

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

**Messa a punto di un metodo analitico LC-HRMS per la semi-quantificazione di acido
ursolico in sistemi di drug delivery basati sull'utilizzo di vescicole extracellulari
vegetali**

Relatore

Prof.ssa Erika Del Grosso

Correlatore/i:

Dott. Salvatore Villani

Candidato

Serena Maria Massaro Cenere

Matricola 20015919

Anno Accademico 2024-2025

Sessione Straordinaria

LISTA ABBREVIAZIONI

LC-MS Cromatografia Liquida- Spettrofotometria di Massa

ESI Ionizzazione Elettrospray

MS/MS spettrometria di massa tandem

RT tempo di ritenzione

UA acido ursolico

OA acido oleanolico

BA acido betulinico

EV vescicole extracellulari

PDEV *Plant-Derived Extracellular Vesicles* (vescicole extracellulari di origine vegetale)

PRM Parallel Reaction Monitoring

DMSO dimetilsolfossido

LOQ *Limit of Quantification* (Limite di quantificazione)

LOD *Limit of Detection* (Limite di rilevabilità)

MeOH metanolo

H₂O acqua

FA acido formico

EE% *Encapsulation efficiency* (efficienza di incapsulamento)

INDICE

1.INTRODUZIONE	1
1.1 ACIDO URSOLICO	1
1.1.1 ORIGINE DELL'ACIDO URSOLICO	1
1.1.2 CARATTERISTICHE CHIMICO FISICHE ACIDO URSOLICO	5
1.1.3 ATTIVITÀ FARMACOLOGICHE DELL'ACIDO URSOLICO	5
1.2 VESCICOLE EXTRACELLULARI	7
1.3 SISTEMI INNOVATIVI DI SOMMINISTRAZIONE	11
1.4 METODI ANALITICI PER QUANTIFICARE L'ACIDO URSOLICO	12
2. SCOPO DEL LAVORO	17
3. MATERIALI E METODI	18
3.1 SOLVENTI	18
3.2 APPARECCHIATURE USATE	18
3.3 METODO LC-HRMS	19
3.3.1 CONDIZIONI LC	19
3.3.2 CONDIZIONI MS	20
3.4 PREPARAZIONE DELLA FASE MOBILE	21
3.5 PUREZZA ACIDO URSOLICO	21
3.8 PREPARAZIONE CAMPIONI DI VESCICOLE EXTRACELLULARI CON ACIDO URSOLICO	22
3.8.1 ISOLAMENTO DELLE VESCICOLE EXTRACELLULARI DA DERIVATI DA MELA	23
3.8.2 CARICAMENTO DELLE VESCICOLE EXTRACELLULARI CON ACIDO URSOLICO	24
3.9 PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI PER LA QUANTIFICAZIONE DELL'UA NELLE VESCICOLE	26
3.9.1 PREPARAZIONI DELLE SOLUZIONI PER LA CURVA DI CALIBRAZIONE	26
3.9.2 TRATTAMENTO CAMPIONI PER DETERMINAZIONE SEMI-QUANTITATIVA	26
3.9.3 EFFICIENZA INCAPSULAMENTO	28
.4. RISULTATI E DISCUSSIONI	28
4.1 METODO LC-HRMS	29
4.2 PUREZZA ACIDO URSOLICO	31
4.3 SEMI-QUANTIFICAZIONE DELL'ACIDO URSOLICO NELLE VESCICOLE EXTRACELLULARI	36

4.4.1 CURVA DI CALIBRAZIONE	36
4.4.3 DETERMINAZIONE SEMI-QUANTITATIVA ACIDO URSOLICO IN VESICOLE EXTRACELLULARI	37
5. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI	42
BIBLIOGRAFIA	44

1.INTRODUZIONE






1.1 Acido ursolico


1.1.1 Origine dell'acido ursolico

L'acido ursolico è un triterpenoide pentaciclico appartenente ai metaboliti secondari di origine vegetale, comunemente localizzato nella corteccia del fusto, nelle foglie e nella buccia dei frutti. Tra le categorie di prodotti naturali, i triterpenoidi rappresentano una vasta famiglia di composti e comprendono più di 20.000 molecole identificate, incluso l'acido ursolico con promettente valore terapeutico.[1] Accanto all'acido ursolico, altre molecole triterpeniche strutturalmente affini, come l'acido oleanolico, l'acido betulinico, l'uvaolo e gli isomeri α - e β -amirina, risultano ampiamente distribuite nel regno vegetale. La concentrazione relativa di tali composti e il loro profilo compositivo variano sensibilmente da specie a specie, in funzione della specifica attività degli enzimi coinvolti nella loro biosintesi.[3] Tra le matrici vegetali con un alto contenuto di acido ursolico (Tabella 1.1) e di potenziale importanza pratica come fonte di questo composto si possono menzionare la buccia del frutto di mela (*Malus domestica*), le foglie e la corteccia di eucalipto (*Eucalyptus*), le foglie di maggiorana (*Origanum majorana*), le foglie di rosmarino (*Rosmarinus officinalis*), le foglie di salvia (*Salvia officinalis*), le foglie di origano (*Origanum vulgare*), le foglie di timo (*Thymus vulgaris*), le foglie e i fiori di lavanda (*Lavandula angustifolia*), le foglie di caffè (*Coffea arabica*), le foglie e la corteccia di sambuco nero (*Sambucus nigra*), le foglie e i fiori di biancospino (*Crataegus* spp.), e lo strato ceroso di molti frutti commestibili come pere e prugne.[1], [3]

Tabella 1.1-Fonti naturali di acido ursolico [4]: principali fonti biologiche in cui è presente l'acido ursolico, suddivise per nome della specie, immagine rappresentativa, parte della pianta e famiglia botanica.

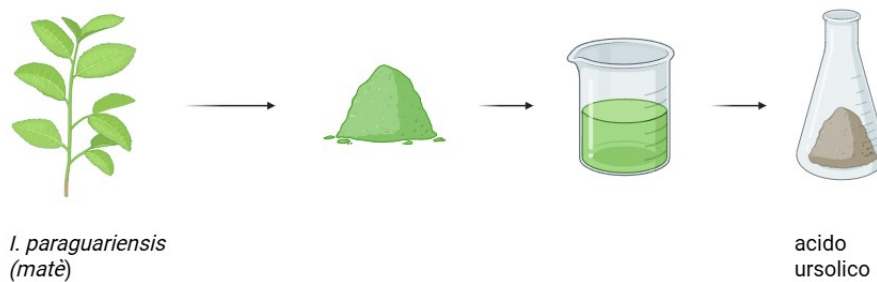
Nome comune	Figura vegetale	Parte della pianta	Fonte biologica (famiglia)
Mela		buccia di frutta	<i>Malus domestica</i> (Rosaceae)
Sambuco nero		Foglie e corteccia	<i>Sambucus nigra</i> (Adoxaceae)
Caffè		Foglie e frutti	<i>Coffea arabica</i> (Rubiaceae)
Eucalipto		Foglie e corteccia	<i>Eucalipto</i> (Myrtaceae)
Biancospino		Foglie e fiori	<i>Crataegus</i> spp. (Rosaceae)

Nome comune	Figura vegetale	Parte della pianta	Fonte biologica (famiglia)
basilico sacro		Foglie	<i>Ocimum sanctum</i> (Lamiaceae)
Lavanda		Foglie e fiori	<i>Lavandula angustifolia</i> (Lamiaceae)
Maggiorana		Pianta intera	<i>Origanum majorana</i> (Lamiaceae)
Origano		Foglie	<i>Origanum vulgare</i> (Lamiaceae)
Rosmarino		Foglie	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Lamiaceae)
Salvia		Foglie	<i>Salvia officinalis</i> (Lamiaceae)

Nome comune	Figura vegetale	Parte della pianta	Fonte biologica (famiglia)
Timo		Foglie	<i>Timo vulgaris</i> (Lamiaceae)

Un'altra delle fonti dell'acido ursolico è il mate da cui viene estratto da campioni di foglie polverizzate di *I. paraguariensis* (matè) con un processo che ha lo scopo di rimuovere i composti meno polari come gli esteri amirini, producendo uno sciroppo che viene poi trattato, in modo da ottenere il precipitato dell'acido ursolico (Figura 1.1). L'acido ursolico così ottenuto risulta contaminato da acido oleanolico.[5]

Figura 1.1 - Schema del processo di estrazione dell'acido ursolico da foglie di mate: dalle foglie viene ottenuto uno sciroppo concentrato, successivamente lavorato per isolare l'acido ursolico in forma di polvere.

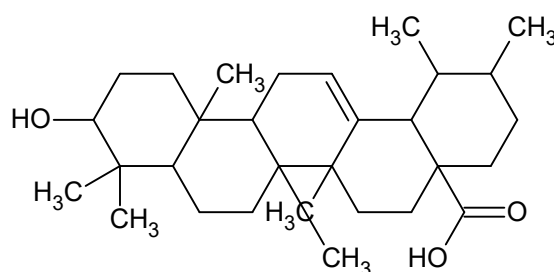


Created in [BioRender.com](https://www.biorender.com) 

1.1.2 Caratteristiche chimico fisiche acido ursolico

L'acido ursolico (UA) è una molecola triterpenica di origine vegetale ampiamente distribuito in foglie, frutti e cortecce di numerose specie botaniche che presenta numerose proprietà farmaceutiche. La struttura dell'acido ursolico (Figura 1.2) comprende un isoprenoide C-30 nella forma di un triterpenoide pentaciclico, la sua formula molecolare è $C_{30}H_{48}O_3$, peso molecolare 456.70032 g/mol, punto di fusione 283 °C–285 °C, con una lunghezza d'onda massima di assorbimento UV di ~450 nm.[1]

Figura 1.2 – Struttura chimica e proprietà molecolari dell'acido ursolico.



Molecular Formula: $C_{30}H_{48}O_3$
Formula Weight: 456.711
[M+H]⁺: 457.367622 Da
[M-H]⁻: 455.353069 Da

L'acido ursolico presenta una solubilità estremamente ridotta in acqua, attribuibile alla sua natura idrofobica e alla presenza prevalente di gruppi funzionali apolari. Risulta invece solubile in solventi organici appropriati, quali acido acetico glaciale caldo e NaOH alcolico. La solubilità dell'acido ursolico aumenta significativamente con l'aumentare della temperatura, indipendentemente dal solvente utilizzato. Tuttavia, l'aggiunta di acqua, anche in piccole quantità, riduce drasticamente la sua solubilità, a causa della sua struttura chimica idrofobica.[1], [2]

1.1.3 Attività farmacologiche dell'acido ursolico

L'acido ursolico impiegato da secoli in estratti erboristici della medicina tradizionale, solo negli ultimi decenni ha suscitato un crescente interesse scientifico per il suo ampio spettro di attività farmacologiche (Figura 1.3). Numerosi studi hanno evidenziato come l'acido ursolico sia in grado di modulare processi biologici fondamentali, tra cui la proliferazione

cellulare, l'apoptosi, l'angiogenesi e la trasduzione del segnale, agendo su fattori di trascrizione pro-infiammatori, proteine del ciclo cellulare e molecole chiave delle vie di segnalazione intracellulare. In particolare, si è distinto per il suo potenziale chemio preventivo e chemioterapico, mostrando effetti promettenti contro la crescita tumorale, la metastatizzazione e la formazione di neo-vascolarizzazione a supporto dei tumori. [1], [3], [6]

Parallelamente, è stato osservato un ruolo rilevante nella protezione da danni cardiovascolari e neurodegenerativi, nonché nella modulazione di processi legati all'infiammazione cronica e allo stress ossidativo, condizioni alla base di numerose patologie degenerative. Oltre a queste proprietà, sono state riportate anche attività antimicrobiche e altri effetti farmacologici di potenziale interesse clinico [1], [3], [6].

