

UNIVERSITÀ
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL
FARMACO

Direttrice Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

**LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE**

**Caratterizzazione di ciclodestrine anfifiliche e loro
impiego nella preparazione di sistemi colloidali
farmaceutici**

Relatore: Prof.ssa Milena Lillina Sorrenti

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di

Jessica Makheal

1. CICLODESTRINE

1.1 Struttura

Le ciclodestrine (CDs) sono una famiglia di oligosaccaridi ciclici, costituiti da unità di D-(+) glucopiranosio unite tra loro mediante legami α -1,4-glicosidici, ottenute dalla degradazione batterica dell'amido, mediata da enzimi, quali ciclodestrina glicosil-transferasi (CGTasi) [1]

Presentano una caratteristica struttura tronco-conica, derivante dalla disposizione spaziale dei gruppi funzionali delle unità di glucosio, in cui i gruppi ossidrilici secondari (C₂ e C₃), sono situati all'estremità della cavità con diametro maggiore, mentre i gruppi ossidrilici primari (C₆) sono situati all'estremità con diametro inferiore. La presenza di questi gruppi è responsabile del carattere idrofilo delle CDs. La cavità interna, invece, è rivestita da atomi di idrogeno e ponti di ossigeno glicosidici, che conferiscono un carattere idrofobico, permettendo la formazione di complessi di inclusione con un gran numero di composti (Figura 1) [2]

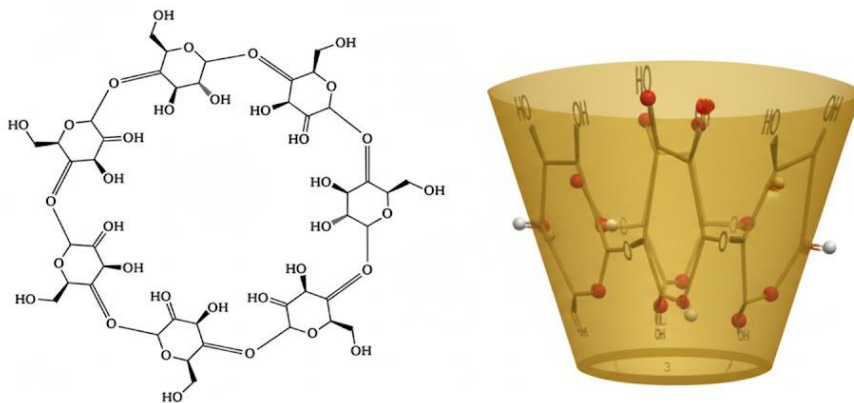


Figura 1. Struttura toroide di una ciclodestrina.

1.2 Ciclodestrine naturali

Le CDs naturali α -CD, β -CD e γ -CD sono costituite rispettivamente da 6, 7 e 8 unità di D-glucopiranosio (Figura 2). Sebbene l'impedimento sterico avesse inizialmente fatto escludere l'esistenza di macrocicli con meno di 6 unità, nel 2019 sono state sintetizzate CDs costituite da 3 o 4 unità di glucopiranosio, la cui struttura ciclica è ancora oggi oggetto di studio e il cui potenziale impiego resta, pertanto, da approfondire attraverso studi futuri [3].

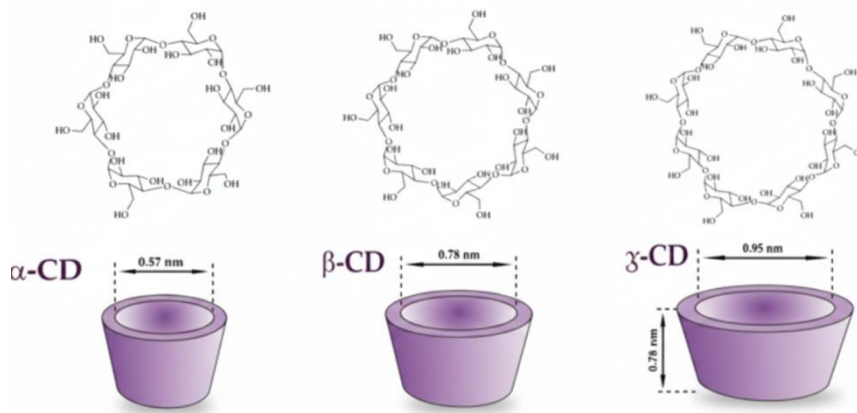


Figura 2. Struttura di α -, β - e γ -ciclodestrina.

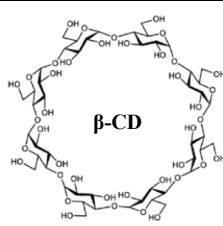
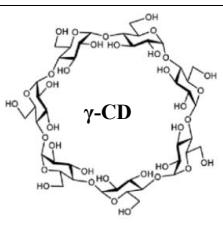
Esistono inoltre CDs sintetizzate con oltre 8 unità glucosidiche; tuttavia, a causa della complessità dei processi produttivi e della ridotta efficacia nel generare complessi di inclusione, tali macrocicli non vengono attualmente impiegati in campo farmaceutico [4].

1.3 Ciclodestrine derivate

Le CDs derivate rappresentano l'evoluzione tecnologica dei macrocicli naturali, nate per superarne i limiti intrinseci come la scarsa solubilità acquosa. Una volta verificata la formazione del complesso d'inclusione con il principio attivo, quest'ultimo beneficerà a sua volta di un aumento della solubilità apparente. Di conseguenza, si otterrà un'ottimizzazione della biodisponibilità specificamente per quel farmaco [5]. Le CDs derivate vengono ottenute attraverso funzionalizzazione dei gruppi ossidrilici primari e secondari dell'anello di glucopiranosio in seguito a reazioni di esterificazione, eterificazione o amminazione [6].

I derivati maggiormente impiegati in campo farmaceutico sono: dimetil- β -CD (DM β CD o DIMEB), 2-idrossipropil β -CD (HP β CD), 2-idrossipropil γ -CD (HP γ CD), random- β -CD metilata (RAMEB) e sulfobutiletere β -CD (SBE β CD) [6] (Tabella 1).

Tabella 1. Principali ciclodestrine derivate.

Struttura generale	Ciclodestrina (CD)	R
 <p style="text-align: center;">β-CD</p>	β -CD 2-Idrossipropil β -CD (HP β CD) Random β -CD metilata (RAMEB) Dimetil β -CD (DIMEB) Sulfobutiletere β -CD (SBE β CD)	-H - CH ₂ CHOHCH ₃ -CH ₃ o -H -CH ₃ o -H -(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻ Na ⁺
 <p style="text-align: center;">γ-CD</p>	γ -CD 2-Idrossipropil γ -CD (HP γ CD)	-H -CH ₂ CHOHCH ₃

1.4 Proprietà chimico-fisiche

Le CDs sono solidi cristallini caratterizzati da un'elevata omogeneità e da una natura non igroscopica. La loro marcata idrofilia è determinata dalla densità di gruppi ossidrilici esposti sulla superficie esterna della molecola: questi fungono da numerosi siti donatori e accettori, facilitando la formazione di legami a idrogeno con il mezzo acquoso.

Questa configurazione molecolare si traduce in un coefficiente di ripartizione olio/acqua ($\log P_{O/W}$) negativo, parametro che conferma sperimentalmente la loro natura fortemente idrofila. Per quanto riguarda la stabilità chimica, le CDs mostrano una notevole resistenza in ambiente alcalino, mentre risultano vulnerabili all'idrolisi acida: a valori di pH molto bassi, infatti, la struttura macrociclica tende a degradarsi con la conseguente apertura dell'anello [7].

Le differenze tra le tre CDs naturali (α -CD, β -CD e γ -CD) non riguardano soltanto il diametro della cavità centrale, ma influenzano drasticamente anche la loro solubilità acquosa. Tra queste, la β -CD risulta la meno solubile e tale limitazione deriva dall'elevata rigidità della molecola allo stato cristallino, causata da una "cintura" completa di legami a idrogeno intramolecolari tra i gruppi ossidrilici secondari in posizione C₂ e C₃; questa rete satura i siti di legame, impedendo l'interazione con le molecole d'acqua circostanti.

La α -CD presenta una solubilità maggiore della β -CD [7], poiché la sua cintura di legami a idrogeno è interrotta da un'unità glucopiranosidica in posizione distorta, rendendo la struttura meno rigida. La γ -CD, oltre ovviamente a presentare più gruppi ossidrilici rispetto ai due omologhi inferiori, presenta una conformazione non-coplanare che conferisce una certa flessibilità strutturale che ne favorisce l'idratazione. Tutti i principali parametri chimico-fisici di questi macrocicli sono riportati nella Tabella 2 [8].

Tabella 2. Principali caratteristiche chimico-fisiche delle ciclodestrine naturali.

CD	Diametro cavità interna (Å)	Massa molecolare (g/mol)	Solubilità (mg/ml, 25 °C)	Log Po/w
α -CD	4,7-5,3	972	145	-12,7
β -CD	6,0-6,5	1135	18,5	-14,8
γ -CD	7,5-8,3	1297	232	-16,9

L'introduzione di sostituenti sulla struttura delle CDs naturali ne potenzia la capacità di interagire con le molecole d'acqua circostanti; per questo motivo le CDs derivate presentano una solubilità in acqua oltre 100 volte maggiore rispetto a quelle non derivate [7]. Le CDs derivate sono commercializzate come miscele isomeriche amorfe caratterizzate da un specifico Grado di Sostituzione (DS), parametro che esprime il numero medio di gruppi ossidrilici sostituiti per unità glucopiranosidica. Il DS è un fattore critico per le performance tecnologiche del macrociclo: da un lato, l'elevata polidispersità isomerica inibisce la ricristallizzazione aumentandone drasticamente la solubilità acquosa (fino a renderle sostanze igroscopiche deliquescenti); dall'altro, il numero e la posizione dei sostituenti modulano l'ingombro sterico e l'idrofobicità della cavità, influenzando l'affinità verso le molecole ospiti e l'efficacia del processo di inclusione [7].

1.5 Applicazioni in campo farmaceutico

Le CDs in campo farmaceutico trovano vasto impiego, principalmente come eccipienti, come sistemi di drug-delivery e come veri e propri farmaci [9].

