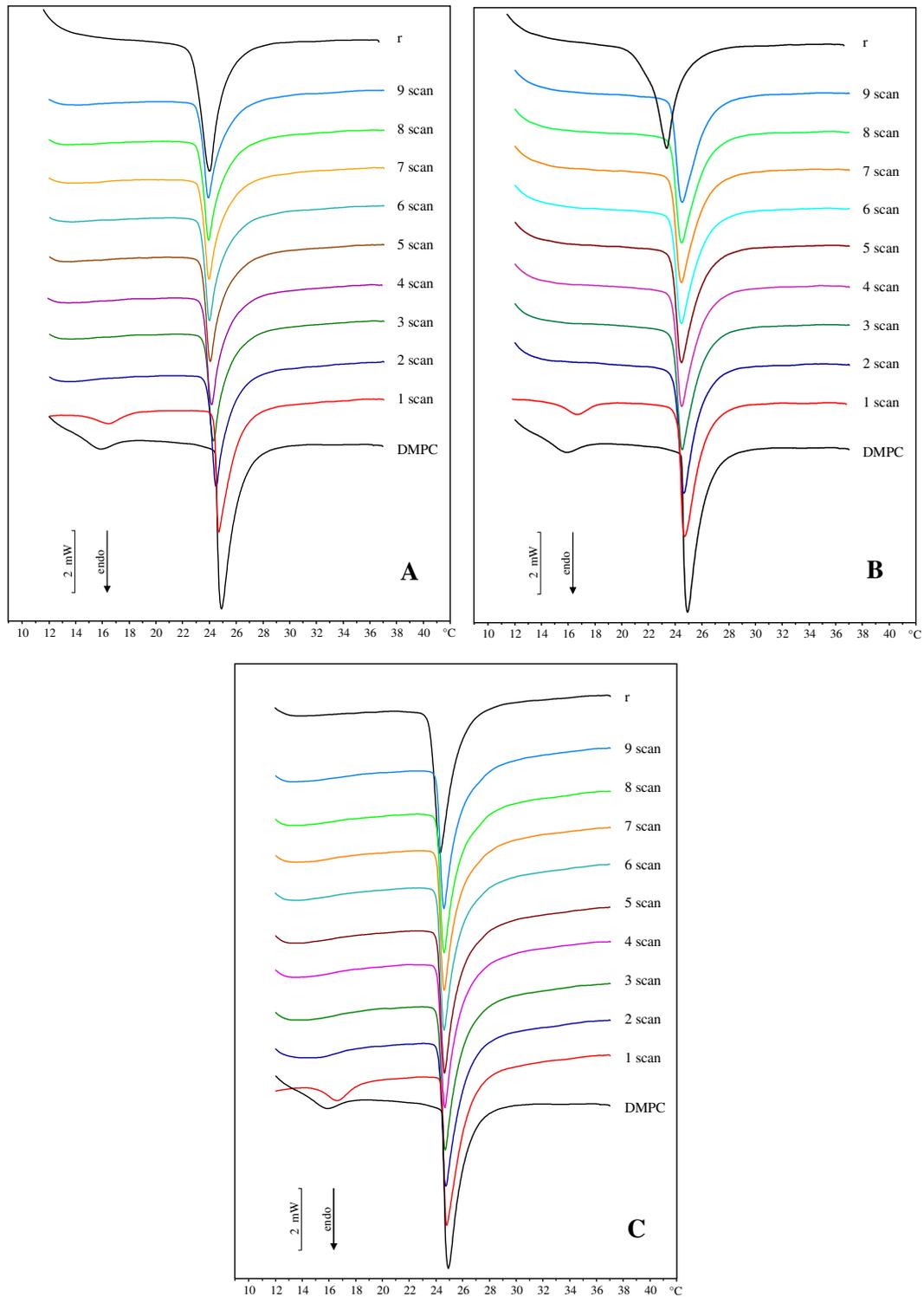
I composti in esame alla frazione molare 0,09 sono stati lasciati a incubare con MLV di DMPC e le curve calorimetriche sono state registrate subito dopo il contatto e a intervalli di un'ora in modo da studiare la capacità dei composti di solubilizzarsi nel mezzo acquoso circostante e di raggiungere e attraversare i doppi strati lipidici dei liposomi.

La figura 37 mostra le curve calorimetriche degli MLV di DMPC pura posti a contatto, a differenti tempi di incubazione, con la Scopoletina, l'Esculetina e l'Esculina, ciascuno alla frazione molare 0,09 rispetto al fosfolipide. Nei termogrammi le curve sono confrontate con la curva degli MLV di DMPC pura e con la curva degli MLV di DMPC preparati in presenza dei composti alla frazione molare 0,09 presa come riferimento (r). Cambiamenti nella temperatura di transizione o nell'entalpia degli MLV possono essere messi in relazione con la quantità di composto che entra nello strato lipidico (A. Raudino and F. Castelli, 1998) e qualora il composto si disperdesse in maniera completa negli MLV, si otterrebbe un termogramma simile a quello registrato per la frazione molare di riferimento ( $X=0,09$ ) in fase organica.

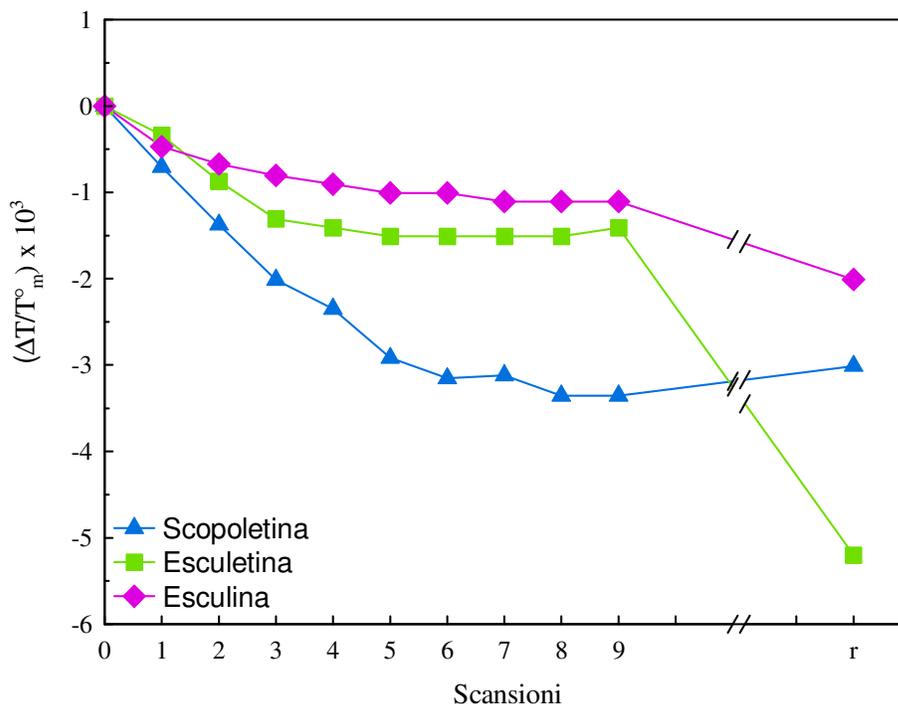
Nel caso della Scopoletina (fig. A) il picco di pretransizione scompare alla seconda scansione e, all'aumentare del tempo di incubazione, si osserva lo spostamento del picco principale a valori più bassi di temperatura fino a raggiungere la temperatura di transizione della curva di riferimento (r). Anche nel caso dell'Esculetina (fig. B), il picco di pretransizione scompare alla seconda scansione ma il picco principale non subisce rilevanti variazioni e si sposta leggermente verso temperature più basse rimanendo distante dalla curva di riferimento (r). Questo comportamento è simile a quello evidenziato per l'Esculina (fig. C). Mettendo in grafico (figura 38) la variazione della temperatura di transizione dei picchi calorimetrici dei liposomi di DMPC lasciati in presenza dei composti alla frazione molare 0,09 rispetto al fosfolipide in funzione del tempo di incubazione, si evidenzia che solo la Scopoletina provoca un abbassamento della temperatura di transizione fino a raggiungere il valore r; l'Esculina e ancor di più l'Esculetina, provocano comunque una diminuzione della  $T_m$  senza però raggiungere il valore di riferimento r.

L'Esculina e l'Esculetina, quando si trovano in ambiente acquoso, hanno una minore capacità di interagire con il bilayer fosfolipidico, rappresentato dagli MLV, rispetto alla Scopoletina ed infatti il valore di temperatura di riferimento r viene

raggiunto solo da quest'ultima che, probabilmente a causa della maggiore lipofilia è capace di raggiungere la superficie degli MLV di DMPC e perturbare i doppi strati lipidici.



**Fig. 37:** Curve calorimetriche di MLV di DMPC pura lasciati in contatto con Scopoletina (A) Esculetina (B) ed Esculina (C) alla frazione molare 0,09 a differenti tempi d'incubazione. r = MLV di DMPC preparati in presenza dei composti alla frazione molare 0,09.



**Fig. 38:** Variazione della temperatura di transizione dei picchi calorimetri degli MLV di DMPC lasciati in contatto con Scopoletin, Esculetina ed Esculina alla frazione molare 0,09 a diversi tempi di incubazione. La variazione della temperatura di transizione è riportata come  $\Delta T/T_m^0$  ( $\Delta T = T_m - T_m^0$ , dove  $T_m$  = temperatura di transizione di MLV di DMPC in presenza dei composti esaminati e  $T_m^0$  è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura) in funzione del tempo di incubazione.

**r** = valore relativo ai liposomi di DMPC e stilbene, alla frazione molare 0,09.

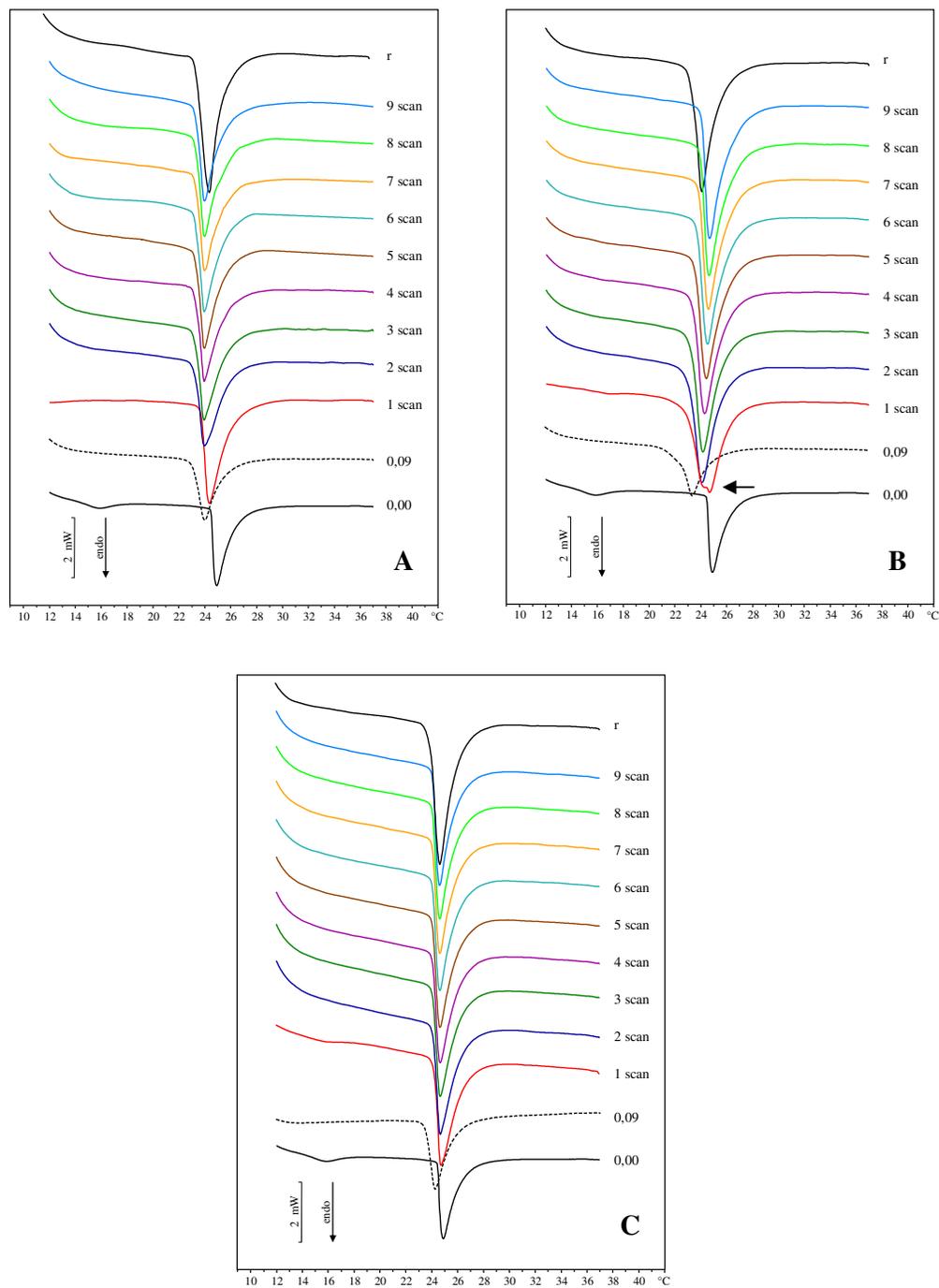
### *Cinetiche di trasferimento transmembrana*

Questi esperimenti sono stati condotti per verificare se i composti in esame possano essere rilasciati da un carrier liposomiale ai modelli di biomembrana. A tale scopo, MLV di DMPC preparati in presenza del composto in esame (carrier) alla frazione molare 0,09 sono stati messi a contatto con MLV di sola DMPC (modello di biomembrana), a tempi di incubazione crescenti. Le curve calorimetriche di tali esperimenti sono mostrate in figura 39 e confrontate con: le curve degli MLV di DMPC pura; le curve degli MLV di DMPC preparati in presenza di composto alla frazione molare 0,09; le curve degli MLV di DMPC preparati in presenza di composto alla frazione molare 0,045 (curva r).

La curva r è usata come riferimento in quanto rappresenta la curva che si dovrebbe ottenere se il composto migrasse dagli MLV pieni ( $X=0,09$ ) agli MLV vuoti ( $X=0,00$ ) fino al raggiungimento dello stato di equilibrio in cui è possibile ipotizzare che in tutti gli MLV ci sia un valore medio di concentrazione pari a una frazione molare 0,045.

Per quanto riguarda la Scopoletina il picco di pretransizione scompare già alle prime scansioni. Il picco principale si sposta verso temperature più basse raggiungendo la curva di riferimento r. Nel caso dell'Esculetina nella prima scansione il picco di pretransizione è ancora presente anche se attenuato e si nota la presenza di una spalla intorno a 24°C (indicata da una freccia) che si può attribuire agli MLV preparati in presenza di composto, e di un picco principale intorno a 25 °C, che si può attribuire agli MLV di sola DMPC. Alla seconda scansione si ha la completa scomparsa del picco di pretransizione e man mano che aumenta il tempo di incubazione il picco principale si sposta verso temperature più basse non raggiungendo però il valore della temperatura di transizione della curva di riferimento r.

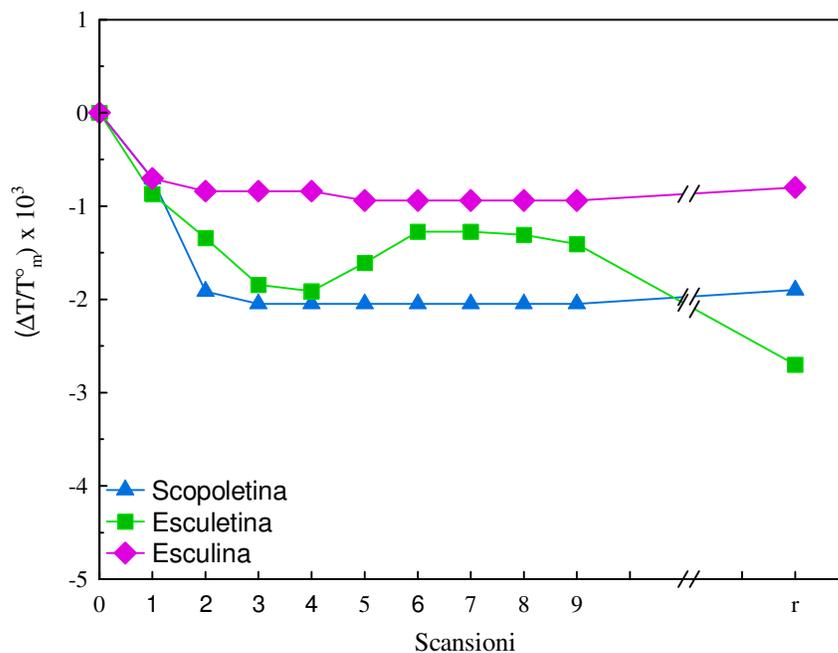
Dalle curve calorimetriche relative all'Esculina si nota che il picco di pretransizione scompare completamente alla seconda scansione, ma già alla prima scansione il picco principale si sposta verso valori più bassi di temperatura raggiungendo il valore della temperatura di transizione della curva di riferimento r.



**Fig. 39:** Curve calorimetriche di MLV di DMPC pura lasciati in contatto con MLV di DMPC contenenti Scopoletina (A) Esculetina (B) ed Esculina (C) alla frazione molare 0,09 a differenti tempi d'incubazione.

r = MLV di DMPC preparati in presenza dei composti alla frazione molare 0,045.

In figura 40 sono mostrati i valori della temperatura di transizione del picco principale degli esperimenti di trasferimento transmembrana come  $\Delta T/T_m^0$ , in funzione del tempo di incubazione. Tali valori sono confrontati con i valori della temperatura di transizione dei liposomi di DMPC preparati in presenza dei composti alla frazione molare 0,045 (valore  $r$ ). Per tutti i composti si osserva una diminuzione della  $T_m$ . Per la Scopoletina il decremento della  $T_m$  è veloce fino alla seconda scansione e rimane invariato all'aumentare del tempo di incubazione fino a raggiungere il valore  $r$ . Ciò indica che questo composto si trasferisce dal carrier lipofilo ai modelli di membrana completamente, durante la prima ora di incubazione. Per quanto riguarda l'Esculetina il decremento della  $T_m$  è graduale per tutto il periodo di incubazione e il valore  $r$  è raggiunto e mantenuto già nella prima scansione. L'Esculetina invece sembra trasferirsi gradualmente dagli MLV pieni a quelli vuoti, tuttavia, dalla quinta scansione si evidenzia, così come è possibile notare anche dall'analisi delle curve calorimetriche, un leggero innalzamento della  $T_m$  del picco probabilmente attribuibile ad un trasferimento non completo che non rende possibile il raggiungimento del valore di riferimento  $r$ .



**Fig. 40:** Variazione della temperatura di transizione dei picchi calorimetri degli MLV di DMPC lasciati in contatto con MLV di DMPC contenenti Scopoletina, Esculetina, Esculina alla frazione molare 0,09 a diversi tempi di incubazione. La variazione della temperatura di transizione è riportata come  $\Delta T/T_m^0$  ( $\Delta T = T_m - T_m^0$ , dove  $T_m$  = temperatura di transizione degli MLV di DMPC in presenza di Scopoletina, Esculetina ed Esculina.  $T_m^0$  è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura) in funzione del tempo di incubazione.

### 2.5.2. Misure di tensione superficiale: Langmuir-Blodgett

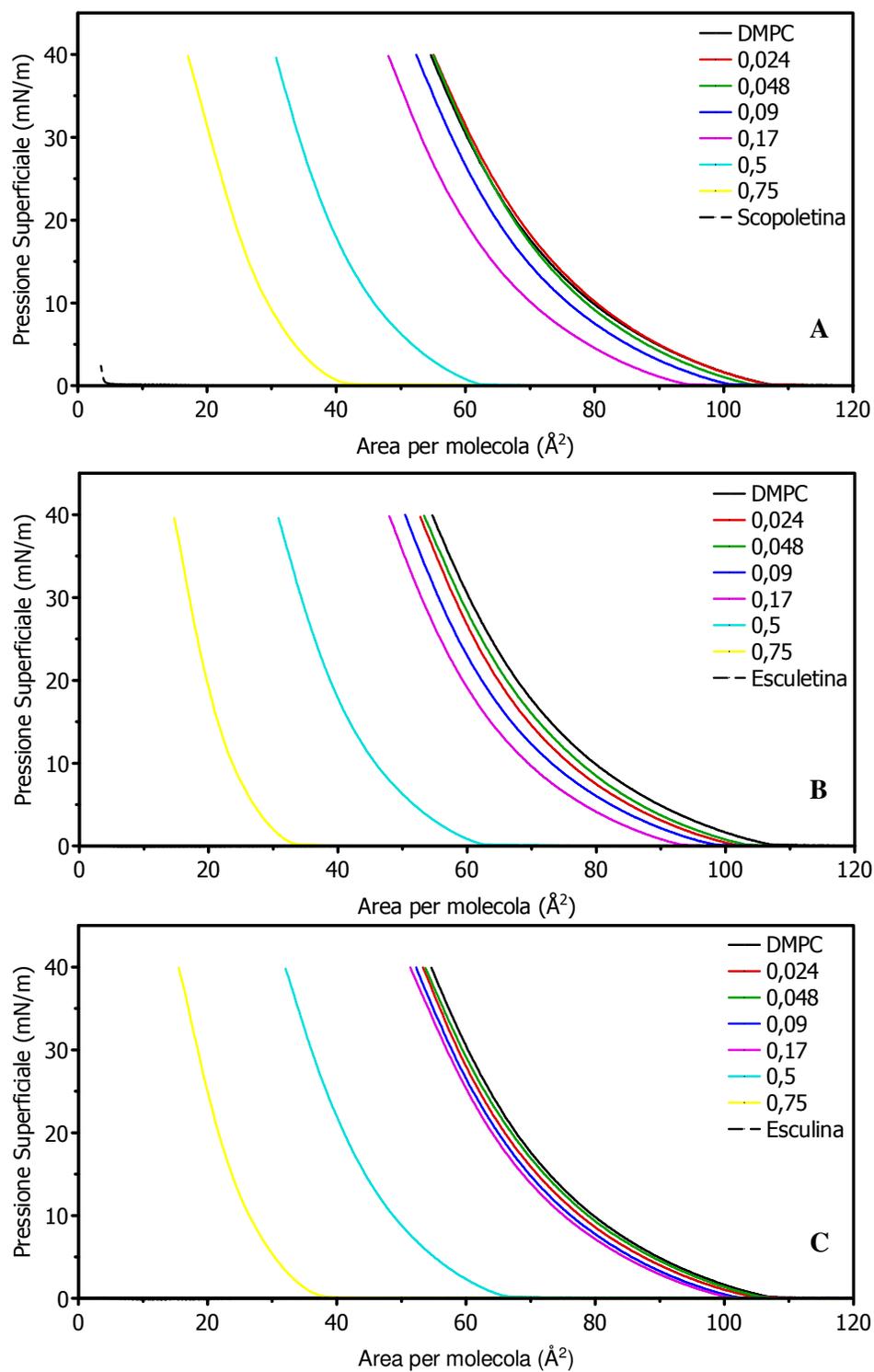
Nella figura 41 sono riportate le curve pressione superficiale (mN/m)/area media per molecola ( $\text{\AA}^2$ ) della DMPC, delle tre cumarine e delle miscele DMPC/cumarine a diverse frazioni molari a 37 °C e a pH 4.

Per tutti e tre i composti puri non si osserva alcuna isoterma. Per le miscele DMPC/Scopoletina a partire dalla frazione molare 0,09 si osservano spostamenti delle isoterme a valori più bassi di area per molecola, e tale spostamento è maggiore per le isoterme delle frazioni molari 0,5 e 0,75 di Scopoletina rispetto alla DMPC.

All'aumentare della frazione molare di Esculetina si osserva una diminuzione progressiva del valore di area per molecola ( $\text{\AA}^2$ ) delle isoterme delle miscele DMPC/Esculetina rispetto all'isoterma della sola DMPC.

Rispetto all'isoterma della DMPC pura, le isoterme della miscela DMPC/Esculina alle frazioni molari comprese tra 0,024 e 0,17 sono leggermente spostate a valori d'area per molecola minori; tale spostamento diventa più evidente per le frazioni molari maggiori (0,5 e 0,75).

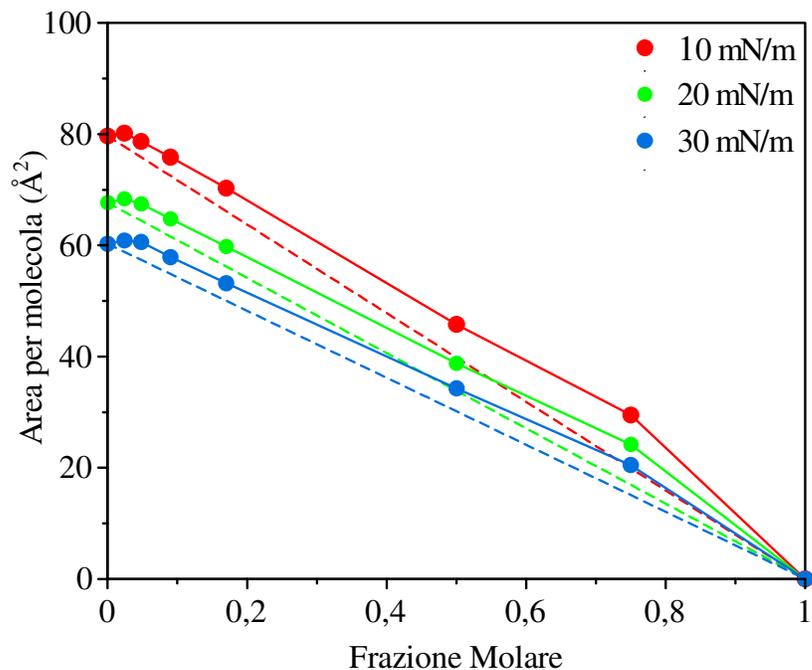
Riportano in grafico i dati relativi all'area media per molecola, a differenti valori di pressione superficiale, in funzione delle frazioni molari di Scopoletina, Esculetina ed Esculina, possiamo ottenere ulteriori informazioni sul tipo di interazioni intermolecolari che si instaurano nei monolayers misti di DMPC/cumarine. La retta tratteggiata indica i valori di area per molecola ad un determinato valore di pressione superficiale per un monolayer a due componenti con comportamento ideale e si ottiene congiungendo il valore dell'area per molecola di DMPC pura (frazione molare pari a 0,0 del composto considerato) al valore ottenuto per il composto puro (frazione molare pari a 1) a determinati valori di pressione superficiale (10 mN/m; 20 mN/m; 30 mN/m), alla temperatura di 37°C e a pH 4.



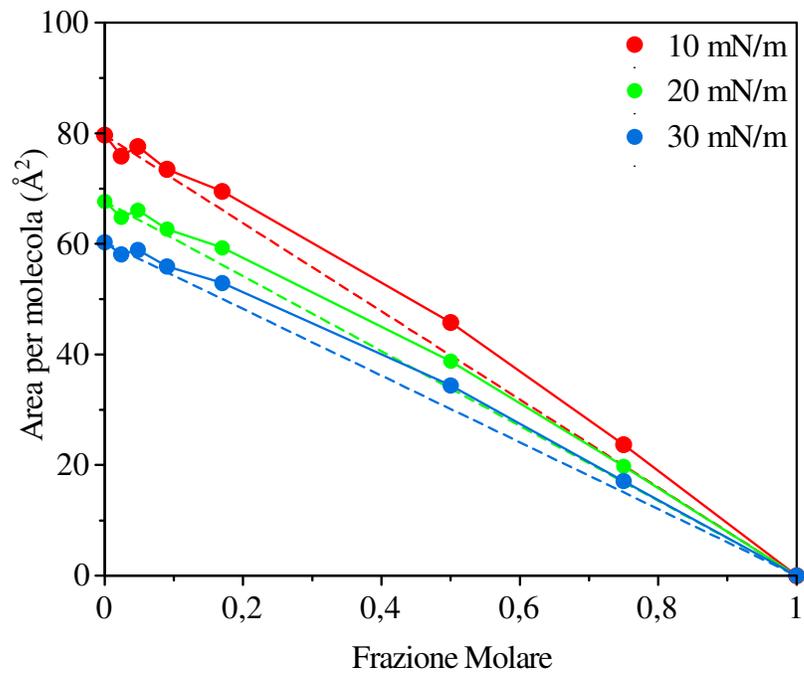
**Fig. 41:** Curve isoterme tensione superficiale (mN/m)/area media per molecola ( $\text{\AA}^2$ ), alla temperatura di 37 °C e a pH 4 dei monolayers di DMPC in presenza di Scopoletina (A), Esculetina (B) ed Esculina (C) a diverse frazioni molari.

La figura 42 mostra l'andamento dell'area per molecola delle miscele DMPC/Scopoletina in funzione della frazione molare di Scopoletina. Per le miscele DMPC/Scopoletina si ha un andamento simile per tutti e tre i valori di pressione superficiale considerati e si nota una deviazione positiva dei valori di area molecolare rispetto alla retta ideale, maggiore per le frazioni molari più alte. Tale deviazione è indice di interazioni repulsive tra il composto e la DMPC.