Nonostante i numerosi benefici dell'acido ursolico, l'applicazione clinica dell'acido ursolico è limitata dalla sua scarsa solubilità in acqua e bassa biodisponibilità.

Figura 1.3- *Principali effetti terapeutici attribuiti all'acido ursolico, quali proprietà antinfiammatorie, antiossidanti, antitumorali e antimicrobiche.*



1.2 Vescicole extracellulari

Le vescicole extracellulari (EV) sono nanoparticelle prodotte e rilasciate da tutte le cellule, sia procariotiche che eucariotiche. Sono costituite da una membrana lipidica associata a proteine di membrana, che racchiude un nucleo acquoso contenente molecole solubili come proteine e acidi nucleici, ad esempio miRNA e mRNA. Le vescicole extracellulari agiscono come strumenti di comunicazione intercellulare, trasferendo informazioni e molecole bioattive dalla cellula produttrice a quelle riceventi, sia nelle vicinanze che in siti distanti dell'organismo. In base al loro processo di formazione e rilascio, le EV si dividono principalmente in tre categorie: Esosomi (EXOs), le vescicole extracellulari più piccole, con dimensioni comprese tra 50 e 100 nm, originate dal ripiegamento interno della membrana degli endosomi, con la formazione di corpi multivescicolari; Microvescicole (MVs), con dimensioni tra 100 e 1000 nm, generate dal distacco diretto della membrana plasmatica; Corpi apoptotici (ABs), con diametro compreso tra 1 e 5 μm , prodotti durante la morte cellulare programmata (apoptosi).[7]

Le vescicole extracellulari sono presenti in numerosi fluidi biologici, come sangue, latte, urina e saliva, e svolgono un ruolo cruciale nella comunicazione intercellulare, regolando processi fisiologici e patologici.[8], [9]

Il crescente interesse verso queste strutture deriva dalle loro peculiari proprietà biologiche: stabilità nei fluidi biologici, capacità di attraversare barriere fisiologiche come la barriera emato-encefalica o il tratto gastrointestinale, e abilità di trasferire selettivamente materiali biochimici alle cellule bersaglio.[10]

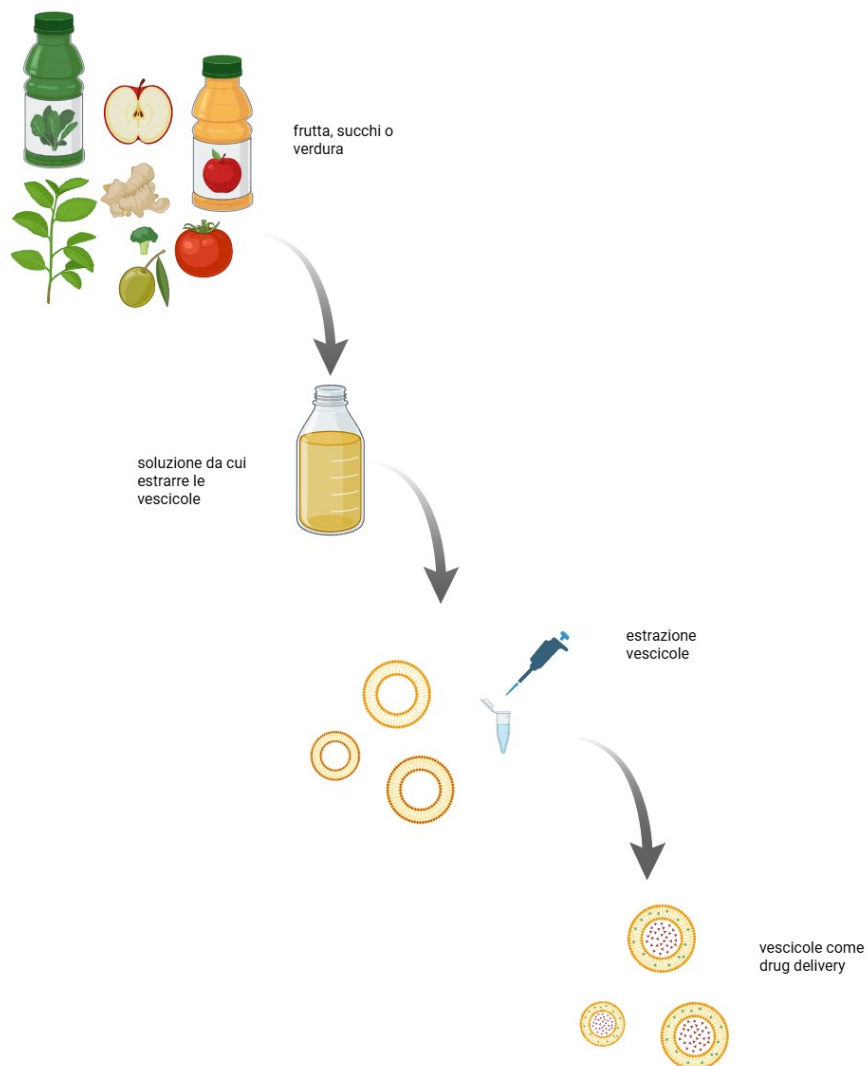
Dal punto di vista strutturale, le vescicole extracellulari sono composte da un doppio strato fosfolipidico arricchito in colesterolo, sfingolipidi e fosfatidilserina, elementi che conferiscono stabilità e favoriscono l'internalizzazione da parte delle cellule riceventi. Oltre a lipidi e proteine, queste vescicole trasportano anche RNA messaggeri, miRNA, RNA non codificanti e DNA mitocondriale, molecole in grado di modulare l'espressione genica e influenzare le funzioni biologiche delle cellule riceventi. [11]

In ambito farmacologico, tali caratteristiche rendono le vescicole extracellulari vettori naturali di biomolecole con potenziale utilizzo per la somministrazione mirata di farmaci e macromolecole terapeutiche. La loro biocompatibilità, la capacità di proteggere il carico terapeutico dalla degradazione enzimatica le rendono particolarmente promettenti rispetto ai vettori sintetici convenzionali. Tuttavia, l'applicazione clinica delle EV di origine animale

è ancora limitata da difficoltà tecniche legate all'isolamento, al caricamento del farmaco e alla standardizzazione dei protocolli di produzione.[10]

Negli ultimi anni, una crescente attenzione è stata rivolta alle vescicole extracellulari di origine vegetale (*Plant-Derived Extracellular Vesicles*, PDEV), che rappresentano un'alternativa sostenibile e sicura ai sistemi tradizionali di *drug delivery*. Le PDEV possono essere isolate da differenti matrici vegetali, tra cui succhi, frutti, radici, semi o materiali vegetali essiccati (Figura 1.4), e sono costituite da nanostrutture lipidiche prive di colesterolo ma arricchite da componenti che conferiscono maggiore stabilità nel tratto gastrointestinale. [12] È inoltre possibile recuperarli da sottoprodotti dell'industria alimentare, un ambito ancora scarsamente esplorato nonostante alcune evidenze, come l'isolamento da acque di vegetazione di olivo [13], [14]

Figura 1.4-Isolamento vescicole extracellulari da matrici vegetali [13]



Analogamente alle vescicole extracellulari di mammifero, le PDEV trasportano proteine, lipidi, RNA e metaboliti secondari che contribuiscono alle loro proprietà antiossidanti, antinfiammatorie e immunomodulanti. Grazie alla loro struttura anfifilica, possono incapsulare e veicolare sia composti idrofili che lipofili, migliorando la stabilità, l'assorbimento e la biodisponibilità dei principi attivi somministrati per via orale. [13], [15]

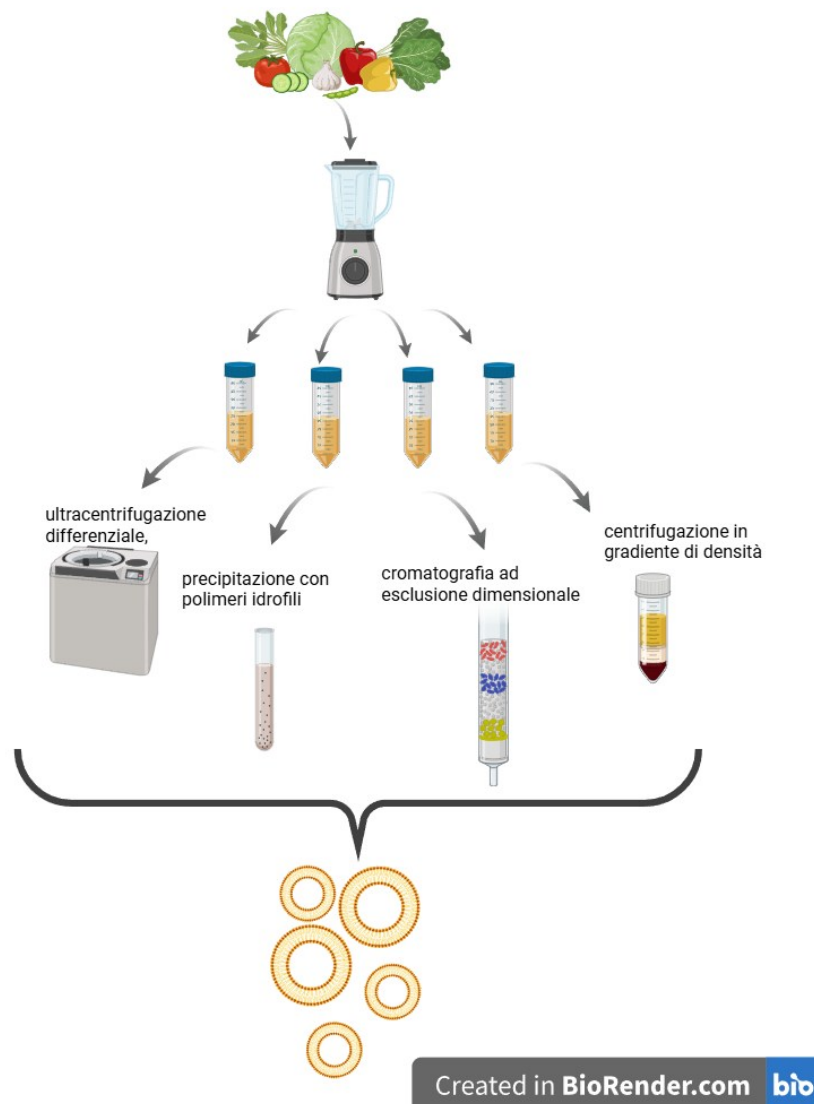
Un aspetto di particolare rilevanza è la capacità delle PDEV di mediare la comunicazione intercellulare tra specie diverse (*cross-kingdom communication*), dimostrando la possibilità di modulare l'espressione genica di cellule animali attraverso il rilascio controllato del proprio contenuto. Tale fenomeno apre nuove prospettive per l'impiego delle PDEV come carrier naturali di molecole terapeutiche, inclusi farmaci antitumorali, composti nutraceutici e RNA terapeutici.[13], [15]

Le vescicole extracellulari, naturalmente coinvolte nei processi di comunicazione intercellulare, sono in grado di attraversare barriere biologiche, proteggere i farmaci da fenomeni degradativi e modulare il rilascio in maniera controllata e prolungata. Inoltre, rispetto ai liposomi artificiali, le vescicole extracellulari di origine vegetale possono presentare una composizione molecolare più complessa, comprendente composti bioattivi di origine vegetale che, che potrebbero, in alcuni casi, esercitare un'azione complementare rispetto al principio attivo incapsulato; tuttavia, la presenza di un reale effetto sinergico richiede una valutazione sperimentale specifica.[13], [15]

Le loro dimensioni nanometriche, comprese generalmente tra poche decine e alcune centinaia di nanometri, risultano ottimali per l'assorbimento cellulare e la penetrazione tissutale, rendendole adatte alla veicolazione sia di molecole idrofobe che idrofile. Sebbene persistano sfide legate alla standardizzazione delle tecniche di isolamento e alla scalabilità della produzione, le PDEV si configurano come piattaforme versatili e sostenibili, capaci di offrire nuove prospettive nello sviluppo di sistemi di *drug delivery* avanzati. [13], [15]