Le CDs sono eccipienti fondamentali per ottimizzare la formulazione di farmaci "critici" grazie alla loro capacità di formare complessi di inclusione. Il loro impiego principale riguarda il miglioramento della solubilità e, di conseguenza, della velocità di dissoluzione di molecole appartenenti alle classi II e IV del sistema BCS (Biopharmaceutical Classification System), favorendone la transizione verso la classe I e aumentandone la biodisponibilità [10]. Oltre a ciò, le CDs incrementano la stabilità chimico-fisica dei principi attivi proteggendoli da ossidazione, fotossidazione e idrolisi (estendendone la shelf-life), mascherano odori o sapori sgradevoli e riducono eventuali incompatibilità proteggendo il farmaco da interazioni sfavorevoli con altri componenti della formulazione [10][11].

L'integrazione delle nanotecnologie nei sistemi di drug-delivery apre nuove frontiere per le terapie innovative, con un interesse crescente verso i nanosistemi basati sulle CDs. Queste soluzioni emergono come strumenti promettenti per ottimizzare l'efficienza farmacocinetica e il design formulativo, garantendo al contempo elevati standard di sicurezza. Grazie alla loro estrema versatilità, le CDs permettono di progettare nanosistemi "su misura" per lo specifico principio attivo, migliorandone le proprietà chimico-fisiche e i parametri biologici. La ricerca ha evidenziato come tali sistemi siano particolarmente efficaci per la somministrazione orale, offrendo numerosi vantaggi terapeutici, tra cui:

- un elevato carico di farmaco e la sua stabilità all'interno del tratto gastrointestinale;

- rilascio controllato, modificato o sito-specifico;
- la protezione dall'inattivazione pre-sistemica e la completa biodegradabilità del vettore.

L'evoluzione della chimica supramolecolare ha ulteriormente ampliato queste possibilità, portando alla sintesi di architetture complesse come i sistemi coniugati CD-polimero, i polirotassani e le CDs anfifiliche. Questi nanosistemi supramolecolari vengono classificati in base alla loro struttura, tra cui si distinguono micelle, nanosfere, nanocapsule, nanogel, e vescicole (unilamellari o multilamellari) per evidenziarne le specifiche funzionalità (Figura 3)[6], [12].

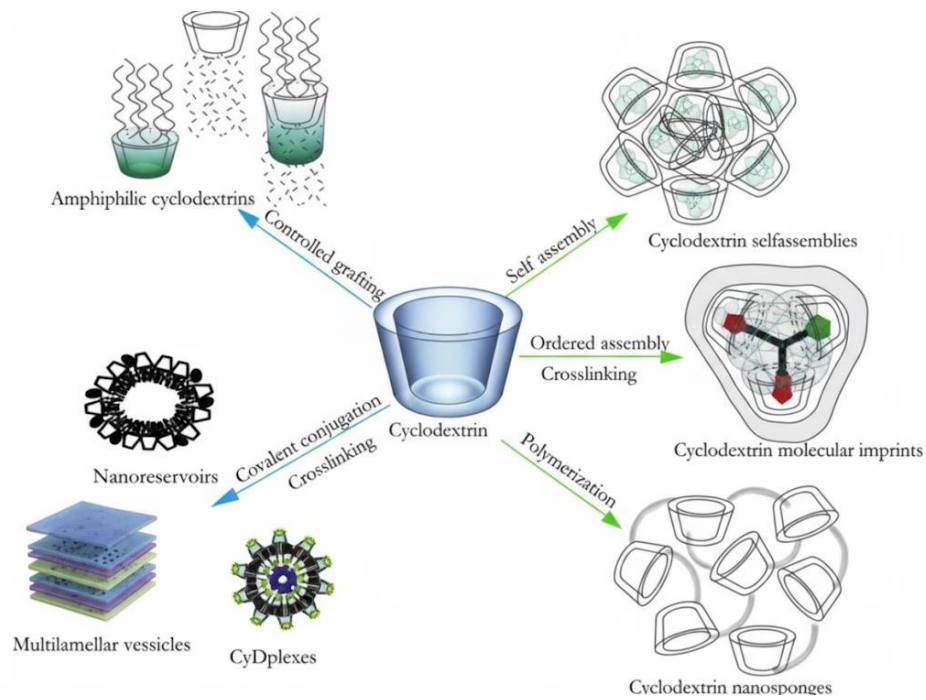


Figura 3. Rappresentazione di nanosistemi supramolecolari a base di ciclodestrine.

La distinzione tra queste strutture è fondamentale per analizzare aspetti critici quali i meccanismi di caricamento del farmaco, le dimensioni delle particelle, la morfologia e le proprietà della superficie [12].

Oltre al loro tradizionale ruolo di vettori, ricerche recenti hanno evidenziato come le CDs possiedano un significativo potenziale come veri e propri farmaci per il trattamento di diverse condizioni patologiche come l'ipercolesterolemia [13] e la malattia di Niemann-Pick C [14]. L'uso della HP β CD ha mostrato risultati sorprendenti grazie alla capacità di formare complessi di inclusione con le molecole di colesterolo, eliminando quindi dalle cellule il colesterolo in eccesso, migliorando la qualità della vita e le aspettative di sopravvivenza [15].

Un prodotto commerciale ad uso ospedaliero è il Sugammadex (Bridion®), una γ -CD modificata, che ha rivoluzionato l'anestesiologia. Utilizzato come antidoto per alcuni miorellassanti, il Sugammadex agisce nel plasma come una vera e propria "trappola molecolare": incapsula gli agenti steroidei simili al curaro, neutralizzandoli istantaneamente e favorendone l'eliminazione attraverso le urine [16] [17].

Risultati simili si stanno osservando anche nella GM1-gangliosidosi, una malattia ereditaria causata dall'accumulo di gangliosidi GM1 in tessuti e organi, in modo prevalente nel cervello. Oltre a queste applicazioni, la ricerca si sta muovendo inoltre verso l'oncologia e la medicina della riproduzione. In ambito chemioterapico, la HP β CD ha dimostrato di poter combattere diverse forme di leucemia [18]; sottraendo colesterolo alle membrane delle cellule tumorali, ne blocca la crescita e ne provoca la morte. Allo stesso modo, nel trattamento dell'infertilità, la Metil β CD viene impiegata per favorire la fecondazione *in vitro*: agendo sulla membrana degli spermatozoi, ne facilita la maturazione e aumenta le probabilità di successo della fecondazione [19].

1.6 Meccanismi di formazione dei complessi di inclusione

La caratteristica distintiva delle CDs consiste nella loro capacità di formare complessi di inclusione con diverse molecole ospiti (*guest*), sia allo stato solido che in soluzione. Tale processo si realizza attraverso l'inserimento del principio attivo all'interno della cavità idrofobica della CD (*host*), dove viene stabilizzato esclusivamente da interazioni non covalenti, come le forze di van der Waals o le interazioni idrofobiche, senza che avvenga la formazione o la rottura di legami chimici permanenti (Figura 4).

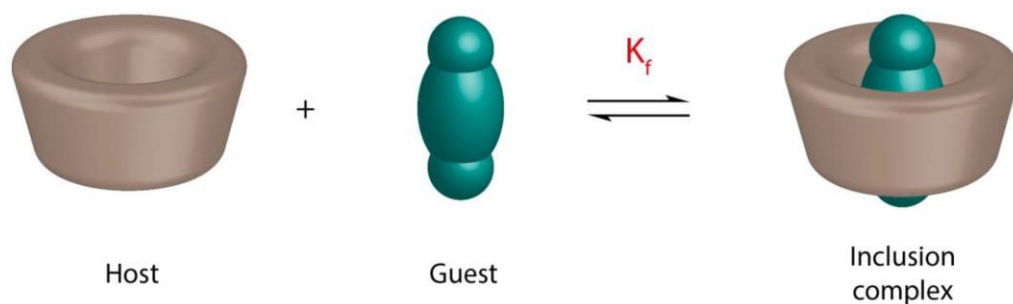


Figura 4. Rappresentazione della formazione di un complesso di inclusione.

Dal punto di vista termodinamico, la complessazione è un fenomeno favorito, specialmente in ambiente acquoso. Inizialmente, la cavità apolare della CD ospita molecole d'acqua in una condizione di instabilità energetica dovuta alla differenza di polarità; l'ingresso di un substrato idrofobico provoca lo spostamento di queste molecole d'acqua verso il solvente esterno, determinando il passaggio verso una configurazione molecolare più stabile e vantaggiosa [11].

Il successo della complessazione dipende innanzitutto dal tipo di CD utilizzata e dalla dimensione della sua cavità interna. Sebbene le CD naturali siano idrofile, presentano una solubilità acquosa limitata e richiedono una perfetta corrispondenza geometrica con la molecola ospite

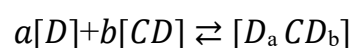
(guest). Affinché il legame sia stabile, il farmaco deve avere dimensioni complementari alla cavità: una molecola troppo voluminosa non riuscirebbe a inserirsi correttamente, mentre una troppo piccola scivolerebbe attraverso la cavità senza formare interazioni significative o instaurando legami estremamente deboli.

Un altro elemento da tenere in considerazione è la carica dei componenti coinvolti. Le CDs ionizzate mostrano generalmente una capacità solubilizzante superiore grazie alla formazione di complessi più efficienti con molecole di segno opposto. Ad esempio, le CD anioniche, come la SBE β CD, stabilizzano efficacemente i farmaci cationici, ma risultano poco efficaci con molecole neutre o cariche negativamente. Al contrario, le CDs neutre, come la HP β CD, sono particolarmente adatte a interagire con farmaci privi di carica.

La natura del solvente ha un ruolo fondamentale nella formazione del complesso, perché sia il farmaco sia la CD devono solubilizzarsi. Sebbene l'acqua rappresenti il mezzo ideale, la scarsa solubilità acquosa di molti farmaci può rallentare o impedire la reazione. In questi contesti si ricorre spesso a solventi organici volatili, come l'etanolo o l'etere dietilico, che hanno il vantaggio di essere facilmente eliminabili e di non competere con il farmaco nella formazione del complesso con la CD.

Infine, la temperatura agisce come parametro critico, in quanto un suo aumento favorisce la solubilità sia del farmaco che del complesso finale, ma al contempo tende a ridurre la costante di stabilità apparente del legame host-guest, quindi deve essere opportunamente bilanciata. [20].