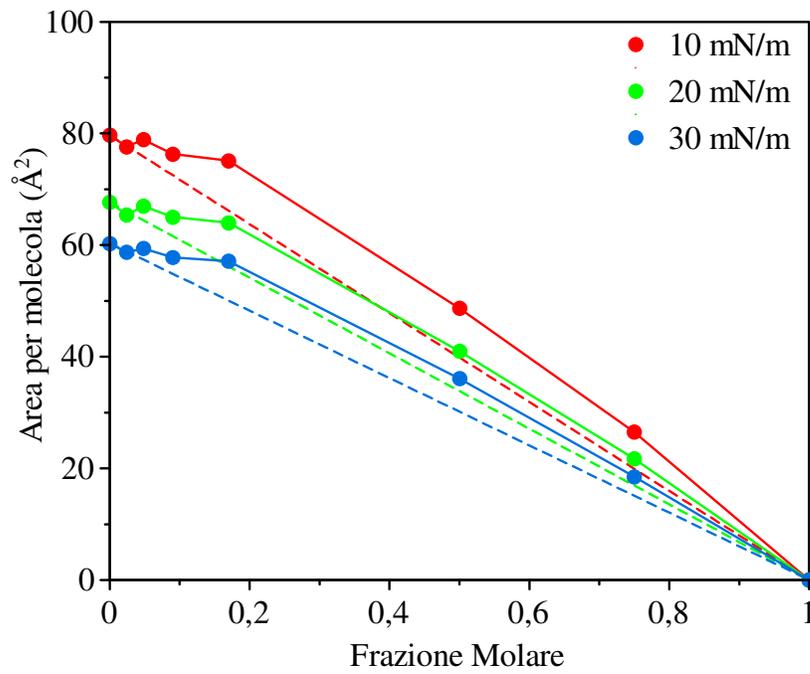
La figura 43 mostra l'andamento dell'area per molecola delle miscele DMPC/Esculetina in funzione della frazione molare di Esculetina. Si nota una piccola deviazione negativa alla frazione molare 0,024, ciò indica che si hanno piccole interazioni attrattive tra l'Esculetina e la DMPC sia a 10 che a 20 che a 30 mN/m. A partire dalla frazione molare 0,048 comincia ad esserci una piccola deviazione positiva dei valori di area per molecola per tutti e tre i valori di pressione superficiale che aumenta all'aumentare della frazione molare. La figura 44 mostra l'andamento dell'area per molecola, in funzione della frazione molare di Esculina delle miscele DMPC/Esculina. A partire dalla frazione molare 0,048 si osserva una deviazione positiva dei valori di area per molecola che aumenta alla frazione molare 0,17 mantenendo lo stesso andamento anche per le frazioni molari successive (0,5 e 0,75) con un andamento simile per tutti e tre i valori di pressione superficiale considerati.



**Fig. 42:** Area media per molecola ( $\text{\AA}^2$ ) per miscele di DMPC/Scopoletina a frazioni molari crescenti di Scopoletina, a 37 °C e a pH 4.



**Fig. 43:** Area media per molecola ( $\text{\AA}^2$ ) per miscele di DMPC/Esculetina a frazioni molari crescenti di Esculetina, a 37 °C e a pH 4.



**Fig. 44:** Area media per molecola ( $\text{\AA}^2$ ) per miscele di DMPC/Esculina a frazioni molari crescenti di Esculina, a 37 °C e a pH 4.

## 2.6. Conclusioni

È stata studiata l'interazione della Scopoletina (7-idrossi-6-metossi-2H-1-benzopirano-2-one), dell'Esculetina (6,7-diidrossi-2H-1-benzopirano-2-one) e dell'Esculina (6-( $\beta$ -D-glucopiranosilossi)-7-idrossi-2H-1-benzopirano-2-one), con modelli di biomembrana mediante la tecnica della DSC ed LB. Esaminando i risultati ottenuti relativi agli esperimenti di calorimetria si evince che i tre composti esaminati: Scopoletina, Esculetina ed Esculina, interagiscono con gli MLV di DMPC in modo differente. Per quanto riguarda la variazione della temperatura di transizione dei picchi calorimetrici degli MLV di DMPC preparati in presenza delle tre cumarine a frazioni molarali crescenti, i risultati mostrano che è l'Esculetina, la cumarina che interagisce maggiormente. L'Esculina a causa della maggiore idrofilia destabilizza meno il bilayer fosfolipidico, mentre la Scopoletina ha un comportamento analogo all'Esculetina, infatti, queste due molecole sono quelle più lipofile con valori simili di coefficiente di ripartizione. Per quanto riguarda la variazione di entalpia si riscontra un generale abbassamento del parametro per tutti e tre i composti indice di una destabilizzazione del bilayer di DMPC. Gli esperimenti di cinetica ci hanno permesso di studiare la capacità dei composti di solubilizzarsi nel mezzo acquoso circostante, raggiungere e attraversare il doppio strato lipidico dei liposomi (cinetiche di migrazione) e la capacità di trasferirsi dai liposomi di DMPC preparati in presenza di un'esatta frazione molare di composto a liposomi di DMPC pura (cinetiche di trasferimento). Per quanto riguarda le cinetiche di contatto i risultati ottenuti dimostrano che il mezzo acquoso non favorisce l'uptake dell'Esculetina e dell'Esculina da parte dei modelli di biomembrana, mentre la Scopoletina riesce a raggiungere la superficie degli MLV di DMPC e ad interagire raggiungendo il valore di riferimento. Dai dati relativi alle cinetiche di trasferimento si evince che tutte e tre le cumarine sono rilasciate dalle vescicole e assorbite dai modelli di biomembrana. Nel caso della Scopoletina e dell'Esculina già dopo la prima ora di incubazione si ha un completo trasferimento dagli MLV carichi a quelli vuoti, mentre per l'Esculetina si evidenzia un trasferimento non completo e più lento, infatti, il valore di riferimento non viene raggiunto. I dati Langmuir sono in accordo con i risultati calorimetrici. Infatti, deviazioni positive dell'area molecolare dai valori ideali indicano l'intervento di interazioni repulsive tra la DMPC e i composti testati dovute alla capacità che hanno molecole simili di aggregarsi tra loro riducendo la densità dei monolayers poiché si ha una maggiore area occupata dalle molecole che lo formano.

### 3. TERPENI

I terpeni sono una grande classe di composti presenti in natura come metaboliti secondari di piante e animali. Sono in genere classificati fra i lipidi non saponificabili, in quanto ne condividono molte proprietà, prima fra tutte quella di essere solubili in solventi poco polari, ed in virtù della loro origine biosintetica vengono anche definiti *isoprenoidi*. Essi si suddividono in varie sottoclassi quali ad esempio i monoterpeni, i sesquiterpeni, i diterpeni, i triterpeni, in base al numero di unità isopreniche contenute ( $C_5H_8$ ):

<b>Classificazione</b>	<b>Unità isopreniche</b>	<b>Atomi di carbonio</b>
Emiterpeni	1	5
Monoterpeni	2	10
Sesquiterpeni	3	15
Diterpeni	4	20
Sesterpeni	5	25
Triterpeni	6	30
Tetraterpeni	8	40

I terpeni posseggono una grande varietà di proprietà biologiche come ad esempio proprietà antimicrobiche, antifungine, antivirali, chemopreventive, antiiperglicemiche, antiinfiammatorie ed entiparassitarie.

Questi composti fungono inoltre da “penetration enhancer” per applicazioni topiche ed intervengono nella prevenzione e nella terapia di alcune patologie infiammatorie (*R. Paduch et al., 2007*).

Si trovano nei frutti, nei vegetali e nei fiori e in particolare, i monoterpeni e i sesquiterpeni, che sono i principali costituenti degli oli essenziali, hanno mostrato una buona attività antiproliferativa ed antimutagenica (*A. Di Sotto et al, 2008; 2010*).

Alla luce di queste proprietà, sono stati studiati gli effetti esercitati dai seguenti terpeni:

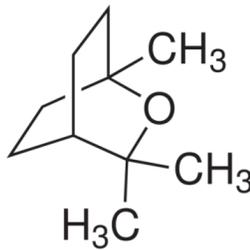
- 1,8-cineolo
- $\alpha$ -terpineolo
- $\beta$ -cariofillene ossido
- Acido 3,4-secoisopimar-4(18),7,15-trien-3-oico (SCB-58)

sul comportamento termotropico di vescicole multilamellari (MLV) di 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) per ottenere informazioni sulla lipofilia e sulla solubilità di queste molecole nei lipidi, tutti fattori che modulano la loro interazione con la membrana cellulare e la loro penetrazione nella membrana stessa.

Queste interazioni sono state studiate mediante misure di Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC), tecnica non perturbativa impiegata per investigare gli effetti esercitati da composti biologicamente attivi sul doppio strato fosfolipidico durante processi di riscaldamento o raffreddamento (*D. Trombetta et al., 2005; F. Castelli. et al., 2006a, 2006b; 2007a, 2007b; M. Cristiani et al., 2007; M.G. Sarpietro et al., 2007*).

### 1,8-cineolo

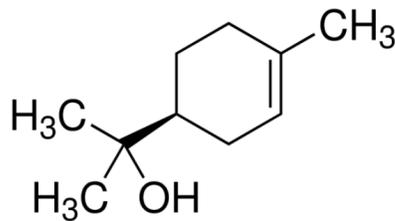
L'1,8-cineolo (fig. 45), noto come eucaliptolo, è uno dei componenti presenti nell'olio essenziale dell'*Eucalyptus polybractea*. È utilizzato nelle preparazioni farmaceutiche come spray nasale, disinfettante e analgesico. Inoltre è stato riportato un utilizzo dell'1,8-cineolo per il trattamento di tosse, dolori muscolari, reumatismi, asma e calcoli alle vie urinarie (B. Geremia., 1955).



**Fig. 45:** Struttura dell'1,8-cineolo.

### $\alpha$ -terpineolo

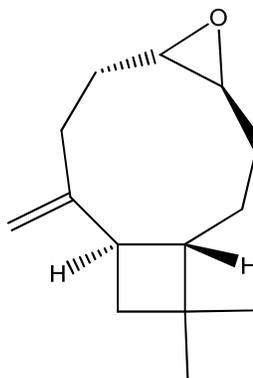
L'alfa-terpineolo (fig. 46) è un alcool naturale monoterpene isolato da una varietà di fonti come l'olio essenziale di pino. La sua presenza è in genere accompagnata da piccole percentuali dei due isomeri  $\beta$ -terpineolo e  $\gamma$ -terpineolo. La miscela naturale dei tre isomeri prende il nome generico di terpineolo.



**Fig. 46:** Struttura dell' $\alpha$ -terpineolo.

### **$\beta$ -cariofillene ossido**

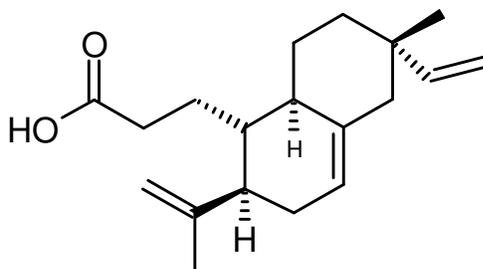
Il  $\beta$ -cariofillene ossido (fig.47) deriva dal  $\beta$ -cariofillene che è un sesquiterpene biciclico con un anello 1,1-dimetilciclobutano fuso in configurazione trans con un anello a nove atomi di carbonio contenente un 1,5-diene (A .V. Tkachev, 1987; I. G. Collado et al, 1998). Il  $\beta$ -cariofillene e il suo ossido, si trovano negli oli essenziali di molte piante, in particolare nell'*Eugenia caryophyllata* (G. Q. Zheng et al, 1992), nel *Piper nigrum* (O. Politeo et al, 2006) e nel *Zingiber nimmonii* (B. Sabulal et al, 2006). Il  $\beta$ -cariofillene ha un'attività anti-cancerogena dovuta alla sua capacità di promuovere, sia *in vivo* che *in vitro*, l'attività delle cellule *natural killer* (S. L. Da Silva et al., 2007) e ha dimostrato anche una attività antiproliferativa nell'adenocarcinoma renale e per le cellule del melanoma amelanotico (M. R. Loizzo et al, 2008).



**Fig. 47:** Struttura del  $\beta$ -cariofillene ossido.

### **Acido 3,4-secoisopimar-4(18),7,15-trien-3-oico (SCB-58)**

È un diterpene che si ottiene dalle parti aeree della *Salvia cinnabarina* (C. A. Epling, 1939). L'SCB-58 (fig. 48) possiede una grande attività antimutagena *in vitro* comprovata dal test di Ames (test che analizza la genotossicità di una sostanza) nei confronti di molti mutageni e per diversi ceppi (A. Di Sotto et al., 2009).



**Fig. 48:** Struttura dell'SCB-58.

### 3.1. Materiali

La 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) è stata ottenuta dalla Genzyme Pharmaceuticals (Liestal, Svizzera). La purezza della DMPC, determinata tramite cromatografia su strato sottile ad alta pressione (HPTLC), è 99,9 %. La concentrazione lipidica è stata determinata tramite l'analisi del fosforo (*G. Rouser et al., 1970*). L'1,8-cineolo, l' $\alpha$ -terpineolo e il  $\beta$ -cariofillene ossido, sono stati ottenuti dalla Sigma-Aldrich; l'acido 3,4-secoisopimara-4(18),7,15-triene-3-oico è stato estratto dalla *S. cinnabarina* (grado di purezza HPLC del 96%) da Romussi et al. (*G. Romussi et al., 2001*); per gli esperimenti è stato usato il sale sodico del diterpenoide preparato per reazione di una quantità equivalente di NaOH in una soluzione di MeOH ed evaporato a secco. Per formare i liposomi è stata utilizzata una soluzione di idrossimetilaminometano (Tris) 50 mM portata a pH 7,4 mediante HCl.

Per la preparazione dei liposomi sono state utilizzate vescicole multilamellari (MLV) di DMPC, sia come riferimento, che in presenza di 1,8-cineolo,  $\alpha$ -terpineolo,  $\beta$ -cariofillene ossido e SCB-58 a diverse frazioni molari (0,015; 0,03; 0,045; 0,06; 0,09; 0,12). Nel caso dell' $\alpha$ -terpineolo, avendo pesato il composto successivamente le frazioni molari sono 0,015; 0,03; 0,05; 0,06; 0,09; 0,11.

### 3.2. Preparazione dei liposomi: MLV

I liposomi contenenti i terpeni studiati sono stati preparati seguendo due differenti procedure, poiché alcuni terpeni sono delle polveri e altri sono degli oli.

Per quanto riguarda il  $\beta$ -cariofillene ossido e l'SCB-58 (polvere) appropriate quantità di DMPC e dei composti in esame sono stati solubilizzati in cloroformio/metanolo 1:1 v:v; aliquote a concentrazione nota di DMPC (7 mg, 0,010325 mmoli), di  $\beta$ -cariofillene ossido e di SCB-58 sono state miscelate in tubi da saggio per ottenere una esatta frazione molare di composti rispetto alla DMPC; i solventi sono stati allontanati sotto flusso di azoto ed i film fosfolipidici così ottenuti sono stati essiccati sotto vuoto.

I film sono stati, quindi, idratati con tampone Tris pH 7,4 e posti a 37 °C per 1 minuto; agitati per 1 minuto; per tre volte, e infine lasciati a 37 °C per 60 minuti. Si ottengono in tal modo liposomi in cui il farmaco è omogeneamente disperso in tutti i bilayers.

Per quanto riguarda l'1,8-cineolo e l' $\alpha$ -terpineolo (oli), dopo che i film di DMPC sono stati essiccati, è stata aggiunta una quantità esatta dei terpeni in modo da ottenere le frazioni molari desiderate.

### 3.3. Analisi DSC

L'entità dell'interazione tra i composti con i modelli di membrana, può essere determinata attraverso le seguenti prove sperimentali:

**a) analisi DSC dei campioni preparati in fase organica;**

**b) cinetiche di contatto**

seguendo la stessa procedura descritta a pagina 23.

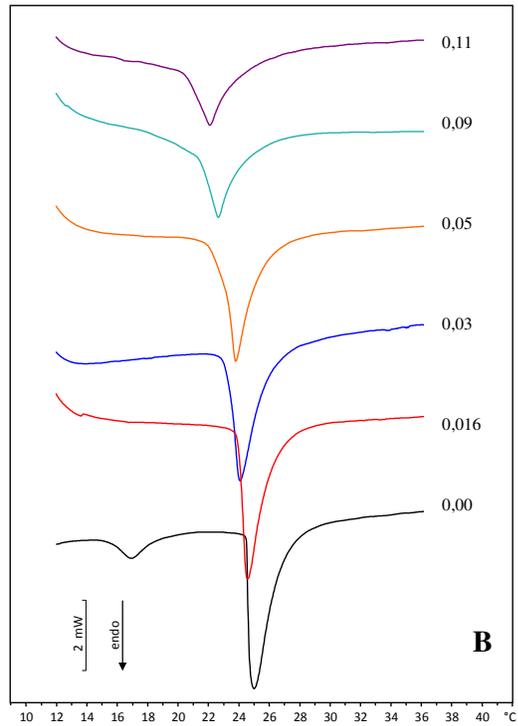
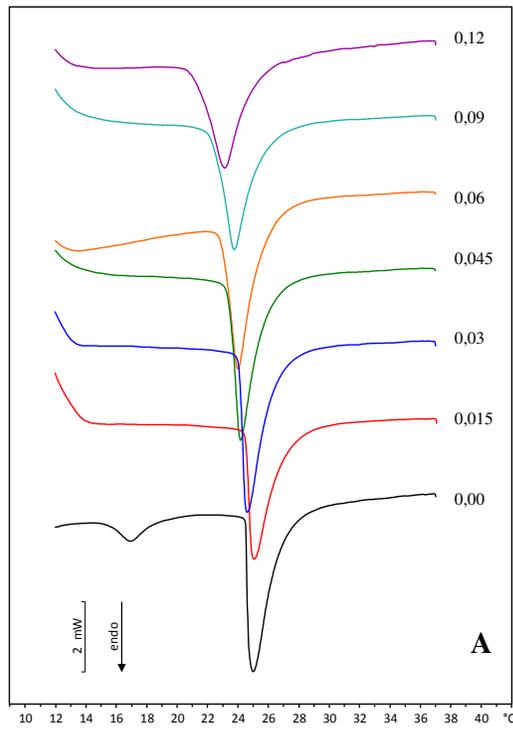
### 3.4. Risultati e discussione

#### *Interazione fra i composti e gli MLV di DMPC*

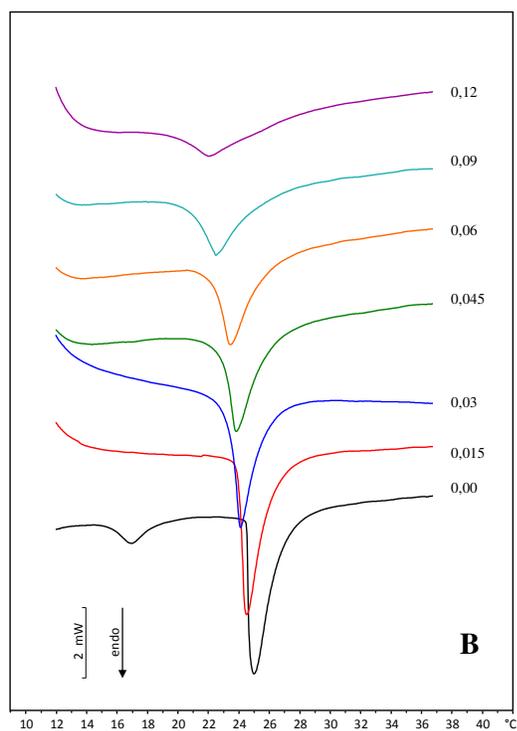
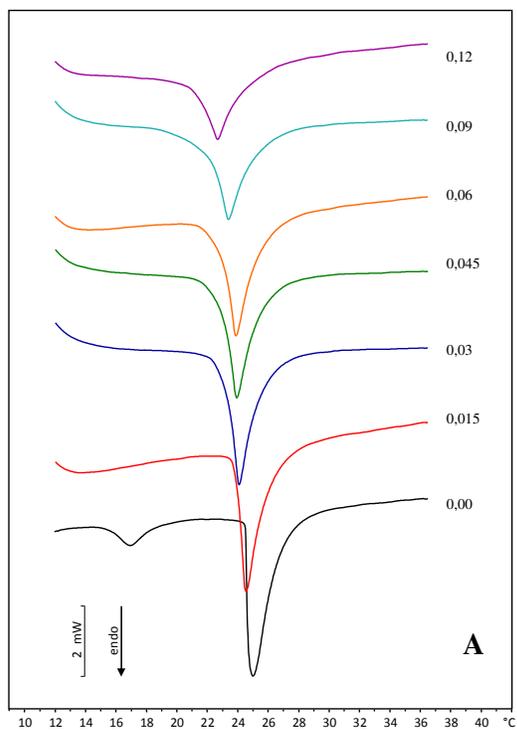
È stato studiato l'effetto dell'1,8-cineolo, dell' $\alpha$ -terpineolo, del  $\beta$ -cariofillene ossido e del SCB-58 sul comportamento termotropico di vescicole multilamellari di DMPC (MLV). Le curve DSC delle vescicole di DMPC pura sono state confrontate con le curve delle vescicole preparate in presenza di differenti frazioni molari dei composti come mostrato nelle figure 49-50.

Tutti e quattro i terpeni studiati, interagiscono con il nostro modello di biomembrana. L'incorporazione dei terpeni negli MLV di DMPC causa la scomparsa del picco di pretransizione (a circa 17°C), caratteristico del fosfolipide utilizzato già alla frazione molare più bassa (0,015) ed inoltre all'aumentare della frazione molare dei terpeni si nota una diminuzione della temperatura di transizione, rispetto alla  $T_m$  della DMPC ed una diminuzione dell'entalpia.

L'effetto esercitato dai terpeni studiati è però differente in particolare, l'effetto maggiore è esercitato dall'SCB-58, tale composto infatti destabilizza e fluidifica maggiormente il bilayer fosfolipidico.



**Fig. 49:** Curve calorimetriche di MLV di DMPC preparati in presenza di 1,8-cineolo (**A**) ed  $\alpha$ -terpineolo (**B**) a diverse frazioni molari.



**Fig. 50:** Curve calorimetriche di MLV di DMPC preparati in presenza di  $\beta$ -cariofillene ossido (A) e SCB-58 (B) a diverse frazioni molari.

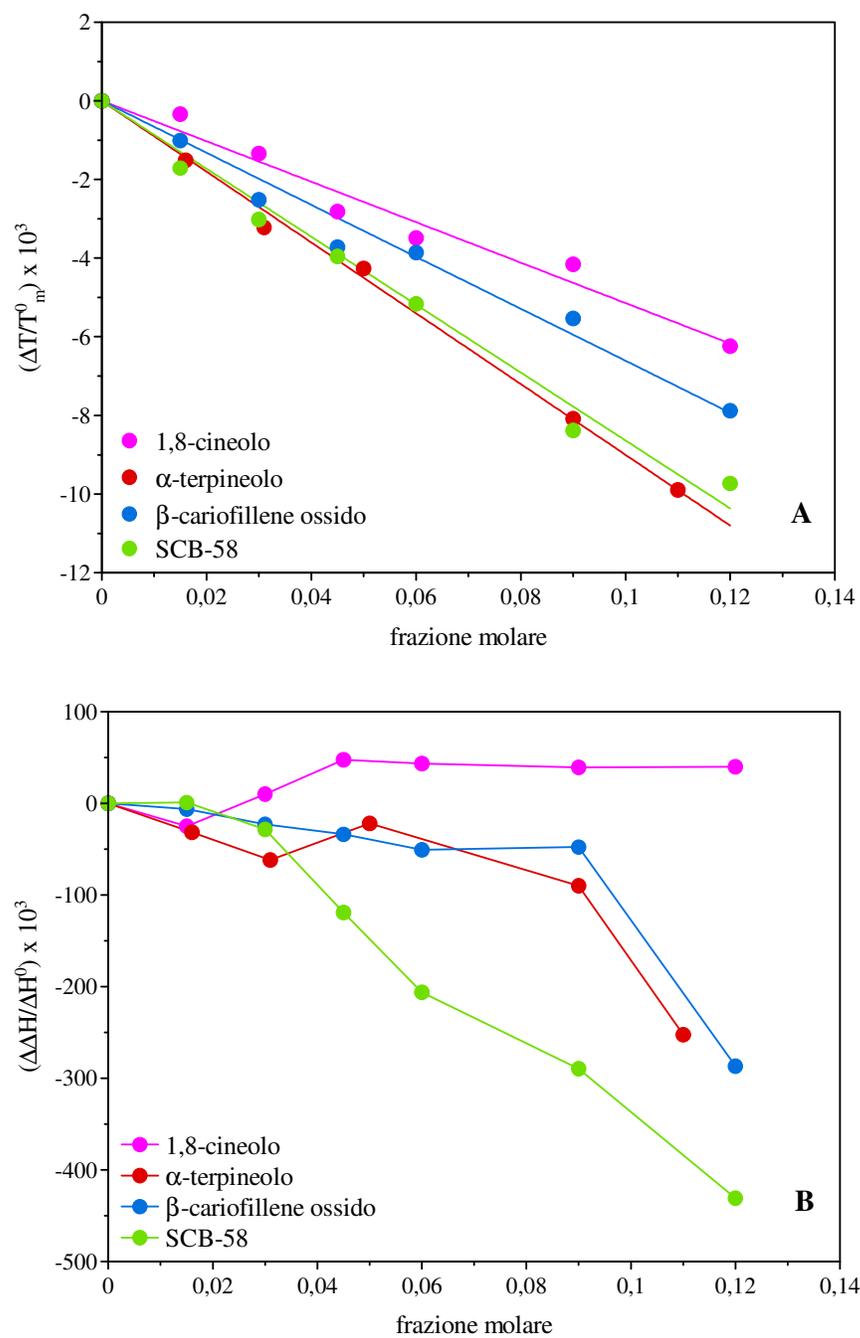
La differente influenza esercitata dai terpeni studiati sul bilayer fosfolipidico, è maggiormente evidente in figura 51 (A) che mostra l'andamento della temperatura di transizione degli MLV di DMPC preparati in presenza di 1,8-cineolo,  $\alpha$ -terpineolo, del  $\beta$ -cariofillene ossido e del SCB-58 riportata come  $\Delta T/T_m^0$  in funzione della frazione molare di composto presente nella dispersione acquosa degli MLV in virtù della relazione:  $\Delta T = T_m - T_m^0$  ( $T_m$  = temperatura di transizione degli MLV di DMPC in presenza di ognuno dei composti esaminati;  $T_m^0$  = temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura)

In particolare è possibile individuare un ordine crescente di interazione:

SCB-58 >  $\alpha$ -terpineolo >  $\beta$ -cariofillene ossido > 1,8-cineolo.

Analogamente a quanto avviene per la temperatura di transizione, anche nel caso dell'entalpia i terpeni seguono lo stesso andamento come mostrato nella figura 51 (B).

La variazione dell'entalpia è riportata, come  $\Delta\Delta H/\Delta H^0$ , in funzione della frazione molare di composto presente nella dispersione acquosa degli MLV in virtù della relazione:  $\Delta\Delta H = \Delta H - \Delta H^0$  ( $\Delta H$  = entalpia degli MLV di DMPC in presenza di ognuno dei composti esaminati;  $\Delta H^0$  = entalpia degli MLV di DMPC pura)

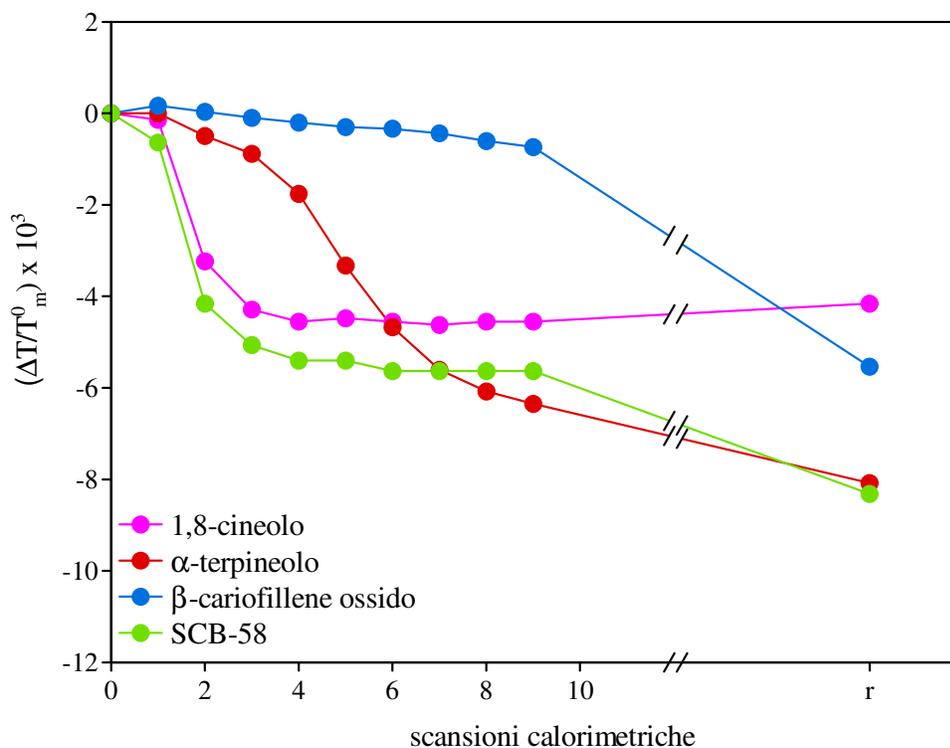


**Fig. 51:** (A) Variazione della temperatura di transizione dei picchi calorimetri degli MLV di DMPC preparati in presenza di 1,8-cineolo,  $\alpha$ -terpineolo,  $\beta$ -cariofillene ossido e SCB-58 a frazioni molari crescenti. (B) Variazione dell'entalpia dei picchi calorimetri degli MLV di DMPC preparati in presenza di 1,8-cineolo,  $\alpha$ -terpineolo,  $\beta$ -cariofillene ossido e SCB-58 a frazioni molari crescenti.