I metodi più impiegati per l'estrazione delle PDEV (Figura 1.5) comprendono l'ultracentrifugazione differenziale, la centrifugazione in gradiente di densità, la (ad esempio PEG) e la cromatografia ad esclusione dimensionale. Ciascun approccio presenta vantaggi e limitazioni: l'ultracentrifugazione ha migliore resa ed è considerata la tecnica di isolamento primaria quando l'obiettivo è produrre vescicole extracellulari derivate da piante, ma può generare aggregati o frammenti non desiderati, mentre la cromatografia consente di ottenere frazioni più pure con minori danni strutturali.[16], [17]

Figura 1.5 I metodi più impiegati per l'estrazione delle PDEV (vescicole extracellulari derivate da piante)[15]



Una volta isolate, le vescicole devono essere sottoposte a un'accurata caratterizzazione fisico-chimica, che include la determinazione delle dimensioni, della morfologia, della concentrazione e della composizione molecolare. [13], [15]

Nonostante i progressi nella comprensione della biogenesi e delle proprietà biofisiche delle PDEV, permangono sfide significative legate alla caratterizzazione molecolare, all'identificazione di marcatori specifici di superficie e allo sviluppo di metodi scalabili e riproducibili di isolamento e caricamento. [13], [15]

Le vescicole extracellulari rappresentano pertanto sistemi di veicolazione promettenti, in grado di migliorare l'efficacia terapeutica di numerosi composti bioattivi, offrendo nuove prospettive per lo sviluppo di piattaforme di rilascio controllato caratterizzate da elevata biocompatibilità e sostenibilità. In questo contesto, si è ritenuto opportuno incapsulare l'acido ursolico all'interno di vescicole extracellulari di origine vegetale, al fine di migliorarne la biodisponibilità e superare i limiti associati alla sua scarsa solubilità in ambiente acquoso.

1.3 Sistemi innovativi di somministrazione

Tra i composti che trarrebbero maggiore beneficio dal loro incapsulamento all'interno di vescicole extracellulari figura l'acido ursolico. Negli ultimi anni sono stati sviluppati numerosi sistemi innovativi di somministrazione allo scopo di migliorare le proprietà fisico-chimiche dell'acido ursolico e supportarne l'impiego terapeutico. Poiché l'acido ursolico è caratterizzato da una marcata idrofobicità, tali sistemi mirano non solo ad aumentarne la solubilità e la biodisponibilità, ma anche a modulare il profilo di rilascio del composto.

Tra le strategie maggiormente investigate rientrano:

- Nanofitoliposomi, progettati per potenziare l'attività antitumorale attraverso l'incapsulamento dell'acido ursolico all'interno di sistemi rivestiti con poli-L-lisina (PLL) e acido ialuronico (HA), al fine di migliorarne la stabilità e la veicolazione mirata. [18]
- Nanocapsule a nucleo lipidico, utilizzate per favorire la rigenerazione tissutale: è stato dimostrato che nanocapsule caricate con acido ursolico possono migliorare la guarigione delle ferite, in particolare in condizioni caratterizzate da ridotti livelli di estrogeni. [19]
- Nanoparticelle di poli (acido lattico) modificate con chitosano (PLANP), sviluppate con l'obiettivo di aumentare la solubilità in acqua e l'assorbimento orale dell'acido ursolico tramite un sistema polimerico biodegradabile e biocompatibile. [20]
- Dispersioni solide, volte a ottimizzare la solubilità e il profilo di dissoluzione dell'acido ursolico, migliorandone la disponibilità per l'assorbimento sistemico. [21]
- Nanoemulsioni, studiate per applicazioni topiche, in particolare per valutare l'effetto antinfiammatorio di formulazioni a base di triterpeni e per analizzare la cinetica di rilascio e i meccanismi di penetrazione cutanea. [22]

- Liposomi sensibili al pH, impiegati come potenziale sistema per la somministrazione endovenosa dell'acido ursolico, con lo scopo di garantire un rilascio controllato in ambiente fisiologicamente acido e di valutarne stabilità e caratteristiche chimico-fisiche. [23]
- *Nanostructured Lipid Carriers* (NLC), proposti per migliorare la biodisponibilità dell'acido ursolico e di altri composti derivati da estratti vegetali, con potenziali applicazioni nel trattamento dell'artrite riducendo gli effetti collaterali associati ai farmaci convenzionali. [24]
- Nanoparticelle di silice mesoporosa (MSN), impiegate come sistemi di rilascio controllato grazie alla loro elevata area superficiale e alla capacità di ospitare acido ursolico all'interno dei pori strutturati. [25]
- Gel niosomiale, formulato per migliorare la distribuzione transdermica e la permeabilità cutanea dell'UA, con particolare applicazione nel trattamento dell'artrite. [26]
- Nanosospensioni, finalizzate ad aumentare la biodisponibilità orale dell'UA tramite la riduzione delle dimensioni del principio attivo e a valutarne l'attività antidiabetica. [27]

Nel loro insieme, questi approcci evidenziano l'intensa attività di ricerca dedicata all'ottimizzazione della veicolazione dell'acido ursolico e confermano l'importanza di sviluppare sistemi di somministrazione capaci di superare le limitazioni intrinseche della molecola.

1.4 Metodi analitici per quantificare l'acido ursolico

Numerosi metodi analitici sono stati proposti e applicati per l'analisi qualitativa e quantitativa dell'acido ursolico (UA) in diverse matrici di origine naturale. Come riportato in Tabella 1.2, tra le tecniche più studiate figurano la cromatografia liquida ad alte prestazioni con rivelazione UV (HPLC-UV), molti studi usano colonne C18 con miscele di acetonitrile/acqua o metanolo/acqua come fase mobile e rilevazione UV per separare e quantificare l'acido ursolico. [2], [28] Tecniche HPLC accoppiate a spettrometria di massa (HPLC-MS), Tecnica altamente specifica e sensibile che fornisce anche informazioni sulla struttura delle molecole, utile per identificare e quantificare l'acido ursolico in campioni

complessi. Spesso impiegata per misurare simultaneamente l'acido ursolico e altri triterpenoidi.[2] [29] La gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS), impiegata per la determinazione dell'acido ursolico in estratti vegetali commerciali, scelta per l'elevata selettività e accuratezza nell'analisi di matrici complesse. [30]

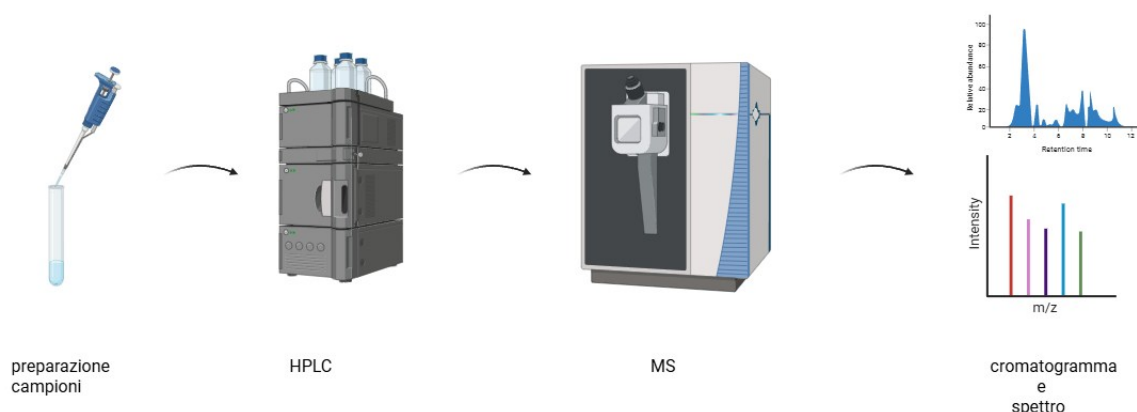
Ulteriori metodiche includono la cromatografia liquida ultra-veloce (UPLC), [31] l'elettrocinetica micellare modificata con ciclodestrina (CD-MEKC), [32] la cromatografia capillare micellare elettrocinetica (MECC) [33] e l'elettroforesi capillare non acquosa (NACE). Quest'ultima utilizza soluzioni elettrolitiche basate su solventi organici puri, migliorando la solubilità e la stabilità di composti idrofobici; è stata dimostrata idonea per la separazione simultanea di acido ursolico e acido oleanolico mediante una miscela metanolo:acetonitrile (65:35, v/v) contenente 90 mM tris-idrossimetil-aminometano (Tris), con voltaggio applicato pari a +25 kV e rivelazione UV a 214 nm. [34] Sono stati inoltre impiegati metodi cromatografici su strato sottile ad alte prestazioni (HPTLC), [35] e approcci basati sulla risonanza magnetica nucleare (NMR). [36]

L'efficacia di questi metodi in termini di selettività, capacità di separazione, sensibilità e tempi di analisi varia a seconda del tipo di colonna cromatografica utilizzata (ad esempio, colonne C18, C30, a grafite porosa, monolitiche), della composizione della fase mobile (tipo di solventi, aggiunta di acidi, basi o ciclodestrine), della temperatura e del pH. [2]

La maggior parte dei metodi analitici descritti in letteratura per la determinazione dell'acido ursolico in differenti matrici si basa sulla cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), scelta per la sua semplicità operativa, l'elevata sensibilità, l'ottima risoluzione e i tempi di analisi relativamente brevi. In particolare, la quantificazione dell'acido ursolico viene generalmente effettuata mediante HPLC accoppiata a rivelatori UV, MS o, in alternativa, a rivelatori a fluorescenza dopo opportuna derivatizzazione chimica. Questa varietà di approcci consente di selezionare la configurazione analitica più adatta in funzione delle esigenze di sensibilità, specificità e della complessità della matrice da analizzare.[2] [37]

Negli ultimi anni l'acido ursolico ha suscitato un crescente interesse in campo analitico, sia per il suo ruolo biologico e farmacologico sia per la sua diffusione in matrici di origine vegetale e biologica. La caratterizzazione di questo composto è stata affrontata in letteratura con diverse metodologie cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa, che si distinguono per sensibilità, riproducibilità e adattabilità a campioni complessi (Figura 1.6).