Il processo di inclusione può essere descritto dalla seguente reazione reversibile:



dove:

- $[D]$ è la concentrazione molare del farmaco libero;
- $[CD]$ è la concentrazione molare della CD libera;
- a e b sono i coefficienti stechiometrici di D e CD ;
- $[D_aCD_b]$ è la concentrazione molare del complesso farmaco-CD.

Le molecole di farmaco D reagiscono con le molecole di CD per formare complessi di inclusione con stechiometria $a:b$; la reazione mostra come le molecole di complesso di inclusione siano in equilibrio con le molecole libere nella soluzione.

La costante della reazione è definita costante di formazione (o costante di stabilità) $K_{a:b}$, data dalla seguente equazione:

$$K_{a:b} = \frac{[D_aCD_b]}{[D]^a[CD]^b}$$

Viene espressa in M^{-1} [20] e rappresenta il parametro fondamentale per quantificare l'affinità tra guest e CD [1].

Per determinare sperimentalmente sia il valore della costante sia il rapporto stechiometrico del complesso di inclusione in fase liquida, uno dei metodi più usati è lo studio di solubilità di fase: tale approccio è stato introdotto originariamente da Higuchi e Connors [21]

Il rapporto stechiometrico 1:1 risulta quello più comune; tuttavia esistono anche complessi a diversa stechiometria, come 2:1, 1:2, 2:2 o ordine superiore (Figura 5) [8].

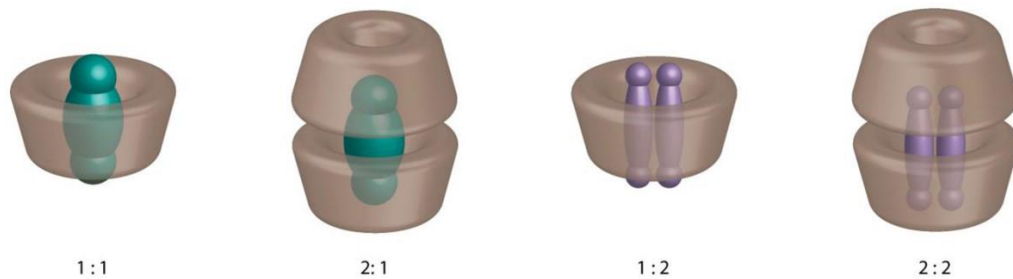


Figura 5. Rappresentazione schematica dei complessi di inclusione a diversa stechiometria.

Il metodo Higuchi e Connors valuta l'incremento della solubilità molare del farmaco (substrato) in funzione della concentrazione molare della CD, in altre parole è possibile determinare l'effetto solubilizzante della CD nei confronti dell'host che è stato solubilizzato da essa. Il diagramma di solubilità di fase si costruisce riportando in ascissa la concentrazione molare dell'agente complessante CD e in ordinata la concentrazione molare del farmaco solubilizzato. I profili di solubilità ottenuti vengono classificati in due macro-categorie (Figura 6), a loro volta suddivise in sottoclassi:

- sistemi di tipo A (complessi solubili): descrivono generalmente la formazione di complessi solubili in cui la solubilità del farmaco aumenta proporzionalmente alla quantità di ciclodestrina aggiunta. All'interno di questa categoria, il profilo A_L indica una crescita lineare tipica di rapporti stechiometrici 1:1 o superiori rispetto al farmaco, mentre il profilo A_P mostra una deviazione positiva dovuta alla formazione di complessi che includono più molecole di CD. Al contrario, il tipo A_N evidenzia una deviazione negativa dalla linearità, spesso causata da fenomeni di auto-associazione o variazioni nelle proprietà chimico-fisiche del solvente ad alte concentrazioni di legante;

- sistemi di tipo B (complessi a limitata solubilità): si riferiscono alla formazione di complessi con solubilità limitata o insolubili nel mezzo acquoso. Nel profilo di tipo B_S , l'aggiunta di CD favorisce inizialmente un aumento della solubilità apparente del farmaco fino a un punto critico di saturazione, superato il quale il complesso precipita determinando una diminuzione della concentrazione in soluzione. Nel caso del profilo B_I , il complesso risulta talmente insolubile che la solubilità del farmaco rimane pressoché costante o diminuisce drasticamente fino ad arrivare alla precipitazione.

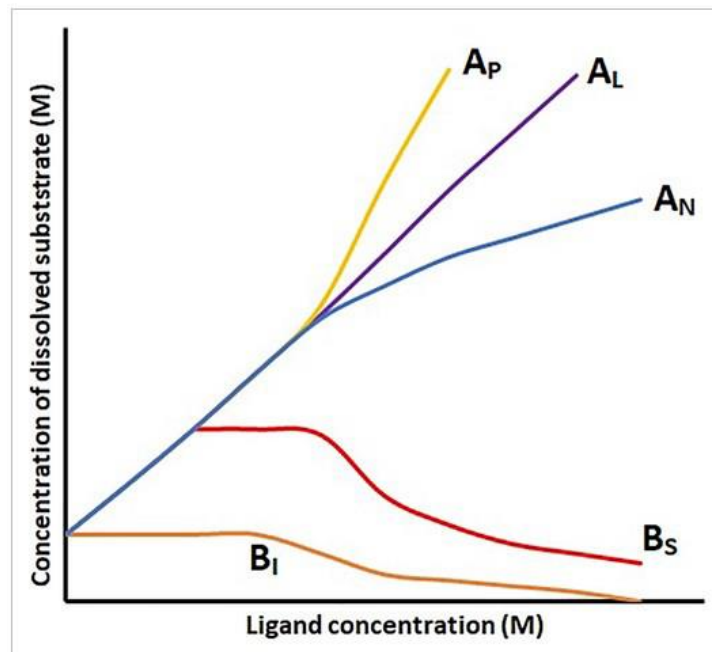


Figura 6. Profili di solubilità di fase secondo Higuchi e Connors.

Dal profilo lineare di solubilità di fase riconducibile ad un rapporto stechiometrico 1:1, è possibile ricavare la costante di formazione del complesso $K_{1:1}$, espressa dalla seguente equazione:

$$K_{1:1} = \frac{Slope}{S_0(1-Slope)}$$

dove:

- *Slope*: pendenza della retta
- S_0 : solubilità intrinseca del farmaco

Da questa equazione risulta che $K_{1:1}$ è però influenzata dalla solubilità intrinseca del farmaco (S_0); per questo motivo un metodo più affidabile consiste nella determinazione della costante di complessazione CE, espressa dalla seguente equazione:

$$CE = S_0 \times K_{1:1}$$

Sostituendo a $K_{1:1}$ l'equazione vista in precedenza, si ottiene:

$$CE = \frac{Slope}{(1-Slope)}$$

Da questa equazione si evince che un valore di CE basso denota la necessità di elevate quantità di CD per la formazione del complesso di inclusione. Un valore di $CE \approx 0,3$ indica che una molecola di CD su quattro è impiegata nella formazione del complesso [22].

1.7 Ciclodestrine anfifiliche

Le CDs anfifiliche (ACDs) rappresentano un'evoluzione significativa delle CDs naturali, progettate specificamente per superare i limiti di solubilità e per creare sistemi di trasporto avanzato.

Le ACDs si ottengono in seguito alla sostituzione dei gruppi ossidrilici (-OH) con catene alifatiche (idrofobe o fluorurate) e talvolta, gruppi idrofili polari o ionici, di varia lunghezza, sulle facce primaria e/o secondaria dell'anello glucopiranosidico. Questa modifica conferisce alla molecola una duplice natura, permettendole di auto-assemblarsi spontaneamente in acqua, senza l'ausilio di tensioattivi, formando:

- micelle e nanosfere: formate da ACDs con catene idrofobe corte. Sono ideali per solubilizzare molecole molto lipofile come i terpeni;
- vescicole e nanocapsule: offrono una stabilità meccanica superiore rispetto le altre tipologie;
- nanoparticelle solide lipidiche.

In base ai gruppi funzionali aggiunti, possono essere classificate in:

- non ioniche, le più studiate, ottenute legando catene alchiliche tramite legami esterei o eterei (esempi in Figura 7 sono i derivati "Lollipop", "Medusa-like" o "Skirt-shaped");
- cationiche, contenenti gruppi amminici che possono risultare importanti per il gene delivery, poiché la carica positiva interagisce con la carica negativa di DNA/RNA;
- anioniche, che contengono gruppi solfato o carbossilato, utili per interagire con farmaci carichi positivamente [6].

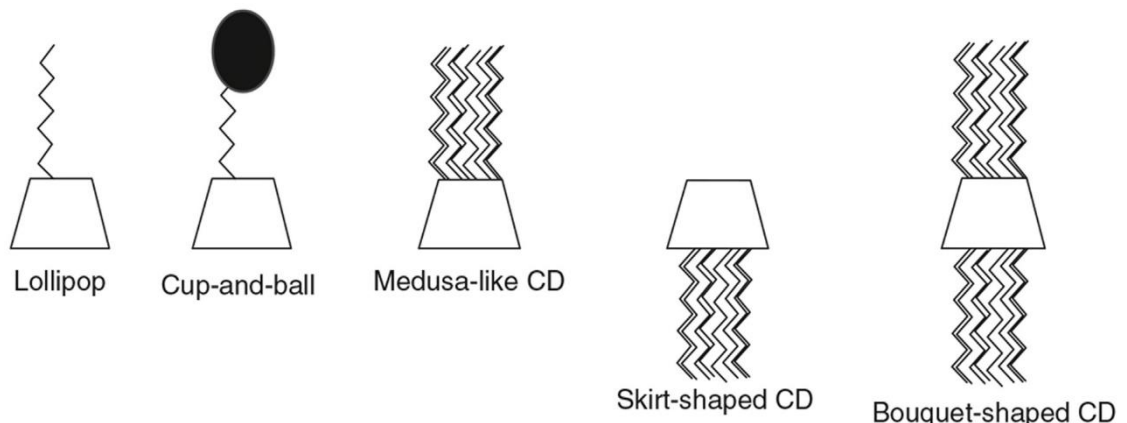


Figura 7. Strutture schematiche di alcune ciclodestrine anfifiliche.