### *Cinetiche di contatto*

La tecnica DSC è stata usata anche per studiare la capacità dei composti di solubilizzarsi in un mezzo acquoso circostante e, successivamente, di raggiungere e attraversare i doppi strati lipidici dei liposomi.

La figura 52 mostra i valori della variazione di temperatura di transizione dei picchi calorimetrici dei liposomi di DMPC lasciati in presenza dei composti alla frazione molare 0,09 rispetto al fosfolipide in funzione del tempo di incubazione. Il valore  $r$  rappresenta la variazione della  $T_m$  dei liposomi di DMPC contenenti i composti alla frazione molare 0,09; questo corrisponde alla massima interazione possibile fra il composto e i liposomi. Dal grafico si evince che: il  $\beta$ -cariofillene ossido causa solo un piccolo decremento della temperatura di transizione e questo indica la sua bassa capacità di dissolversi nel mezzo acquoso, attraversarlo ed essere assorbito dal bilayer fosfolipidico; l' $\alpha$ -terpineolo causa un graduale decremento della temperatura di transizione quasi raggiungendo il valore di riferimento  $r$ . Tale comportamento indica che questo terpene è capace di penetrare gradualmente e quasi completamente il bilayer degli MLV ed è analogo a quello esercitato dall'SCB-58. L'1,8-cineolo provoca una veloce diminuzione della temperatura di transizione e ciò indica un rapido assorbimento del terpene nel bilayer lipidico con raggiungimento del valore  $r$ .



**Fig. 52:** Variazione della temperatura di transizione dei picchi calorimetri degli MLV di DMPC lasciati in contatto con 1,8-cineolo,  $\alpha$ -terpineolo,  $\beta$ -cariofillene ossido e SCB-58 alla frazione molare 0,09 a diversi tempi di incubazione. La variazione della temperatura di transizione è riportata come  $\Delta T/T_m^0$  ( $\Delta T = T_m - T_m^0$ , dove  $T_m$  = temperatura di transizione di MLV di DMPC in presenza dei composti esaminati e  $T_m^0$  è la temperatura di transizione degli MLV di DMPC pura) in funzione del tempo di incubazione.

**r** = valore relativo ai liposomi di DMPC e terpeni, alla frazione molare 0,09.

### 3.5. Conclusioni

Lo scopo del lavoro è quello di acquisire informazioni sull'interazione dell'1,8-cineolo, dell' $\alpha$ -terpineolo, del  $\beta$ -cariofillene ossido e dell'SCB-58 con modelli di biomembrana mediante la tecnica della Calorimetria a Scansione Differenziale. Per quanto riguarda la variazione della temperatura di transizione dei picchi calorimetrici degli MLV di DMPC preparati in presenza dei terpeni a frazioni molari crescenti, i risultati mostrano che tutti e quattro i terpeni studiati interagiscono con il modello di biomembrana in modo diverso. Il maggiore effetto di destabilizzazione del bilayer fosfolipidico è esercitato dall'SCB-58, segue l' $\alpha$ -terpineolo che mostra un comportamento analogo mentre il  $\beta$ -cariofillene ossido e 1,8-cineolo, sono i terpeni che meno destabilizzano gli MLV di DMPC. Ciò è evidente anche valutando la variazione di entalpia, si riscontra infatti un generale abbassamento del parametro, indice di interazione tra i terpeni e gli MLV di DMPC, la cui intensità segue l'ordine già visto per la variazione della temperatura di transizione. Gli esperimenti di cinetica di contatto ci hanno permesso di studiare la capacità dei composti di solubilizzarsi nel mezzo acquoso circostante, raggiungere e attraversare il doppio strato lipidico dei liposomi. I risultati ottenuti dimostrano che il mezzo acquoso non favorisce l'uptake del  $\beta$ -cariofillene ossido da parte dei modelli di biomembrana. Comportamento analogo hanno invece l'SCB-58 e l' $\alpha$ -terpineolo per i quali si osserva una diminuzione della  $T_m$  all'aumentare del tempo di incubazione e riescono quasi a raggiungere il valore della temperatura di riferimento. L'1,8-cineolo, per le sue caratteristiche chimico fisiche, riesce a raggiungere la superficie degli MLV di DMPC e ad essere assorbito raggiungendo il valore di riferimento.

# INTERAZIONE TRA DRUG DELIVERY SYSTEMS E MODELLI DI BIOMEMBRANA

## 4. Sistemi nanoparticellari come Drug Delivery Systems

Le nanoparticelle sono state ottenute per la prima volta, nel 1976 da Birrenbach e Speiser, utilizzando dei polimeri non biodegradabili (*G. Birrenbach. e P. P. Speiser, 1976*) e nel 1979 da Couvreur e collaboratori con polimeri biodegradabili (*P. Couvreur et al., 1979*).

I sistemi terapeutici nanoparticellari sono particelle colloidali (formate da macromolecole artificiali o naturali) con dimensioni inferiori a 1  $\mu\text{m}$  (generalmente comprese tra 10 e 500 nm), nelle quali un principio attivo è disperso, incapsulato, oppure adsorbito alla superficie. Un sistema nanoparticellare, quindi, funge da carrier il quale modula sia la farmacocinetica che la farmacodinamica del principio attivo nell'organismo, mascherandone le proprietà chimico-fisiche, ma senza alterarle.

I sistemi nanoparticellari devono possedere dei requisiti di carattere generale affinché possano essere destinati ad un uso farmaceutico e cosmetico; questi requisiti sono: la biocompatibilità, l'assenza di azioni tossiche, la capacità di incorporare la dose di farmaco richiesta e la sufficiente stabilità anche nei confronti dei metodi di sterilizzazione. Il complesso farmaco-vettore, inoltre, deve poter superare il torrente sanguigno, gli spazi interstiziali e poter attraversare la membrana cellulare, perciò, il relativo impiego è funzione della sua dimensione. Una volta giunto all'interno della cellula bersaglio, il farmaco deve essere staccato dal vettore ad opera degli enzimi lisosomiali. Il vettore privo del farmaco, infine, viene totalmente digerito nello spazio lisosomiale.

I vantaggi che scaturiscono dalla possibilità dell'utilizzo di un sistema nanoparticellare come vettore di farmaci sono i seguenti:

- *Migliore specificità d'azione.* Una risposta farmacologica dipende dalla concentrazione tissutale del farmaco e spesso, per avere una buona risposta, devono essere usate alte concentrazioni. L'associazione ad un vettore permette di correggere le proprietà chimico-fisiche del principio attivo ed avere, così, un più ampio range di attività ed una maggiore affinità per il tessuto bersaglio.

- *Ottimizzazione dell'efficacia farmacologica.* A volte, il principio attivo da solo non è capace di penetrare le cellule bersaglio dell'organismo accumulandosi all'esterno di esse. Un sistema nanoparticellare può essere un vettore in grado di

umentare la biodisponibilità dei farmaci (trasportati attraverso barriere anatomiche inaccessibili) grazie ad una maggiore penetrazione intracellulare realizzata mediante un processo di endocitosi.

- *Riduzione delle fluttuazioni ematiche e degli effetti tossici.* Alcuni farmaci somministrati attraverso le forme farmaceutiche convenzionali sono caratterizzati dall'aver una durata d'azione troppo breve che comporta somministrazioni multiple e ravvicinate del farmaco, con conseguenti fluttuazioni dei relativi livelli ematici e rischio di fenomeni di tossicità da accumulo del farmaco. L'introduzione di questi farmaci in un sistema nanoparticellare può rappresentare una soluzione per un minore rischio di concentrazione inefficace o tossica.

- *Aumento della stabilità.* Le molecole di principio attivo possono subire inattivazione prima di giungere al sito d'azione. La loro protezione contro l'inattivazione prematura può essere ottenuta ricorrendo a particelle nanodisperse; ne sono esempi il retinolo ed il tocoferolo (A. Dingler, 1998; V. Jennings e S. Gohla, 2001).

- *Riduzione degli effetti collaterali.* Alcuni farmaci per le loro caratteristiche possono arrecare irritazione in determinati siti dell'organismo (ad esempio, l'irritazione gastro-intestinale di un antinfiammatorio o l'irritazione nel sito d'iniezione di un farmaco acido somministrato per via intramuscolare). Le formulazioni nanoparticellari, per le loro dimensioni e la loro funzione di deposito, possono rappresentare una valida soluzione per la somministrazione di farmaci potenzialmente irritanti.

Nonostante questi indubbi vantaggi, l'utilizzo delle nanoparticelle presenta delle difficoltà, soprattutto dovute alle loro ridotte dimensioni che comportano problemi di fabbricazione su larga scala. I prodotti di degradazione delle nanoparticelle, inoltre, sembrano essere responsabili dell'eventuale tossicità presentata; si è riscontrato, infatti, che certe nanoparticelle parzialmente degradate sono tossiche a differenza di quelle non degradate.

## 4.1. Nanoparticelle lipidiche

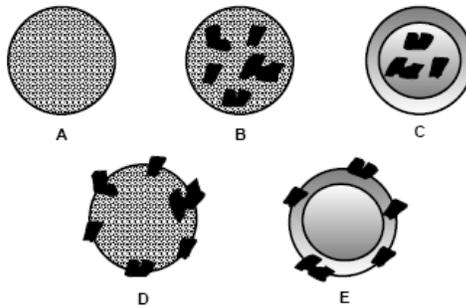
Le nanoparticelle lipidiche sono dei sistemi carrier costituiti da materiale lipidico. Esistono diversi tipi di nanovettori lipidici: i Carriers Lipidici Nanostrutturati (NLC), le nanoparticelle di Coniugato Farmaco-Lipide (LDC) e le Nanoparticelle Solide Lipidiche (SLN).

I **Carriers Lipidici Nanostrutturati (NLC)** sono nanoparticelle ottenute da miscele di lipidi solidi e liquidi (oli); possono essere utilizzati come vettori di principi attivi in campo cosmetico e farmaceutico.

Le **Nanoparticelle Solide Lipidiche (SLN)** sono vettori colloidali di natura lipidica per il direzionamento sito-specifico ed il rilascio controllato di farmaci (idrofilo o lipofilo), vaccini, oligonucleotidi. Esse sono state sviluppate come un sistema carrier alternativo alle classiche emulsioni, ai liposomi ed alle nanoparticelle polimeriche.

Si possono distinguere, in genere, cinque modelli d'incorporazione di un principio attivo all'interno delle SLN (fig. 53):

- A Principio attivo disciolto nella matrice della nanosfera;
- B Principio attivo disperso ("intrappolato") nella matrice;
- C Principio attivo incapsulato dalla membrana della nanocapsula;
- D Principio attivo adsorbito alla superficie della nanosfera;
- E Principio attivo adsorbito alla superficie della nanocapsula.



**Fig. 53:** Modalità d'incorporazione di un farmaco nelle SLN.

La struttura ottenuta è funzione della composizione della formulazione (lipide, principio attivo e tensioattivo) e dalle condizioni di preparazione (omogeneizzazione a caldo o a freddo). Le SLN con il principio attivo adsorbito alla superficie della nanosfera (D) od alla superficie della nanocapsula (E) mostrano un “burst release”, mentre le SLN con il principio attivo incapsulato dalla membrana della nanocapsula (C) portano ad un rilascio controllato dalla membrana, rilascio che segue la “Legge di diffusione di Fick” (A. Zur Muhlen e W. Mehnert., 1998; A. Zur Muhlen et al., 1998).

#### **4.2. SLN COME DRUG DELIVERY SYSTEM PER IL SISTEMA NERVOSO CENTRALE**

Grazie alla natura lipofila della matrice, le nanoparticelle solide lipidiche sono particolarmente utili per la somministrazione di farmaci lipofili (A. Dingler and S. H. Gohla, 2002), inoltre hanno una maggiore specificità verso cellule o tessuti, aumentano la biodisponibilità dei farmaci sia aumentando la loro diffusione attraverso le membrane biologiche che inattivando gli enzimi che li degradano (A. Lippacher et al., 2004). Il trattamento farmacologico delle malattie che colpiscono il Sistema Nervoso Centrale è spesso limitato a causa dell’incapacità dei farmaci di passare la barriera emato-encefalica (BEE) (J. Temsamani et al., 2000; A. V. Kabanov and E. V. Batrakova, 2004). La BEE non permette il passaggio di molecole ad alto peso molecolare e con carica mentre permette la penetrazione nel parenchima di piccole molecole lipofile. Tra le numerose strategie messe in atto per superare questo ostacolo sicuramente un ruolo importante ricopre quella che vede protagoniste le nanoparticelle (N. Bodor e P. Buchwald, 2003; E. Garcia-Garcia et al., 2005) che permettono, mascherando le caratteristiche chimico-fisiche dei farmaci, di penetrare la BEE.

Il morbo di Parkinson è tra le patologie del sistema nervoso centrale, maggiormente studiate, si tratta di una malattia neurodegenerativa caratterizzata da rigidità e tremori causati da una perdita di neuroni dopaminergici che si trovano a livello della *substantia nigra* ed è proprio la dopamina il neurotrasmettitore che controlla il circuito del movimento che viene prodotto da questi neuroni. I farmaci utilizzati nel trattamento di tale patologia mirano quindi a ridurre il deficit dopaminergico, si tratta quindi di L-Dopa, di inibitori della monoamino ossidasi B e della catecol-O-metiltransferasi e di agonisti dopaminergici (O. Rascol et al., 2002).

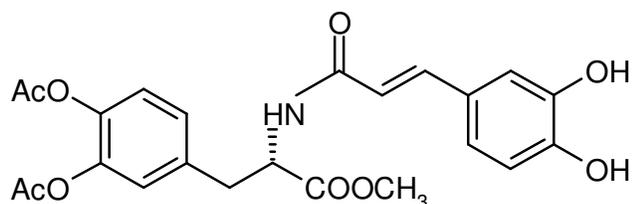
L'introduzione di L-Dopa o suoi prodrug in SLN può essere una nuova ed efficace strategia per permettere a questi farmaci di passare la BEE aumentando la biodisponibilità.

### 4.3. SLN profarmaco levodopa-acido caffeico

#### 4.3.1. Materiali

La 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC) è stata ottenuta dalla Genzyme Pharmaceuticals (Liestal, Svizzera). La purezza della DMPC, determinata tramite cromatografia su strato sottile ad alta pressione (HPTLC), è 99.9 %. La concentrazione lipidica è stata determinata tramite l'analisi del fosforo (*G. Rouser et al., 1970*).

Gli SLN sono stati preparati dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Rita Cortesi, (Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Ferrara) e sono stati caricati con il prodrug ottenuto dalla coniugazione della L-Dopa con l'acido caffeico (*P. Sozio et al., 2008*) (fig. 54).



**Fig. 54:** Struttura del profarmaco L-Dopa-acido caffeico (PL).

### **4.3.2. Preparazione SLN**

Le SLN vengono preparate mediante emulsione di una fase lipidica contenente il principio attivo in una fase acquosa. La fase acquosa costituita da poloxamer 188 al 2,5% p/p. La fase lipidica rappresenta in genere il 3-10% p/p della formulazione totale. In questo caso, la fase lipidica è al 2,5% p/p rispetto al peso totale della formulazione ed è costituita da tristearina, labrasol e lecitina di soia (2:1: 0,025 p/p). Inizialmente le due fasi vengono riscaldate a 80° C, temperatura alla quale la fase lipidica fonde, con piastra riscaldante [RCT basic, IKA Labotechnik]. Una volta aggiunto il principio attivo, la fase organica viene quindi versata a filo all'interno di quella acquosa, poi la miscela viene sottoposta ad omogenizzazione a 13500 rpm per 1 minuto [omogenizzatore Ultraturrax, IKA Labotechnik] seguita da sonicazione a sonda [Microson™, Ultrasonic cell Distrator] per 15 minuti alla frequenza di 6,75 kHz. La formulazione così ottenuta, posta in un bagno, viene portata a temperatura ambiente (22° C) fino ad ottenere la solidificazione delle goccioline di fase lipidica in sospensione e quindi la formazione delle SLN.

Le SLN studiate sono state caricate con due diverse quantità di profarmaco 0,12 mg/ml e 0,24 mg/ml e le formulazioni studiate sono state chiamate rispettivamente 1X e 2X in base alla quantità di profarmaco incorporato.

### **4.3.3. Contenuto di profarmaco disperso nelle SLN**

Per calcolare la quantità di profarmaco contenuta negli SLN, un campione della dispersione è stato diluito in metanolo (1:4 v/v) e lasciato sotto agitazione per 3 ore.

Successivamente il campione è stato filtrato con filtri da 0,45 µm e la quantità è stata analizzata mediante HPLC.

#### 4.3.4. Caratterizzazione delle SLN tramite Cryo-TEM

L'analisi Cryo-TEM è stata condotta utilizzando un crio microscopio elettronico (CEM902a, Zeiss, D-Oberkochen, Philips CM120, NL Eindhoven). Le immagini sono state acquisite e processate con il processore di immagini Kontron IBAS.

#### 4.3.5. Analisi DSC

Abbiamo valutato il comportamento termotropico delle SLN, in particolare le SLN vuote; SLN con profarmaco levodopa in concentrazione 1X (SLN PL 1X) ed SLN con profarmaco levodopa in concentrazione 2X (SLN PL 2X). Abbiamo inoltre effettuato degli studi di assorbimento dell'acido caffeico, della diacetildopa e del profarmaco PL su SLN vuote.

**a) analisi DSC delle SLN:** 80 µl delle tre preparazioni di SLN sono state poste in crogioli di alluminio da 160 µl. I crogioli sono stati chiusi ermeticamente e sottoposti ad una scansione in riscaldamento da 5 a 65°C a 2°C/min e ad una scansione in raffreddamento da 65 a 5°C a 4°C/min, per tre volte.

**b) cinetiche di assorbimento:** una quantità esatta di acido caffeico; diacetildopa o PL (corrispondente a quella contenuta in 80 µl della formulazione 1X) sono stati pesati sul fondo di un crogiolo e sono stati aggiunti 80 µl di SLN vuote. Il crogiolo è stato chiuso ermeticamente e sottoposto alle seguenti scansioni calorimetriche: una scansione di riscaldamento da 5 a 65°C a 2°C/min; una scansione di raffreddamento da 65 a 5°C a 4°C/min, un periodo di incubazione isotermico a 37°C per 60 minuti ed un raffreddamento da 37°C a 5°C a 4°C/min.

La procedura è stata ripetuta per otto volte.

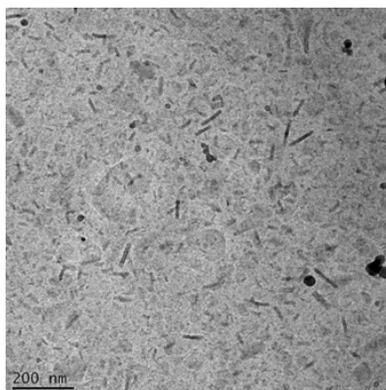
## 4.4. Risultati e discussione

### 4.4.1. Contenuto di profarmaco disperso nelle SLN

La percentuale di profarmaco incorporato è valutata mediante HPLC e pari a  $78,12 \pm 2,11\%$ .

### 4.4.2. Caratterizzazione delle SLN tramite Cryo-TEM

Questa analisi è stata condotta diffondendo un fascio di luce sulle particelle di SLN disperse in modo da valutarne la morfologia, il risultato di questa analisi è riportato in figura 55.



**Fig. 55:** Cryo-TEM di SLN caricate con il profarmaco.

### 4.4.3. Analisi DSC

Variazioni strutturali dei composti sono accompagnate da variazioni di temperatura, ad esempio assorbimento di calore durante la fusione o rilascio di calore durante la cristallizzazione. La Calorimetria a Scansione Differenziale permette di monitorare e quantificare gli eventi termici che avvengono sul campione analizzato e di identificare la temperatura alla quale avvengono questi eventi (*H. Bunjes and T. Unruh, 2007*). Abbiamo usato la DSC per caratterizzare le SLN sia vuote che cariche.

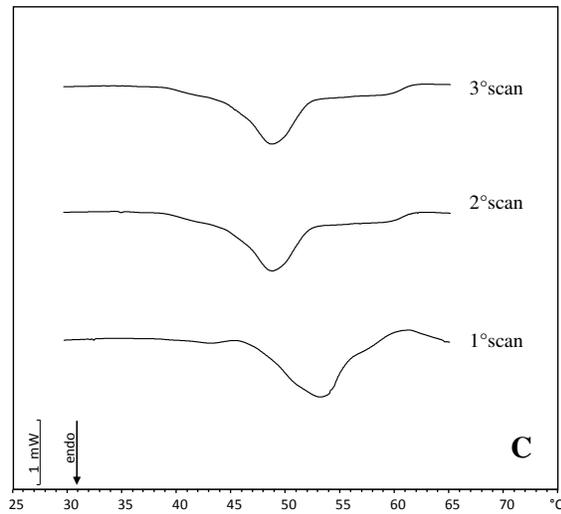
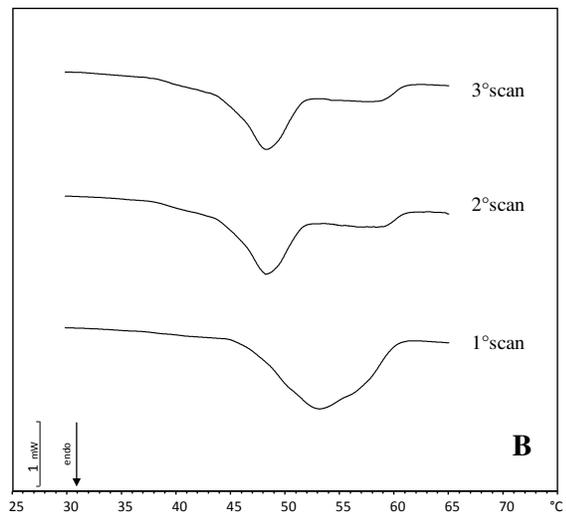
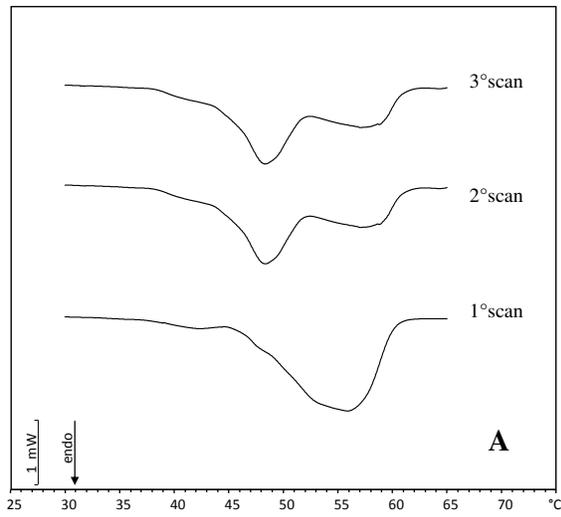
Tutte le SLN studiate mostrano le prime curve calorimetriche differenti rispetto alle seguenti. Per quanto riguarda le SLN vuote (fig. 56 A), la prima curva calorimetrica è caratterizzata da un picco principale alla temperatura di  $56,4^{\circ}\text{C}$  e tre spalle a temperature più basse (rispettivamente a circa  $43, 49$  e  $53,5^{\circ}\text{C}$ ); nella seconda e nella

terza scansione si osserva una spalla a circa 43°C (sovrapponibile a quella della prima scansione), un picco definito a 48,4°C (sovrapponibile alla seconda spalla della prima scansione) e un picco molto largo a circa 57°C (sovrapponibile alla terza spalla e picco principale della prima scansione). Le SLN contenenti la quantità 1X del profarmaco (SLN PL 1X) (fig. 56 B) nella prima scansione mostrano cinque segnali calorimetrici: un piccolo picco a circa 43°C, due spalle a 46 e 50°C, un picco principale a 53°C e una spalla a 57°C. Nella seconda e nella terza scansione sono evidenti tre segnali: una spalla a circa 43°C (che nella prima scansione era un picco), un picco principale a 48,3°C e una spalla più larga a temperatura più alta. Nella prima scansione calorimetrica delle SLN contenenti la quantità 2X del profarmaco (SLN PL 2X) (fig. 56 C) sono presenti gli stessi segnali visti nella prima scansione delle SLN PL 1X tranne la spalla ad alte temperature. La seconda e la terza scansione sono simili a quelle delle SLN PL 1X. Questo comportamento potrebbe essere dovuto ad un riarrangiamento delle SLN in seguito ad un primo riscaldamento che rimane inalterato nelle scansioni successive.

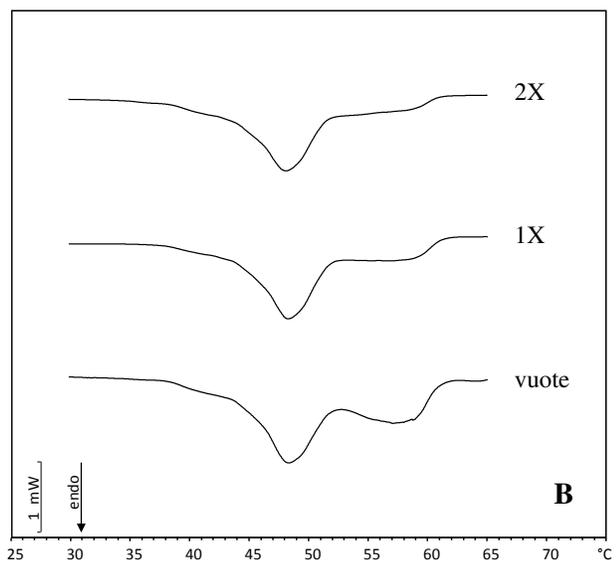
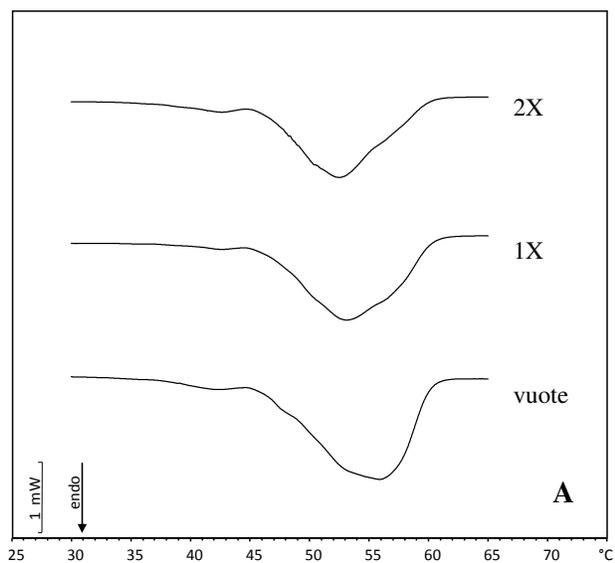
Importanti informazioni sul comportamento termotropico delle SLN studiate vengono dalla comparazione delle prime scansioni calorimetriche sia delle SLN vuote che contenenti il prodrug (fig. 57). In tutte le SLN è presente un piccolo picco a circa 43°C. Rispetto alle SLN vuote, in quelle cariche il picco principale si sposta verso temperature più basse.

Nelle SLN PL 1X si ha un termogramma con due spalle, rispettivamente a 50,5°C e 57°C, mentre nelle SLN PL 2X è presente solo la spalla a 50,5°C. Inoltre l'intensità del picco diminuisce passando dalle SLN vuote alle SLN PL 2X.

Per quanto riguarda la prima scansione, la differenza più evidente riguarda il picco largo a 58°C la cui intensità diminuisce all'aumentare della quantità di profarmaco PL presente nelle SLN.



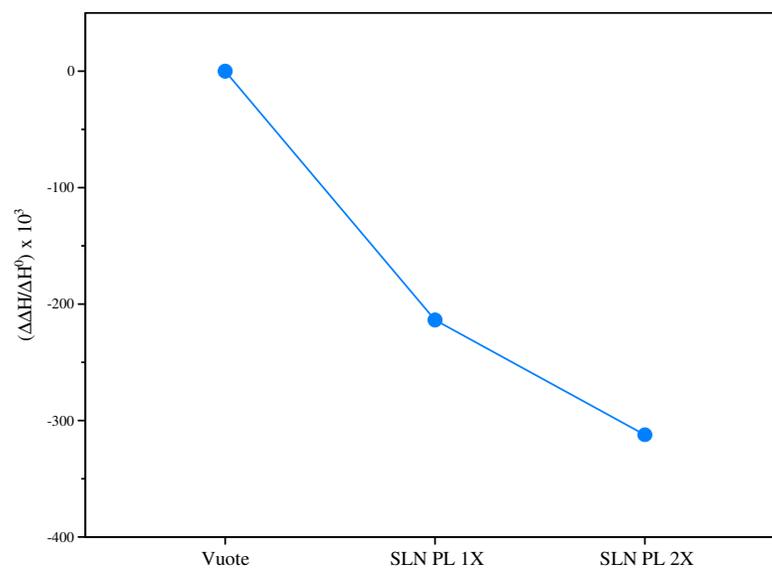
**Fig. 56:** Curve calorimetriche delle SLN vuote (A), delle SLN PL1X (B) e delle SLN PL2X (C).