Figura 1.6-Caratterizzazione acido ursolico in HPLC-MS



Created in BioRender.com 

Per quanto riguarda le matrici biologiche, diversi autori hanno studiato il comportamento farmacocinetico e la distribuzione tissutale di UA nel ratto, sviluppando metodi HPLC-MS basati su estrazioni liquido-liquido con etil acetato, l'utilizzo dell'acido glicirretico come standard interno e la separazione su colonne C18, con rivelazione in modalità SIM degli ioni caratteristici a m/z 455 e 469. Questi approcci hanno permesso analisi in tempi relativamente brevi (circa 6 minuti) e risultati affidabili in plasma e tessuti. Analogamente, nel plasma umano sono stati messi a punto metodi LC-MS/MS caratterizzati da estrazioni con metil-ter-butiletere (MTBE) e da rivelazione in MRM, che hanno garantito un'elevata specificità e una buona riproducibilità, risultando idonei a studi clinici di farmacocinetica.[38], [39], [40]

Parallelamente, ampio spazio è stato dedicato alle matrici vegetali, nelle quali UA è stato determinato in foglie di specie appartenenti al genere *Staphylea* e in *Staphylea holocarpa* Hemsl. In questo caso sono state utilizzate estrazioni con cloroformio o metanolo, seguite da analisi LC-MS o MS/MS condotte in condizioni isocratiche o a gradiente, con interfacce ESI o APCI. Tali metodiche hanno evidenziato tempi di analisi particolarmente rapidi, compresi tra 2 e 3 minuti, rendendosi utili sia per lo studio fitochimico sia per il controllo qualità di estratti vegetali. Inoltre, l'acido ursolico è stato quantificato anche in matrici biologiche derivate da somministrazione di preparati erboristici tradizionali, come il cosiddetto *Lu-Ying extract*, attraverso LC-MS in modalità APCI negativa e monitoraggio SIM.[40], [41], [42]

Più recentemente, l'attenzione si è estesa anche a sistemi innovativi, come le nanocapsule polimeriche, dove UA è stato determinato mediante metodi UHPLC

accoppiati a rivelazione PDA. In questo caso le separazioni sono state condotte in condizioni isocratiche su colonne a particelle sub-2 μm , ottenendo tempi di corsa estremamente ridotti (circa 2 minuti) e una quantificazione affidabile anche in matrici farmaceutiche complesse.[43]

Questi studi mostrano chiaramente come la scelta del protocollo analitico, dalle modalità di estrazione al sistema cromatografico fino al tipo di ionizzazione, sia strettamente condizionata dalla matrice di partenza e dall'obiettivo dello studio. Ciò mette in evidenza l'importanza di disporre di metodi versatili e validati per la determinazione di acido ursolico, sia in campo farmacocinetico sia in ambito fitochimico e farmaceutico.[38], [39], [40], [41], [42], [43]

Tabella 1.2 - tecniche analitiche con cui sono stati analizzate le diverse matrici in cui era presente l'acido ursolico

Matrice	Tecnica analitica	rif
Plasma di ratto	HPLC-MS	[38]
Plasma umano	LC-MS/MS	[39]
Foglie di Staphylea pinnata L., S. holocarpa Hemsl., S. elegans Zab. e S. colchica Stev	MS/MS	[41]
Staphylea holocarpa Hemsl	LC-MS	[42]
Nanocapsule polimeriche	UHPLC-PDA	[43]
Plumeria obtusa	HPLC-UV	[28]

Matrice	Tecnica analitica	rif
commercial botanicals	GC-MS	[30]
Plasma di ratto e Olea europaea	UPLC-MS	[31]
Pterocephalus hookeri	CD-MEKC	[32]
Ligustrum lucidum	MECC	[33]
Erbe cinesi: Rabdosia japonica, Hara var. Glaucoalyx	NACE	[34]
Plantago major	HPTLC	[35]
Plasma di ratto	HPLC-MS	[29]
Estratto di piante della famiglia delle Lamiaceae e Oleaceae	NMR	[36]

2. SCOPO DEL LAVORO

L'acido ursolico (UA) è un triterpenoide pentaciclico di origine naturale, ampiamente distribuito nel regno vegetale e noto per le sue numerose proprietà farmacologiche, tra cui attività antinfiammatorie, antitumorali, antiossidanti e antimicrobiche. Nonostante il rilevante interesse scientifico e applicativo, la sua marcata idrofobicità, la scarsa solubilità in ambiente acquoso e la conseguente bassa biodisponibilità ne limitano significativamente l'impiego in ambito terapeutico. Tra le strategie formulative proposte per superare tali criticità, l'impiego di vescicole extracellulari di origine vegetale (Plant-Derived Extracellular Vesicles, PDEV) rappresenta un approccio innovativo e potenzialmente sostenibile per la veicolazione di composti lipofili.

Nel presente lavoro è stato valutato l'utilizzo delle vescicole extracellulari isolate dal residuo secco del succo di mela come sistemi di incapsulamento per l'acido ursolico. L'ipotesi di studio prevede che l'inclusione dell'acido ursolico all'interno di tali nanostrutture lipidiche possa migliorarne la dispersione in ambiente acquoso, aumentarne la stabilità e rappresentare un primo passo verso un potenziale incremento della biodisponibilità. Obiettivo principale dell'attività sperimentale sono stati lo sviluppo e l'ottimizzazione di un protocollo analitico LC-HRMS idoneo per la determinazione della purezza dell'acido ursolico da estrazione e per la quantificazione dello stesso all'interno della matrice vescicolare.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Solventi

Solventi usati grado UHPLC (Carlo Erba, Milano, Italia):

- Dimetilsolfossido (DMSO, Carlo Erba, Milano, Italia);
- Acqua (H₂O);
- Metanolo (MeOH);
- Acido formico (CH₂O₂).

3.2 Apparecchiature usate

LC-MS

- Spettrometro di massa Q-Exactive Plus UHMR Hybrid Quadrupole Orbitrap equipaggiato di Sistema UHPLC Vanquish Duo.

COLONNA CROMATOGRAFICA

- Colonna Kinetex[®] 2.6 µm C18 100 Å, 150 x 2.1 mm

CENTRIFUGHE

- Eppendorf 5452 mini-spin
- Centrifuge4226

BILANCE

Bilancia tecnica: LIBROR EB-4300SW;

Bilancia analitica: Precisa XR 205 SM-DR.

VORTEX

VELP SCIENTIFIC 2X.

ULTRASUONI

SWEEPZONE TECHNOLOGY QUANTREX S200.

PIPETTE

GILSON pipetman classic: P10, P20, P200, P1000, P5000

VETRERIA DA LABORATORIO

3.3 Metodo LC-HRMS

3.3.1 Condizioni LC

Le analisi cromatografiche per la quantificazione dell'acido ursolico sono state condotte come descritto in Tabella 3.1, utilizzando una colonna Kinetex® C18 (2,6 µm, 100 Å, 150 × 2,1 mm), temperatura della colonna 40 °C, eluizione in isocratica 80% fase mobile B (fase mobile A: H₂O 0.1% FA v/v; fase mobile B: MeOH 0.1% FA v/v), flusso 0,400 mL/min, volume di iniezione 5 µL per un tempo totale di analisi di 10 minuti.

Tabella 3.1-Condizione LC quantificazione acido ursolico

Condizioni LC-quantifica	
Colonna	Kinetex® 2.6 µm C18 100 Å 150 x 2.1 mm
Temperatura della colonna	40 °C
Fase mobile A	H ₂ O 0.1% FA v/v
Fase mobile B	MeOH 0.1% FA v/v
Flusso	0.400 mL/min
Eluizione isocratica	80% B (0.00-10.00 min)
Tempo di analisi	10.0 min
Volume di iniezione	5 µL

Per la determinazione della purezza dell'acido ursolico, le analisi cromatografiche sono state effettuate come riportato in Tabella 3.2., utilizzando una colonna Kinetex® C18 (2,6 µm, 100 Å, 150 × 2,1 mm), temperatura della colonna 40 °C, eluizione gradiente con 50-90% di fase B (0.00-40.00 min), 95% di fase B (40.00-45.00 min), 95-50% di fase B (45.00-45.20 min), 50% di fase B (45.20-60.00 min), (fase mobile A: H₂O 0.1% FA v/v; fase mobile B: MeOH 0.1% FA v/v), flusso a 0,300 mL/min, il volume di iniezione 5 µL per un tempo totale di analisi di 60 minuti.

Tabella 3.2. Condizioni LC purezza

Condizioni LC-purezza	
Colonna	Kinetex® 2.6 µm C18 100 Å 150 x 2.1 mm
Temperatura della colonna	40 °C
Fase mobile A	H ₂ O 0.1% FA v/v
Fase mobile B	MeOH 0.1% FA v/v
Flusso	0.300 mL/min
Gradiente di eluizione	50-90% B (0.00-40.00 min) 95% B (40.00-45.00 min) 95-50% B (45.00-45.20 min) 50%B (45.20-60.00 min)
Tempo di analisi	60.0 min
Volume di iniezione	5 µL

3.3.2 Condizioni MS

Le condizioni della sorgente MS (Q-Exactive Plus UHMR Hybrid Quadrupole Orbitrap) sono state identiche per entrambi i metodi cromatografici. I parametri utilizzati per la ionizzazione elettrospray (ESI), in modalità positiva e negativa, sono riportati nella Tabella 3.3. Scansione in Full MS (ESI +/-; range di massa 50.00-750.00 m/z) e in PRM (ESI+) sullo ione m/z 457.368 hcd 14. Tale ione è lo ione pseudomolecolare di acido ursolico, acido oleanolico e acido betulinico.

I dati sono stati elaborati con software Thermo Xcalibur Version 3.1 ed Excel.

Tabella 3.3. Condizioni MS

Condizioni MS	
Tipo sorgente	ESI +/-
Tensione di spray	3.50 kV
Temperatura del capillare	300 °C
Flusso Sheath gas (N₂)	45.00 L/min
Flusso Sweep gas (N₂)	1.00 L/min
Flusso auxiliary gas (N₂)	10.00 L/min
Temperatura auxiliary gas	350 °C
corrente massima di spray	100.00 µA
Scan	Full MS (ESI +/-; 50.00-750.00 m/z) PRM (ESI+) m/z 457.368@14,

3.4 Preparazione della fase mobile

La fase mobile acquosa (A) H₂O 0.1% v/v FA è stata preparata aggiungendo 1.0 mL di acido formico in 1.0 L di H₂O grado LC-MS.

La fase mobile organica (B) MeOH 0.1% v/v FA è stata preparata aggiungendo 1.0 mL di acido formico in 1.0 L di MeOH grado LC-MS.

3.5 Purezza acido ursolico

L'acido ursolico (UA) viene estratto da fonti vegetali e può contenere altri componenti triterpenoidi quali acido oleanolico (OA) e acido betulino (BA). Per verificare la purezza del materiale di partenza utilizzato negli esperimenti sono state eseguite analisi mediante LC-HRMS in gradiente o isocratica a seconda dello scopo.

- Preparazione soluzioni acido ursolico e impurezze (determinazione tempi di ritenzione)

Dalla *stock solution* (SS) 5000 µg/mL di UA in DMSO è stata effettuata una diluizione 1:25 per ottenere la *working solution* (WS) 2000 µg/mL, da cui sono state prelevate le quantità necessarie per preparare i campioni di UA 10 µg/mL (10 µL di WS + 1990 µL di DMSO).

Dalla *stock solution* (SS) 5000 µg/mL di OA in DMSO è stata effettuata una diluizione 1:25 per ottenere la *working solution* (WS) 2000 µg/mL, da cui sono state prelevate le quantità necessarie per preparare i campioni di OA 10 µg/mL (10 µL di WS + 1990 µL di DMSO).

Dalla *stock solution* (SS) 5000 µg/mL di BA in DMSO è stata effettuata una diluizione 1:25 per ottenere la *working solution* (WS) 2000 µg/mL, da cui sono state prelevate le quantità necessarie per preparare i campioni di BA 10 µg/mL (10 µL di WS + 1990 µL di DMSO).

- Preparazione campioni per la valutazione semi-quantitativa dei componenti dell'acido ursolico utilizzato

Miscela UA + OA

- **UA 10 µg/mL + 1% OA:** 10 µL WSUA + 20 µL WSOA + 1970 µL DMSO
- **UA 10 µg/mL + 5% OA:** 10 µL WSUA + 100 µL WSOA + 1890 µL DMSO
- **UA 10 µg/mL + 10% OA:** 10 µL WSUA + 200 µL WSOA + 1790 µL DMSO
- **UA 10 µg/mL + 20% OA:** 10 µL WSUA + 400 µL WSOA + 1590 µL DMSO
- **UA 10 µg/mL + 50% OA:** 10 µL WSUA + 1000 µL WSOA + 990 µL DMSO

Miscela UA + BA

- **UA 10 µg/mL + 1% BA:** 10 µL WSUA + 20 µL WSBA + 1970 µL DMSO
- **UA 10 µg/mL + 5% BA:** 10 µL WSUA + 100 µL WSBA + 1890 µL DMSO
- **UA 10 µg/mL + 10% BA:** 10 µL WSUA + 200 µL WSBA + 1790 µL DMSO
- **UA 10 µg/mL + 20% BA:** 10 µL WSUA + 400 µL WSBA + 1590 µL DMSO
- **UA 10 µg/mL + 50% BA:** 10 µL WSUA + 1000 µL WSBA + 990 µL DMSO

3.8 Preparazione campioni di vescicole extracellulari con acido ursolico

I campioni di vescicole extracellulari utilizzati nel presente studio sono stati preparati presso il Laboratorio di Tecnologia Farmaceutica e descritti in precedenti lavori del gruppo [44], dai quali sono state tratte le informazioni metodologiche riportate nel presente elaborato.