Grazie alle catene idrofobe, le ACDs possono intrappolare farmaci poco solubili non solo nella cavità interna, ma anche tra le catene alifatiche esterne, aumentando significativamente la capacità di carico. La capacità di formare nanoparticelle stabili senza l'aggiunta di tensioattivi riduce drasticamente la potenziale tossicità del sistema (evitando ad esempio l'emolisi dei globuli rossi); in più mostrano una stabilità colloidale superiore e profili di rilascio del farmaco più controllati e prolungati rispetto alle CDs classiche [6]

Nel campo del drug delivery hanno numerosi utilizzi:

- *trasporto di farmaci idrofobi*: sono utilizzate principalmente per aumentare la solubilità e la biodisponibilità di molecole lipofile.
- *capacità di carico "dualistica"*: il farmaco può essere ospitato sia all'interno della cavità della CD (complesso di inclusione) sia tra le catene idrofobe dell'aggregato (interazione idrofobica).
- *trasporto di proteine e peptidi*: creano un ambiente protetto per molecole biologiche fragili.

- *stabilità colloidale*: le nanoparticelle a base di ACDs sono stabili nel tempo e resistono bene alla diluizione nel sangue *in vitro*.
- *bassa tossicità*: a differenza dei tensioattivi sintetici, le ACDs mostrano una ridotta attività emolitica [23].

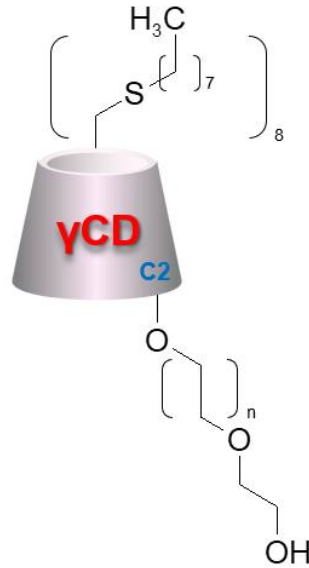
2. SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro di tesi si pone l'obiettivo di caratterizzare alcune ACDs, al fine di approfondire le conoscenze sulle loro proprietà strutturali e sul loro comportamento nella formazione di sistemi colloidali ed in particolare di nanoemulsioni. Le ACDs rappresentano una classe di molecole molto promettente, poiché combinano la capacità di inclusione tipica del macrociclo con la capacità di auto-assemblarsi in sistemi colloidali (come micelle o nanoparticelle). Sono stati considerati tre derivati, uno ottenuto per derivatizzazione della β -CD e due per derivatizzazione della γ -CD con catene alchiliche a diversa lunghezza. La prima fase del lavoro ha previsto la caratterizzazione delle ACDs dal punto di vista chimico-fisico mediante spettrofotometria FT-IR e analisi termogravimetrica (TGA). Se ne è quindi esplorata la capacità di autoassemblarsi in strutture nanoparticellari (micelle polimeriche) che sono state caratterizzate per le dimensioni e per la capacità di caricamento di pirene come sonda fluorescente idrofobica, sensibile alla polarità del microambiente delle micelle. Infine, si è effettuata una valutazione preliminare della capacità di caricamento di un componente idrofobico quale alfa pinene. Anche in questo caso una valutazione per quanto preliminare delle ACDs come stabilizzanti di nanoemulsioni è stata effettuata valutando anche per questi sistemi il diametro medio idrodinamico e il PDI.

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1 Materiali

Ciclodestrine

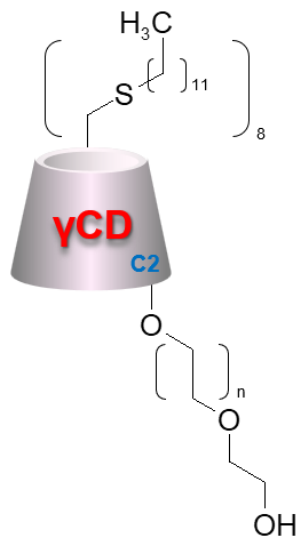


Octakis(6-deoxy-6-octylthio-2-oligo(ethyleneglycol))-gamma-cyclodextrin

Questa CD si presenta come una polvere marrone, prodotta da Carbohyde (Budapest, Ungheria) con le seguenti caratteristiche dichiarate:

Formula bruta: $(SC_8)_8\text{-GCD}-(\text{PEG})_n\text{-OH}$

Solubile in metanolo

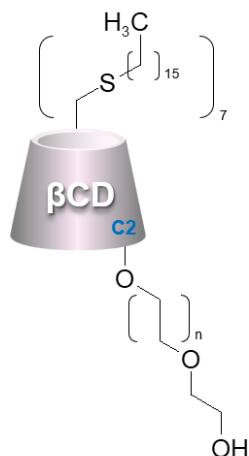


Octakis(6-deoxy-6-dodecylthio-2-oligo(ethyleneglycol))-gamma-cyclodextrin

Questa ciclodestrina si presenta come una polvere marrone chiaro, prodotta da Carbohyde (Budapest, Ungheria) con le seguenti caratteristiche dichiarate:

Formula bruta: $(SC_{12})_8\text{-GCD}\text{-(PEG)}_n\text{-OH}$

Solubile in cloroformio, n-propanolo, DMSO

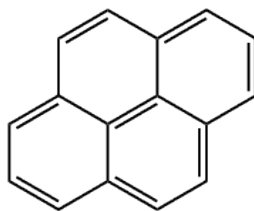


Heptakis(6-deoxy-6-dodecylthio-2-oligo(ethyleneglycol))-beta-cyclodextrin

Questa ciclodestrina si presenta come una polvere giallognola, prodotta da Carbohyde (Budapest, Ungheria) con le seguenti caratteristiche dichiarate:

Formula bruta: $(SC_{16})_7\text{-BCD}\text{-(PEG)}_n\text{-OH}$

Solubile in cloroformio, n-propanolo, DMSO



Pirene

Prodotto da Sigma-Aldrich (Milano, Italia) con le seguenti caratteristiche dichiarate:

Formula bruta: C₁₆H₁₀

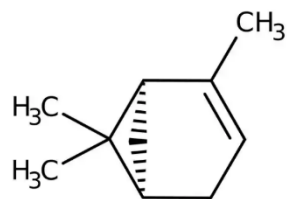
Peso molecolare: 202.25 g/mol

Purezza: 98%

Punto di fusione: 145-148 °C

Punto di infiammabilità: >200 °C

Si presenta come polvere cristallina bianca.



(+)-Alfa-Pinene

Prodotto da Ak Scientific (USA) con le seguenti caratteristiche dichiarate:

Formula bruta: $C_{10}H_{16}$

Peso molecolare: 136.23 g/mol

Purezza: 98%

La sostanza appare come un olio.

3.2 Solventi utilizzati

Tutti i solventi utilizzati acetone, metanolo, *n*-propanolo, dimetilsolfossido, etilacetato sono prodotti da Carlo Erba (Milano, Italia) e sono di grado farmaceutico.

3.3 Metodi

Spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR)

Per la caratterizzazione chimico-fisica delle ACDs è stata utilizzata la spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier (FT-IR). Le misure sono state effettuate nell'intervallo spettrale compreso tra 650 e 4000 cm^{-1} utilizzando uno spettrofotometro Spectrum One (Perkin Elmer, Monza). Grazie al dispositivo MIRacle™ (Pike Technologies), è stato possibile analizzare i campioni allo stato solido, tal quali, mediante la tecnica della riflessione totale attenuata su cristallo di ZnSe. La qualità del segnale è stata garantita mediando 32 scansioni con una risoluzione strumentale di 4 cm^{-1} .

Analisi Termogravimetrica (TGA)

La caratterizzazione termica dei campioni è stata effettuata mediante analisi termogravimetrica (TGA), utilizzando un sistema Mettler STARe accoppiato a calorimetria differenziale a scansione (DSC), modello TGA/DSC1 (Mettler Toledo, Milano, Italia). Per ogni misura, aliquote di circa 5-6 mg sono state allocate in crogioli di allumina chiusi. Le analisi sono state condotte in atmosfera inerte di azoto N_2 , con un flusso costante di 50 mL/min, nell'intervallo di temperatura compreso tra 30 °C e 350 °C e con una velocità di scansione termica di 10 K/min. Preventivamente alle analisi, lo strumento è stato calibrato utilizzando l'indio come standard di riferimento.

Dynamic Light Scattering (DLS)

Le misurazioni della dimensione delle particelle e del PDI (indice di polidispersione) sono state eseguite mediante DLS (Dynamic Light Scattering) utilizzando uno strumento Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical Ltd, Worcestershire, UK). Questa tecnica non invasiva misura le fluttuazioni nell'intensità della luce diffusa causate dal moto browniano delle particelle in sospensione. Quando un raggio laser illumina il campione, le particelle diffondono la luce in tutte le direzioni. La velocità di queste fluttuazioni di intensità dipende dalla velocità delle particelle, che è inversamente proporzionale alle loro dimensioni. Per le analisi sono state usate delle cuvette trasparenti in polidimetilsilossano da 4 mL. Le misurazioni sono state condotte a 25 °C con un laser incidente a 633 nm e un angolo di rilevazione di 90°. Lo strumento esegue tre repliche per ogni campione nelle medesime condizioni.

Analisi spettrofluorimetrica

La determinazione dell'intensità di fluorescenza è stata fatta mediante uno spettrofluorimetro Shimadzu RF-6000 (Shimadzu Italia S.R.L, Milano, Italia) per rilevare lo spettro di emissione nell'intervallo 350-500 nm. Le acquisizioni sono state effettuate con una velocità di scansione di 600 nm/min e un intervallo di campionamento (data interval) di 2.0 nm; per quanto riguarda la configurazione strumentale, sia l'ampiezza di banda in eccitazione (EX Bandwidth) che in emissione (EM Bandwidth) sono state impostate a 5 nm.

Sonicator a sonda (Probe sonicator)

Il sonicator a sonda utilizza le onde sonore ad alta frequenza (ultrasuoni) per agitare le particelle in un campione liquido. È stato valutato l'impatto dell'apporto energetico mediante l'impiego di un sonicator a sonda (Fisherbrand FB-505, frequenza di uscita 20 kHz). Il processo di sonicazione è stato condotto per 15 minuti posizionando il vial in bagno di ghiaccio per mantenere la temperatura costante. L'analisi è stata impostata con un'ampiezza del 20% e cicli intermittenti (10s ON/10s OFF).