**Fig. 57:** Curve calorimetriche della prima scansione (**A**) e della seconda scansione (**B**) delle SLN sia vuote che caricate con il profarmaco a concentrazione 1X e 2X.

La variazione dell'entalpia è riportata in figura 58, come  $\Delta\Delta H/\Delta H^0$ , in funzione della frazione molare di composto presente nella dispersione acquosa degli MLV in base alla relazione:  $\Delta\Delta H = \Delta H - \Delta H^0$  ( $\Delta H$  = entalpia della seconda scansione calorimetrica delle SLN caricate con PL 1X e PL 2X;  $\Delta H^0$  = entalpia della seconda scansione calorimetrica delle SLN vuote).

L'entalpia diminuisce all'aumentare della quantità di PL nelle SLN e ciò ci indica che l'incorporazione del profarmaco provoca una diminuzione della cooperatività delle molecole lipidiche.



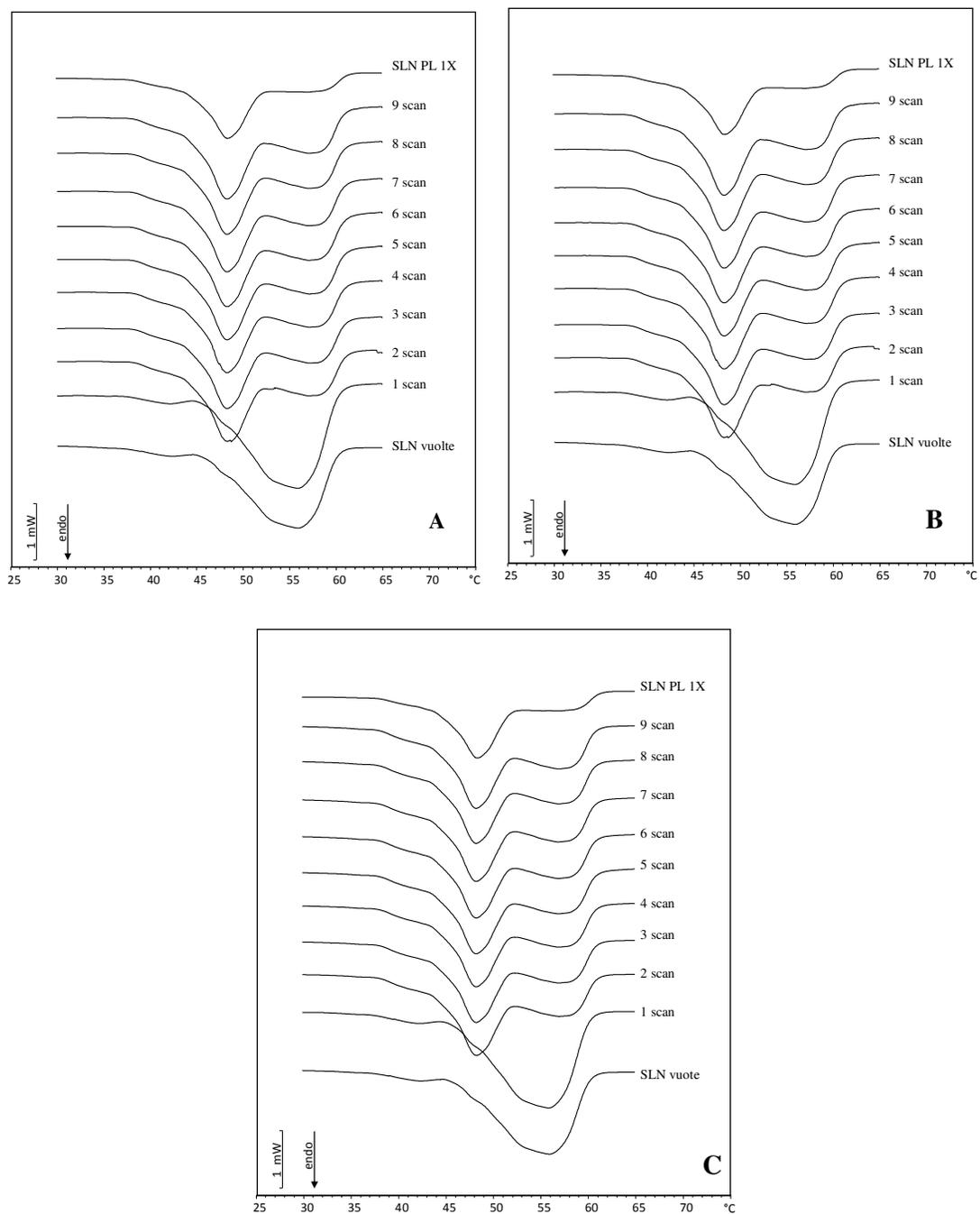
**Fig. 58:** Variazione dell'entalpia della seconda scansione calorimetrica delle SLN vuote, della SLN PL 1X e delle SLN PL 2X.

### *Cinetiche di contatto*

La tecnica DSC è stata usata anche per valutare se il profarmaco PL o i suoi precursori (acido caffeico e diacetil dopa) sono assorbiti dalle SLN. A tale scopo sono stati effettuati studi di penetrazione pesando una esatta quantità di PL, di acido caffeico o di diacetil dopa all'interno del crogiolo e aggiungendo le SLN vuote. Un eventuale incorporazione dei composti nelle SLN sarà evidenziato da cambiamenti nella curva calorimetrica delle SLN vuote.

In figura 59 le curve calorimetriche sono paragonate a quelle delle SLN vuote e delle SLN PL 1X. L'ultima curva calorimetrica rappresenta la curva di riferimento, infatti, se i composti fossero assorbiti dalle SLN, le curve calorimetriche dovrebbero spostarsi verso la curva delle SLN PL 1X

Dai termogrammi si evince che le curve calorimetriche riferite a tutti i composti studiati non subiscono variazioni rispetto a quella delle SLN vuote, anche dopo otto ore di incubazione. Questo dimostra che il semplice contatto tra le SLN vuote e i composti, non ne permette l'incorporazione, e ciò evidenzia l'importanza del procedimento di preparazione per permettere l'incorporazione del profarmaco nelle SLN.



**Fig. 59:** Curve calorimetriche delle SLN vuote lasciate in contatto con PL 1X (A), con acido caffeico (B) e diacetil dopa (C) a differenti tempi d'incubazione. SLN PL 1X= curva calorimetrica di riferimento.

## 4.5. Conclusioni

Scopo del lavoro è stato quello di studiare il comportamento termotropico di SLN sia vuote che caricate con il profarmaco levodopa-acido caffeico (PL) a due diverse concentrazioni (1X e 2X) per valutare l'influenza dell'incorporazione di diverse quantità di profarmaco sulle SLN base. Analizzando le scansioni calorimetriche delle tre preparazioni (SLN vuote: SLN PL 1X ed SLN PL 2X) si nota che, dopo la prima scansione, si ottengono delle curve calorimetriche differenti rispetto alla prima, e ciò è probabilmente dovuto ad una modifica del sistema in seguito ad un primo ciclo di riscaldamento, modifica che rimane invariata per i successivi cicli. Paragonando le curve calorimetriche delle SLN vuote con quelle cariche otteniamo dei risultati che indicano chiaramente che il PL modifica il comportamento termotropico delle SLN e tale influenza è legata alla quantità di prodrug che viene incorporato.

Dagli studi cinetici, atti a verificare la capacità del prodrug PL e dei suoi precursori, l'acido caffeico e la diacetil dopa, di penetrare all'interno delle SLN si evince che la metodica di preparazione delle SLN cariche influenza la capacità di incorporarsi dei composti.

## 5. AGGREGATI LIPIDICI SUPRAMOLECOLARI

Gli aggregati lipidici supramolecolari (ALS) rappresentano un particolare tipo di aggregazione dei lipidi che possono costituire sistemi di veicolazione biocompatibili, non tossici e biodegradabili. Il loro utilizzo per uso dermatologico consente di aumentare l'assorbimento percutaneo delle molecole veicolate prolungandone il rilascio nel tempo e quindi la risposta farmacologica.

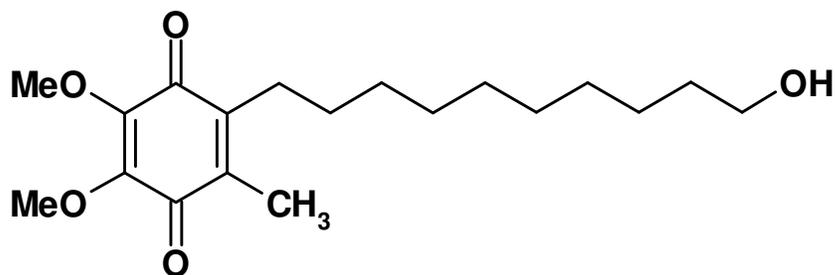
In particolare, risultano essere interessanti gli aggregati lipidici supramolecolari che possiedono una specifica morfologia simile a quella della membrana cellulare. Questa morfologia è unica e consiste in un doppio strato lipidico continuo, curvo che si estende in tre dimensioni, separato in due parti da canali acquosi, l'aggregato che ne deriva possiede una elevata viscosità. La curvatura del doppio strato in questo tipo di aggregato è associata ad un'energia conosciuta come energia elastica di curvatura, che determina la stabilità dello stesso aggregato in funzione della composizione. È stato recentemente suggerito che la formazione spontanea e la stabilità termodinamica di questo tipo di fase, formata da doppi strati bicontinui organizzati in strutture con superfici minime periodiche trovate in molti sistemi acqua/lipidi, sono dovute ad una concorrenza fra i due termini di energia libera: l'energia di curvatura di ogni singolo strato contro l'energia d'allungamento delle catene lipidiche. Attraverso calcoli matematici, visto lo spessore costante assunto dal doppio strato, si può concludere che i due termini di energia sono simultaneamente annullati, da questo fatto deriva la eccezionale stabilità termodinamica di questo tipo di aggregato. La struttura e le proprietà fisico-chimiche degli aggregati lipidici supramolecolari in fase liquido cristallina si prestano bene per l'utilizzo di questi sistemi per l'applicazione topica di farmaci.

Alcuni studi sostengono la teoria che i componenti delle vescicole lipidiche migrano nella pelle durante il rilascio del farmaco. L'interazione delle vescicole lipidiche con la pelle ed il trasporto del farmaco attraverso la pelle sembrano essere collegati con la capacità dei liposomi di permeare attraverso lo strato corneo (*M. Foldvari, 2000*). Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare le potenzialità applicative degli aggregati lipidici supramolecolari per la veicolazione topica di farmaci tra i quali è stato scelto l' Idebeneone (Ide).

In una prima fase le formulazioni scelte sono state caratterizzate dal punto di vista chimico fisico presso i laboratori del Prof Massimo Fresta e della Dott.ssa Donatella Paolino, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università “Magna Graecia”, Catanzaro, in particolare effettuando studi di stabilità ed analisi dimensionale. Successivamente sono stati valutati i profili di rilascio e di permeazione in vitro e in vivo (Università di Catanzaro). In una seconda fase sono stati effettuati studi di interazione e cinetiche di rilascio con modelli di membrane biologiche mediante Calorimetria a Scansione Differenziale. Ed infine sono stati effettuati studi di interazione e cinetiche di rilascio con modelli di membrane biologiche mediante Calorimetria a Scansione Differenziale.

### 5.1. Idebenone

Il 2,3-dimetossi-5-metil-6-(10-idrossidecil)-1,4-benzochinone, il cui nome commerciale è Idebenone (fig. 60), è un analogo sintetico del coenzima Q10, un antiossidante della membrana cellulare ed un essenziale costituente della catena di trasporto elettronico ATPasica mitocondriale che riesce ad operare in condizioni di basse pressioni di ossigeno, grazie alla sua capacità di inibire la perossidazione lipidica, protegge le membrane cellulari e i mitocondri dal danno ossidativo. L'Idebenone differisce dal coenzima Q10 per alcune importanti caratteristiche che lo possono rendere più utile per rallentare l'invecchiamento cutaneo. Infatti in condizioni di ipossia il coenzima Q10 si trasforma in un pro-ossidante. L'Idebenone anche in caso di ipossia è in grado di sopprimere i radicali liberi e di continuare la produzione dell'adenosina trifosfato.



**Fig. 60:** Formula di struttura dell'Idebenone.

## 5.2. Materiali

La 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC), è stata ottenuta dalla Genzyme Pharmaceuticals (Liestal, Svizzera). La purezza della DMPC, determinata tramite cromatografia su strato sottile ad alta pressione (HPTLC), è 99.9 %. La concentrazione lipidica è stata determinata tramite l'analisi del fosforo (*G. Rouser et al., 1970*). L'acqua utilizzata è acqua ultra pura con resistività di 18.2 M $\Omega$  cm ottenuta mediante un sistema Simplicity 185 Millipore. L'Idebenone è stato fornito dalla Sigma Aldrich.

Gli aggregati lipidi supramolecolari sono stati forniti dal gruppo di ricerca del Prof. Massimo Fresta e della Dott.ssa Donatella Paolino, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università "Magna Graecia", Catanzaro. La composizione e la metodica di preparazione degli aggregati lipidici supramolecolari vengono appositamente omessi dal momento che questo tipo di carrier è attualmente in fase di brevettazione. Nella seguente tesi sperimentale chiameremo le formulazioni saggiate con le sigle A, B, C, D per i veicoli vuoti e con le sigle A<sub>IDE</sub>, B<sub>IDE</sub>, C<sub>IDE</sub>, D<sub>IDE</sub> per le formulazioni contenenti Idebenone. In particolare le formulazioni B e D si differenziano da A e B per la presenza di un lipide e inoltre le formulazioni A e B differiscono da C e D per la concentrazione (Tabella 2).

**Tabella 2** Componenti delle formulazioni studiate.

ALS	TENSIOATTIVO	LIPIDE	IDE	H <sub>2</sub> O (mL)
A	<input checked="" type="checkbox"/>			10
B	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		10
C	<input checked="" type="checkbox"/>			2
D	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		2
A <sub>IDE</sub>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	10
B <sub>IDE</sub>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	10
C <sub>IDE</sub>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input checked="" type="checkbox"/>	2
D <sub>IDE</sub>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	2

### 5.2.1. Analisi dimensionale e di stabilità

La stabilità è un requisito fondamentale quando si prevede l'applicazione terapeutica di un *drug delivery system*. Lo strumento è collegato ad un software, installato su un personal computer, in grado di elaborare grafici di trasmissione e backscattering e di calcolare parametri fisici quali, il diametro delle particelle ( $d$ ), la frazione volumetrica delle particelle ( $\phi$ ), la superficie specifica media delle particelle ( $s$ ), la velocità media dei fotoni liberi ( $\lambda$ ) e la velocità media del trasporto dei fotoni liberi ( $\lambda^*$ ). Il Turbiscan Lab possiede due sistemi operativi Scan e Fixed position. Scan: la lettura ottica scansiona l'intera lunghezza del campione circa (50mm), acquisendo i dati di trasmissione e backscattering nell'intervallo di 40  $\mu\text{m}$  ogni minuto per 3h. Le curve ottenute rilevano il flusso di luce trasmesso e riflesso, in percentuale, relativa ad uno standard di riferimento (sospensione di lattice  $d=0,3\mu\text{m}$  e  $\phi=10\%$  e olio di silicone).

Questi profili creano un'impronta digitale macroscopica del campione a tempi prestabiliti. Fixed position: i dati di trasmissione e di backscattering sono acquisiti ogni 0,1 secondi, rivelando le cinetiche di trasmissione e di backscattering. Con l'aiuto di questa metodica non invasiva ed utilizzando il sistema operativo Fixed position, abbiamo constatato la grandezza delle particelle e la stabilità delle formulazioni. Il Turbiscan Lab Expert è formato da un detector parallelo a tutta la lunghezza del campione posto in una cella cilindrica in vetro. Lo strumento dispone di una sorgente luminosa pulsatile con una lunghezza d'onda vicina all'infrarosso (880 nm) e di due detector sincroni che ricevono rispettivamente la luce riflessa e trasmessa dal campione. Il detector di trasmittanza (T) riceve la luce che attraversa il campione a 180 gradi dalla radiazione incidente mentre il detector di Backscattering (BS) riceve la luce riflessa dal campione a 45 gradi rispetto alla radiazione incidente. Il detector esamina l'intera altezza del campione (circa 50mm) acquisendo i dati di T e BS ogni 40  $\mu\text{m}$  per un determinato intervallo di tempo. I grafici ottenuti mostrano i fotoni trasmessi o riflessi, in percentuale relativa rispetto allo standard di riferimento. La propagazione del raggio in un mezzo disperso può essere considerata indipendentemente dai vari parametri, quando la velocità media fotonica  $\lambda$  ( correlata a  $\phi$ ,  $d$ ) è più grande della  $\lambda^*$  della radiazione incidente, secondo la seguente equazione:

$$\lambda(\phi, d) = \frac{\lambda}{n(\pi d^2/4)Q_c} = \frac{2d}{3\phi Q_c}$$

da cui si ricava:

$$\phi = \frac{n\pi d^3}{6}$$

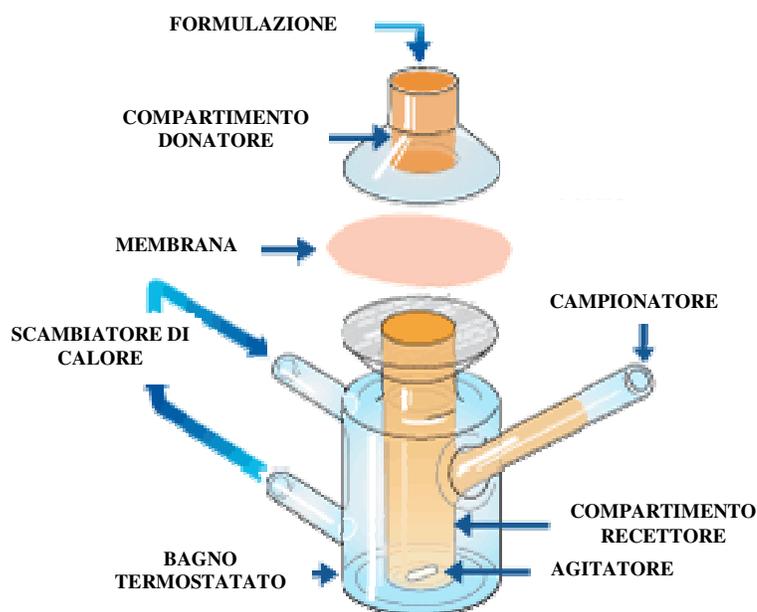
dove  $n$  è la densità particellare,  $d$  il diametro medio delle particelle,  $\phi$  la frazione volumetrica e  $Q_c$  l'efficienza del fattore di estinzione per fenomeni di assorbimento e di scattering. Nel caso di scattering anisotropici, si può definire la velocità di trasporto fotonica  $\lambda^* = \lambda(1-g)$ , che rappresenta una lunghezza decorrelata in cui il fotone non considera né la direzione della radiazione incidente né l'entità dello scattering delle singole particelle.

### 5.2.2. Valutazione delle dimensioni mediante light scattering

Per determinare la dimensione dei vari sistemi colloidali è stato impiegato lo scattering dinamico di luce. Lo strumento utilizzato è costituito da un laser ad Argon (Spectra Physic mod. 166), da un sistema portacampioni della Malvern mod. PC 8 (Worcestershire, UK), da un goniometro meccanico ad altissima precisione con controllo micrometrico e da un sistema ottico della Melles-Griot mod. f. 150. Il raggio luminoso proveniente dalla sorgente laser ad una lunghezza d'onda di 514.5 nm è stato focalizzato sulla sospensione vescicolare contenuta dentro delle cuvette di quarzo termostate ad una temperatura di  $21 \pm 0.01$  °C con un termostato Haake F3-R (Berlino, Germania). L'intensità della luce scatterata è rilevata a 90° rispetto al raggio incidente con un fotomoltiplicatore (RCA, Fishers, NY, USA) raffreddato a -30 °C. L'apparato di PCS è stato calibrato con un campione standard monodisperso di particelle di polistirene (126 nm). La dimensione dei vari sistemi colloidali è calcolata dalla funzione di autocorrelazione.

### 5.2.3. Valutazione dei profili di rilascio e di permeazione percutanea

Gli studi di rilascio e permeazione percutanea in vitro sono stati eseguiti utilizzando rispettivamente campioni di membrana sintetica (acetato di cellulosa) e di pelle umana costituita soltanto dallo strato corneo e dall'epidermide. I campioni di pelle umana sono stati ottenuti da interventi di chirurgia plastica eseguiti su soggetti adulti (età media  $32 \pm 7$  anni), di sesso femminile a livello della regione addominale. Sono stati utilizzati campioni di pelle costituiti soltanto da strato corneo ed epidermide perché l'uso di pelle intera in esperimenti di assorbimento percutaneo di sostanze lipofile può fornire risultati poco attendibili, in quanto il derma si può comportare come barriera addizionale alla permeazione (R. J. Scheuplein and I.H. Blank, 1973; R. L. Bronaugh and R. S. Stewart, 1984). La separazione di SCE dal derma è stata effettuata secondo la procedura descritta da Klingman e Christophers (1963). I campioni di cute, quindi, dopo attenta rimozione del grasso sottocutaneo, sono stati immersi in acqua distillata a  $60 \pm 1$  °C per 2 min. e lo strato corneo e l'epidermide sono stati delicatamente rimossi dal derma sottostante con l'aiuto di un bisturi a lama smussa. Le membrane di SCE sono state così ottenute sono state disidratate in un essiccatore (25% RH), avvolte in fogli di alluminio e conservati alla temperatura di  $4 \pm 1$  °C fino al momento dell'uso. Tale tecnica di conservazione consente di mantenere inalterate le caratteristiche di permeabilità dei campioni di SCE per almeno 9 mesi. Prima di procedere agli esperimenti di rilascio e di permeazione sia la membrana sintetica che i campioni di SCE sono state reidratate rispettivamente per 30 min e 1 ora. Questi esperimenti, in vitro, sono stati effettuati utilizzando celle di tipo "Franz" (LGA, Berkeley, CA) (fig. 61), ognuna delle quali era costituita da una camera, detta "donor", nel cui interno sono stati posti 200 µl della formulazione da esaminare (SLN, trasfersomi, fasi cubiche con il probe o con il farmaco, sospensione acquosa di Idebenone o soluzione acquosa di fluoresceina) e da una seconda camera, detta "receptor" nella quale è stata posta acqua sterile. I due compartimenti sono separati da membrane di cellulosa (rilascio) o di strato corneo ed epidermide (permeazione). La cella è gestita da una pompa peristaltica che, a tempi prefissati, provvede al prelievo e al rimpiazzo di una quantità prefissata di soluzione recettrice. L'esperimento è stato condotto per 24 ore. I risultati sono stati espressi come quantità rilasciata e permeata durante le 24 ore dell'esperimento.



**Fig. 61:** Riproduzione di una cella di Franz.

#### **5.2.4. Determinazione analitica dell'Idebenone**

I campioni, prelevati a differenti intervalli di tempo, sono stati analizzati mediante spettrofotometria UV (UV-Vis Shimadzu 1601) alla lunghezza d'onda di 280 nm per determinare la quantità di Idebenone rilasciato. Le letture sono state fatte dopo avere determinato una retta di taratura mediante soluzioni a titolo noto (concentrazione compresa tra 0,0088 mg/ml e 0,088 mg/ml). La retta così ottenuta presentava un  $R^2=0,9907$ .

#### **5.2.5. Studi in vivo su volontari sani: la spettroscopia di riflettanza**

L'entità dell'effetto antiossidante delle varie formulazioni contenenti Idebenone è stata valutata effettuando prove in vivo su volontari sani. I partecipanti all'esperimento sono stati informati sulla natura dello studio e sono stati raccolti i consensi informati ad oggi conservati presso i laboratori del Prof. Massimo Fresta, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università "Magna Graecia", Catanzaro. La tecnica usata (spettrofotometria di riflettanza) valuta, mediante una metodica non invasiva, la presenza, l'intensità e la durata del processo eritematogeno indotto sulla

cute dalle formulazioni o dai loro componenti. Il protocollo sperimentale consiste nella demarcazione, sulla parte interna di entrambi gli avambracci di ogni soggetto, di 8 siti (4 per ogni avambraccio) di 1 cm<sup>2</sup>. In seguito, mediante uno spettrofotometro di riflettanza a sfera della serie SP60 (X-Rite Incorporated, USA), sono state effettuate le misurazioni della riflettanza di ogni sito preso in esame prima di ogni trattamento (baseline). Lo strumento viene calibrato secondo uno standard di bianco e di nero, utilizzando una sorgente di illuminazione C ed un angolo di osservazione di 2°. Lo spettrofotometro è stato collegato ad un personal computer in grado di elaborare gli spettri di riflettanza della nostra pelle nella regione 400-700nm, mediante un software in dotazione con lo strumento (Spectrostart). Dopo la misura della baseline, è stato indotto un eritema applicando una soluzione di metil nicotinato allo 0,2%. Successivamente sono state applicate in doppio le varie formulazioni contenenti Idebenone allo 2,5% mediante dei patch con un'area superficiale di 1 cm<sup>2</sup>. Sono state effettuate le misurazioni del grado di eritema fino a completa scomparsa.

#### **5.2.6. Studi dell'interazione dei vari carrier con la pelle in vivo**

Per valutare l'interazione in vivo le formulazioni contenenti fluoresceina sono state applicate a ratti di tipo Wistar del peso di circa 25 gr tabulati in condizioni standard di temperatura e umidità (25 +/-1 grado centigrado 65% di umidità), con acqua e cibo forniti *ad libitum*. I ratti sono stati anestetizzati con una soluzione di cloralio idrato e rasati, quindi sono stati delimitati 9 siti, dove poi si sono applicate le formulazioni (10µl per ogni tipo) e un controllo con fisiologica. Quindi i ratti sono stati sacrificati con un eccesso di cloralio idrato. Ogni esperimento è stato effettuato su sei ratti. I campioni di pelle sono stati prelevati dopo 6, 12, 24 ore e fissati poi in formalina. Sono state fatte delle sezioni seriali dei campioni con un Vibratomo (Leica), per poter valutare l'entità e la profondità della permeazione in rapporto al tempo e al tipo di carrier grazie alla microscopia confocale.

### **5.2.7. Microscopia confocale**

Per valutare l'entità e la profondità della permeazione della fluoresceina dei campioni è stata condotta un'analisi con un microscopio confocale a scansione laser Leika TCS SP MP alla lunghezza d'onda di eccitazione di 496 nm e a quella di emissione di 519 nm. I campioni sono stati posti in un vetrino e fissati con un collante trasparente al fine di impedire l'inglobamento di aria tra il campione e il vetrino. L'obiettivo utilizzato per la visualizzazione dei campioni era un 60x ad immersione ad olio.

### **5.3. Preparazione dei liposomi: MLV**

Sono state preparate soluzioni standard in cloroformio/metanolo (1:1 v:v) di DMPC. La soluzione di DMPC così ottenuta è stata trasferita in tubi da saggio in modo da avere stesse aliquote di lipide per ognuno di essi (8 mg; 0,01180 mmoli).

Ad alcune di queste sono state aggiunte aliquote delle soluzioni di Idebenone, in modo da avere le opportune frazioni molari (0,0; 0,015; 0,03; 0,06; 0,09).

In seguito dalle soluzioni ottenute di DMPC pura e DMPC/Idebenone è stato allontanato il solvente sotto flusso di azoto, a 37° C (temperatura superiore alla temperatura di transizione del lipide), per ottenere un film lipidico.

Successivamente i campioni sono stati liofilizzati per 40 minuti per eliminare eventuali tracce di solvente.

I campioni sono stati idratati aggiungendo 120 µl di acqua ultrapura, quindi, posti in un bagno termostato (HAAKE F3) a 37° C per un minuto e poi vorticizzati per un minuto, la procedura è stata ripetuta per tre volte e quindi lasciati per un'ora a 37° C in modo da ottenere una dispersione liposomiale omogenea.

Mediante questa tecnica si ottengono liposomi multilamellari di DMPC pura e liposomi di DMPC in cui l'Idebenone è omogeneamente disperso in tutti i bilayers.

## 5.4. Analisi DSC

### *Interazione con modelli di biomembrana*

L'analisi calorimetrica è stata eseguita mediante un sistema termoanalitico Mettler TA-STAR<sup>®</sup> provvisto di cella calorimetrica DSC 822 e software Mettler TA-STAR<sup>®</sup> versione 8.10.

Sono state eseguite le seguenti misure:

- Interazione DMPC- Idebenone (in fase organica)
- Interazione DMPC-ALS A
- Interazione DMPC-ALS B
- Interazione DMPC-ALS C
- Interazione DMPC-ALS D
- Interazione DMPC-ALS A Ide
- Interazione DMPC-ALS B Ide
- Interazione DMPC-ALS C Ide
- Interazione DMPC-ALS D Ide

La velocità di riscaldamento scelta è stata di 2°C/min. in un intervallo di temperature di 5 –50°C. 60 µl della sospensione liposomiale di DMPC pura, vengono posti in un crogiolo di alluminio da 160 µl e a questa aggiunti 60 µL di formulazione ALS. Per gli esperimenti di interazione DMPC-Idebenone, 60 µL di miscela contenente l'opportuna frazione molare sono stati posti sul fondo del crogiolo e sottoposti ad analisi calorimetrica.