I campioni sono stati ottenuti attraverso diverse fasi operative. Le vescicole extracellulari di origine vegetale, ricavate dagli scarti alimentari, sono state isolate dal residuo secco

derivante dalla pressatura delle mele. Le vescicole extracellulari estratte sono state successivamente caratterizzate in termini di contenuto proteico e lipidico, al fine di quantificare con precisione la quantità di vescicole necessaria, 3.27 µg di lipidi per mg di polvere, per effettuare il caricamento dell'acido ursolico nelle vescicole considerando diversi rapporti:

- 1:1, intesi come 1 parte di acido ursolico e 1 parte di lipidi di EV;
- 1:2, intesi come 1 parte di acido ursolico e 2 parti di lipidi di EV;
- 1:5, intesi come 1 parte di acido ursolico e 5 parti di lipidi di EV;
- 1:10, intesi come 1 parte di acido ursolico e 10 parti di lipidi di EV.

3.8.1 Isolamento delle vescicole extracellulari da derivati da mela

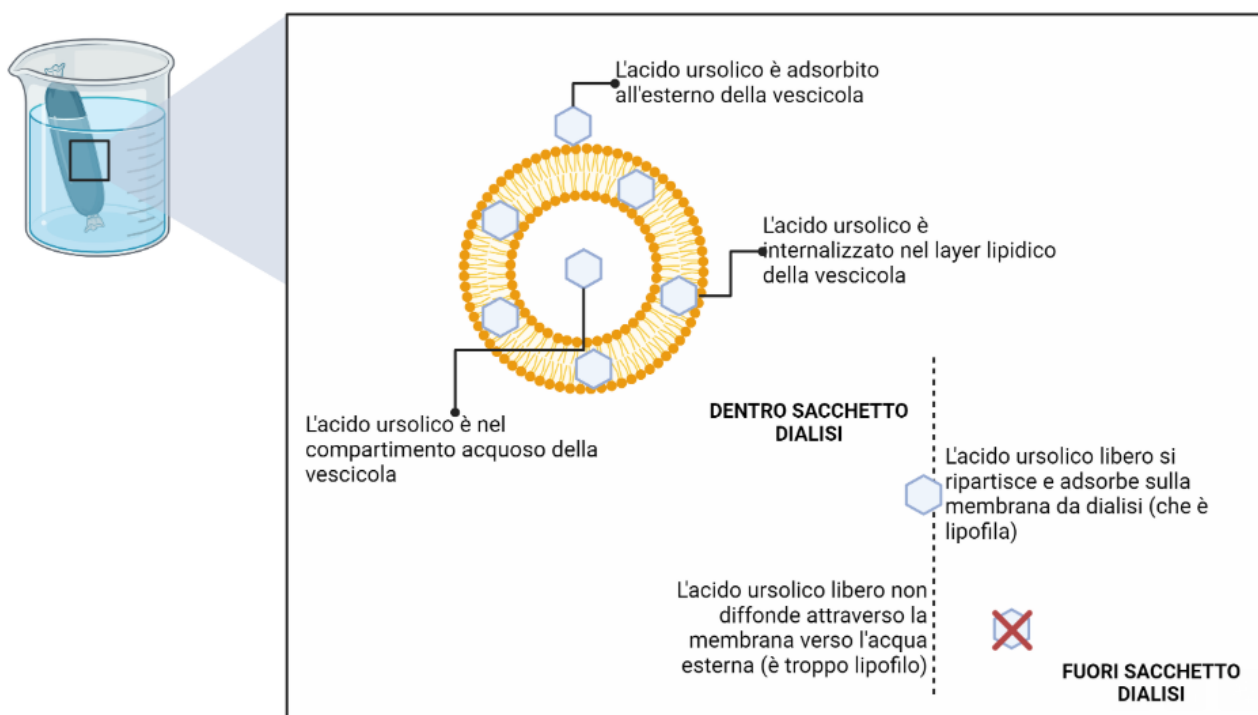
Le vescicole extracellulari di origine vegetale sono state ottenute a partire dal residuo solido derivante dalla spremitura delle mele. Il materiale di partenza è stato inizialmente sospeso in acqua ultrapura in rapporto 1:1 e mantenuto a 4 °C per 24 ore in condizioni statiche. Successivamente, il campione è stato sottoposto a centrifugazione a 3500 ×g per 10 minuti, al fine di separare la frazione liquida dal materiale insolubile. Il surnatante recuperato è stato diluito con acqua ultrapura deionizzata fino a raggiungere un rapporto solido finale pari a 1:500 e successivamente sottoposto a più fasi di filtrazione: una prima filtrazione mediante filtro da 70 µm, al fine di rimuovere le particelle grossolane e ridurre la contaminazione nelle fasi successive di purificazione; e successivamente tramite filtri da 1 µm, per consentire la rimozione delle prima della fase di purificazione mediante filtrazione a flusso tangenziale. Il processo di filtrazione a flusso tangenziale è stato condotto utilizzando il sistema KrosFlo® Research 2i (Spectrum Laboratories, Milano, Italia), equipaggiato con un modulo di filtrazione in polietersolfone modificato con cut-off pari a 300 kDa. Al termine della concentrazione, che ha portato a una riduzione del volume fino al 25% di quello iniziale, i campioni sono stati sottoposti a diafiltrazione utilizzando acqua ultrapura sterilizzata come soluzione esterna. Durante le fasi di concentrazione e diafiltrazione, la velocità di taglio del flusso di alimentazione è stata mantenuta compresa tra 2000 e 6000 s⁻¹, mentre la pressione transmembrana è stata mantenuta inferiore a 5 psi. Infine, ai campioni è stato aggiunto mannitolo allo 0,5% (p/v) come agente crioprotettore; le sospensioni sono state quindi congelate a -80 °C e successivamente liofilizzate (Christ Epsilon 2-16D LSCplus) a -50 °C e 8 × 10⁻¹ mbar per 72 ore. Le vescicole extracellulari liofilizzate sono state conservate a -20 °C fino al momento dell'utilizzo.

3.8.2 Caricamento delle vescicole extracellulari con acido ursolico

L'acido ursolico è stato solubilizzato in DMSO (1 mg/mL) e quindi incubato con le vescicole extracellulari a rapporti crescenti di acido ursolico: EV pari a 1:1, 1:2, 1:5 e 1:10, con le EV quantificate in base al contenuto lipidico (μg).

Per facilitare il caricamento dell'acido ursolico nelle vescicole extracellulari, i campioni sono stati posti in un bagno a ultrasuoni e sonicati per 1 ora sul ghiaccio a 4 °C. Infine, i campioni ottenuti sono stati trasferiti in membrane cut-off pari a 3.5 kDa e sottoposte a dialisi statica (Figura 3.1) contro 1 L di acqua distillata per 72 ore a temperatura ambiente, in modo che l'acido ursolico libero si ripartisca e adsorba sulla membrana di dialisi e non dovrebbe attraversare la membrana verso l'acqua esterna, in quanto troppo lipofilo.

Figura 3.1- dialisi statica



La preparazione dei campioni per effettuare il caricamento delle vescicole extracellulari con acido ursolico e i rispettivi controlli, sono stati preparati nel seguente modo:

- **Lotto 245**, rapporto UA:EV pari a 1:1
1 ml di acqua + 10 mg di EV 233 (pari a 32.7 μg di lipidi) + 32.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di acido ursolico
- **Lotto 246**, rapporto UA:EV pari a 1:2
1 ml di acqua + 10 mg di EV 233 (pari a 32.7 μg di lipidi) + 16.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di acido ursolico

- **Lotto 247**, rapporto UA:EV pari a 1:5
1.5 ml di acqua + 15 mg di EV 233 (pari a 49.05 ug di lipidi) + 9.81 µg/mL di acido ursolico
- **Lotto 248**, rapporto UA:EV pari a 1:10
3 ml di acqua + 30 mg di EV 233 (pari a 98.1 ug di lipidi) + 9.81 µg/mL di acido ursolico
- **Lotto 249**, bianco solo EV
1 ml di acqua + 10 mg di EV 233 (pari a 32.7 ug di lipidi)
- **Lotto 250**, bianco UA 1:1
1 ml di acqua + 32.7 µg/mL di acido ursolico
- **Lotto 251**, bianco UA 1:2
1 ml di acqua + 16.35 µg/mL di acido ursolico
- **Lotto 252**, bianco UA 1:5
1.5 ml di acqua + 9.81 µg/mL di acido ursolico
- **Lotto 253**, bianco UA 1:10
3 ml di acqua + 9.81 µg/mL di acido ursolico
- **Lotto 264**, rapporto UA:EV pari a 1:1
1 ml di acqua + 76 mg di EV 256 (pari a 32.7 ug di lipidi) + 32.7 µg/mL di acido ursolico
- **Lotto 265**, rapporto UA:EV pari a 1:2
1 ml di acqua + 76 mg di EV 256 (pari a 32.7 ug di lipidi) + 16.35 µg/mL di acido ursolico
- **Lotto 266**, rapporto UA:EV pari a 1:5
1.5 ml di acqua + 76 mg di EV 256 (pari a 32.7 ug di lipidi) + 6,54 µg/mL di acido ursolico
- **Lotto 267**, rapporto UA:EV pari a 1:10
3 ml di acqua + 76 mg di EV 256 (pari a 32.7 ug di lipidi) + 3,27 µg/mL di acido ursolico
- **Lotto 268**, bianco solo EV
1 ml di acqua + 76 mg di EV 256 (pari a 32.7 ug di lipidi)
- **Lotto 269**, bianco UA 1:1
1 ml di acqua + 32.7 µg/mL di acido ursolico
- **Lotto 270**, bianco acido ursolico 1:2
1 ml di acqua + 16. µg/mL di acido ursolico

- **Lotto 271**, bianco acido ursolico 1:5
1.5 ml di acqua + 6,54 µg/mL di acido ursolico
- **Lotto 272**, bianco acido ursolico 1:10
3 ml di acqua + 3,27 µg/mL di acido ursolico

3.9 Preparazione delle soluzioni per la quantificazione dell'UA nelle vescicole

3.9.1 Preparazioni delle soluzioni per la curva di calibrazione

Per la preparazione dei punti della curva di calibrazione (UA 3 µg/mL-0.001 µg/mL H₂O:MeOH 10:90), è stata inizialmente allestita una soluzione stock (SS) di acido ursolico (UA) 5000 µg/mL in DMSO. A partire dalla soluzione stock, è stata preparata una soluzione di lavoro (working solution) UA 10 µg/mL mediante una diluizione 1:500 in matraccio tarato, utilizzando una miscela H₂O:MeOH 10:90 come solvente di diluizione. Da quest'ultima sono state successivamente allestite, per diluizioni seriali, le soluzioni calibranti necessarie per coprire l'intervallo prefissato, compreso tra UA 3 µg/mL-0.001 µg/mL H₂O:MeOH 10:90.

3.9.2 Trattamento campioni per determinazione semi-quantitativa

Trattamento campioni:

- H₂O dialisi: questi campioni sono stati prelevati, centrifugati (13000 rpm per 5 min) ed analizzati come tali
- MEMBRANE dialisi: a ciascuna membrana sono stati aggiunti 5 mL di MeOH. Il campione è stato sonicato per 15 min a 30°C; il solvente è stato trasferito quantitativamente in matraccio da 10 mL.
- CAMPIONI dialisi (UA:EV, bianco UA, bianco EV): ciascun campione è stato trasferito quantitativamente in un matraccio da 10 mL.