3.4 Autoassemblamento di ciclodestrine

Al fine di ottenere sistemi colloidali “scarichi”, a base di sola CD, si procede come di seguito indicato. Si pesano 1,5 mg di ACD e si solubilizzano in 100 μ L di solvente opportuno, metanolo per CD γ 170 e n-propanolo per CD γ 171, rispettivamente, agitando per alcuni secondi a 1000–1200 rpm. La soluzione viene aggiunta goccia a goccia, molto lentamente, ad un volume definito (2900 μ L) di acqua Milli-Q filtrata, mantenuta sotto veloce agitazione, e si osserva la formazione di una sospensione che, considerando la natura anfifilica delle ACD, potrebbe essere riconducibile alla formazione di micelle. Il vial contenente la sospensione viene quindi lasciato sotto cappa, in agitazione fino a completa evaporazione dei solventi organici che avviene nel giro di 30 minuti. La sospensione verrà successivamente caratterizzata mediante DLS appena preparata e dopo conservazione in frigorifero a una temperatura di 4 °C e in freezer a una temperatura di –20 °C.

3.5 Sistema pirene - ciclodestrine

Per preparare la soluzione madre di *pirene*, è stata pesata una quantità opportuna (10^{-3} M) di polvere, disciolta in acetone e lasciata in agitazione fino a completa solubilizzazione. La soluzione è stata diluita in step successivi, dapprima con acetone e poi con H₂O milli Q, fino ad ottenere una soluzione a concentrazione 10^{-7} M.

Sulla soluzione diluita è stata condotta un'analisi spettrofluorimetrica. Lo spettro così ottenuto è stato utilizzato come standard di riferimento per un confronto con i profili di emissione dei sistemi colloidali contenenti pirene e ACDs.

Ciascuna ACDs è stata pesata (1,5 mg) e solubilizzata in 100 μ L di solvente opportuno, metanolo per il campione CD γ 170 e *n*-propanolo per il campione CD γ 171.

Alla soluzione ottenuta vengono aggiunti 30 μ L della soluzione di *pirene* alla concentrazione di 10^{-5} M precedentemente preparata.

La miscela viene agitata per alcuni secondi a 1000–1200 rpm. La soluzione viene aggiunta goccia a goccia, molto lentamente, ad un volume definito (2870 μ L) di acqua Milli-Q filtrata, mantenuta sotto veloce agitazione, e si osserva la formazione di una sospensione riconducibile alla formazione di micelle. Il vial contenente la sospensione viene quindi lasciato sotto cappa, in agitazione per circa 30 minuti, effettuando controlli successivi ed assicurandosi dell'evaporazione completa dei solventi organici. La sospensione verrà successivamente caratterizzata mediante DLS e spettrofluorimetria.

3.6 Sistema α -(+)-pinene - ciclodestrine

Si pesano 1,5 mg di ACD e si solubilizzano in 100 μ L di metanolo o *n*-propanolo a seconda che si tratti del campione CD γ 170 o CD γ 171. La miscela viene agitata per alcuni secondi a 1000–1200 rpm.

A parte si pesa il campione di α -(+)-pinene (rispettivamente da 1,5 mg a 6 mg) e si solubilizza in 30 μ L di acetone aggiunto poi alla soluzione di ACD precedentemente preparata.

La soluzione così ottenuta in rapporto ACD: α -(+)-pinene 1:1 (p/p) o 1:2 (p/p) viene aggiunta goccia a goccia ad un volume definito (2870 μ L) di acqua Milli-Q filtrata mantenuta sotto veloce agitazione e si osserva la formazione di una sospensione riconducibile alla formazione di micelle.

Il vial contenente la sospensione viene quindi lasciato sotto cappa in agitazione per circa 30 minuti fino a completa evaporazione dei solventi organici. La sospensione verrà successivamente caratterizzata mediante DLS.

Successivamente lo stesso campione viene sottoposto a sonicazione con probe per 15 minuti, 20% amplitude, 10s ON/10s OFF e nuovamente analizzato con DLS.

3.7 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta mediante software Statgraphics Centurion 18 (Statgraphics Technologies, The Plains, Virginia, US). E' stata utilizzato un test ANOVA 1-way con successivo confronto tra gruppi mediante Multiple Range Test ($p < 0,05$).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Caratterizzazione delle ciclodestrine anfifiliche

Le CDs oggetto di questo studio sono state gentilmente sintetizzate dal Dott. Milo Malanga di Carbohyde. Preliminarmente alla formulazione dei sistemi colloidali, è stata condotta una caratterizzazione chimico-fisica allo stato solido mediante analisi termica e spettroscopia FT-IR. Le ACDs selezionate per lo studio sono due derivati della γ -CD e un derivato della β -CD, denominate rispettivamente, CD γ 170, CD γ 171 e CD β 172. Sono state ottenute per sostituzione nucleofila mirata sui gruppi ossidrilici delle rispettive CDs naturali, per ottenere una porzione idrofobica e una porzione idrofila.

La faccia superiore della CD è stata sostituita con una catena alchilica mediante un ponte tiolo, la faccia inferiore con una porzione idrofila, in particolare con una catena di polietilenglicole (PEG). Le tre CDs differiscono per la lunghezza della catena lipofila: la CD γ 170 presenta 8 atomi di carbonio, la CD γ 171 ne presenta 12, mentre la CD β 172 16. Ciascuna catena idrofobica si ripete per un numero di volte pari al numero di unità glucosidiche del macrociclo e, pertanto, 7 per la β -CD e 8 per la γ -CD, rispettivamente.

Analisi FT-IR

La spettroscopia FT-IR è stata utilizzata per confermare l'avvenuta funzionalizzazione delle CDs e per identificare i gruppi funzionali caratteristici dei derivati anfifilici analizzati. Negli spettri FT-IR riportati in Figura 8 è possibile osservare per la CD γ 170 la presenza di una banda larga intorno ai 3401 cm⁻¹ a conferma della natura idrofila data dai numerosi gruppi -OH. I picchi intensi da 1000 a 1100 cm⁻¹ sono il 'marker' principale della presenza del PEG [24]. Inoltre i picchi che vanno da 753 cm⁻¹ a 667 cm⁻¹ sono caratteristici del gruppo tioetereo [25] presente nella catena della ACD.

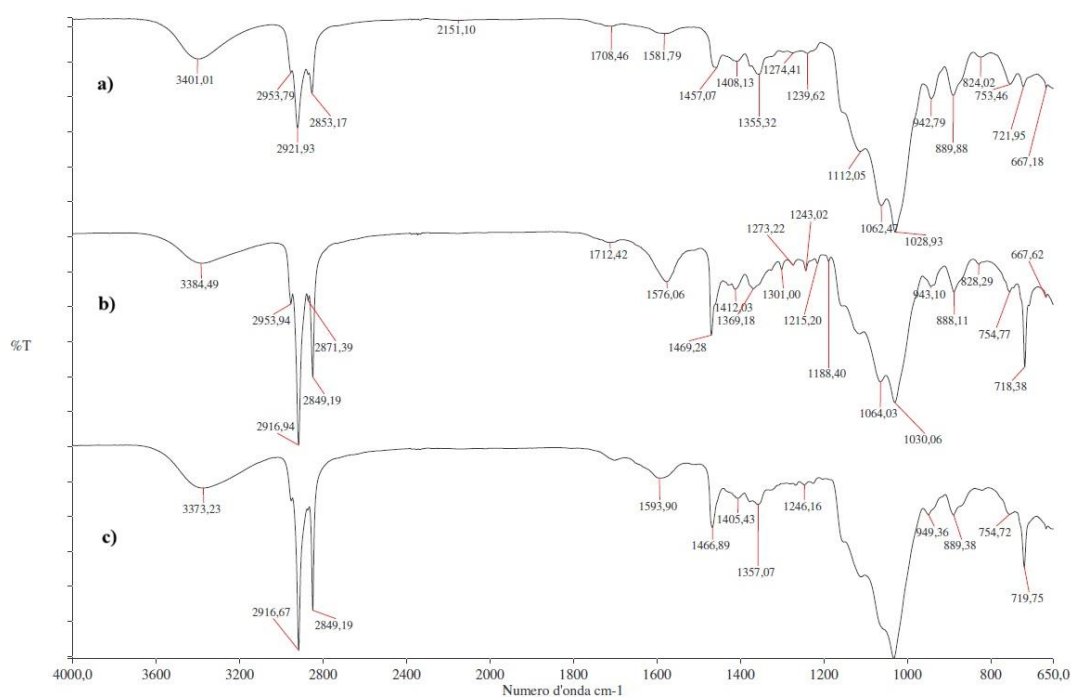


Figura 8. Spettri FT-IR della CD γ 170 (a), CD γ 171 (b) e β CD172 (c).

Le bande più significative sono state riportate in Tabella 3.

Tabella 3. Assegnazione picchi principali FT-IR del campione CD γ 170.

Numero d'onda (cm ⁻¹)	Assegnazione Chimica
3401	Stretching del gruppo -OH
2921.9 e 2853,2	Stretching del legame C-H
1112.1	Stretching C-O
1028.9	Stretching del ponte C-O-C
753 / 667	Stretching S-C

Nello spettro FT-IR della CD γ 171, viene confermata la natura anfifilica della CD funzionalizzata (vedi picchi principali in Tabella 4). Si osserva l'intensa banda di stretching alifatica a 2916-2849 cm⁻¹ dovuta alle catene idrofobiche e il forte assorbimento del sistema etero C-O-C a 1064-1030 cm⁻¹ [24], tipico dello scheletro macrociclico e della catena del PEG. La presenza di una banda larga intorno ai 3384 cm⁻¹ conferma la natura idrofila data dai numerosi gruppi -OH. La presenza del ponte solfuro è suggerita dai segnali deboli nella regione 720-660 cm⁻¹[25].

Tabella 4. Assegnazione picchi principali FT-IR del campione CD γ 171.