I campioni sono stati sottoposti al seguente ciclo di scansioni calorimetriche:

- 1) Riscaldamento del crogiolo contenente il campione da 5 °C fino a 50°C temperatura superiore alla temperatura di transizione del fosfolipide (a 2 °C/min).
- 2) Raffreddamento da 50 °C a 5 °C a 4 °C /min.

La procedura è ripetuta almeno tre volte per verificare la riproducibilità dei parametri termodinamici.

Lo spostamento della  $T_m$  e la variazione di  $\Delta H$  rispetto ai liposomi di solo fosfolipide sono parametri che indicano l'entità d'interazione che una qualsiasi molecola causa sui liposomi di DMPC. Le curve calorimetriche dei campioni sono stati ottenuti con il metodo della sottrazione del riferimento costituito di un crogiolo contenente 60 o 120  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura. La calibrazione dell'entalpia del sistema calorimetrico è stata eseguita usando indio come riferimento. Le variazioni di entalpia sono state calcolate dall'area del picco usando i programmi del software Mettler.

#### *Cinetiche di rilascio dell'Idebenone*

Queste misure sono state effettuate per valutare la capacità dell'Idebenone di allontanarsi dal sistema carrier, attraversare il mezzo acquoso, interagire con le membrane modello ed eventualmente penetrare nelle stesse e delle formulazioni di comportarsi da drug delivery system. Tali esperimenti sono stati eseguiti ponendo 60  $\mu\text{L}$  di sospensione liposomiale sul fondo del crogiolo e a questi aggiunti 60  $\mu\text{L}$  di formulazione di ALS contenenti Idebenone.

Gli stessi esperimenti sono stati effettuati anche con i carriers vuoti, come riferimento. Inoltre per l'Idebenone puro è stata eseguita anche una cinetica di contatto, in cui il farmaco è stato pesato direttamente sul fondo del crogiolo in modo da avere una frazione molare  $X=0,06$  rispetto al fosfolipide. Sono stati aggiunti successivamente 60  $\mu\text{L}$  di sospensione acquosa di MLV di DMPC. I crogioli, dopo essere stati sigillati, sono stati sottoposti a leggera agitazione per 10 secondi, e quindi a cicli calorimetrici consistenti di tre steps:

- 1) una scansione calorimetrica in riscaldamento da 5 a 44 °C con un incremento di temperatura di 2 °C/min. al fine di investigare l'interazione fra i composti e il modello di membrana, durante una prima fase di riscaldamento che porta i campioni ad una temperatura di 44 °C, superiore alla  $T_m$ ;
- 2) un periodo di incubazione isoterma per 60 minuti a 44 °C per permettere ai composti di permeare il layer lipidico, il quale si trova in uno stato di disordine ad una temperatura maggiore di quella di transizione;
- 3) una fase di raffreddamento del campione dalla temperatura di incubazione (44 °C) alla temperatura di 5 °C ad una velocità di 4°C/min per poi poter ripetere il ciclo dal primo step.

## 5.5. Risultati e discussione

### 5.5.1. Analisi dimensionale e di stabilità

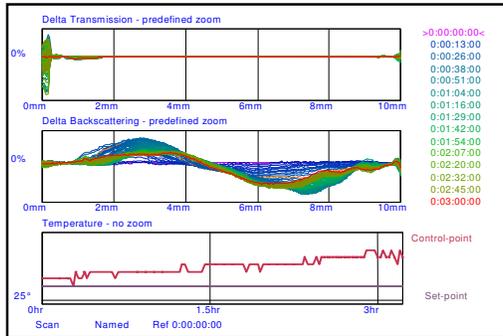
La stabilità è un requisito fondamentale quando si prevede l'applicazione terapeutica di un *drug delivery system*. Per questo motivo gli ALS sono stati sottoposti a valutazione mediante Turbiscan Lab Expert.

In figura 62 sono riportati i profili di trasmittanza e backscattering degli ALS A e D vuoti mettendo in evidenza un'elevata stabilità del sistema A; difatti si evidenzia solo una variazione del ~2% nel profilo di backscattering nel panel A, il che significa che non vi sono presenti fenomeni di instabilità quali coalescenza, flocculazione o creaming.

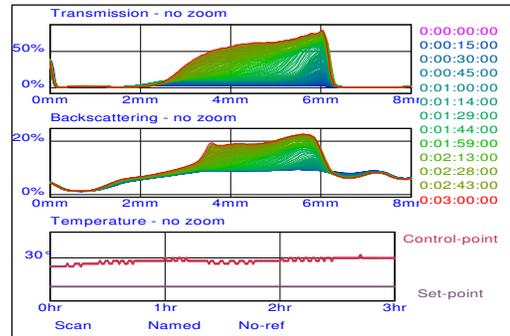
Nel caso degli ALS D invece si nota (figura A panel B) si nota sia una grande variazione di trasmittanza pari al 70% dall'inizio alla fine dell'esperimento concomitante con il medesimo punto nel profilo di backscattering dove è evidente una variazione del 20% che comunque rientra nel limite massimo.

Questo fenomeno non riscontrato negli altri ALS è probabilmente relativo al fatto che questa particolare formulazione si è rivelata termoreversibile con una quasi totale perdita dell'opalescenza iniziale a temperatura ambiente e un ritorno all'opalescenza tipica degli ALS a +4°C.

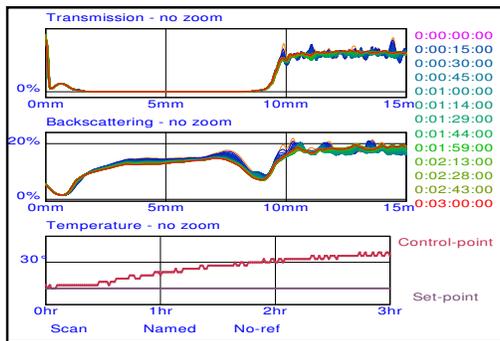
I dati estrapolati dai profili di backscattering e trasmittanza permettono di calcolare l'indice di stabilità delle varie formulazioni.



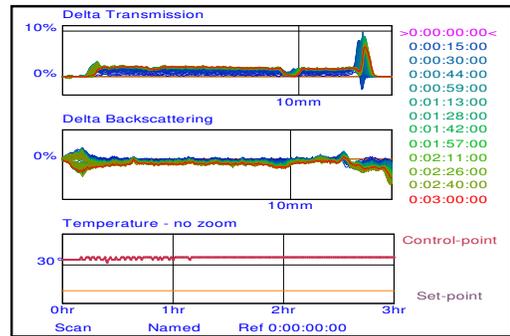
A



B



C



D

**Fig. 62:** Profilo della variazione di backscattering e trasmittanza in base alla temperatura degli ALS (Panel A formulazione A, panel B formulazione D, panel C formulazione A contenente Idebeneone, panel D formulazione D contenente Idebeneone).

La tabella 3 mostra l'indice di stabilità calcolato dallo strumento. Questo valore è stato calcolato allo stesso tempo e alla stessa altezza del campione. Più il valore risulta basso, maggiore è la stabilità del campione. Tutti i campioni di ALS hanno dato un indice di stabilità basso, si può dedurre che essi avranno un'elevata stabilità nel tempo.

In particolare si deve notare che le formulazioni contenenti Idebenone mostrano dei valori più bassi rispetto alle formulazioni vuote, probabilmente perché l'Idebenone interagisce con la matrice lipidica incrementando la stabilità del sistema.

**Tabella 3.** Indici di stabilità delle formulazioni vuote e contenenti Idebenone.

<b>Campione</b>	<b>Indice di stabilità</b>
ALS A	2.03
ALS A + Idebenone	1.02
ALS D	3.13
ALS D + Idebenone	1.24

### **5.5.2. Valutazione delle dimensioni mediante light scattering**

La determinazione di alcuni dei parametri fondamentali che caratterizzano i vari sistemi carrier, quali le dimensioni medie e l'indice di polidispersione è di notevole importanza sia dal punto di vista tecnologico-applicativo che dal punto di vista dell'efficacia della formulazione *in vivo*. Questi parametri sono in grado di influenzare notevolmente l'efficienza di incapsulazione del sistema, la sua stabilità nel tempo ed il rilascio del principio attivo.

L'analisi dimensionale tramite PCS (Proton Correlation Spettroscopy) dei vari sistemi ha mostrato una notevole diversità tra le preparazioni effettuate nei nostri laboratori, in tabella 4 sono riportati i dati relativi alle dimensioni ed all'indice di polidispersione dei vari carrier valutati. Gli esperimenti sono stati condotti sia sui carrier vuoti che sui carrier contenenti Idebenone. In particolare si osserva che la presenza dell'Idebenone non influenza in modo significativo né le dimensioni né l'indice di polidispersione.

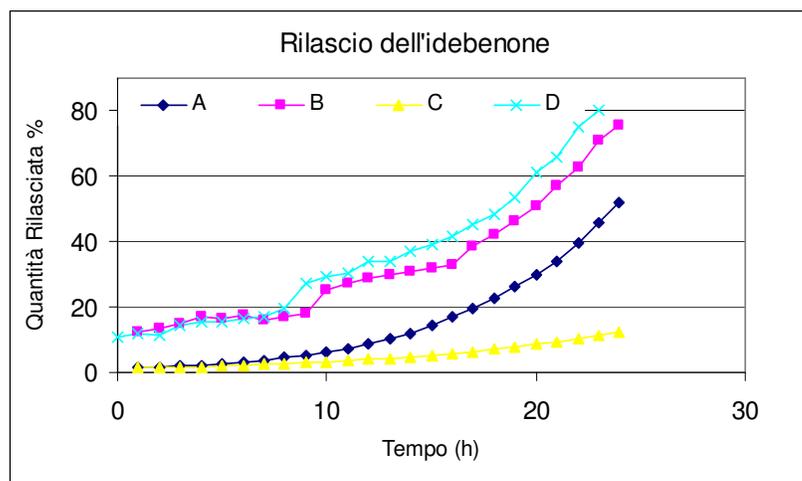
**Tabella 4.** Analisi dimensionale mediante scattering dinamico di luce.

CAMPIONE	Dimensioni	Indice di polidispersione
A	277,7±12.3	0,251±0,007
B	251,1±19.5	0,278±0,009
C	249,7±15.3	0,241±0,011
D	212,1±12.9	0,161±0,007
A <sub>IDE</sub>	272,1±11.8	0,232±0,016
B <sub>IDE</sub>	228,1±10.8	0,251±0,019
C <sub>IDE</sub>	250,2±18.2	0,213±0,005
D <sub>IDE</sub>	208,1±17.2	0,244±0,021

### 5.5.3. Valutazione dei profili di rilascio e di permeazione percutanea

Gli esperimenti effettuati in vitro hanno avuto lo scopo di valutare le caratteristiche di rilascio dell'Idebenone dai carrier utilizzati. In figura 63 sono riportati i profili di rilascio dell'Idebenone.

Le formulazioni A e C hanno mostrato dei profili di rilascio interessanti, ma ancor più lo sono stati quelli delle formulazioni B<sub>IDE</sub> e D<sub>IDE</sub> che alla fine dell'esperimento hanno rilasciato rispettivamente il 75% e l'80% della quantità di farmaco contenuto all'interno delle formulazioni. La formulazione C<sub>IDE</sub> è quella che mostra alla fine dell'esperimento la minore quantità di farmaco rilasciato.



**Fig. 63:** Profili di rilascio dell'Idebenone.

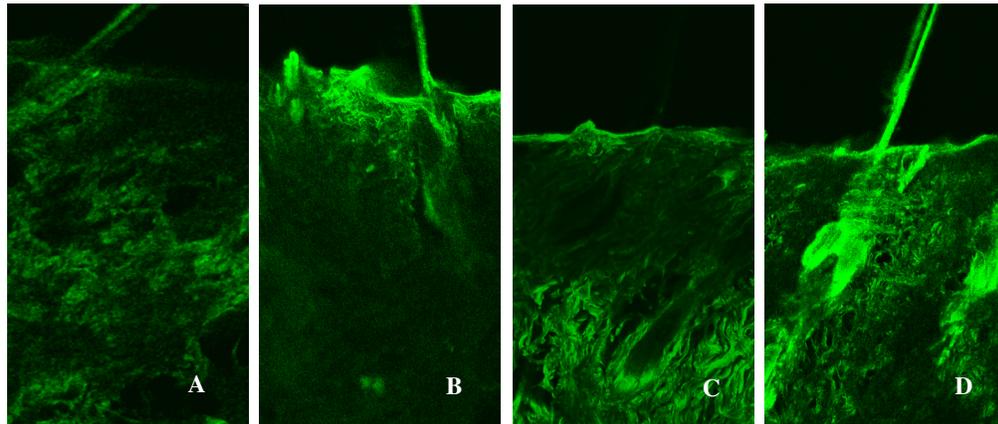
Per valutare la capacità dei vari sistemi di migliorare la cinetica di permeazione per cutanea sono stati effettuati dei saggi *ex vivo* su pelle umana isolata. I profili di permeazione dell'Idebenone attraverso membrane di strato corneo ed epidermide (dati non riportati) mostrano che tutte e quattro le formulazioni sono state in grado di incrementare in modo significativo la permeazione dell'Idebenone rispetto alla sospensione acquosa utilizzata come controllo. In particolare le formulazioni B e D hanno presentato il maggiore incremento di permeazione rispetto al controllo, (quantità permeata alla fine dell'esperimento rispettivamente 55% e 73%), le formulazioni A e C hanno migliorato in modo significativo la permeazione percutanea dell'Idebenone anche se la quantità permeata alla fine dell'esperimento era rispettivamente 17% e 48%.

#### **5.5.4. Studi dell'interazione dei vari carrier con la pelle in vivo**

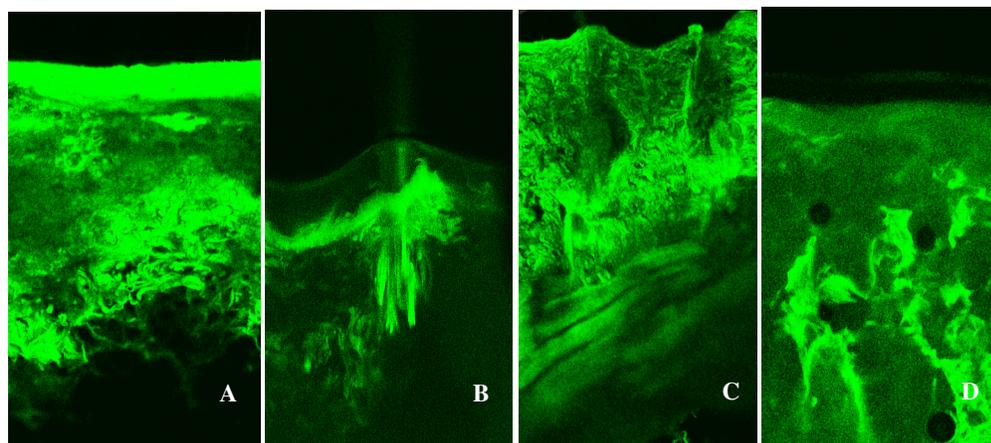
I dati relativi studio di microscopia confocale hanno confermato quelli relativi alla caratterizzazione chimico-fisica, alla valutazione *in vitro* ed *in vivo*.

Gli aggregati lipidici supramolecolari hanno dimostrato di possedere buone potenzialità di trasporto a livello dermico già a 6 ore di applicazione. Infatti a 6 ore la fluorescenza si distribuisce in modo differente rispetto al carrier. Le formulazioni A e C si posizionano durante il corso delle prime 6 ore nello strato corneo e nell'epidermide (figura 64, panel A e C).

Le formulazioni B e D (figura 64, panel B e D) riescono a penetrare attraverso lo strato corneo principalmente attraverso i bulbi piliferi (transfollicolare) e ad arrivare in profondità già in poco tempo. Dopo 24 ore di contatto i risultati sono ancora più marcati (figura 65) confermando per le formulazioni B e D una permeazione principalmente transfollicolare.



**Fig. 64:** Micrografie confocali di sezioni seriali di pelle di ratto trattata con i gli aggregati lipidici supramolecolari dopo 6 ore dall'applicazione.



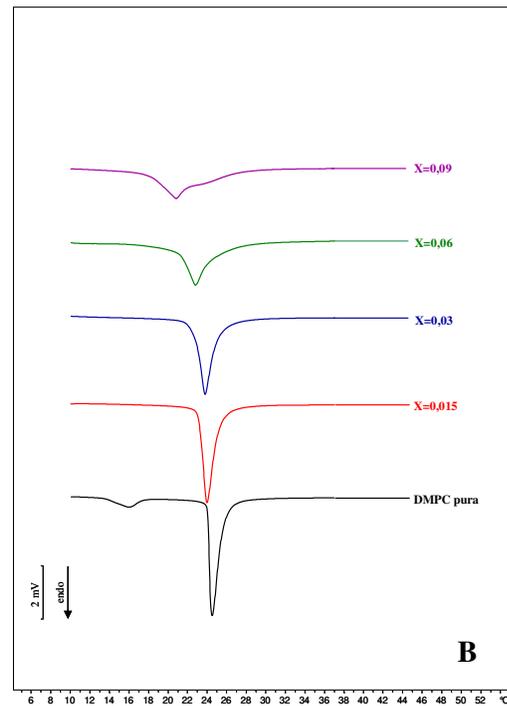
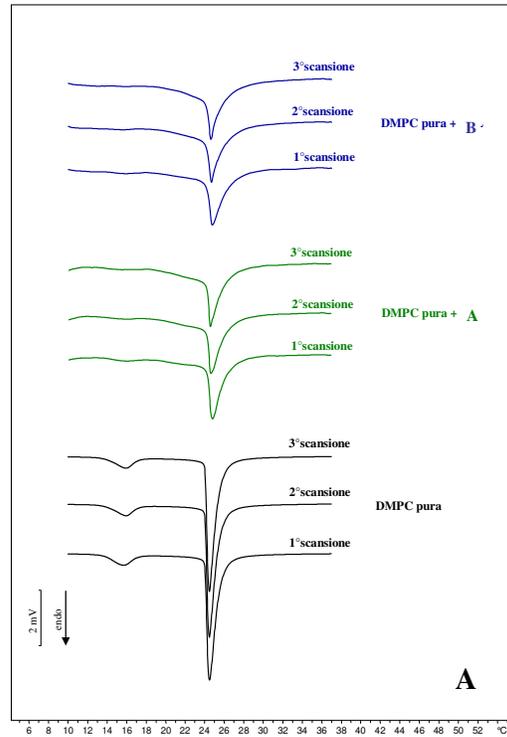
**Fig. 65:** Micrografie confocali di sezioni seriali di pelle di ratto trattata con i gli aggregati lipidici supramolecolari dopo 24 ore dall'applicazione.

### 5.5.5. Analisi DSC

Gli aggregati lipidici supramolecolari, così preparati e caratterizzati sono stati infine studiati mediante Calorimetria a Scansione Differenziale. Sono state caratterizzate due tipi di formulazione a due diverse concentrazioni in presenza e in assenza di Idebenone per un totale di 8 formulazioni.

Tracciati calorimetrici senza alcun effetto termico sono stati ottenuti eseguendo misure calorimetriche sulle formulazioni A, B, C e D pure (60  $\mu$ L) (curve non riportate).

In figura 66 (A) sono riportate le curve calorimetriche delle formulazioni A e B miscelate ad un uguale volume di vescicole multilamellari di DMPC. Inoltre sono riportate le curve di sola DMPC come confronto. Come si può osservare entrambe le formulazioni determinano la scomparsa del picco di pretransizione, una forte riduzione dell'area e uno slargamento del picco, ma non si riscontrano sostanziali differenze tra i due tipi di formulazioni. In figura 66 (B) sono riportate le curve calorimetriche degli MLV di DMPC preparati in presenza di Idebenone a differenti frazioni molari (0,015; 0,03; 0,06; 0,09) in fase organica. Come si può vedere dalle curve il picco di pretransizione scompare già alla frazione molare più bassa ed è possibile notare che all'aumentare della frazione molare diminuisce la temperatura di transizione della miscela con una forte riduzione dell'entalpia, fino ad avere una separazione di fase, alla frazione molare 0,09. In figura 67 (A) sono riportate le tre scansioni calorimetriche della formulazione A<sub>IDE</sub> (Ide X=0,006) miscelata ad uno stesso volume di vescicole multilamellari di DMPC confrontate con la curva calorimetrica della pura DMPC (in nero). Quello che si osserva da questo tracciato calorimetrico è un totale abbattimento del picco con una notevole riduzione dell'entalpia, una scomparsa del picco di pretransizione, e uno spostamento del picco principale verso più basse temperature. In realtà il termogramma non sembra essere costituito da un unico picco bensì da due più evidenti nella prima scansione e meno nella terza. In figura 67 (B) sono riportate le tre scansioni della formulazione B<sub>IDE</sub> (Ide X=0,006) miscelata ad uno stesso volume di vescicole multilamellari di DMPC. In nero è riportata la curva calorimetrica della pura DMPC come confronto. Come si può evincere dal termogramma già dalla prima scansione scompare il picco di pretransizione e si ha un abbassamento della  $T_m$ . Anche in questo caso si nota uno slargamento del picco con la comparsa di una separazione di fase, più evidente che per la formulazione A<sub>IDE</sub>, e la presenza di un leggero picco a valori di temperatura più alti a causa dall'interazione dell'Idebenone con il lipide.



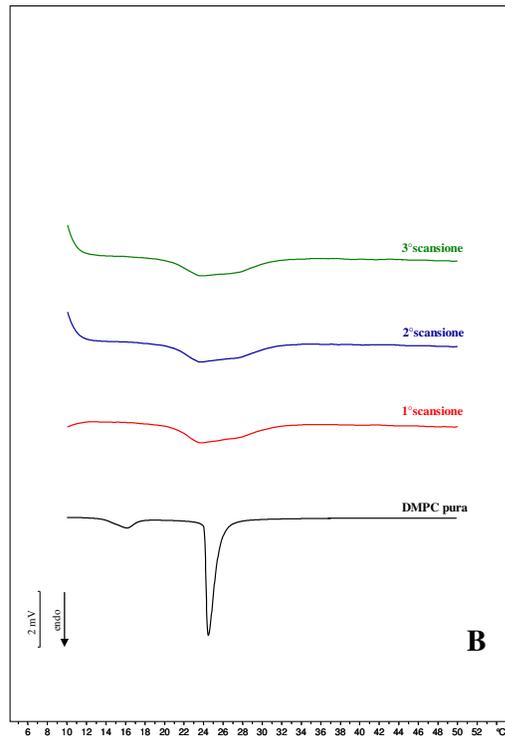
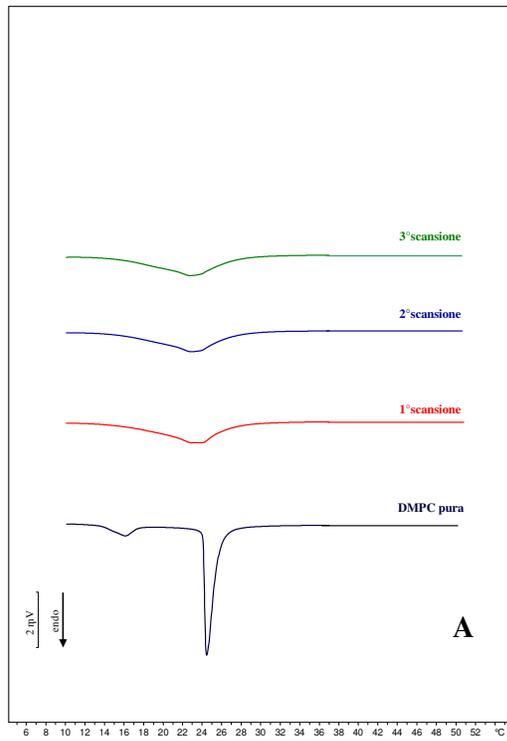
**Fig. 66:** (A) Curve calorimetriche delle formulazioni A e B miscelate ad uno stesso volume di vescicole multilamellari di DMPC. In nero le curve calorimetriche della pura DMPC. (B) Curve calorimetriche di MLV di DMPC preparati in presenza di Idebenone a differenti frazioni molari

In figura 68 (A) sono riportate le curve calorimetriche relative alla cinetica della formulazione B messa a contatto con gli MLV di DMPC pura. La curva r rappresenta gli MLV di DMPC pura miscelati alla formulazione B ed è usata come confronto in quanto rappresenta l'effetto massimo ottenibile. Dopo la prima ora si nota la scomparsa del picco di pretransizione ed è possibile notare che all'aumentare del tempo di contatto non ci sono rilevanti variazioni nel valore della temperatura di transizione rispetto alla DMPC pura. Il valore della  $T_m$  nell'ultima scansione si avvicina a quello degli MLV di DMPC pura miscelati alla formulazione B.

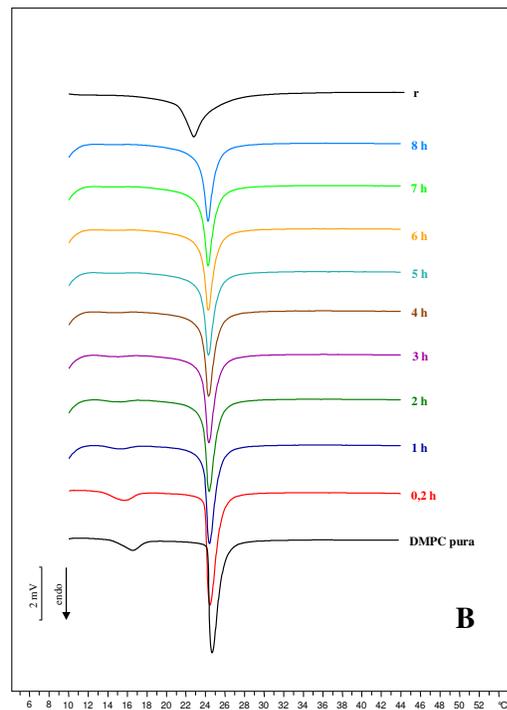
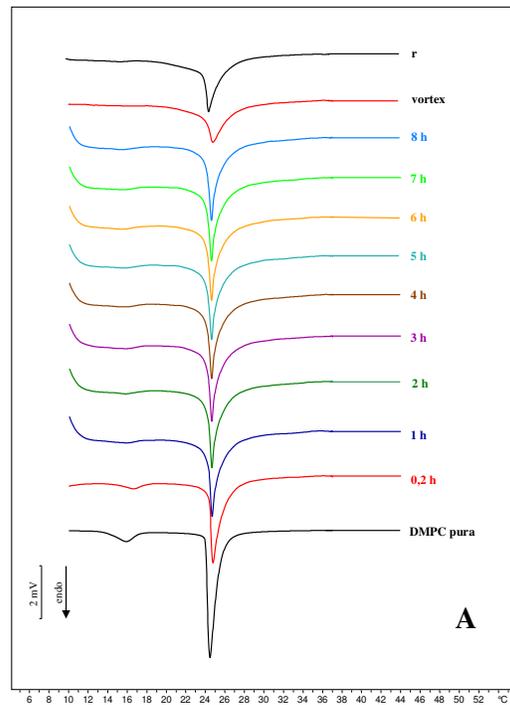
Lo stesso crogiolo utilizzato nell'esperimento è stato sottoposto a vorticizzazione e riscaldamento per favorire l'interazione tra gli MLV di DMPC e la formulazione, la curva è riportata in figura 60. Quello che si osserva è un notevole effetto sull'entalpia del sistema, che si manifesta con l'abbattimento del picco principale, confermando il tipo di interazione che si osserva per la curva r, la massima interazione ottenibile, evidenziando l'incapacità del sistema di interagire spontaneamente con gli MLV. Le curve calorimetriche relative alla cinetica della formulazione A messa a contatto con gli MLV di DMPC pura (curve non riportate), mostrano un andamento simile a quelle della formulazione B.

In figura 68 (B) sono riportate le curve calorimetriche di MLV di DMPC messi in contatto con Idebenone alla frazione molare 0,06. r rappresenta l'effetto massimo ottenibile, estrapolato dalle curve calorimetriche dei liposomi di DMPC preparati in presenza di Idebenone in fase organica.

Si osserva una piccola e graduale diminuzione della  $T_m$ . Il picco di pretransizione si abbatte ma non scompare del tutto fino alla quinta scansione. L'entalpia non subisce grandi variazioni. In ogni caso non si raggiunge il massimo trasferimento dell'Idebenone come si ha nella fase organica.



**Fig. 67:** Curva calorimetrica della formulazione A<sub>IDE</sub> (**A**) e B<sub>IDE</sub> (**B**), (Ide X=0,006) miscelata ad uno stesso volume di vescicole multilamellari di DMPC. In nero la curva calorimetrica della pura DMPC.



**Fig. 68:** (A) Curve calorimetriche degli MLV di DMPC pura lasciati in contatto con la formulazione B a differenti tempi di incubazione. r= MLV di DMPC pura miscelati alla formulazione B. (B) Curve calorimetriche di MLV di DMPC messi in contatto con Idebenone alla frazione molare 0,06. r rappresenta l'effetto massimo ottenibile, ottenuto dalle curve calorimetriche dei liposomi di DMPC preparati in presenza di Idebenone in fase organica.

In figura 69 (A) sono mostrate le curve calorimetriche relative alla cinetica di rilascio della formulazione  $A_{IDE}$ , messa a contatto con gli MLV di DMPC. La curva di riferimento  $r$  è rappresentata dalla curva degli MLV di DMPC miscelati alla formulazione  $A_{IDE}$ .