Il trasferimento quantitativo è stato fatto prelevando il contenuto da ciascun e trasferito in matraccio da 10 mL. Sono stati effettuati 3 lavaggi del contenitore con 1 mL di MeOH, vortexando ad ogni lavaggio per favorire il recupero dell'analita presente.

Successivamente è stato portato a volume il matraccio con MeOH. Il contenuto di ogni matraccio è stato poi analizzato tramite LC-HRMS previa sonicazione per 15 min a 30°C e centrifugazione per 5 minuti a 13000 rpm.

I campioni analizzati, provenienti dal processo di dialisi, sono riportati in Tabella 3.4

Tabella 3.4 campioni dialisi

Campione UA:EV 1:1	Campione UA:EV 1:1
L264 campione UA:EV 1:1 L264 membrana L264 H2O	L245 campione UA:EV 1:1 L245 membrana L245 H2O
L269 campione bianco UA 1:1 L269 membrana L269 H2O	L250 campione bianco UA 1:1 L250 membrana L250 H2O
L268 campione bianco EV L268 membrana L268 H2O	L249 campione bianco EV L249 membrana L249 H2O
Campione UA:EV 1:2	Campione UA:EV 1:2
L265 campione UA:EV 1:2 L265 membrana L265 H2O	L246 campione UA:EV 1:2 L246 membrana L246 H2O
L270 campione bianco UA 1:2 L270 membrana L270 H2O	L251 campione bianco UA 1:2 L251 membrana L251 H2O
L268 campione bianco EV L268 membrana L268 H2O	L249 campione bianco EV L249 membrana L249 H2O
Campione UA:EV 1:5	Campione UA:EV 1:5
L266 campione UA:EV 1:5 L266 membrana L266 H2O	L247 campione UA:EV 1:5 L247 membrana L247 H2O
L271 campione bianco UA 1:5 L271 membrana L271 H2O	L252 campione bianco UA 1:5 L252 membrana L252 H2O
L268 campione bianco EV L268 membrana L268 H2O	L249 campione bianco EV L249 membrana L249 H2O
Campione UA:EV 1:10	Campione UA:EV 1:10
L267 campione UA:EV 1:10 L267 membrana L267 H2O	L248 campione UA:EV 1:10 L248 membrana L248 H2O
L272 campione bianco UA 1:1 L272 membrana L272 H2O	L253 campione bianco UA 1:1 L253 membrana L253 H2O
L268 campione bianco EV L268 membrana L268 H2O	L255 campione bianco EV L255 membrana L255 H2O

3.9.3 Efficienza incapsulamento

L'efficienza di incapsulamento (*Encapsulation efficiency* -EE%) dell'acido ursolico nelle vescicole extracellulari in funzione del rapporto UA:EV è stata calcolata come rapporto percentuale tra la quantità di acido ursolico rilevata nelle vescicole e la quantità totale rilevata (membrana + vescicole + acqua) attraverso la presente formula

$$EE\% = \frac{\mu g \text{ UA vescicole}}{(\mu g \text{ UA vescicole} + \mu g \text{ UA membrane} + \mu g \text{ UA acqua})} * 100$$

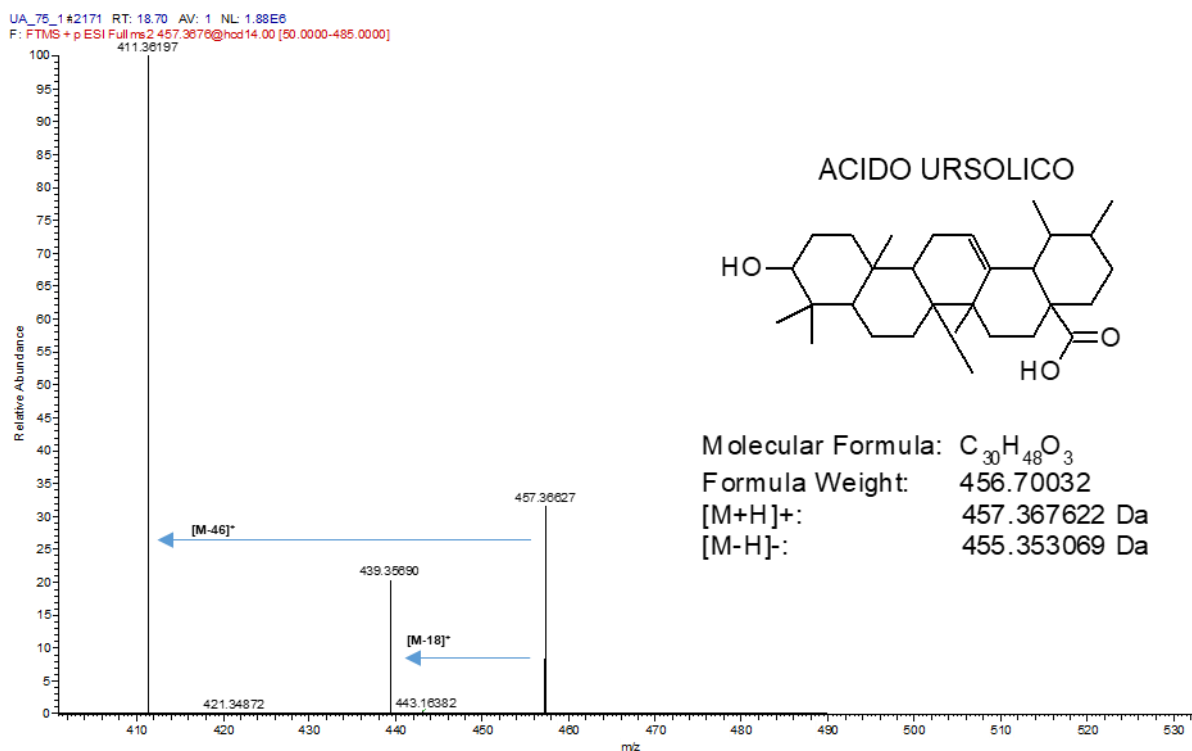
4. RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1 Metodo LC-HRMS

La determinazione quali/quantitativa dell'acido ursolico può essere effettuata attraverso l'utilizzo sia della spettroscopia UV-VIS, Massa o NMR accoppiate a tecniche separative quali HPLC o GC. In questo lavoro è stata sviluppata una detection in massa in modalità Full MS (ESI+) e PRM (m/z 457.368 m/z) accoppiata ad una cromatografia liquida in fase inversa come descritto nella sezione 3.3

Per quel che riguarda l'energia di collisione, questa è stata ottimizzata a 14 eV, valore che ha permesso di preservare il 30% del segnale dello ione precursore (457.368 m/z). Gli ioni prodotto risultanti (Figura 4.1) sono compatibili con la perdita di una molecola d'acqua ($[M-18]^+$: 443.362 m/z) e di un gruppo COOH ($[M-46]^+$: 439.357 m/z). Nonostante l'acido ursolico possa essere analizzato in modalità negativa, in questo studio la ionizzazione positiva è stata preferita in quanto ha fornito informazioni strutturali più specifiche.

Figura 4.1- Zoom Spettro MS/MS UA (ESI+, m/z 457,368@hcd14)



Nelle stesse condizioni di analisi dell'acido ursolico si sono analizzati anche campioni standard di acido betulinico (BA) e acido oleanolico (OA), triterpeni della stessa famiglia

spesso presenti in miscela quando si utilizza acido ursolico da fonte naturale, che presentano stesse caratteristiche di lipofilia e stesso PM dell' UA(Figura 4.2).

Figura 4.2: Strutture di acido ursolico, betulinico e oleanolico a confronto



Gli spettri PRM dell'acido oleanolico (Figura 4.3) e dell'acido betulinico (Figura 4.4) forniscono una frammentazione in cui gli ioni sono gli stessi dell'acido ursolico; questo aspetto evidenzia come solo una buona separazione cromatografica potrebbe essere la via per la quantificazione di ciascun componente, sebbene ancor oggi non sia descritta in letteratura alcuna metodica utile a tale fine. La purezza delle miscele viene infatti di solito calcolata *via* NMR.

Figura 4.3- Zoom spettro MS/MS OA (ESI⁺, m/z 457,368@hcd14)

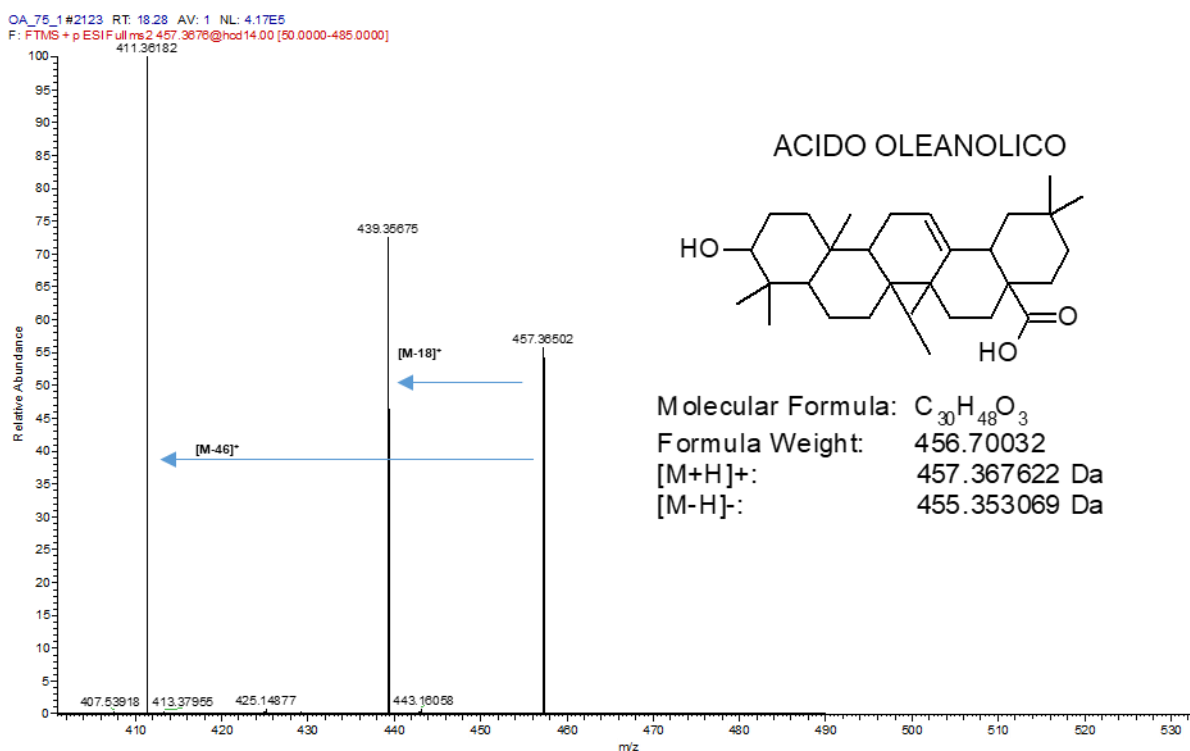
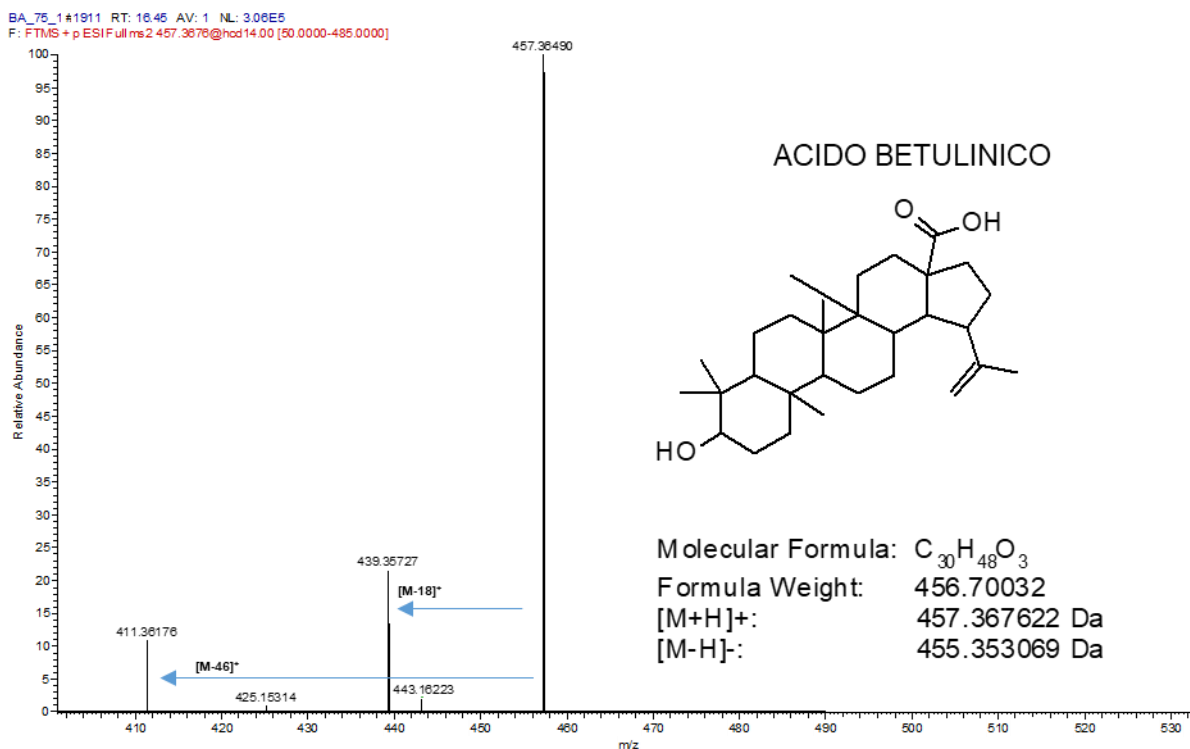