Numero d'onda (cm ⁻¹)	Assegnazione Chimica
3384,49	Stretching -OH
2916,45 / 2849,19	Stretching C-H
1111,41	Stretching C-O-C
1030,06	Stretching C-O
718	Stretching C-S

Nello spettro FT-IR della CDβ172 si può osservare che nella regione ad alti numeri d'onda, tra 2916 e 2849 cm⁻¹, sono presenti due picchi intensi che corrispondono allo stretching dei legami C-H alifatici[24]. A 3373 cm⁻¹ è presente la banda larga degli idrossili (-OH). Spostandoci verso la zona centrale dello spettro, si trova un picco a 1026 cm⁻¹, banda caratteristica dello stretching del legame C-O-C [2]. Infine, si può identificare la presenza del legame C-S grazie al segnale a 719 cm⁻¹ (vedi picchi caratteristici in Tabella 5)

Tabella 5. Assegnazione picchi principali FT-IR del campione CDβ172.

Numero d'onda (cm ⁻¹)	Assegnazione Chimica
3373,23	Stretching -OH
2916,67 / 2849,19	Stretching C-H
1110-1026	Stretching C-O-C / C-O
719	Stretching C-S

- **CD γ 171**: Presenta la temperatura di picco più bassa, intorno ai 295-300 °C.
- **CD β 172**: Mostra un picco di degradazione intermedio, circa a 325 °C.
- **CD γ 170**: Risulta essere il più resistente termicamente, con il picco di degradazione che si sposta verso i 335-340 °C.

4.2 Studio di solubilità

La solubilità delle ACDs è stata determinata disperdendo una quantità accuratamente pesata di polvere in un volume via via crescente di solvente ed osservando visivamente l'aspetto del campione. Le prove di solubilità sono state condotte o direttamente a temperatura ambiente (20 °C) o lasciando riequilibrare la soluzione a temperatura "ambiente", dopo breve riscaldamento su piastra riscaldante (40-50 °C) e in seguito a trattamento di sonicazione.

Per i campioni CD γ 170 e CD γ 171 la solubilizzazione è stata immediata, senza richiedere riscaldamento. Al contrario il campione CD β 172 ha mostrato maggiore difficoltà nella solubilizzazione. Per questo motivo, per la CD β 172, è stato condotto uno studio di solubilità più approfondito nei seguenti solventi:

- *n*-propanolo
- etil acetato
- dimetilsolfossido (DMSO).

Le prove di solubilità in *n*-propanolo ed etil acetato hanno evidenziato un comportamento analogo per entrambi i solventi. Nonostante l'aggiunta crescente di volumi di solvente il composto CD β 172 è risultato insolubile a temperatura ambiente. In seguito a riscaldamento, su piastra riscaldante, si è osservata una dissoluzione transitoria, seguita però da una precipitazione del soluto al ripristino della temperatura ambiente. Il successivo trattamento in bagno a ultrasuoni, per 10 minuti, ha infine portato alla formazione di una sospensione opalescente persistente, confermando che il campione non aveva raggiunto la completa solubilizzazione.

Un comportamento diverso è stato riscontrato in DMSO. Sottoponendo 1,5 mg di CD β 172 a aggiunte crescenti di solvente, fino a un volume finale

di 1,5 ml, si è inizialmente osservata la formazione di una sospensione opalescente a temperatura ambiente. Questa opalescenza è risultata parzialmente ridotta sottoponendo il campione a riscaldamento su piastra riscaldante. Il successivo trattamento in bagno a ultrasuoni, per 10 minuti, ha portato alla completa dissoluzione del campione, che è rimasta stabile per 10-15 minuti, per poi tornare opalescente dopo il ritorno a temperatura ambiente.

Per via della scarsa solubilità della CD β 172 non si è proseguito con ulteriori indagini riguardanti questa ACD.

4.3 Preparazione dei sistemi colloidali con pirene

Rifacendosi ad un precedente studio condotto dal gruppo di ricerca [26], si è deciso di utilizzare il pirene come molecola fluorescente, poiché caratterizzata da elevata idrofobicità e limitata solubilità in acqua, il cui spettro di fluorescenza cambia in funzione dell'ambiente circostante. Infatti, essendo una molecola fortemente idrofobica, il pirene tende a ripartirsi preferenzialmente all'interno dei domini apolari, come le cavità delle ciclodestrine o il core idrofobico delle micelle, piuttosto che nella fase acquosa. A seguito della partizione nel microambiente idrofobico, lo spettro del pirene cambia. Questo effetto viene utilizzato, come riportato in letteratura [27], per valutare l'effettiva presenza di strutture simili a micelle, o almeno di domini idrofobici all'interno delle nanoparticelle.

4.4 Caratterizzazione dei sistemi colloidali caricati con pirene

Analisi tramite Dynamic Light Scattering (DLS)

I sistemi ottenuti sono stati caratterizzati tramite Dynamic Light Scattering.

Tabella 6. Diametro medio idrodinamico e PDI dei sistemi allestiti.

	Diametro idrodinamico (nm) ± Dev. St.	PDI (%) ± Dev. St.
CD γ 170	298,6 ± 7,7	20 ± 2
CD γ 170 + pirene	233,4 ± 3,6	10,8 ± 4,8
CD γ 171	306 ± 12,5	14,3 ± 8,7
CD γ 171 + pirene	147,7 ± 12,1	23,6 ± 0,9

In Tabella 6 sono riassunti i parametri dimensionali ottenuti, espressi come media di tre determinazioni successive. I valori del diametro idrodinamico medio e del PDI delle nanoemulsioni cariche di pirene vengono posti a confronto con i rispettivi parametri di sistemi analoghi “scarichi”, preparati seguendo il medesimo protocollo sperimentale.

Dall'analisi dei dati emerge che le nanoemulsioni formulate con CD γ 170 in presenza di pirene mostrano un diametro medio di $233,4 \pm 3,6$ nm, mentre per i sistemi basati su CD γ 171 si osserva una dimensione inferiore, pari a $147,7 \pm 12,1$ nm. Il confronto con i campioni di controllo (“scarichi”) permette di valutare l'eventuale influenza della sonda sull'organizzazione strutturale e sulla stabilità dimensionale del sistema costituito dalla sola ACD.

A titolo di esempio viene riportato in Figura 10 un grafico ottenuto mediante analisi DLS per il campione CD γ 170 + pirene da cui si può osservare la distribuzione omogenea delle particelle nel range dimensionale intorno a 230 nm, con un PDI di circa il 10 %.

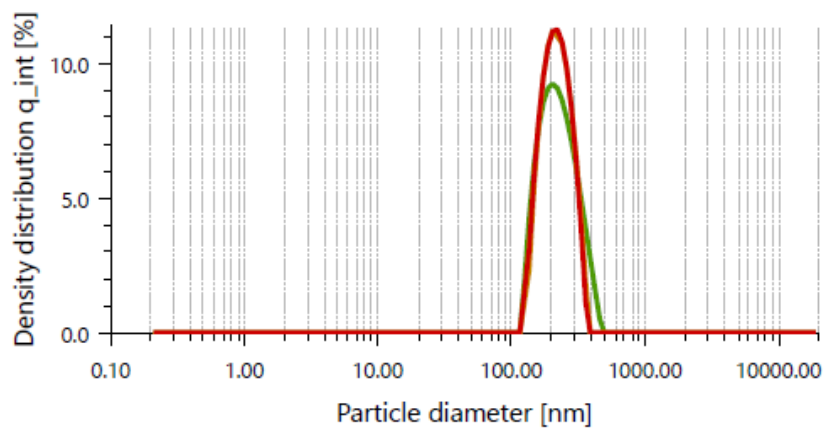


Figura 10. Analisi DLS dei sistemi colloidali a base di CD γ 170 e pirene.

I risultati ottenuti tramite tecnica DLS (Tabella 6) portano a pensare a una possibile interazione tra il pirene e le matrici di ACDs. È interessante notare come l'incorporazione della sonda provochi una riduzione del diametro idrodinamico statisticamente significativo per entrambe le ACDs (ANOVA a una via e Multiple Range Test ($p < 0,05$)). In particolare, per il campione CD γ 171, il diametro dimezza quasi il suo valore, passando da $306 \pm 12,52$ nm a $147,7 \pm 12,10$ nm. Non significativa risulta allo stesso test la differenza tra le non-cariche a base di CD γ 170 e CD γ 171.

Questa riduzione strutturale potrebbe essere attribuibile all'instaurarsi di interazioni idrofobiche tra il pirene e le porzioni apolari delle ACDs; l'ospite potrebbe promuovere un impaccamento più serrato delle catene idrofobiche, portando alla formazione di nanostrutture più compatte rispetto ai sistemi “scarichi” [11] Mentre per la CD γ 170 questo processo porta anche a una maggiore uniformità del sistema (diminuzione del PDI), per la CD γ 171 la marcata riduzione dimensionale si accompagna a un lieve aumento dell'eterogeneità del campione. Nessuna differenza significativa si trova comunque tra i valori di PDI dei diversi campioni.

Analisi spettrofluorimetrica

Le analisi di fluorescenza per rilevarne lo spettro di emissione sono state registrate nell'intervallo 350-500 nm. Le acquisizioni sono state effettuate con una velocità di scansione di 600 nm/min e un intervallo di campionamento (data interval) di 2.0 nm; per quanto riguarda la configurazione strumentale, sia l'ampiezza di banda in eccitazione (EX Bandwidth) che in emissione (EM Bandwidth) sono state impostate a 5 nm.

In prima istanza, è stata analizzata la soluzione di pirene a più bassa concentrazione (10^{-7} M) al fine di avere un riferimento (bianco) per un

confronto con le successive analisi effettuate sulle nanoemulsioni a base di ACDs.

Lo spettro del pirene risente della polarità del microambiente in cui si trova: il rapporto tra le intensità dei picchi di emissione (specificamente il rapporto I_1/I_3) varia a seconda della natura idrofobica o idrofila del mezzo. L'avvenuto inglobamento del pirene all'interno del core idrofobico delle micelle è confermato qualora il rapporto delle intensità risulti inferiore rispetto a quello misurato nella soluzione acquosa di riferimento. Questo criterio di analisi segue il protocollo consolidato nel 1977 da K. Kalyanasundaram and J. K. Thomas [27], i quali hanno dimostrato come lo spettro di fluorescenza del pirene funga da sonda molecolare per studiare i meccanismi di incapsulamento e la formazione di aggregati micellari.

In particolare, per il nostro sistema è stato considerato il rapporto (R) tra le intensità dei picchi registrati alle due lunghezze d'onda di emissione $\lambda_{em} = 373 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 384 \text{ nm}$, in accordo con quanto riportato in letteratura al fine di valutare come questo cambi in funzione dell'ambiente circostante la sonda.

$$R = \frac{I_1 (373 \text{ nm})}{I_3 (384 \text{ nm})}$$

A titolo di esempio viene riportato lo spettro della soluzione di pirene in soluzione acquosa. (Figura 11).