Si osserva la scomparsa del picco di pretransizione già dalla prima ora di incubazione, tuttavia pur avendo un piccolo spostamento del picco principale verso più basse temperature con una diminuzione dell'entalpia, non si raggiunge la massima interazione possibile che invece si ha per vorticizzazione del campione.

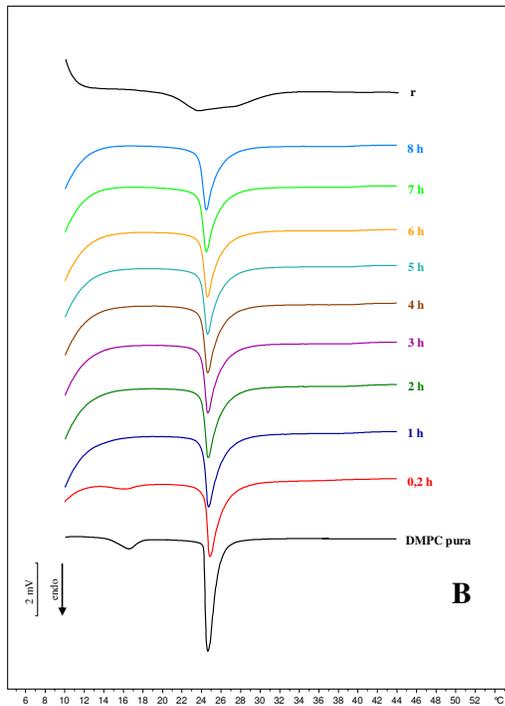
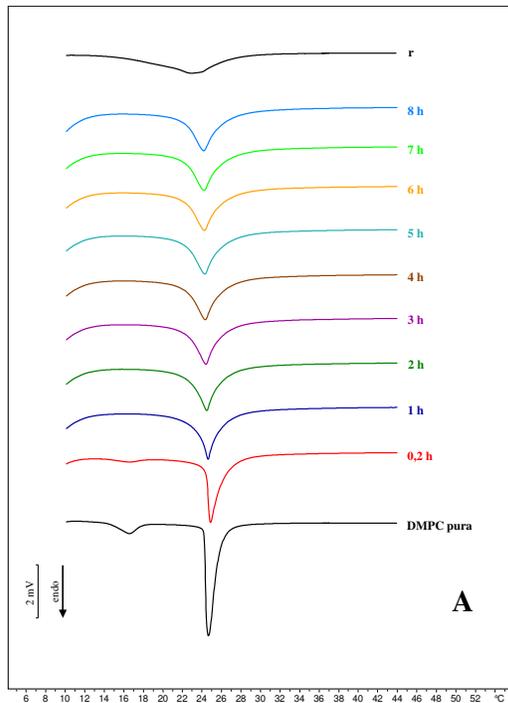
In figura 69 (B) sono mostrate le curve calorimetriche della cinetica di rilascio della formulazione  $B_{IDE}$ . La curva di riferimento  $r$  è rappresentata dalla curva degli MLV di DMPC miscelati alla formulazione  $B_{IDE}$ .

Si può osservare la scomparsa del picco di pretransizione già dalla prima ora d'incubazione.

Anche in questo caso pur avendo un piccolo spostamento del picco verso più basse temperature con una diminuzione dell'entalpia non si raggiunge la massima interazione possibile che invece si ha per vorticizzazione del campione.

In figura 70 (A) sono mostrate le curve calorimetriche della formulazione C miscelata ad uno stesso volume di vescicole multilamellari di DMPC. In nero è riportata la curva calorimetrica della pura DMPC. La prima scansione mostra un picco a  $22,99^{\circ}\text{C}$  più piccolo rispetto a quello delle scansioni successive che ne presentano uno piuttosto slargato intorno a  $20^{\circ}\text{C}$ . In definitiva si può osservare un completo abbattimento del picco calorimetrico della DMPC pura.

La figura 70 (B) mostra le curve calorimetriche della formulazione D miscelata ad uno stesso volume di vescicole multilamellari di DMPC. In nero è riportata la curva calorimetrica della pura DMPC. Nella prima scansione è presente un picco a  $23,85^{\circ}\text{C}$ , nella seconda scansione a  $23,45^{\circ}\text{C}$  e nella terza a  $23,89^{\circ}\text{C}$ . Tra la prima e l'ultima scansione è possibile notare una diminuzione dell'entalpia. Anche in questo caso l'entalpia del sistema diminuisce notevolmente in presenza della formulazione.



**Fig. 69:** (A) Curve calorimetriche degli MLV di DMPC pura lasciati in contatto con la formulazione  $A_{IDE}$  a differenti tempi di incubazione.  $r$ = MLV di DMPC pura miscelati alla formulazione  $A_{IDE}$ . (B) Curve calorimetriche degli MLV di DMPC pura lasciati in contatto con la formulazione  $B_{IDE}$  a differenti tempi di incubazione.  $r$ = MLV di DMPC pura miscelati alla formulazione  $B_{IDE}$ .

In figura 71 (A) sono rappresentate le curve calorimetriche della formulazione  $C_{IDE}$  (Ide  $X=0,06$ ) miscelata ad uno stesso volume di MLV di DMPC. In nero è riportata la curva calorimetrica della pura DMPC. Il sistema mostra un picco molto slargato intorno a  $18-19^{\circ}\text{C}$  presente in tutte e tre le scansioni. Le curve calorimetriche hanno un andamento simile a quello visto per la formulazione C pura. Di conseguenza è possibile evincere che sia per la formulazione C pura che per quella contenente l'Idebenone ( $X=0,06$ ) ( $C_{IDE}$ ) non ci sono rilevanti variazioni per quanto riguarda gli esperimenti di interazione.

In figura 71 (B) sono riportate le curve calorimetriche della formulazione  $D_{IDE}$  (Ide  $X=0,06$ ) miscelata ad uno stesso volume di vescicole multilamellari di DMPC. In nero è mostrata la curva calorimetrica della pura DMPC. Utilizzando questa formulazione la temperatura del picco principale è spostata verso valori più alti, intorno a  $33^{\circ}\text{C}$ , per tutte e tre le scansioni. E' quindi possibile ipotizzare un'interazione dell'Idebenone con il lipide presente nella formulazione.

In figura 72 (A) sono mostrate le curve calorimetriche relative alla cinetica della formulazione C pura, messa a contatto con gli MLV di DMPC. La curva di riferimento r rappresenta la curva della sola formulazione C. Nella prima scansione, quindi dopo pochi minuti dalla messa in contatto, si osserva una riduzione del picco di pretransizione così come del picco principale ma la temperatura rimane invariata. Già dalla seconda scansione si osserva la scomparsa del picco di pretransizione della DMPC, una diminuzione della  $T_m$  di circa un grado centigrado, mentre l'entalpia rimane pressoché invariata. All'aumentare del tempo di incubazione la  $T_m$  continua a spostarsi a valori leggermente più bassi così come l'entalpia non raggiungendo il valore dato dalla curva di riferimento.

Solo dopo vorticizzazione del campione per due minuti dopo le 16 ore si ottiene una curva simile alla curva di riferimento r che rappresenta la massima interazione ottenibile.

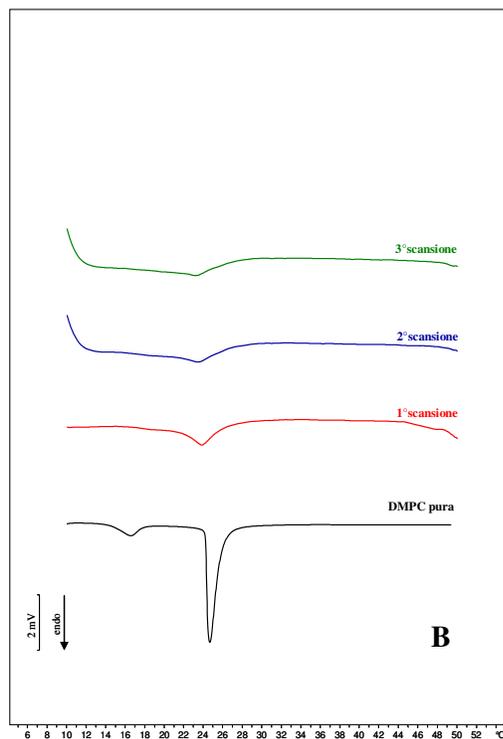
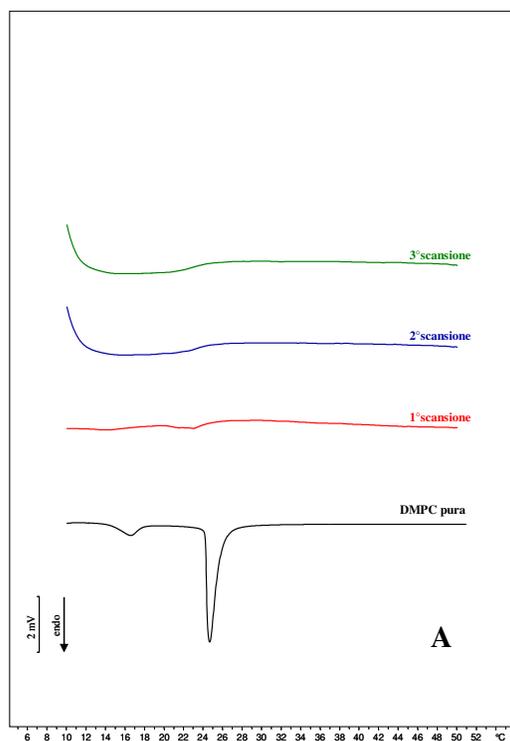
In figura 72 (B) sono mostrate le curve calorimetriche relative alla cinetica della formulazione D pura, messa a contatto con gli MLV di DMPC. La curva di riferimento r rappresenta la curva della sola formulazione D. Nella prima scansione non si notano grandi variazioni della temperatura di transizione, si evidenzia solo un leggero abbattimento del picco di pretransizione. Alla seconda scansione si ha invece una diminuzione di circa un grado centigrado della  $T_m$  con un leggero abbassamento dell'entalpia. Dal terzo ciclo in poi la temperatura continua a diminuire leggermente

così come l'entalpia. Anche per la formulazione D, per la completa interazione con i liposomi, è necessaria la vorticizzazione del campione a 16 h per due minuti. Solo dopo vorticizzazione, infatti, si raggiunge l'interazione massima mostrata dalla curva di riferimento r.

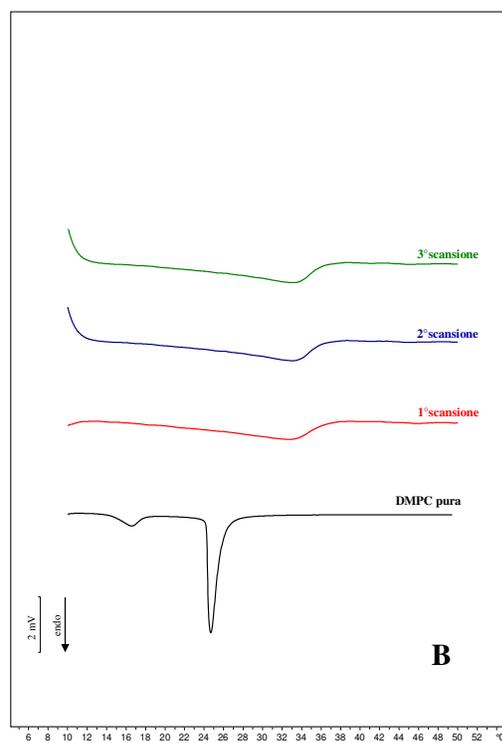
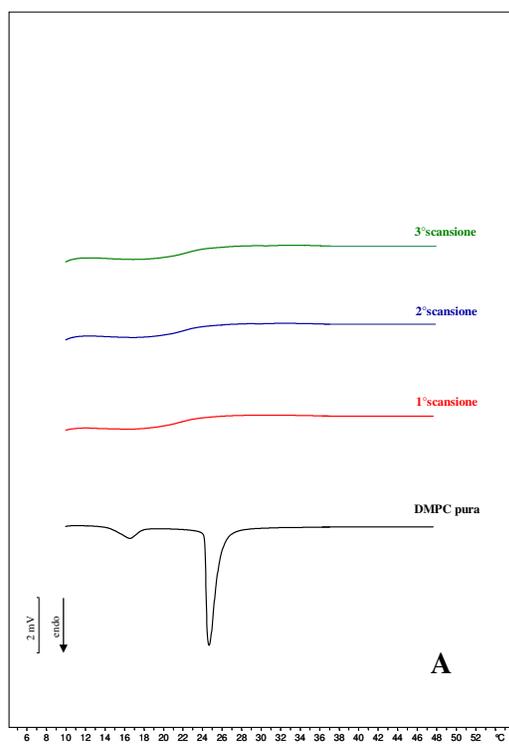
In figura 73 (A) sono mostrate le curve calorimetriche relative alla cinetica di rilascio della formulazione  $C_{IDE}$  ( $X=0,06$ ), messa a contatto con gli MLV di DMPC. La curva di riferimento r rappresenta la curva degli MLV di DMPC miscelati alla formulazione  $C_{IDE}$ . La prima scansione mostra subito la scomparsa del picco di pretransizione e una diminuzione dell'entalpia. Il valore della  $T_m$  invece rimane invariato.

Dalla seconda scansione si ha però un abbattimento totale del picco principale con uno spostamento della  $T_m$  a valori più bassi senza però raggiungere il valore della curva di riferimento r che rappresenta la massima interazione ottenibile.

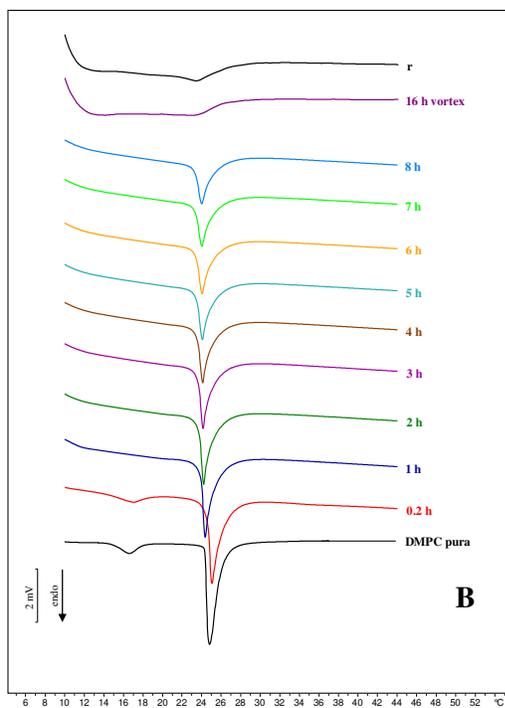
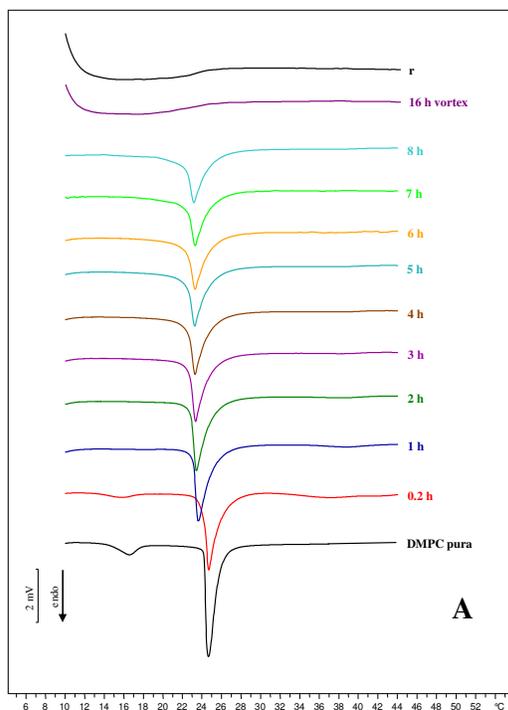
In figura 73 (B) sono mostrate le curve calorimetriche relative alla cinetica della formulazione  $D_{IDE}$  messa a contatto con gli MLV di DMPC. La curva di riferimento r rappresenta la curva degli MLV di DMPC miscelati alla formulazione di  $D_{IDE}$ . Anche in questo caso per la prima scansione si osserva la scomparsa del picco di pretransizione con una diminuzione della  $T_m$  e una forte riduzione dell'entalpia. All'aumentare del tempo di incubazione si osserva un ancor più evidente abbattimento del picco con uno spostamento del valore di  $T_m$  del picco principale verso temperature più alte, come già osservato negli esperimenti di interazione, rafforzando quindi l'idea di una possibile interazione dell'Idebenone con il lipide presente nella formulazione D tale da destabilizzare completamente la matrice fosfolipidica dei nostri modelli di biomembrana.



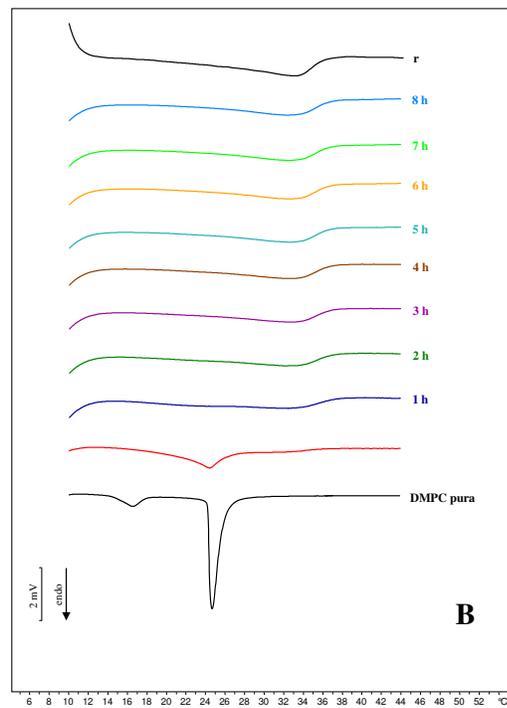
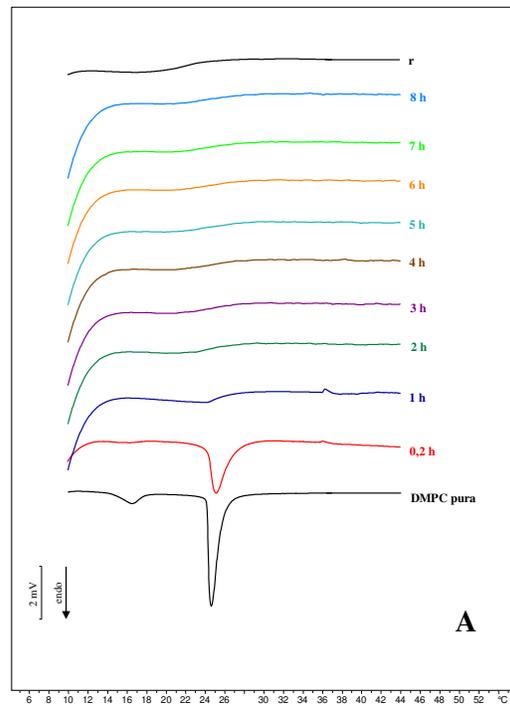
**Fig. 70:** Curve calorimetriche della formulazione C (**A**) e della formulazione D (**B**) miscelate ad uno stesso volume di vescicole multilamellari di DMPC. In nero la curva calorimetrica della pura DMPC.



**Fig. 71:** Curva calorimetrica della formulazione  $C_{IDE}$  (**A**) e  $D_{IDE}$  (**B**), ( $X_{IDE}=0,06$ ) miscelata ad uno stesso volume di vescicole multilamellari di DMPC. In nero la curva calorimetrica della pura DMPC.



**Fig. 72:** Curve calorimetriche degli MLV di DMPC pura lasciati in contatto con la formulazione C (**A**) e con la formulazione D (**B**), a differenti tempi di incubazione. r= MLV di DMPC pura miscelati alle formulazioni.



**Fig. 73:** Curve calorimetriche degli MLV di DMPC pura lasciati in contatto con la formulazione  $C_{IDE}$  (A) e  $D_{IDE}$  (B), ( $I_{de} X=0,06$ ) a differenti tempi di incubazione. r= MLV di DMPC pura miscelati alle formulazioni.

## 5.6. Conclusioni

In questo lavoro sono stati preparati degli aggregati lipidici supramolecolari, interessanti drug delivery system prodotti da lipidi solidi, le cui potenzialità sono state valutate per la veicolazione dell'Idebenone per uso topico nel trattamento di patologie correlate con l'incremento di radicali liberi. Dagli studi effettuati è emerso che:

- I sistemi si sono mostrati piuttosto stabili nel tempo sia in assenza che in presenza di Idebenone.
- L'analisi dimensionale ha evidenziato che l'incorporamento dell'Idebenone non apporta significativi incrementi delle dimensioni medie.
- I profili di rilascio e di permeazione hanno mostrato delle diverse caratteristiche in funzione della composizione.
- La microscopia confocale ha mostrato che le formulazioni B e D presentano un preferibile meccanismo di permeazione transfollicolare.
- Esaminando i risultati ottenuti relativi agli esperimenti di calorimetria si evince che i tracciati calorimetrici delle formulazioni pure A, B, C, D non mostrano nessun effetto termico rilevante.

Tutte otto le formulazioni interagiscono con i modelli di biomembrana ma in maniera differente. In particolare tra le formulazioni senza il farmaco si è osservato che le meno concentrate (A e B) hanno un piccolo effetto sui modelli di biomembrana, sia in presenza che in assenza del lipide. Le formulazioni più concentrate C e D, invece, destabilizzano maggiormente il sistema liposomiale; la presenza del lipide (D) inoltre modifica il tipo di interazione con gli MLV di DMPC e ciò si evidenzia nel tracciato calorimetrico con la presenza di un secondo picco spostato a temperature più alte. Per quanto riguarda le formulazioni preparate in presenza dell'Idebenone, per tutte e quattro si osserva una maggiore interazione con i modelli di biomembrana e ciò potrebbe essere spiegato da una possibile interazione del farmaco con il carrier. In particolare è emerso che nelle formulazioni contenenti il lipide, e più concentrate, si ha ancor più questa azione destabilizzante sui sistemi liposomiali. Anche per queste ultime formulazioni, la presenza del lipide modifica l'interazione con le vescicole fosfolipidiche spostando ulteriormente il picco verso più alte temperature.

In conclusione proprio queste ultime formulazioni sono quelle che meglio si prestano all'utilizzo come carrier per il rilascio di farmaci attraverso la cute.

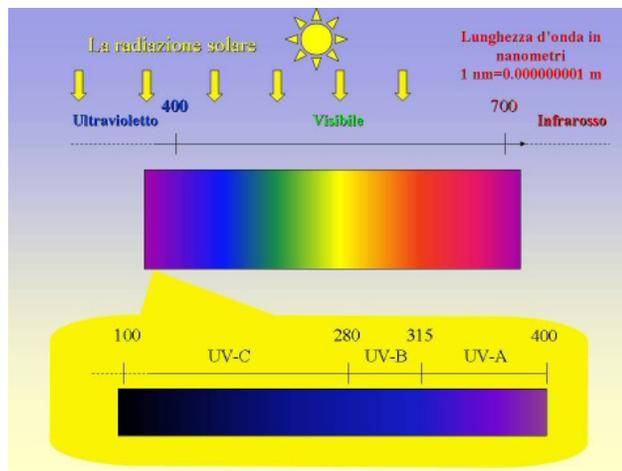
## 6. CARATTERIZZAZIONE DI SLN COME CARRIER PER LA VEICOLAZIONE DI FILTRI SOLARI

Scopo di questo lavoro è stata la caratterizzazione, dal punto di vista chimico-fisico e tecnologico, di Nanoparticelle Solide Lipidiche (SLN) vuote o utilizzate come sistema carrier per la veicolazione di due filtri solari *Ottimetossicinnamato* (OMC) e *Butilmetossidibenzoilmetano* (BMBM); infatti, tali sostanze veicolate per mezzo delle SLN risultano meno irritanti con una concomitante riduzione del loro assorbimento sistemico (R. H. Muller et al., 2002; J. Pardeike. et al., 2009).

### 6.1. Le radiazioni UV e gli effetti sulla cute umana

L'energia emessa dal sole, sottoforma di radiazione elettromagnetica, copre un intervallo di lunghezza d'onda che si estende da 250 nm a 3000 nm.

Le radiazioni con lunghezze d'onda comprese tra 400 nm e 200 nm vengono comunemente indicate come radiazioni ultraviolette, o semplicemente UV. La figura 74 mostra la loro posizione nello spettro elettromagnetico, rispetto alla luce visibile ed alla luce infrarossa.



**Fig. 74:** La radiazione solare e la regione ultravioletta.

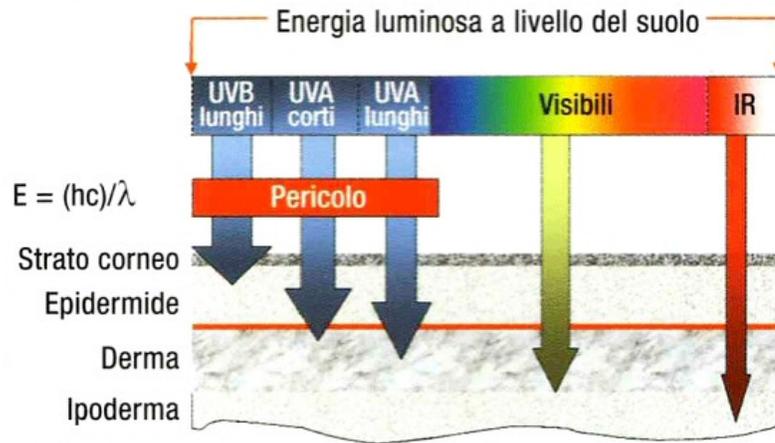
All'interno della regione ultravioletta si individuano, convenzionalmente, tre bande: UVA (400-315 nm), UVB (315-280 nm) e UVC (280-130 nm).

Tra le radiazioni UV, le UVC sono le più energetiche ed incompatibili con qualsiasi forma di vita, in quanto interagiscono fortemente con i costituenti fondamentali delle cellule viventi, quali gli acidi nucleici e le proteine; questa regione spettrale viene denominata germicidal region.

La regione delle radiazioni UVB, invece, è responsabile dell'insorgenza di reazioni di fotosensibilizzazione (eritemi e scottature solari) ed ipercheratosi provocate da prolungate esposizioni della pelle ai raggi solari ed è correlata ad un aumento del rischio d'insorgenza di tumori cutanei; questa regione intermedia di radiazioni UV viene definita erythematous region.

La regione degli UV a più basso contenuto energetico è la UVA, chiamata anche tanning region poichè determina un iniziale processo di abbronzatura naturale della pelle. Anche in questo caso, però, un'esposizione non corretta ai raggi UVA può essere dannosa alla pelle provocandone l'invecchiamento, innescando reazioni fotoallergiche e fototossiche ed aumentando il rischio per lo sviluppo di tumori cutanei. Le UVA, inoltre, potenziano gli effetti biologici delle UVB; è stato, infatti, sperimentalmente dimostrato che la pelle irradiata da UVA e sottoposta successivamente a radiazioni UVB, risulta molto più sensibile ai danni biologici prodotti da queste ultime.

Fortunatamente, l'ossigeno ( $O_2$ ) e l'ozono ( $O_3$ ), presenti nell'atmosfera, arrestano le radiazioni dotate di maggiore energia (quali le UVC e le UVB corte) che, così, non raggiungono la superficie terrestre. In tal modo, l'ossigeno e l'ozono provvedono, con il loro assorbimento, a proteggere l'uomo dalle radiazioni UV più pericolose; tuttavia, circa un 10 % di UVB riesce ad attraversare l'atmosfera e raggiungere il suolo causando diversi effetti dannosi per la salute umana. Gli UVA, invece, non sono assorbiti dall'ozono e costituiscono, quindi, la maggior parte della radiazione UV che raggiunge la superficie terrestre. La figura 75 mostra la penetrazione della radiazione solare nella pelle.



**Fig. 75:** La penetrazione della radiazione solare nella pelle.

Si può notare che le UVB penetrano fino agli strati superficiali della pelle (quelli dell'epidermide) non riuscendo ad andare oltre; invece, le UVA attraversano i vari strati dell'epidermide fino a raggiungere lo strato basale ed il derma. La pelle esposta alle radiazioni solari reagisce mettendo in moto dei meccanismi di difesa come la produzione di acido urocanico che assorbe radiazioni UVB passando dalla forma cis, in cui si trova normalmente, alla forma trans.

Tale meccanismo di protezione risulta, comunque, poco efficace dal momento che l'acido urocanico viene prodotto in quantità modeste come metabolita dell'istidina ed inoltre, essendo idrosolubile viene rimosso facilmente dall'acqua e dal sudore.