Figura 4.4- Zoom spettro MS/MS BA (ESI+, m/z 457,368@hcd14)



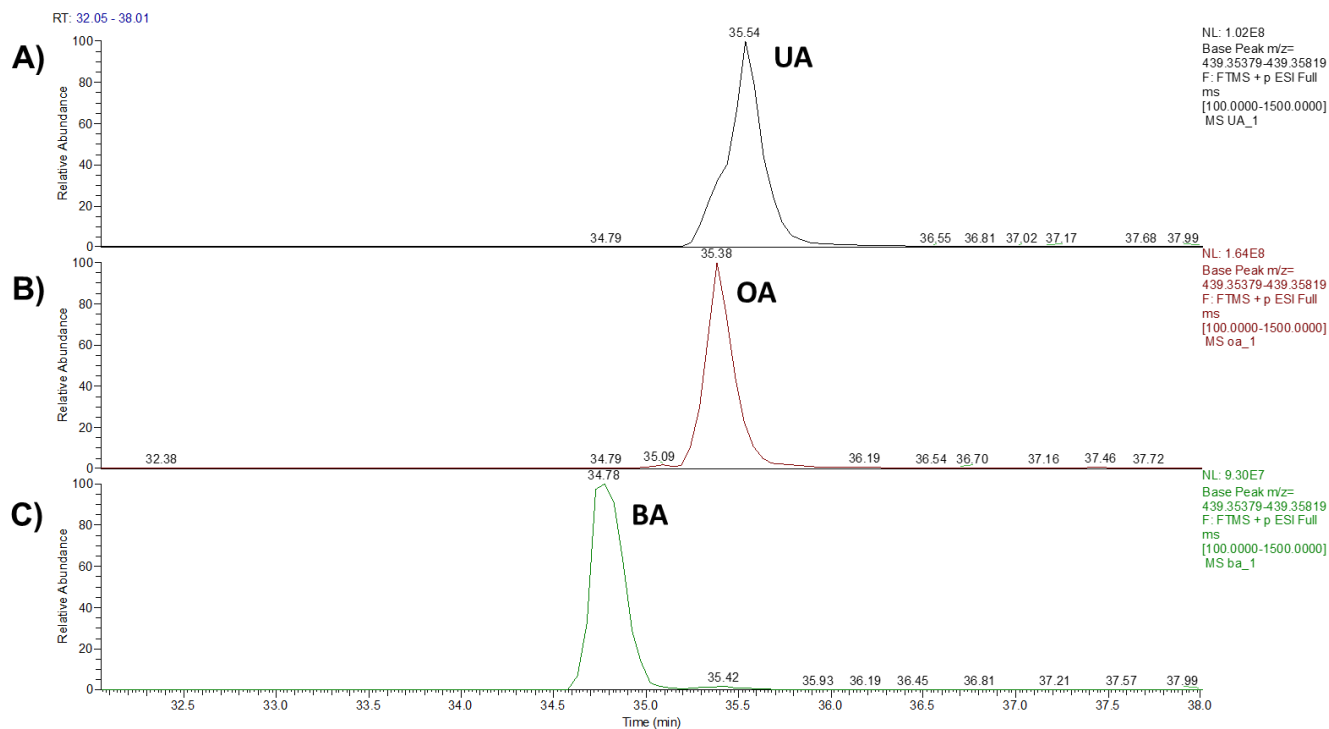
4.2 Purezza acido ursolico

L'acido ursolico derivante dall'estrazione da matrici vegetali ha una composizione diversa a seconda dell'origine; quello dal matè, ovvero quello utilizzato in questo studio, è noto contenere anche una percentuale (circa 10%) di acido oleanolico (OA) mentre da altre fonti può contenere anche acido betulinico (BA) in proporzioni variabili

Per questo, al fine di trovare un metodo che permettesse la separazione dei tre analiti, si sono analizzati singolarmente campioni standard di UA, OA e BA (Figura 4.5), sfruttando la separazione cromatografica in gradiente (Sezione 3.3) con scansione in massa in PRM sullo ione m/z 457.368.

I risultati ottenuti dall'analisi di soluzioni 10 µg/mL di ciascun analita, sono riportati nella Figura 4.5.

Figura 4.5 cromatogrammi: a) acido ursolico (UA), b) acido oleanolico (OA), c) acido betulinico (BA)



L'analisi dei tre composti considerati singolarmente ha evidenziato la presenza delle tre specie, in tutti i campioni in proporzioni diverse. Come osservabile dal tracciato A della Figura 4.5, il campione di acido ursolico presenta, oltre al picco principale attribuibile all'UA (35.54 min), un'asimmetria del picco attribuibile della coeluizione di OA. L'acido oleanolico, con tempo di ritenzione pari a 35,40 min (Figura 4.5B), è risultato presente sia nel campione di acido ursolico sia in quello di acido betulinico. Analogamente, il picco corrispondente all'acido betulinico (RT=34,79 min) è stato rilevato anche nel campione di acido oleanolico, confermando come i tre prodotti possono essere contemporaneamente presenti e rilevabili qualitativamente.

La separazione cromatografica utilizzata evidenzia infatti una completa mancanza di selettività tra il picco dell'acido ursolico e dell'acido oleanolico, mentre presenta una buona selettività tra il picco dell'acido betulinico e quello dell'acido ursolico. Anche a seguito di diverse modifiche di eluizione e colonne per migliorare tale aspetto, non è stato però possibile ottenere una selettività accettabile tra i picchi di acido ursolico e acido oleanolico.

Volendo comunque ottenere una indicazione semiquantitativa della presenza di oleanolico e/o betulinico nei campioni di acido ursolico utilizzati per l'inserimento nelle EV, si sono effettuati analisi su campioni nei quali sono state aggiunte quantità note di acido oleanolico

o betulinico, in concentrazioni crescenti (1%, 5%, 10%, 20% e 50%), alla concentrazione fissa di 10 ug/mL di acido ursolico. I risultati sono riportati in Figura 4.6 e 4.7.