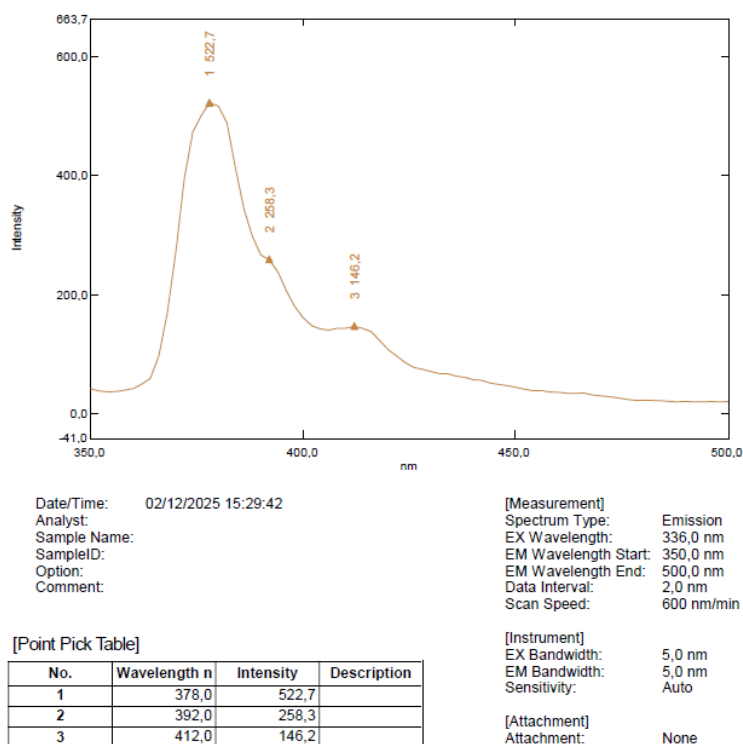


Figura 11. Analisi spettrofluorimetrica della soluzione di pirene.

Successivamente, sono state eseguite le analisi sui sistemi colloidali ottenuti con CD γ 170 e CD γ 171. I risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 7.

Tabella 7. Risultati dell'analisi spettrofluorimetrica dei sistemi caricati con pirene.

	I ₁	I ₂	I ₁ /I ₂
Pirene in soluzione acquosa	522,7	258,3	2
CD γ 170	2703,8	2225,9	1,2
CD γ 171	1213,2	1133,7	1,1

I dati riportati in Tabella 7 evidenziano come il rapporto tra le intensità di emissione del pirene tal quale in soluzione sia significativamente superiore a quello misurato nei sistemi colloidali. Tale diminuzione del rapporto I_1/I_3 conferma il possibile trasferimento delle molecole di pirene dalla fase acquosa all'ambiente idrofobico dei sistemi colloidali risultanti dall'autoassemblaggio delle ACDs. Parte delle molecole di pirene possono essere state inglobate nelle ACDs stesse per complessazione, e parte nei domini idrofobici formati dalle catene alchiliche. L'entità dell'uno e dell'altro contributo dovrà essere analizzata in una successiva più approfondita valutazione, ma il risultato suggerisce la formazione di sistemi nanoparticellari con struttura micellare, in cui si può distinguere un nucleo idrofobico (catene alchiliche) e una zona esterna idrofila (catene di PEG) che si interfaccia con l'ambiente acquoso.

4.5 Sistemi colloidali con α -(+)-pinene

E' stata successivamente valutata la capacità delle due γ -CD anfifiliche di agire come agenti emulsionanti/stabilizzanti per l' α -(+)-pinene, un monoterpene biciclico scelto come modello di sostanza idrofobica oleosa[28]. La composizione della fase acquosa (3 ml) è stata mantenuta in questa fase analoga a quella utilizzata per l'allestimento dei sistemi con pirene, pertanto le ACDs sono state utilizzate in concentrazione pari a 0,5 mg/ml. Come fase oleosa sono state utilizzate quantità di olio di α -(+)-pinene in quantità tale da avere nanoemulsioni con un rapporto ciclodestrina: α -(+)-pinene pari a 1:1 e 1:2 (p/p). Il protocollo di preparazione delle nanoemulsioni è stato mantenuto analogo a quello adottato per i campioni contenenti pirene. Successivamente è stato valutato l'impatto dell'apporto energetico mediante l'impiego di un sonicatore a sonda. Il processo di sonicazione è stato condotto per 15 minuti con un'ampiezza del 20% e cicli intermittenti (10s ON/10s OFF);

l'effetto di tale trattamento sulle proprietà dimensionali del sistema è stato quindi indagato tramite analisi DLS. In tutti i campioni l'utilizzo dell'ultrasonificatore ha portato a un'instabilità del sistema e alla formazione di una nanoemulsione eterogenea, con un aumento del PDI.

Analisi del sistema CD γ 170 e α -(+)-pinene

Il derivato CD γ 170 è stato utilizzato in rapporti 1:1 e 1:2 (p/p) con α -(+)-pinene impiegando quantità crescenti, 1,5 mg, 3 mg e 6 mg. Nella Tabella 8 sono riportati i risultati dell'analisi dimensionale ottenuta per i diversi campioni.

L'analisi DLS ha permesso di caratterizzare l'effetto del carico di α -(+)-pinene sulle proprietà strutturali delle nanoemulsioni di CD γ 170.

Inizialmente, il sistema costituito da CD γ 170 “scarica” presenta un diametro idrodinamico di circa 298 nm. L'aggiunta di 1,5 mg di α -(+)-pinene porta ad ottenere una riduzione delle dimensioni del sistema che presenta un diametro idrodinamico medio pari a circa 113 nm. Questo fenomeno suggerisce un effetto di stabilizzazione idrofobica [11]: il α -(+)-pinene, interagendo con le porzioni anfifiliche della CD, potrebbe favorire la formazione di core più compatti e organizzati.

Tuttavia, aumentando il carico a 3 mg, si osserva un'inversione di tendenza con un incremento del diametro medio intorno a 204 nm e un lieve aumento del PDI (fino al 29%).

E' stata successivamente aumentata in egual misura la concentrazione di CD γ 170 mantenendo un rapporto 1:1 (p/p).

In queste condizioni il diametro idrodinamico si riduce lievemente (150,9 \pm 1,1 nm), e il PDI risulta ancora buono, aggirandosi intorno al 17,5%.

Mantenendo la stessa concentrazione di CD γ 170, e aumentando il α -(+)-pinene a 6 mg, si osserva un andamento molto simile al campione precedente sia per quanto concerne il diametro idrodinamico sia per il PDI.

Infine, incrementando ulteriormente il contenuto in ACD fino a 6 mg, il diametro torna a salire arrivando a circa 206 nm, a conferma che il sistema mantiene caratteristiche nanometriche e polidispersione ottimali.

Tabella 8. Analisi DLS dei sistemi colloidali a base di CD γ 170 con α -(+)-pinene.

	Diametro idrodinamico (nm) \pm Dev. St.	PDI (%) \pm Dev. St.
CD γ 170 “scariche”	298,6 \pm 7,7	20,1 \pm 2
1,5 mg CD γ 170 + 1,5 mg di α -(+)-pinene	113,3 \pm 1,7	24,9 \pm 0,8
1,5 mg CD γ 170 + 3 mg di α -(+)-pinene	204,6 \pm 24,7	29 \pm 4,8
3 mg CD γ 170 + 3 mg di α -(+)-pinene	150,9 \pm 1,1	17,5 \pm 2,2
3 mg CD γ 170 + 6 mg di α -(+)-pinene	144,4 \pm 12,2	27,9 \pm 0,8
6 mg CD γ 170 + 6 mg di α -(+)-pinene	205,9 \pm 8,8	25,5 \pm 2

Analisi del sistema CD γ 171 e α -(+)-pinene

Come per il derivato CD γ 170, anche la CD γ 171 è stata utilizzata in rapporti 1:1 e 1:2 (p/p) con α -(+)-pinene impiegando quantità crescenti, 1,5 mg, 3 mg e 6 mg. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 9 dove è possibile osservare una riduzione del diametro idrodinamico delle micelle in seguito al caricamento con α -(+)-pinene. Nello specifico, la diminuzione più consistente si ottiene con l'aggiunta della minor quantità di α -(+)-pinene, portando il diametro da circa 306 nm a circa 131 nm.

Per il sistema contenente 3 mg di ciascun componente si osserva un lieve incremento del diametro medio idrodinamico che si attesta a circa 191 nm, mantenendo comunque un ottimo profilo di polidispersione (PDI 12,9%), il valore più basso registrato per questa serie.

Il comportamento del sistema muta invece quando si aumenta ulteriormente il carico di α -(+)-pinene fino a 6 mg in presenza di ACD in rapporto 1:1 o 1:2 (p/p); il diametro idrodinamico aumenta considerevolmente superando i 450 nm insieme ad un aumento del PDI che aumenta al 26-27%.

Tabella 9. Analisi DLS dei sistemi colloidali a base di CD γ 171 con e senza α -(+)-pinene.

	Diametro idrodinamico (nm) ± Dev. St.	PDI (%) ± Dev. St.
CD γ 171 “scariche”	306 ± 12,5	14,3 ± 8,7
1,5 mg CD γ 171 + 1,5 mg di α -(+)-pinene	131,3 ± 3	19,1 ± 3,9
1,5 mg CD γ 171 + 3 mg di α -(+)-pinene	179,81 ± 6,2	17,2 ± 4,1
3 mg CD γ 171 + 3 mg di α -(+)-pinene	190,89 ± 2,9	12,9 ± 3,9
3 mg CD γ 171 + 6 mg di α -(+)-pinene	452,1 ± 51,5	26,9 ± 2,9
6 mg CD γ 171 + 6 mg di α -(+)-pinene	462,5 ± 59,9	25,5 ± 2,9

4.6 Stabilità dimensionale delle nanoemulsioni

Al fine di valutare la stabilità fisica del sistema, i campioni di CD γ 170 “scarichi” sono stati conservati in condizioni differenti di temperatura ed in particolare in frigorifero (4 ± 2 °C) e in freezer (-20 ± 2 °C) ed analizzati in termini di dimensioni particellari a tempi diversi fino ad un mese di conservazione. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 10 a confronto con i risultati al tempo 0, ovvero i campioni appena preparati.