Il meccanismo di protezione della pelle che rappresenta la difesa più efficace dalle radiazioni solari è il processo di melanogenesi; infatti, la melanina è la difesa chimica di cui dispone l'organismo. Si suppone che la melanina svolga la sua azione fotoprotettiva attraverso i seguenti processi:

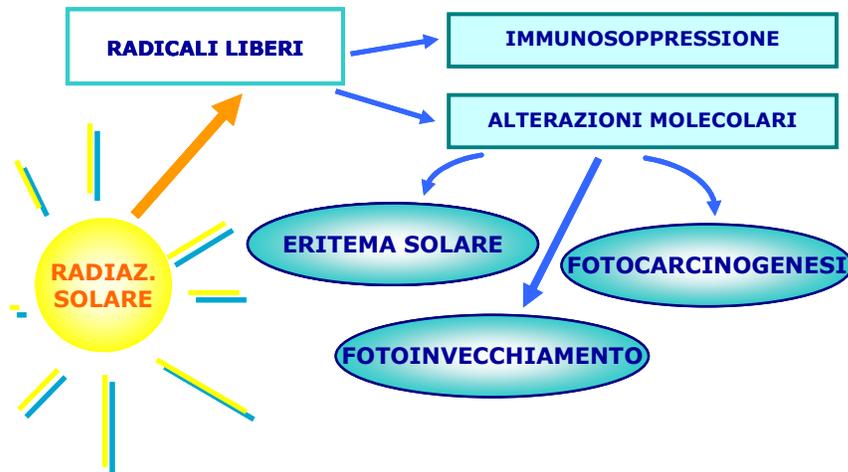
- diffusione della luce;
- assorbimento dell'energia radiante e sua dissipazione sotto forma di calore;

- formazione del radicale libero stabile della melanina che agisce attraverso la sua capacità di ossidoriduzione, al fine di proteggere i tessuti contro le condizioni in grado di rilasciare dei radicali liberi che potrebbero indurre un metabolismo cellulare distruttivo.

Se l'esposizione al sole è persistente, la melanina non riesce più a bloccare l'insulto continuo delle radiazioni ed allora, scatta un meccanismo naturale di difesa fisica che consiste nell'aumento della mitosi cheratinocitica, definito ipercheratosi. Tale fenomeno di intensa e veloce cheratinizzazione determina un ispessimento dello strato corneo che contribuisce a proteggere la pelle attenuando la penetrazione delle radiazioni UV negli strati più profondi dell'epidermide e del derma.

Per contrastare gli insulti dello stress ossidativo fotoindotto che provocano gravi alterazioni del materiale lipidico, proteico e genomico, lo strato corneo è dotato di un suo coordinato sistema di difese, di cui fanno parte fattori antiossidanti di tipo enzimatico e radical scavengers a basso peso molecolare. Tra questi ultimi, un ruolo determinante è svolto dalla vitamina E che, per le sue proprietà lipofile, ben si presta ad operare in ambiente idrofobico. Lo strato corneo, però, non può ricevere dalla circolazione un apporto di fattori di protezione in grado di rimpiazzare quelli perduti; pertanto, diviene importante assicurare una via alternativa di rifornimento, quale quella del sebo, il quale contiene una grande quantità di tocoferoli (tra cui la vitamina E). Anche lo squalene del sebo, in forma non ossidata, svolge la funzione di radical scavenger, tuttavia, quando l'aggressione delle specie radicaliche ne determina la lipoperossidazione si producono composti potenzialmente citotossici in grado di causare riduzione delle difese immunologiche locali e manifestazioni di skin aging. Quando l'esposizione alle radiazioni solari non è graduale e la pelle non ha il tempo di adeguarsi alle condizioni cui è sottoposta, essa risulta essere priva di naturale protezione e quindi, più sensibile ai danni (acuti e cronici) delle radiazioni UV.

Gli effetti negativi più diffusi sono: l'eritema, le ustioni solari, la fotoimmunosoppressione, il fotoinvecchiamento cutaneo e la fotocarcinogenesi (figura 76).



**Fig. 76:** Schema riassuntivo degli effetti negativi provocati dall'esposizione alle radiazioni solari.

Scottature ed eritema solare sono gli effetti acuti più noti dell'esposizione eccessiva e non progressiva alle radiazioni UV. L'eritema è dovuto ad una temporanea vasodilatazione del microcircolo sottoepidermico, causata dalle radiazioni UVB, e consiste nella comparsa di un tipico arrossamento transitorio della cute, spesso accompagnato da bruciore e/o edema (gonfiore) della zona interessata. Se l'esposizione è stata particolarmente intensa si può avere anche la comparsa di vescicole seguite da erosioni (ustioni solari).

La fotoimmunosoppressione, esercitata in particolare dalle radiazioni UVA, è dovuta soprattutto all'azione diretta sulle cellule di Langerhans, ma si esplica anche indirettamente, tramite la produzione di citochine da parte dei cheratinociti. Questa proprietà delle radiazioni UV è stata sfruttata per la cura di numerose patologie dermatologiche (fototerapia), ma è anche un importante elemento patogenetico per lo sviluppo di tumori cutanei.

Il fotoinvecchiamento (o photoaging) è un fenomeno rilevante a carico della cute dovuto ad intensa e prolungata esposizione ai raggi solari e/o a fonti artificiali di radiazioni UV. Quest'effetto cronico, strettamente legato allo stile di vita o all'attività svolta da un individuo, è tanto più precoce e marcato quanto più la pelle è chiara o non

adeguatamente protetta e si manifesta con la comparsa dei segni che fisiologicamente compaiono con l'invecchiamento cutaneo in età avanzata (cronoinvecchiamento). Tali segni clinici compaiono nelle zone più esposte al sole (quali viso, collo e mani) e si caratterizzano per l'aumento dello spessore (ipercheratosi), della secchezza e della rugosità cutanei e per una riduzione dell'elasticità, accompagnati dalla comparsa di ipercromie pigmentarie ed altre lesioni pigmentate della pelle. Le ipercromie cutanee od ipermelanosi sono macchie scure legate ad un accumulo anomalo del pigmento melanico nella cute dovute a cause acquisite e non genetiche, quindi, con un meccanismo patologico solo di tipo ambientale. Tra le cause più frequenti delle ipermelanosi abbiamo: il photoaging, l'esposizione al sole post-gravidanza o durante l'uso di contraccettivi e la somministrazione di sostanze topiche o sistemiche fotosensibilizzanti (come gli antibiotici, i cortisonici ed altri farmaci). È ormai riconosciuto, inoltre, che i principali responsabili delle macchie scure della pelle sono i radicali liberi associati ad errata fotoesposizione.

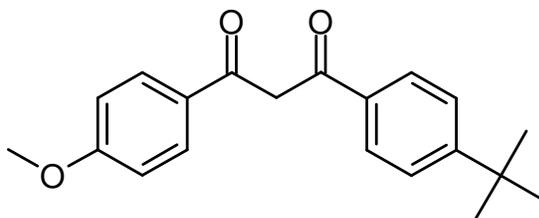
La fotocarcinogenesi, ossia l'insorgenza di tumori cutanei associati all'esposizione ai raggi UV (principalmente UVA), rappresenta oggi la maggiore causa dell'aumento dell'incidenza dei tumori della pelle registrata negli ultimi trent'anni nelle popolazioni sviluppate. I raggi UV sembra che agiscano mediante l'attivazione di oncogeni, l'inattivazione di geni oncosoppressori e l'inibizione dei meccanismi immunitari cutanei di sorveglianza nei confronti della trasformazione neoplastica. A livello molecolare, inoltre, le radiazioni UV possono agire sia direttamente sul DNA, sia indirettamente tramite la produzione di radicali liberi.

Al fine di diminuire il fotoinvecchiamento ed in generale, i danni della pelle legati all'esposizione alle radiazioni solari si deve effettuare una corretta ed efficiente fotoprotezione, fin dalla prima infanzia, capace di schermare l'intero range di raggi UVA-UVB.

I protettori solari topiche che oggi l'uomo ha a sua disposizione sono sostanze chimiche che vengono divise in due categorie: gli schermi solari "total block" ed i filtri solari. Gli schermi solari od agenti di protezione fisica "total block" sono sostanze chimiche di natura inorganica o più raramente metallorganica che, una volta applicate sulla pelle, tendono a riflettere o a disperdere le radiazioni ultraviolette incidenti. L'effetto di schermo totale dipende dalle basi di pigmento bianco presenti nel preparato e dallo spessore dello strato formato sulla pelle. Gli schermi solari più in uso sono: il

carbonato di magnesio, il biossido di titanio, l'ossido di zinco, il talco, il caolino, lo stearato di zinco, l'ossido di magnesio, l'ossido e l'idrossido di alluminio.

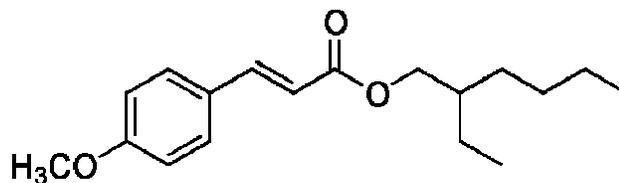
I filtri solari od agenti di protezione chimica sono sostanze chimiche che agiscono assorbendo le radiazioni ultraviolette pericolose (con lunghezza d'onda pari a 250-340 nm) convertendole in radiazioni inattive ed innocue di lunghezza d'onda maggiore (al di sopra dei 380 nm). Sono efficaci a basse concentrazioni (generalmente 2-10%) e possono essere incorporati in molti prodotti cosmetici funzionali. Le sostanze chimiche assorbenti impiegate nei prodotti cosmetici si possono classificare nei seguenti gruppi: i para-amminobenzoati, i salicilati, i cinnammati, i benzofenoni, gli antranilati, i derivati del dibenzoilmetano e del benzoilresorcinolo. In particolare, nella classe dei derivati del dibenzoilmetano (sostanze che assorbono le radiazioni UVA) il filtro più comunemente usato è il Butilmetossidibenzoilmetano (BMBM).



**Fig. 77:** Formula di struttura del BMBM.

Esso mostra un'alta capacità schermante, ma subisce decomposizione se esposto a radiazioni solari, il che porta ad una riduzione della sua efficacia protettiva (*N. Tarras-Wahlberg et al., 1999; E. Chatelain and B. Gabard, 2001; C. A. Bonda, 2005*). Questa fotodegradazione del BMBM, inoltre, porta alla formazione di radicali liberi che potrebbero, direttamente o indirettamente, danneggiare la pelle (*S. Scalia et al., 2002; E. Damiani et al., 2006*).

L'instabilità del BMBM può essere ridotta dall'aggiunta di un filtro UVB, appartenente alla classe dei cinnammati (derivati dell'acido cinnamico), come l'Ottilmetossicinnamato (OMC).



**Fig. 78:** Formula di struttura dell'OMC.

Nella sua struttura chimica, l'OMC presenta un'insaturazione coniugata con l'anello aromatico e con la porzione carbonilica dell'estere per cui è soggetto ad isomeria cis-trans (*L. R. Gaspar and P. M. Maia Campos, 2006*). A temperatura ambiente, si presenta come un liquido di colore giallo più o meno intenso, molto solubile nei solventi organici e negli oli, ma insolubile in acqua, caratteristica che lo rende adatto alle formulazioni resistenti all'acqua. Esso ha una buona sicurezza d'impiego, in quanto è non tossico, non irritante per la pelle, non sensibilizzante, né mutageno (*S. Pattanaargson and P. Limphong, 2001; S. Schneider et al., 2005*).

In questo lavoro sono state caratterizzate SLN da utilizzare come sistema carrier per la veicolazione di BMBM e di OMC; tali principi attivi sono destinati all'applicazione topica e non dovrebbero subire assorbimento transdermico né sistemico.

## 6.2. Materiali

Il Ceteth-20 (Brij 58) è stato ottenuto da Fluka (Germany); il Gliceril oleato (Tegin O) da A.C.E.F. (Italy). Il Cetil Palmitato (Cutina CP) è stato fornito da Cognis S.p.a. Care Chemicals (Italy). Il Butilmetossidibenzoilmetano (BMBM) e l'Ottimetossicinnamato (OMC) forniti da BASF (Germany). L'acqua preservata, usata per la preparazione delle SLN, è stata preparata aggiungendo all'acqua distillata l'Isotiazolinone (Kathon cg) 0,05 %, ed Imidazolidinurea (Kemipur 100) 0,35 %, rispettivamente forniti da A.C.E.F (Italy) e dalla Sinergia (Italy).

## 6.3. Metodo di preparazione

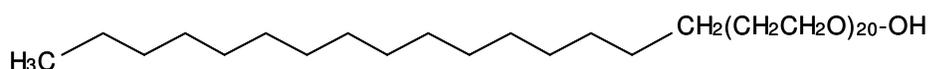
Le SLN sono state preparate con il metodo "Phase Inversion Temperature" (PIT) detto così poiché si basa sull'uso di tensioattivi caratterizzati da una caratteristica temperatura di inversione di fase, come nel caso dei derivati poliossietilenici (*K. H. Diec et al., 2001; L. Montenegro et al., 2006*) dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Montenegro del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Catania.

A temperatura inferiore alla PIT la naturale curvatura di questi tensioattivi è rivolta verso la catena idrocarburica; in queste condizioni, se una miscela tensioattivo/olio/acqua è sottoposta ad agitazione, le goccioline coperte di tensioattivo saranno metastabili, mentre i domini acquosi si uniranno a formare una fase acquosa continua. Al contrario, a temperature al di sopra della PIT, la curvatura naturale dello strato di tensioattivo è rivolta verso la catena poliossietilenica; in queste condizioni, le goccioline di acqua ricoperte di tensioattivo saranno metastabili e si formerà una emulsione acqua/olio (*A. Kabalnov and H. Wennerström, 1996*).

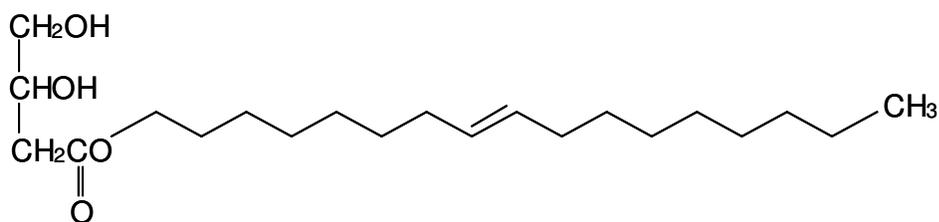
Il metodo PIT consiste, quindi, nel fare un'emulsione acqua in olio ad elevata temperatura, dove essa è metastabile e poi portarla a bassa temperatura, dove la curvatura spontanea del tensioattivo cede metastabilità solo ad emulsioni olio/acqua. È stato ampiamente dimostrato che questo metodo può dare emulsioni olio/acqua costituite da goccioline con dimensioni estremamente piccole (*D. Morales et al., 2006*).

Nonostante il fatto che il metodo PIT sia ampiamente usato e con buoni risultati, il suo meccanismo non è stato ancora pienamente compreso. Si pensa che il processo trasformi direttamente un'emulsione acqua in olio ad alta temperatura in una olio in acqua: la riduzione della temperatura dovrebbe causare l'inversione della curvatura dello strato di tensioattivo attorno alle goccioline di acqua e tale inversione dovrebbe causare una frammentazione della fase continua (olio) in goccioline dell'ordine dei nanometri; tuttavia non c'è alcuna evidenza diretta che spieghi come tale frammentazione abbia luogo (*K. Roger et al., 2009*).

Per preparare le SLN è stato scelto un tensioattivo con struttura lineare, il Ceteth-20 (figura 79), al quale è stato associato, come cotenside, il Gliceril Oleato (Tegin O) che presenta una catena lineare insatura (figura 80).



**Fig. 79:** Formula di struttura del tensioattivo Ceteth-20.



**Fig. 80:** Formula di struttura del cotenside Tegin O.



lascia, quindi, raffreddare la formulazione fino a temperatura ambiente, mantenendola sotto agitazione.

3) SLN con BMBM: alla fase oleosa (preparata sempre con le stesse quantità di Cutina, Ceteth-20 e Tegin O) sono stati aggiunti 0,025 mg di BMBM. Tale miscela è stata riscaldata fino a 95 °C, tenendola sotto agitazione e ad essa sono stati aggiunti 24 mg di acqua preservata, anch'essa portata alla temperatura di 95 °C, continuando ad agitare. Si lascia, quindi, raffreddare la formulazione fino a temperatura ambiente, mantenendola sotto agitazione.

4) SLN con OMC e BMBM: nella fase oleosa sono stati aggiunti contemporaneamente OMC (0,25 mg, 0,50 mg o 1,00 mg per ottenere SLN caricate all'1 % p/p, al 2 % p/p o al 4 % p/p) e 0,025 mg di BMBM (0,1 % p/p). Tale miscela è stata riscaldata fino a 95°C, tenendola sotto agitazione e ad essa sono stati aggiunti 24 mg di acqua preservata, anch'essa portata alla temperatura di 95 °C continuando ad agitare. Si lascia, quindi, raffreddare la formulazione fino a temperatura ambiente, mantenendola sotto agitazione.

#### **6.4. Analisi dimensionale**

La dimensione media delle particelle della dispersione delle SLN e l'indice di polidispersione (una misura dell'uniformità di distribuzione delle nanoparticelle) sono state misurate tramite Photon Correlation Spectroscopy (PCS) a differenti intervalli di tempo dalla preparazione. Le analisi sono state effettuate con un sistema Malvern Zetamaster Instrument (Malvern, UK), sia su formulazioni conservate a temperatura ambiente, che su quelle conservate a 37 °C.

#### **6.5. Analisi DSC**

L'analisi DSC è stata eseguita usando un sistema termoanalitico Mettler TA Stare provvisto di cella calorimetrica DSC 822e e del software Mettler STARe V 8.10. La sensibilità è stata scelta automaticamente come la massima possibile per il sistema calorimetrico ed il crogiolo di riferimento è stato riempito con 100 µl di acqua preservata. La calibrazione dell'entalpia dello strumento è stata eseguita con indio e le variazioni di entalpia sono state calcolate dall'area del picco usando i programmi del software Mettler.

Sono state eseguite misure calorimetriche sulle SLN vuote, sulle SLN caricate con OMC, sulle SLN caricate con BMBM e sulle SLN caricate con OMC e BMBM ed inoltre su: (a) Cetil Palmitato, (b) Cetil Palmitato + Ceteth-20, (c) Cetil Palmitato + Ceteth-20 + Tegin O.

Per quanto riguarda le SLN, 100  $\mu$ l di preparazione sono stati prelevati e posti in un crogiolo di alluminio da 160  $\mu$ l; invece, per quanto riguarda i campioni (a), (b) e (c), i composti sono stati pesati nel crogiolo e ad essi sono stati aggiunti 81  $\mu$ l di acqua preservata (in modo da avere le stesse quantità presenti nelle SLN). I crogioli sono stati chiusi ermeticamente e sottoposti ad analisi calorimetrica come segue:

- 1) Una fase di riscaldamento da 10 °C a 60 °C, con un aumento della temperatura di 2°C/min.
- 2) Successivo raffreddamento da 60 °C a 10 °C, con una diminuzione della temperatura di 4 °C/min.

La procedura è stata ripetuta per tre volte per verificare la riproducibilità dei parametri termodinamici ottenuti.

L'analisi e la comparazione della temperatura e del  $\Delta H$  dei picchi calorimetrici dei campioni danno indicazioni sulla struttura delle SLN e sulle interazioni fra l'OMC ed il BMBM con le SLN.

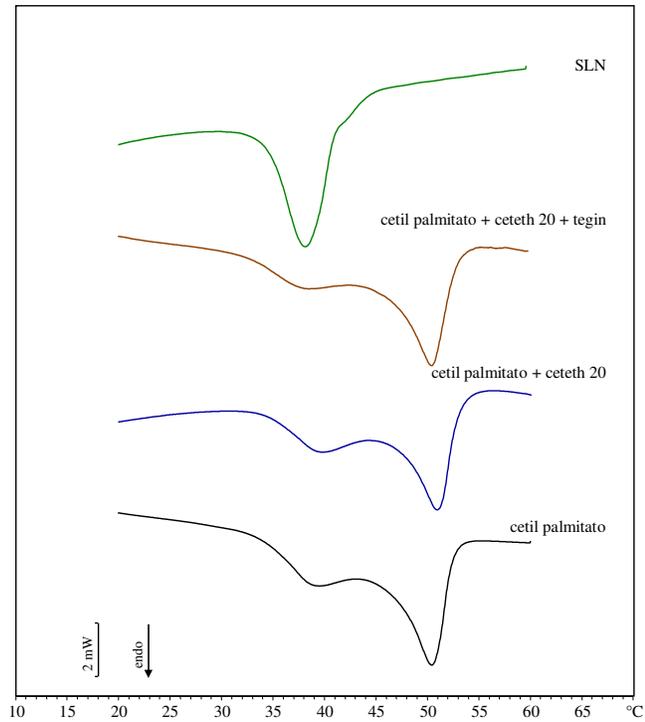
## **6.6. Risultati e discussione**

### **6.6.1. Analisi dimensionale**

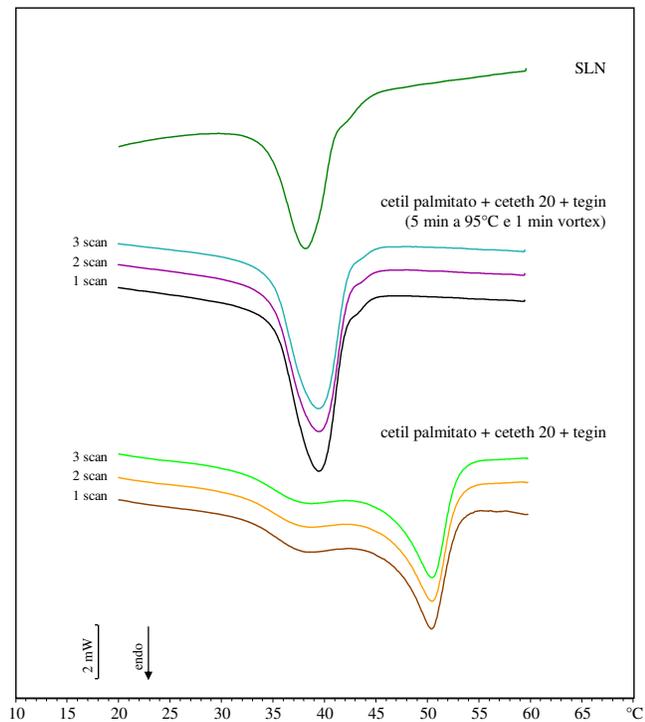
Le SLN vuote hanno una dimensione media di circa 30 nm ed anche in seguito all'incorporazione di OMC e/o BMBM le dimensioni subiscono solo un leggero incremento, infatti il valore massimo di dimensione media raggiunto è di circa 40 nm. Le prove di stabilità, inoltre, effettuate ad intervalli di tempo crescenti (una settimana, due settimane, tre settimane, un mese, due mesi), hanno dimostrato che le formulazioni studiate risultano stabili, sia in seguito alla conservazione a temperatura ambiente, che a 37 °C (dati non mostrati). Per cui il metodo PIT, usato per la preparazione delle SLN, si è dimostrato efficace, infatti, permette di ottenere nanoparticelle con buone caratteristiche dimensionali, omogenee e stabili nel tempo.

### 6.6.2. Analisi DSC

Nella figura 83 sono mostrate le curve calorimetriche dei campioni (a) Cetil Palmitato, (b) Cetil Palmitato + Ceteth-20 e (c) Cetil Palmitato + Ceteth-20 + Tegin O. La curva calorimetrica del Cetil Palmitato è caratterizzata da un picco molto allargato a circa 38,5 °C dovuto al cambiamento di orientazione delle code del fosfolipide e da un picco molto più netto a circa 50,5 °C dovuto alla fusione del lipide. L'aggiunta di Ceteth-20 al Cetil Palmitato (campione (b)) non provoca modificazioni rispetto alla curva calorimetrica del solo Cetil Palmitato indicando che il tensioattivo non ha alcun effetto sul comportamento del lipide. Anche la curva calorimetrica del campione (c) in cui il Cetil Palmitato, il Tegin O ed il Ceteth-20 sono stati messi insieme in presenza di acqua non è differente dalla curva calorimetrica del solo Cetil Palmitato, indicando che la contemporanea presenza di tensioattivo e cotensioattivo non modifica il comportamento del lipide. Tali curve calorimetriche sono, inoltre, confrontate con quella delle SLN vuote; in particolare, la comparazione della curva calorimetrica delle SLN vuote con quella del campione (c) dà importanti informazioni: quest'ultima, infatti, è caratterizzata da un'ampia spalla a circa 38 °C e da un picco a circa 50,5 °C; mentre le SLN vuote mostrano un picco ben definito a circa 38,3 °C ed una spalla a circa 43 °C che indicano la formazione di una struttura ben ordinata con un'elevata cooperatività fra le molecole. Il decremento dell'intensità del picco delle SLN vuote rispetto al campione (c) indica che il Ceteth-20 e il Tegin O interagiscono con le molecole di lipide, determinando una diminuzione della cooperatività; ciò ci consente di dedurre che essi fanno parte della struttura delle SLN. Il crogiolo contenente Cetil Palmitato + Ceteth-20 + Tegin O è stato incubato per cinque minuti alla temperatura di 95 °C, quindi vorticizzato per un minuto e sottoposto a scansione calorimetrica; questa procedura ha lo scopo di riprodurre all'interno del crogiolo stesso le condizioni in cui sono state ottenute le SLN. Nella figura 84, le curve ottenute dall'analisi calorimetrica del crogiolo effettuata prima e dopo il trattamento sono confrontate con quella delle SLN vuote. È possibile notare come, dopo l'incubazione del crogiolo ad alta temperatura e l'agitazione, la curva calorimetrica ottenuta somigli a quella delle SLN, infatti il picco principale si sposta a temperatura inferiore (circa 38 °C), mentre compare una piccola spalla a 43 °C.



**Fig. 83:** Curve calorimetriche, in riscaldamento, dei campioni (a) Cetil Palmitato, (b) Cetil Palmitato + Ceteth-20 e (c) Cetil Palmitato + Ceteth-20 + Tegin. Le curve calorimetriche sono confrontate con quella delle SLN vuote.



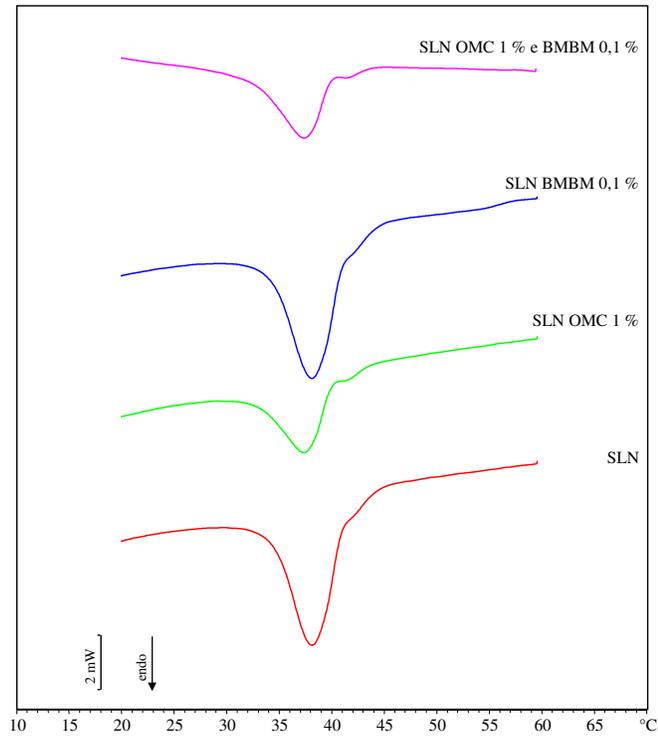
**Fig. 84:** Curve calorimetriche, in riscaldamento, del campione (c) Cetil Palmitato + Ceteth-20 + Tegin prima e dopo trattamento termico. Le curve calorimetriche sono confrontate con quella delle SLN vuote.

Nella figura 85 sono mostrate le curve calorimetriche delle SLN vuote e delle SLN contenenti i filtri solari presi in esame. Le SLN contenenti l'OMC presentano un picco principale ed una spalla ma, rispetto alle SLN vuote, il picco principale si sposta verso temperature più basse e presenta un'entalpia minore, mentre la spalla diventa più pronunciata. Ciò indica che l'OMC si inserisce e si distribuisce dentro le SLN determinando un decremento del picco principale e quindi, della cooperatività fra le molecole lipidiche. La curva calorimetrica delle SLN contenenti il BMBM non mostra variazioni significative rispetto alle SLN vuote. Questo comportamento può dar origine a due ipotesi:

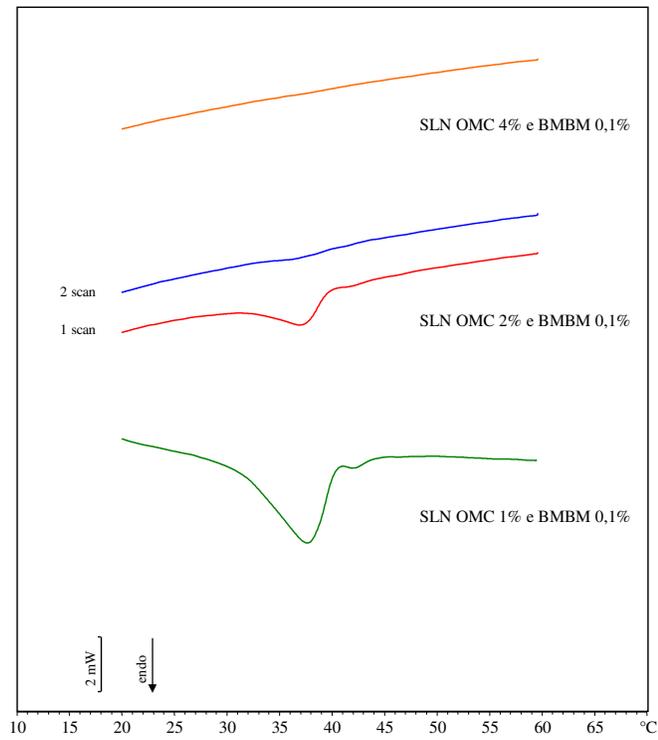
- 1) il BMBM, pur inserendosi e distribuendosi nelle SLN, a causa della piccola quantità non riesce a provocare sostanziali variazioni nei parametri delle SLN;
- 2) il BMBM potrebbe formare dei cluster all'interno della struttura delle SLN e non interagisce con le molecole di Cetil Palmitato.