Tabella 10. Studio di stabilità dimensionale delle nanoemulsioni con CD γ 170.

	4 ± 2 °C		-20 ± 2 °C	
	Diametro idrodinamico (nm) \pm Dev. St.	PDI (%) \pm Dev. St.	Diametro idrodinamico (nm) \pm Dev. St.	PDI (%) \pm Dev. St.
T₀	306 \pm 7,7	14,3 \pm 2	306 \pm 7,7	14,3 \pm 2,2
7 giorni	313 \pm 3,3	15 \pm 1,3	285 \pm 5,2	21 \pm 2,8
14 giorni	319 \pm 1,8	6 \pm 8,4	335 \pm 44	16 \pm 9,9
30 giorni	321 \pm 4,8	20 \pm 6,7	292 \pm 8,9	20,2 \pm 2,6

Come mostrato nella Tabella 10, i campioni conservati a 4 ± 2 °C hanno mantenuto caratteristiche dimensionali pressoché inalterate per l'intero arco del mese, con una variazione del diametro medio idrodinamico minima; ciò che suggerisce una buona stabilità e l'assenza di fenomeni di aggregazione.

Un analogo risultato caratterizza la conservazione a -20 ± 2 °C, in quanto i dati mostrano fluttuazioni minime sia nel diametro medio idrodinamico che nel PDI. Nonostante lo stress meccanico indotto dalla formazione di

cristalli di ghiaccio durante il congelamento, che può influenzare l'assetto delle catene idrofobiche delle CDs, l'assenza di grosse fluttuazioni del diametro medio idrodinamico conferma che il sistema è in grado di tollerare anche temperature sotto lo zero senza perdere le proprie caratteristiche nanostrutturali.

CONCLUSIONI

La caratterizzazione effettuata sulle tre ACDs in studio dal punto di vista dello stato solido mediante analisi TGA ha permesso di evidenziarne la stabilità termica, dimostrando che questi derivati mantengono l'integrità strutturale fino a temperature elevate e confermando che il processo di funzionalizzazione non ha indebolito lo scheletro glucopiranosidico. La caratterizzazione mediante spettroscopia FT-IR ha permesso di identificare i gruppi sostituenti presenti negli anelli delle ACDs a ulteriore conferma di quanto precedentemente evidenziato mediante analisi NMR effettuate in Carbohyde e non inserite nel contesto della presente tesi.

Considerando la natura anfifilica di queste CDs se ne è verificata la tendenza all'autoassemblaggio. Ciò è stato quindi verificato mediante analisi dimensionale condotta su sistemi ottenuti disperdendo soluzioni organiche di CDs in acqua. I risultati hanno dimostrato che le ACDs sono in grado di formare spontaneamente aggregati di tipo micellare con dimensioni nanometriche.

Il caricamento in questi sistemi colloidali di pirene, una molecola utilizzata come sonda fluorescente idrofobica ha permesso di ottenere informazioni sulla polarità del microambiente interno delle strutture formate dalle ACDs. Le analisi dimensionali dei campioni ottenuti hanno consentito di affermare che l'incorporazione del pirene non altera significativamente le dimensioni del sistema colloidale, mantenendo una distribuzione compatibile con sistemi nanoparticellari stabili. Inoltre, l'analisi spettrofluorimetrica ha confermato il cambiamento dello spettro della sonda a indicare che questa si trova a seguito di caricamento inserita in un microambiente idrofobico. Si può ipotizzare che essa si collochi all'interno della cavità idrofobica del macrociclo o si ripartisca tra le

catene alchiliche degli aggregati, confermando la natura anfifilica del sistema e la sua capacità di caricamento dualistica.

Lo studio è proseguito caricando α -(+)-pinene, una molecola oleosa a carattere idrofobico nelle ACDs. I sistemi ottenuti hanno dimostrato che le ACDs sono in grado di formare nanoemulsioni stabili con l' α -(+)-pinene, e il sistema, in termini di dimensioni e omogeneità, mantiene un buon profilo a concentrazioni più basse di olio. I risultati ottenuti in questo lavoro, sono ancora preliminari ma rappresentano il punto di partenza per uno studio più approfondito di questi nanosistemi che potrebbero rivelarsi una piattaforma tecnologica promettente. L'obiettivo futuro sarà quello di sfruttare il sistema a base di ACD e α -(+)-pinene (o altre molecole oleose) come stabilizzante di emulsioni per incrementare la capacità di carico di molecole attive scarsamente idrosolubili, sfruttando da un lato la capacità complessante della CD e dall'altro il loro ruolo come stabilizzanti della formulazione. Questo approccio 'dualistico' apre la strada a formulazioni farmaceutiche sempre più efficienti.

Inoltre, in futuro si dovranno anche completare gli studi della stabilità dei sistemi con la CD γ 171, che non hanno al momento dato risultati riproducibili e occorre, pertanto, una ulteriore loro indagine.

Lo studio dovrà inoltre essere esteso anche al derivato della β CD che è stato solo caratterizzato da un punto di vista di stato solido e presenta una minore solubilità in solventi organici rispetto alle altre due ACDs. Questa ACD rappresenta però una sfida formulativa essendo il derivato della CD che, avendo una cavità che si adatta molto bene alle dimensioni della maggior parte dei farmaci, è la più utilizzata in ambito farmaceutico. Potrebbe, pertanto, rappresentare un eccipiente molto promettente anche in sistemi innovativi come quelli oggetto del presente lavoro di tesi.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Kurkov S. V. and T. Loftsson, (2013) Cyclodextrins, *International Journal of Pharmaceutics*, vol 453, pp 167-180.
- [2] Poulson B. G. et al. (2021). Cyclodextrins: structural, chemical, and physical properties, and applications. *Polysaccharides*, 3(1), 1-31.
- [3] Liu Z. et al., (2021). Cyclodextrin polymers: structure, synthesis, and use as drug carriers. *Progress in Polymer Science*, vol. 118, 101408.
- [4] Crini G., (2014), Review: A history of cyclodextrins Chemil Reviews, *American Chemical Society*. vol. 114, no 21, pp 10940-10975.
- [5] M. A. Estes and C. M. Romero, (2024), Cyclodextrins: Properties and Applications, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*.
- [6] Varan G., Varan C., Erdoğan N., Hincal A. A. & Bilensoy E. (2017). Amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 531(2), 457-469.
- [7] Saokham P., Muankaew C., Jansook P. & Loftsson T. (2018). Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes. *Molecules*, 23(5), 1161.
- [8] B. G. Poulson *et al.*, (2022) Cyclodextrins: Structural, Chemical, and Physical Properties, and Applications, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute* 3(1), 1-31.
- [9] E. M. M. Del Valle, (2004) "Cyclodextrins and their uses: A review.
- [10] Brewster M. E. & Loftsson T. (2007). Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced drug delivery reviews*, 59(7), 645-666.
- [11] Jambhekar S. S. & Breen P. (2016). Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. *Drug discovery today*, 21(2), 356-362.

- [12] Adeoye O. & Cabral-Marques H. (2017). Cyclodextrin nanosystems in oral drug delivery: a mini review. *International journal of pharmaceutics*, no 531(2), pp 521-531.
- [13] J. Férézou *et al.* (1997), Hypocholesterolemic action of β -cyclodextrin and its effects on cholesterol metabolism in pigs fed a cholesterol-enriched diet. *J. Lipid Res.*, vol. 38, no. 1, pp. 86–100.
- [14] S. Hoque *et al.* Differential effects of 2-hydroxypropyl-cyclodextrins on lipid accumulation in Npc1-null cells (2020). *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 3.
- [15] Inc. Cyclo Therapeutics, ‘Studio di fase 3 per valutare Trappsol(R) Cyclo(TM) per via endovenosa in pazienti pediatrici e adulti con malattia di Niemann-Pick di tipo C1 (TransportNPC)’.
- [16] Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), ‘Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto: Bridion.’
- [17] Jahr JS, Miller JE, Hiruma J, Emaus K, You M, and Meistelman C (2015). Sugammadex: A scientific review including safety and efficacy, update on regulatory issues, and clinical use in Europe. *Am J Ther*, pp. 288–297.
- [18] K. Gotoh *et al.*, The antitumor effects of methyl- β -cyclodextrin against primary effusion lymphoma via the depletion of cholesterol from lipid rafts (2014). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 455, no. 3–4, pp. 285–289.
- [19] Arima H., Motoyama K. & Higashi T. (2017). Potential use of cyclodextrins as drug carriers and active pharmaceutical ingredients. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 65(4), 341-348.
- [20] Jacob S. & Nair A. B. (2018). Cyclodextrin complexes: Perspective from drug delivery and formulation. *Drug development research*, 79(5), 201-217.
- [21] Higuchi T. K., A. C. (1965). A phase solubility technique. *Adv. Anal. Chem. Instrum.*, 4, 117-211.
- [22] Cheirsilp B. & Rakmai J. (2016). Inclusion complex formation of cyclodextrin with its guest and their applications. *Biol Eng Med*, 2(1), 1-6.
- [23] R. D. Pârvănescu *et al.*, (2025). The Potential of Amphiphilic Cyclodextrins as Carriers for Therapeutic Purposes: A Short Overview, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*.

- [24] F. X. W. e D. J. K. Robert M. Silverstein, *Identificazione Spettrometrica di Composti Organici*, ed. CEA/Zanichelli.
- [25] J. Zhang *et al.* (2008). Aliphatic thioether polymers as novel cathode active materials for rechargeable lithium battery. *Electrochem. commun.*, vol. 10, no. 10, pp. 1551–1554.
- [26] M. C. Bonferoni *et al.*(2014) Ionic polymeric micelles based on chitosan and fatty acids and intended for wound healing. Comparison of linoleic and oleic acid, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 87, no. 1, pp. 101–106.
- [27] K. Kalyanasundaram, (1977). Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems. *J. Am. Chem. Soc.* 2039-2044.
- [28] G. Botti *et al.*, “Nasal Administration of a Nanoemulsion Based on Methyl Ferulate and Eugenol Encapsulated in Chitosan Oleate: Uptake Studies in the Central Nervous System (2025). *Pharmaceutics*, vol. 17, no. 3.