La curva calorimetrica delle SLN contenenti sia l'OMC che il BMBM è molto simile a quella contenente il solo OMC, ma la spalla è più evidente ed assume l'aspetto di un picco; questo comportamento potrebbe essere dovuto alla presenza del BMBM.

In figura 86 sono riportate le curve calorimetriche delle SLN caricate con lo 0,1 % di BMBM e con quantità crescenti di OMC (1; 2 e 4 %). Le SLN caricate con il 2 % di OMC e con lo 0,1 % di BMBM sono caratterizzate da un picco calorimetrico molto più piccolo, rispetto a quelle caricate con l'1 % di OMC e lo 0,1 % di BMBM; inoltre, la spalla presente a circa 43°C tende quasi a scomparire. Per scansioni successive alla prima anche il picco principale viene completamente abbattuto. Per quanto riguarda le SLN caricate con il 4 % di OMC e con lo 0,1 % di BMBM, già alla prima scansione calorimetrica, sia il picco principale, che la spalla presente a temperature maggiori sono completamente abbattuti.



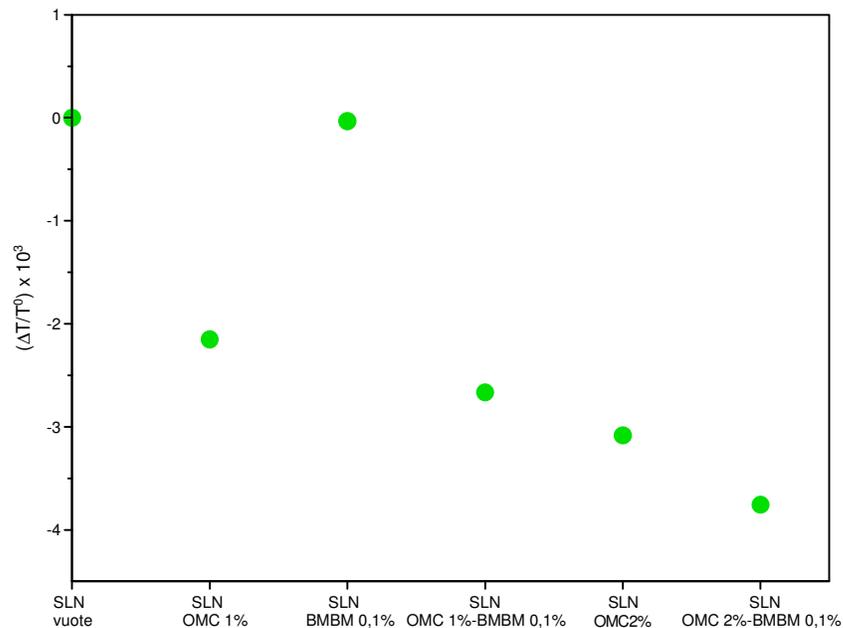
**Fig. 85:** Curve calorimetriche, in riscaldamento, delle SLN vuote e delle SLN contenenti i filtri solari in esame.



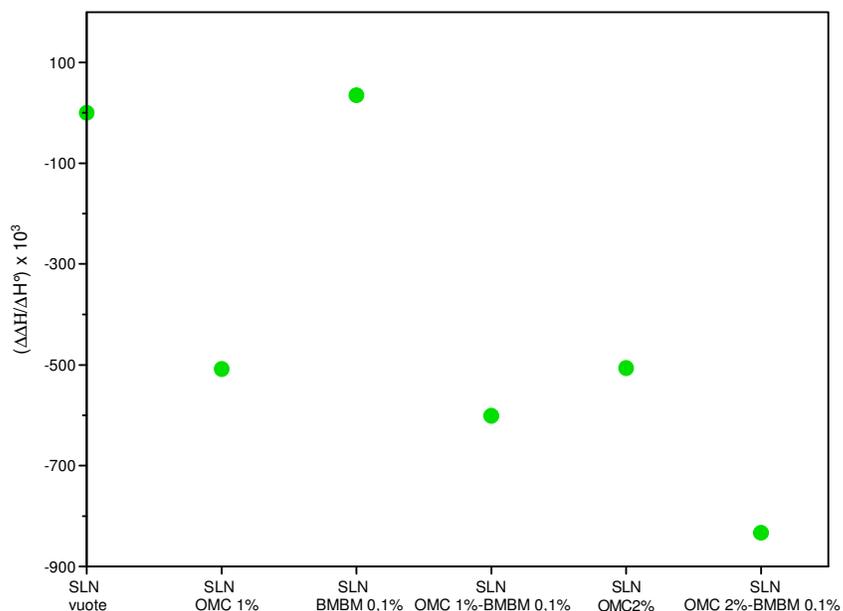
**Fig. 86:** Curve calorimetriche, in riscaldamento, delle SLN vuote e delle SLN contenenti concentrazioni crescenti dei filtri solari in esame.

In figura 87 è riportata la variazione della temperatura del picco delle SLN vuote e delle SLN caricate con OMC e/o BMBM, espressa come il rapporto  $\Delta T/T^0$  ( $\Delta T = T - T^0$ , dove  $T$  è la temperatura del picco delle SLN caricate con i filtri solari e  $T^0$  è la temperatura del picco delle SLN vuote). Dal grafico è possibile vedere come l'incorporazione dell'OMC 1 % p/p, all'interno delle nanoparticelle, causa una notevole diminuzione della temperatura del picco che diventa ancora più marcata raddoppiando la quantità del filtro solare (OMC 2 % p/p). Al contrario, la presenza del solo BMBM 0,1 % p/p non causa evidenti variazioni della temperatura; ciò può essere giustificabile con la ridotta percentuale di composto che si riesce ad introdurre all'interno delle nanoparticelle o con una sua distribuzione non omogenea all'interno del sistema. L'inserimento della stessa quantità di BMBM (0,1 % p/p) nelle nanoparticelle contenenti il 2 % p/p di OMC, tuttavia, permette di ottenere una maggiore riduzione della temperatura del picco; ciò ci consente di ipotizzare che il BMBM si scioglia all'interno dell'OMC riuscendo a distribuirsi in maniera più omogenea all'interno delle nanoparticelle.

Questi risultati sono confermati anche dall'analisi della variazione di entalpia del picco delle SLN vuote e di quelle caricate con OMC e/o BMBM, riportata in figura 88 come  $\Delta\Delta H/\Delta H^0$  ( $\Delta\Delta H = \Delta H - \Delta H^0$ , dove  $\Delta H$  è la variazione di entalpia delle SLN caricate con i filtri solari e  $\Delta H^0$  è la variazione di entalpia delle SLN vuote). Per quanto riguarda la variazione di entalpia, l'introduzione dell'OMC, sia all'1 % che al 2 % p/p, causa una riduzione pressoché simile. Anche in questo caso la presenza di una maggiore quantità di OMC consente di ottenere una riduzione più marcata dell'entalpia quando si introduce il BMBM (0,1 % p/p) all'interno delle nanoparticelle.



**Fig. 87:** Variazione della temperatura del picco delle SLN vuote e caricate con OMC e/o BMBM, espressa come  $\Delta T/T^0$  ( $\Delta T = T - T^0$ , dove  $T$  = temperatura del picco delle SLN caricate con i filtri solari e  $T^0$  = temperatura del picco delle SLN vuote).



**Fig. 88:** Variazione dell'entalpia dei picchi calorimetrici delle SLN vuote e caricate con OMC e/o BMBM, riportata come  $\Delta\Delta H/\Delta H^0$  ( $\Delta\Delta H = \Delta H - \Delta H^0$ , dove  $\Delta H$  = variazione di entalpia delle SLN caricate con i filtri solari e  $\Delta H^0$  = variazione di entalpia delle SLN vuote).

## 6.7. Conclusioni

È stata dimostrata la capacità delle SLN di comportarsi come “carriers attivi” per i filtri solari, infatti, per le loro specifiche caratteristiche, se applicate topicamente, rappresentano di per sé dei filtri solari fisici. Per tale motivo l’incorporazione al loro interno di filtri molecolari potrebbe permettere di ridurre le quantità da usare per ottenere la stessa azione fotoprotettiva. Tale proprietà delle SLN è dovuta alla maggiore capacità delle particelle solide, rispetto alle gocce delle classiche emulsioni, di riflettere le radiazioni ultraviolette (*S. A. Wissing and R. H. Muller, 2003*). Inoltre, in studi in vitro, è stato dimostrato che le SLN sono in grado di ridurre notevolmente la velocità di rilascio di filtri molecolari rispetto alle normali emulsioni olio/acqua (*S. A. Wissing and R. H. Muller, 2002*).

Lo scopo di questo lavoro è stato di valutare la possibilità di incorporare due tra i più comuni filtri solari, l’Ottimetossicinnamato (OMC) e il Butilmetossidibenzoilmetano (BMBM), in SLN preparate usando il metodo della Temperatura di Inversione di Fase (PIT). Tale metodo consente il passaggio da un sistema acqua/olio ad uno olio/acqua; esso si è rivelato molto utile, infatti ha permesso di ottenere, usando basse quantità di tensioattivi, SLN caricate con i filtri solari di dimensioni molto ridotte e dotate di una buona stabilità.

La reale formazione delle nanoparticelle è stata verificata confrontando il segnale calorimetrico dato dai singoli componenti messi a contatto (pesandoli sul fondo del crogiolo) con quello delle SLN. Le curve ottenute sono notevolmente diverse, infatti le SLN danno un picco principale a circa 38°C, temperatura alla quale il segnale calorimetrico della miscela dei componenti presenta, invece, una spalla; infatti, in questo caso il picco principale si trova a temperatura più elevata (circa 50°C). Ulteriore conferma della formazione delle nanoparticelle è stata ottenuta incubando il crogiolo sigillato, contenente i componenti nelle stesse proporzioni usate nella normale preparazione, a 95°C, per cinque minuti, quindi è stato vorticizzato per un minuto e sottoposto ad analisi calorimetrica. Il segnale ottenuto diventa sovrapponibile a quello delle SLN provando che, in seguito al trattamento termico, i componenti sono in grado di formare le nanoparticelle.

I dati calorimetrici, inoltre, danno conferma che l'OMC viene incorporato dalle nanoparticelle; infatti, in questo caso l'area del picco è notevolmente ridotta.

La presenza del solo BMBM non causa variazioni significative alla curva delle SLN vuote; ciò può essere anche dovuto alla quantità molto piccola usata. La contemporanea presenza di entrambi i filtri solari accentua la loro interazione con le SLN.

L'incorporazione di quantità maggiori di OMC, infine, causa un abbattimento del picco; questo potrebbe essere spiegato con un danno causato dalle eccessive quantità di OMC alla struttura delle nanoparticelle.

Dai risultati ottenuti, si può concludere che le nanoparticelle solide lipidiche rappresentano un sistema carrier promettente per la veicolazione di filtri solari; in particolare, come riportato in letteratura (*M. M. Jimenez et al., 2004*), l'uso delle SLN come sistemi di veicolazione per l'OMC consente di ridurre la penetrazione attraverso l'epidermide e di conseguenza, il raggiungimento della circolazione sistemica, evitandone i possibili effetti tossici.

## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio tutti coloro che hanno contribuito alla realizzazione del presente lavoro di ricerca:

- il Prof. Francesco Castelli che in veste di Tutor ha seguito il lavoro svolto presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Catania, sede consorziata del Dottorato;
- la Prof.ssa Maria Grazia Sarpietro che è sempre stata un punto di riferimento importante in questi anni;
- il Coordinatore del Collegio dei Docenti, Prof. Gaetano Giammona insieme al gruppo del laboratorio di Tecnologie Farmaceutiche del Dipartimento di Chimica e Tecnologie Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Palermo;
- il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Catania per avermi ospitato durante lo svolgimento del Dottorato.

## BIBLIOGRAFIA

- Albrecht O., Gruler H., Sackmann E., *Polymorphism of phospholipid monolayers*. Le Journal de Physique, **1978**, 39:301-313.
- Bader H., Dorn K., Hupfer B., Ringsdorf H., *Polymeric monolayers and liposomes as models for biomembranes*. Adv. Polym. Sci., **1985**, 64: 1-62.
- Birrenbach G., Speiser P. P., *Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology*, J. Pharm. Sci., **1976**, 65:1763-1766.
- Bodor, N., & Buchwald, P., *Brain-targeted drug delivery: experiences to date*. Am J Drug Targ, **2003**, 1:13– 26.
- Bonda C. A., *The photostability of organic sunscreen actives*, Shaath N., editor. Sunscreens, Boca Raton, F. L., Taylor Francis, **2005**, 323-345.
- Bronaugh R.L., Stewart R.F., *Methods for in vitro percutaneous absorption studies III: hydrophobic compounds*, J. Pharm. Sci., **1984**, 73(9):1255-8.
- Bruneton J., *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, 2nd Ed. Intercept Ltd., Hampshire, UK, **1999**, 263-277.
- Bunjes H., Unruh T., *Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering*. Advanced Drug Delivery Reviews, **2007**, 59:379–402.
- Cadenhead D.A., *Monomolecular films as biomembrane models. Structures and properties of cell membranes*, In: G. Benga, Editor, Structure and Properties of Cell Membranes III, CRC Press, Boca Raton, FL, **1985**, 2:21–62.
- Cantos E.C., Garcia V.S., De pascual T., Tomas Berberan F.A., *Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of c.v. Napoleon teble grapes*, J. agric. Food Chem., **2000**, 48: 4606-4612.
- Castelli F., Pitarresi G., Tomarchio V., Giammona G., *Effect of pH on the transfer kinetics of an anti-inflammatory drug from polyaspartamide hydrogels to lipid model membrane*. J. Control. Release, **1997**, 45:103-111.
- Castelli F., Conti B., Maccarrone D.E., Conte U., Puglisi G., *Comparative study of “in vitro” release of anti-inflammatory drugs from polylactide-co-glycolide microspheres*. Int. J. Pharm., **1998**, 176: 85-98.
- Castelli F., Giunchedi P., La Camera O., Conte U., *A calorimetric study on the Diflunisal release from poly (lactide-co-glycolide) microspheres by monitoring the drug effect on Dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. Temperature and drug loading influence*. Drug Delivery, **2000a**, 7:45-53.

- Castelli F., Pitarresi G., Giammona G., *Influence of different parameters on drug release from hydrogel systems to biomembrane model. Evaluation by differential scanning calorimetry technique.* Biomaterials, **2000b**, 21:821-833.
- Castelli F., Sarpietro M.G., Ceruti M., Rocco F., Cattel L., *Characterization of lipophilic Gemcitabine prodrugs-liposomal membranes interaction by differential scanning calorimetry.* Mol. Pharmaceutics, **2006a**, 3: 737-744.
- Castelli F., Sarpietro M.G., Miceli D., Trombetta D., Saija A., *Differential scanning calorimetry evidence of the enhancement of  $\beta$ -sitosterol absorption across biological membranes mediated by  $\beta$ -cyclodextrins.* J. Agric. Food Chem., **2006b**, 54: 10288-10233.
- Castelli F., Sarpietro M.G., Miceli D., Stella B., Rocco F., Cattel L., *Enhancement of gemcitabine affinity for biomembranes by conjugation with squalene: differential scanning calorimetry and Lagmuir-Blodgett studies using biomembrane models.* J. Colloid Interface Sci., **2007a**, 316: 43-52.
- Castelli F., Sarpietro M.G., Rocco F., Ceruti M., Cattel L., *Interaction of lipophilic gemcitabine prodrugs with biomembranes models studied by Lagmuir Blodgett technique.* J. Colloid Interface Sci., **2007b**, 313: 363-368.
- Chatelain E., Gabard B., *Photostabilization of butyl methoxycinnamate by bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a new UV broadband filter,* Photochem. Photobiol., **2001**, 74:401-406.
- Collado I.G., Hanson J.R., Macias-Sanchez A.J., *Recent advances in the chemistry of caryophyllene.* Nat. Prod. Rep., **1998**, 2:187-204.
- Couvreur P., Kante B., Roland M., Speiser P., *Adsorption of antineoplastic drugs to polyalkylcyanoacrylate nanoparticles and their release in calf serum,* J. Pharm. Sci., **1979**, 68:1521-1524.
- Cristiani M., D'arrigo M., Mandalari G., Castelli F., Sarpietro M.G., Miceli D., Venuti V., Bisignano G., Saija A., Trombetta D., *Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes: Implications for Their Antibacterial Activity.* J. Agric. Food Chem., **2007**, 55: 6300-6308.
- Da Silva S.L., Figueiredo P.M.S, Yano T., *Chemotherapeutic potential of the volatile oils from Zanthoxylum rhoifolium Lam leaves.* Eur. J. Pharmacol., **2007**, 576:180-188.
- Damiani E., Rosati L., Castagna R., Carloni P., Graci L., *Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UV-A irradiation,* J. Photochem. Photobiol. B., **2006**, 82:204-213.
- Di Sotto A., Evandri M.G., Mazzanti G., *Antimutagenic and mutagenic activities of some terpenes in the bacterial reverse mutation assay.* Mutat Res., **2008**, 31;653(1-2):130-3.

- Di Sotto A, Mastrangelo S, Romussi G, Bisio A, Mazzanti G., *Antimutagenic activity of a secoisopimarane diterpenoid from Salvia cinnabarina M. Martens et Galeotti in the bacterial reverse mutation assay*. Food Chem Toxicol., Epub **2009**, 47(8):2092-6.
- Di Sotto A., Mazzanti G., Carbone F., Hrelia P., Maffei F., *Inhibition by beta-caryophyllene of ethyl methanesulfonate-induced clastogenicity in cultured human lymphocytes*. Mutat Res., **2010**, 17;699(1-2):23-8.
- Diec K. H., Eitrich A., Schimdt T., Sokolowski T., Screeber J., *PIT microemulsions with low surfactant content*, Cosmetic & Toiletries, **2001**, 116:61-66.
- Dingler A. and Gohla S.H., *Production of solid lipid nanoparticles (SLN): scaling up feasibilities*. J. Microencapsulation, **2002**, 19: 11–16.
- Dingler A., *Feste lipid-nanopartikel als kolloidale wirkstofftragersysteme zur dermalen applikation*, Ph.D. thesis, Berlin, **1998**.
- Epling, C.A, *Revision of Salvia, subgenus Calosphace*. In: F. Fedde (Ed.), Repertorium Specierum Novarum regni Vegetabili, vol. CX, Berlin-Dahlem, Germany, **1939**, p. 139.
- Foldvari M., *Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system desing*, Pharm.Sci.Technolo. Today, **2002**, 3(12):417-25.
- Gaines G.L., *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces*. Interscience, New York, **1996**.
- Gao D., Rytting J.H., *Use of solution calorimetry to determine the extent of crystallinity of drugs and excipients*, Int. J. Pharm., **1997**, 151:183-192.
- Garcia-Garcia E., Andrieux K., Gil S., Couvreur P., *Colloidal carriers and blood–brain barrier (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain?* International Journal of Pharmaceutics, **2005**, 298: 274–292
- Garcia-Garcia J., Micol V., De Godos A., Gómez-Fernández J.C.; *The Cancer Chemopreventive Agent Resveratrol is Incorporated into Models Membranes and Inibhits Proteine Kinase C  $\alpha$  Activity*; Archives of Biochemistry and Biophisics, **1999**, 372: 382-388.
- Gaspar L. R., Maia Campos P. M., *Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreen*, Int. J. Pharm., **2006**, 307:123-128.
- Geremia B., *Rassengna Internazionale di Clinica e Therapie.*, Urban and Fisher Co., Verlag, Germany, **1955**, 35:577–592.
- Goldberg David M., Hahn Susan E., Parkes Joel G., *Beyond alcohol. Beverage consumption and cardiovascular mortality*, Clin. Chimi. Acta, **1995**, 237:155-187.

- Hoult J.R., Paya M., *Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins:natural products with therapeutic potential*. Gen Pharmacol. **1996**, 27(4):713-722.
- Jenning V., Gohla S., *Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN)*, J. Microencapsul., **2001**, 18:149-158.
- Jiménez M. M., Pelletier J., Bobin M. F., Martini M. C., *Influence of encapsulation on the in vitro percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate*, Int. J. Pharm., **2004**, 272:45-55.
- Kabalnov A., Wennerström H., *Macroemulsion stability: the oriented wedge theory revisited*, Langmuir, **1996**, 12:276-292.
- Keating G.J. and O’Kennedy R., *The chemistry and occurrence of coumarins*. In: O’Kennedy & Thornes, **1997**, 23-66.
- Klatsky A.L., Armstrong M.A., Friedman G.D., *Alcohol and mortality*, Ann. Intern. Med, **1992**, 117(8): 646-654.
- Krull U.J., Thompson M., Vanderberg E.T., Wong H.E., *Langmuir-Blodgett film characteristics and phospholipid membrane ion conduction*, Anal. Chim. Acta, **1985**, 174:83-94.
- Lacy A. and O’Kennedy R., *Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer*. Current Pharmaceutical Design, **2004**, 10, 3797-3811.
- Langmuir I., *The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids*. J.Am.Chem.Soc., **1917**, 39:1848-1852.
- Lippacher A., Müller R.H., Mäder K.: *Liquid and semisolid SLN dispersions for topical application: Rheological characterization*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **2004**, 58:561–567.
- Loizzo M.R., Tundis R., Menichini F., Saab A.M., Statti G.A, Menichini F., *Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells*. Cell Prolif., **2008**, 41:1002–1012.
- Matern U., Lüer P. and Kreuzsch D., *Biosynthesis of coumarins*. In: Barton D., Nakanishi K., Meth-Cohn O. and Sankawa U. (eds.): Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol. 1, Polyketides and Other Secondary Metabolites Including Fatty Acids and Their Derivatives. Elsevier Science Ltd., Oxford, UK. **1999**, 623-637.
- Miñones J., Sandez Macho M.I., Iribarnegaray E., Sanz Pedrero P., *A comparative study of synthetic lecithin and cephalin monolayers spread on substrates of different pH*. Colloid & Polymer Sci., **1981**, 259:382-390.

- Montenegro L., Carbone C., Condorelli G., Drago R., Puglisi G., *Effect of oil phase lipophilicity on in vitro drug release from o/w microemulsions with low surfactant content*, Drug Dev. Ind. Pharm., **2006**, 32:539-548.
- Morales D., Solans C., Gutiérrez J. M., Garcia-Celma M. J., Olsson U., *Oil/water droplet formation by temperature change in the water/C<sub>16</sub>E<sub>6</sub>/mineral oil system*, Langmuir, **2006**, 22:3014-3020.
- Muller R. H., Radtke M., Wissing S. A., *Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations*, Adv. Drug Deliv. Rev., **2002**, 1:131-155.
- Murray R.D.H., Mendez J. and Brown S.A., *The Natural Coumarins - Occurrence, Chemistry and Biochemistry*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, **1982**.
- Paduch R., Kandefér-Szerszeń M., Trytek M., Fiedurek J., *Terpenes: Substances useful in human healthcare*, Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz), **2007**, (Epub ahead of print).
- Pardeike J., Hommoss A., Müller R. H., *Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products*, Int. J. Pharm., **2009**, 366:170-184.
- Pattanaargson S., Limphong P., *Stability of octyl methoxycinnamate and identification of its photo-degradation product*, Int. J. Cosmet. Sci., **2001**, 23: 153-160.
- Phillips M.C., Chapman D., *Monolayer characteristics of saturated 1,2-diacyl phosphatidylcholines (lecithins) and phosphatidylethanolamines at the air-water interface*, Biochim. Biophys. Acta, **1968**, 163:301-313.
- Politeo O., Juki M., Milo M., *Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants*. Croat. Chem. Acta, **2006**, 79: 545-552.
- Rascol O., Goetz C., Koller W., *Treatment interventions for Parkinson's disease: an evidence based assessment*. Lancet, **2002**, 359: 1589-1598.
- Raudino A., Castelli F., *Modeling specific heat transient anomalies during permeation of liposomes by water-soluble substances*. J. Colloid Interface Sci., **1998**, 200: 52-58.
- Ricciuti S., Cardini C., *Le cumarine: profilo farmacologico e terapeutico*. Il Policlinico Sez. Prat., **2004**, 111:181-194.
- Rimm E.B., Giovannucci E.L., Willet W.C., Colditz G.A., Ascherio A., Rosner B., Stampfer M.J., *Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men*, Lancet, **1991**, 338:464-468.
- Ritschel W.A., Brady M.E. and Tan H.S.I., *First-pass effect of coumarin in man*. Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm., **1979**, 17:99-103.

- Robenek H., Severs N.J., *Recent advances in freeze-fracture electron microscopy: the replica immunolabeling technique*. Biological Procedures Online, **2008**, 28:10: 9-19.
- Roger K., Cabane B., Olsson U., *Formation of 10-100 nm size-controlled emulsions through a sub-PIT cycle*, Langmuir, **2009**, 26:3860-3867.
- Romussi G., Ciarallo G., Bisio A., Fontana N., De Simone F., De Tommasi N., Mascolo N., Pinto L., *A new diterpenoid with antispasmodic activity from Salvia cinnabarina*. Planta Med., **2001**, 67:153-155.
- Sabulal B., Dan M., John A.J., Kurup R., Pradeep N.S., Valsamma R.K., George V., *Caryophyllene-rich rhizome oil of Zingiber nimmonii from South India. Chemical characterization and antimicrobial activity*. Phytochemistry, **2006**, 67:2469–2473.
- Saiko P., Szakmary A., Jaeger W., Szekeres T.; *Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?*, Mutation research, **2008**.
- Sarpietro M.G, Spatafora C., Tringali C., Micieli D., Castelli F.; *Interaction of resveratrol and its trimethyl and triacetyl derivatives with biomembrana models studied by differential scanning calorimetry*, J. Agric. Food Chem., **2007**, 55, 3720-3728.
- Scalia S., Simenoni S., Barbieri A., Sostero S., *Influence of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on photo-induced free radical production by the sunscreen agent, butyl-methoxydibenzoyl-methane*, J. Pharm. Pharmacol., **2002**, 54:1553-1558.
- Scheuplein R.J., Blank I.H., *Mechanism of percutaneous absorption. IV. Penetration of nonelectrolytes (alcohols) from aqueous solutions and from pure liquids*, J. Invest. Dermatol., **1973**, 60(5):286-96.
- Schnaider S., Deckardt K., Hellwig J., Küttler K., Mellert W., Schulte S., van Ravenzwaay B., *Octyl methoxycinnamate: two generation reproduction toxicity in Wistar rats by dietary administration*, Food Chem. Toxicol., **2005**, 43:1083-1092.
- Soine T.O., *Naturally occurring coumarins and related physiological activities*. J. Pharm. Sci., **1964**, 53:231-264.
- Sozio P, Iannitelli A, Cerasa LS, Cacciatore I, Cornacchia C, Giorgioni G, Ricciutelli M, Nasuti C, Cantalamessa F, Di Stefano A., *New L-dopa codrugs as potential antiparkinson agents*. Arch.Pharm.Chem.Life Sci., **2008**, 341:412-7.
- Tarras-Wahlberg N., Stenhagen G., Larko O., Rosen A., Wennberg A. M., Wennerstrom O., *Changes in ultraviolet absorption of sunscreens after ultraviolet irradiation*, J. Invest. Dermatol., **1999**, 113:547-553.
- Taylor K.M.G., Morris R.M., *Thermal analysis of phase transition behaviour in liposomes*. Thermochem. Acta, **1995**, 248:259-269.

- Temsamani J., Scherrmann J. M., Rees A. R. and Kaczorek M., *Brain drug delivery technologies: Novel approaches for transporting therapeutics*. Pharm Sci TechnolToday, **2000**, 3:155–162.
- Tkachev A.V., *The chemistry of caryophyllene and related compounds*. Chem. Nat. Compd., **1987**, 23:393–412.
- Tocanne J.F. and Teissière J., *Ionization of phospholipids and phospholipids supported interfacial lateral diffusion of protons in membrane model system*. Biochim. Biophys. Acta, **1990**, 1031:111-142.
- Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M.G., Venuti V., Cristiani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G., Bisignano G., *Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes*. Antimicrob. Agents Chemother., **2005**, 49:2474-2478.
- Weinmann I., *History of the development and applications of coumarin and coumarin-related compounds*. In: O’Kennedy & Thornes, **1997**, 1-22.
- Wissing S. A., Muller R. H., *Solid lipid nanoparticles as a carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration*, J. Control Release, **2002**, 81:225-233.
- Wissing S. A., Muller R. H., *Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN)*, Int. J. Pharm., **2003**, 254:65-68.
- Zheng G.Q., Kenney P.M., Lam L.K.T., *Sesquiterpenes from clove (Eugenia caryophyllata) as potential anticarcinogenic agents*. J. Nat. Prod., **1992**, 55:999–1003.
- Zur Muhlen A., Mehnert W., *Drug release and release mechanism of prednisolone loaded solid lipid nanoparticles*, Pharmazie, **1998**, 53:2-55.
- Zur Muhlen A., Schwarz C., Mehnert W., *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-drug release and release mechanism*, Eur. J. Pharm. Biopharm., **1998**, 45:149-155.