Figura 4.6 cromatogramma UA+OA

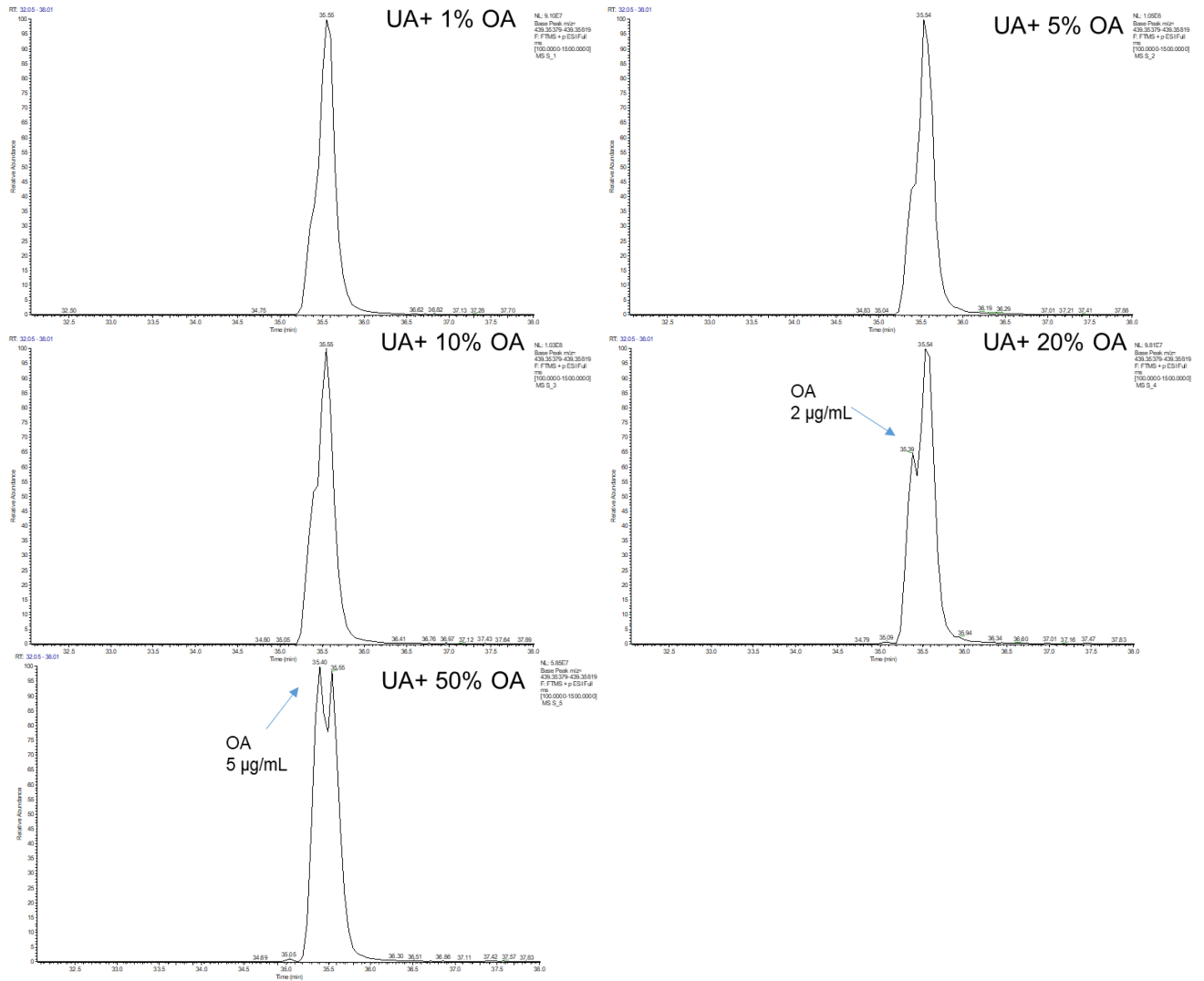
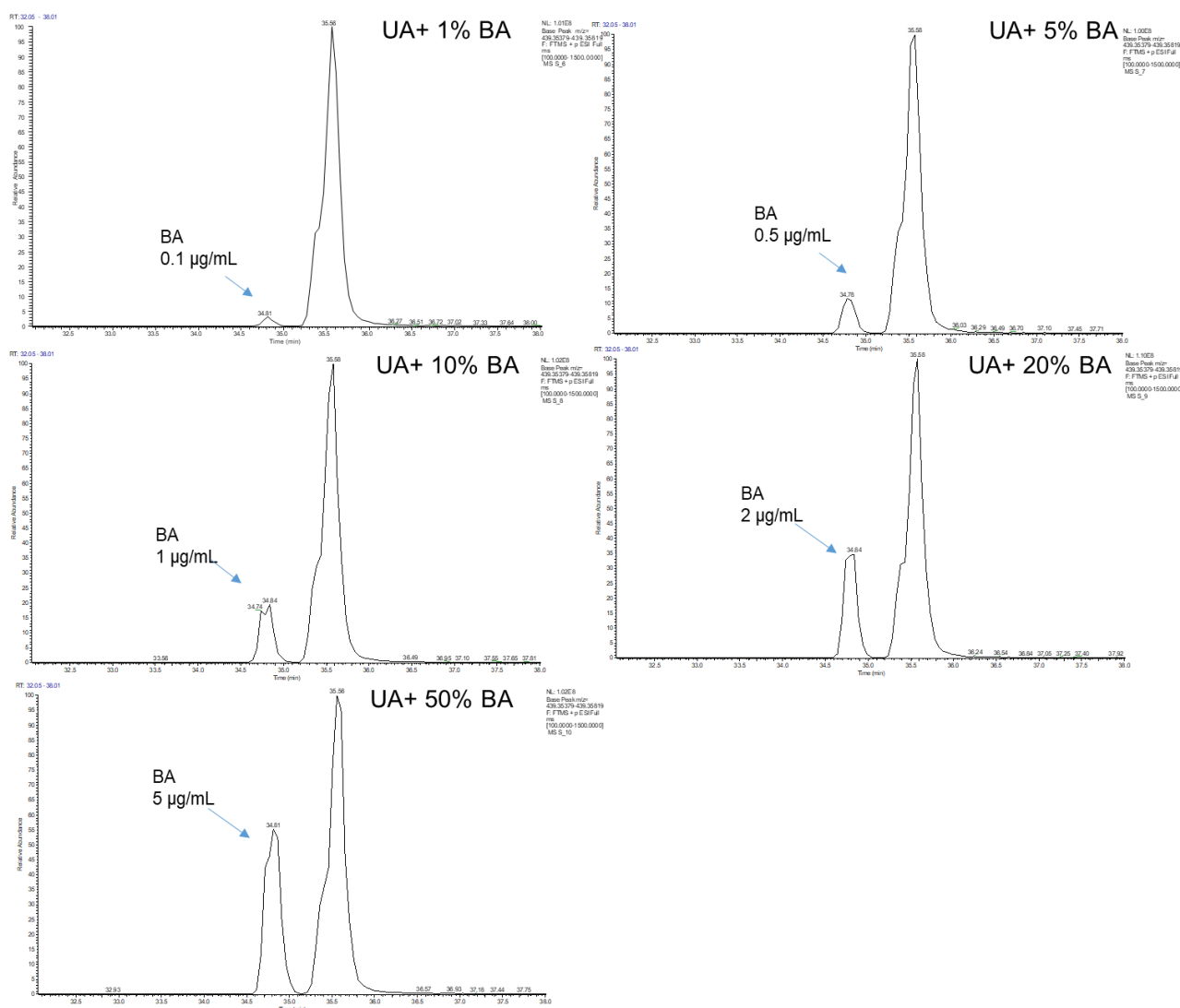


Figura 4.7 cromatogramma UA+BA



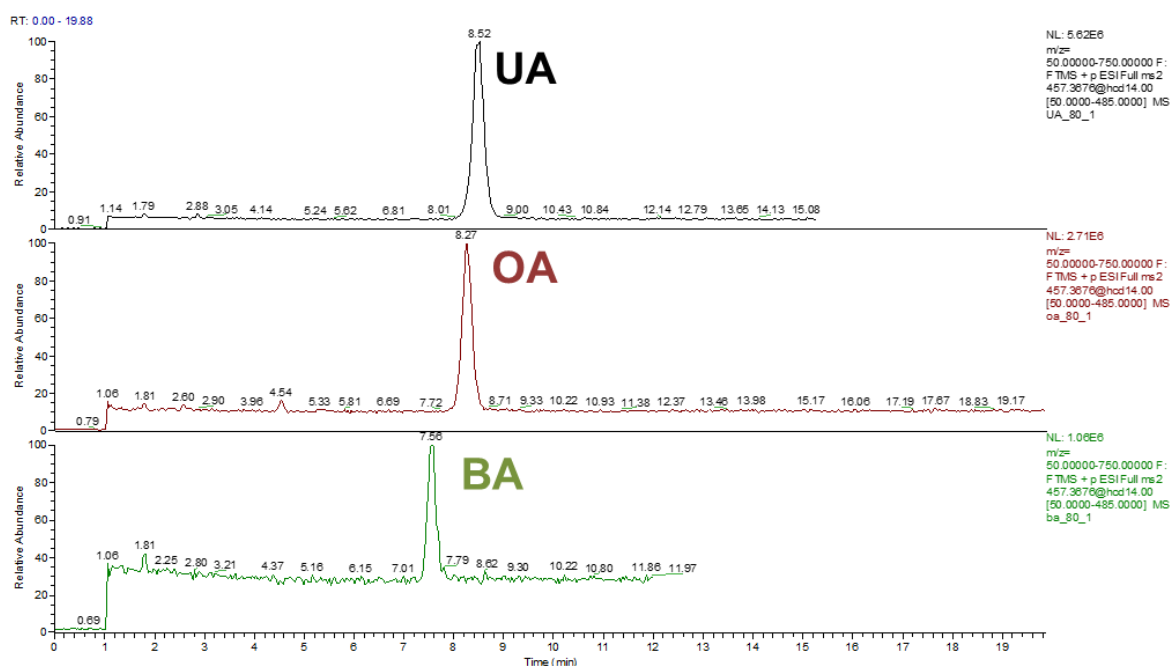
Dai cromatogrammi si evince che l'aumento progressivo della concentrazione di OA (Figura 4.6), porta all'aumento della gobba di OA e, solo a partire dal 20% di OA, determina un chiaro sdoppiamento del picco principale, coerente con la presenza di entrambi i composti. Questo risultato evidenzia che non è possibile quantificare correttamente la presenza di OA in UA attraverso la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa, sebbene sia possibile evidenziarne qualitativamente la presenza. Negli esperimenti con spike crescenti di BA (Figura 4.7), invece, l'acido betulinico risulta rilevabile già a basse concentrazioni (1 µg/mL), con un picco che diviene progressivamente più marcato all'aumentare della concentrazione grazie principalmente alla già buona selettività tra i due picchi. In questo caso è possibile procedere ad una determinazione quantitativa del BA in campioni di OA o di UA quando e se presente

In conclusione, in queste condizioni cromatografiche non è possibile riuscire a quantificare la presenza di oleanolico nei campioni di ursolico, ma solo la presenza di betulinico. Nel caso specifico di questa tesi, poiché il campione di acido ursolico non conteneva alcuna traccia di acido betulinico, la purezza del campione è stata definita tramite analisi NMR che ha evidenziato un 10% di acido oleanolico nel campione.

A fronte di questi risultati si è deciso che, per la quantificazione di acido ursolico utile alla valutazione della percentuale di incapsulamento in EV, non sarebbe stato necessario né sostenibile utilizzare un metodo in gradiente di 60 min, pertanto si è ottimizzato un metodo in isocratica attraverso il quale si mantiene comunque una sufficiente selettività UA/BA ma UA/OA non sono separati. L'impossibilità di separare UA da OA è strettamente legata alla natura isomerica dei due composti che, condividendo medesima formula molecolare e proprietà chimico-fisiche quasi identiche, presentano una lipofilia estremamente simile. Questa affinità strutturale si traduce in tempi di ritenzione sempre simili in qualsiasi condizione cromatografica, rendendo pressoché impossibile una loro risoluzione cromatografica.

Alla luce dei risultati ottenuti, le condizioni analitiche che sono state utilizzate per la quantificazione dell'acido ursolico incapsulate in EV ha visto una eluizione in condizioni isocratiche all'80% di organico (MeOH 0.1% acido formico v/v). In queste condizioni i tre acidi presentano tempi di ritenzione pari a 7.56, 8.27 e 8.52 min per acido betulinico, acido oleanolico e acido ursolico rispettivamente (Figura 4.8)

Figura 4.8 - Cromatogramma UA, OA, BA



4.3 Semi-quantificazione dell'acido ursolico nelle vescicole extracellulari

4.4.1 Curva di calibrazione

Vista la bassa solubilità dell'acido ursolico sono state effettuate diverse prove in condizione di solvente diverso per valutare l'impatto che questo avrebbe avuto sulla forma della curva e sui limiti di quantificazione dell'acido ursolico.

È stato attuato uno studio comparativo utilizzando diversi solventi (H₂O, DMSO, H₂O:MeOH 50:50, H₂O:MeOH 10:90) per determinare i limiti di rilevabilità (LOD) e quantificazione (LOQ) dell'analita. Le curve sono state costruite nel range 0,001–5 µg/mL per tutti i solventi utilizzati. La Tabella 4.1 riporta i dati ottenuti in ciascuna condizione. In acqua sono stati ottenuti un LOQ pari a 0,15 µg/mL e un LOD di 0,005 µg/mL, ed una curva con coefficiente di correlazione R² = 0,974. In DMSO, invece, è stata osservata una linearità superiore (R² = 0,998), ma con una sensibilità inferiore (LOQ 0.03 µg/mL; LOD 0,01 µg/mL). In miscele di H₂O:MeOH come solvente la linearità è inferiore rispetto al DMSO, ma la sensibilità è simile.

Tabella 4.1- Risultati curve in diversi solventi

Matrice: Acqua	Matrice: DMSO
Range di calibrazione: 0.001-5.00 µg/mL	Range di calibrazione: 0.001-5.00 µg/mL
Presunto LOQ: 0.015 µg/mL	Presunto LOQ: 0.03 µg/mL
LOD: 0.005 µg/mL	LOD: 0.01 µg/mL
R ² : 0.9739	R ² : 0.9981
Matrice: H₂O:MeOH 50:50	Matrice: H₂O:MeOH 10:90
Range di calibrazione: 0.001-5.00 µg/mL	Range di calibrazione: 0.001-5.00 µg/mL
Presunto LOQ: 0.03 µg/mL	Presunto LOQ: 0.03 µg/mL
LOD: 0.01 µg/mL	LOD: 0.01 µg/mL
R ² : 0.9743	R ² : 0.9843

Le curve ottenute nel range di concentrazione 0.001-5.00 µg/mL evidenziano, sebbene presentino come discusso una buona linearità in tutte le condizioni e nello stesso range, una risposta molto diversa tra le soluzioni in H₂O o DMSO e quelle in H₂O:MeOH. Questo andamento è perfettamente coerente con le caratteristiche di solubilità dell'acido ursolico (praticamente insolubile in acqua, sufficiente solubilità in MeOH, buona solubilità in DMSO) al punto da avere risposte alla massima concentrazione analizzata (5.00 µg/mL) di circa 20 volte superiori per le curve costruite con MeOH come cosolvente rispetto a quelle in H₂O o DMSO. Per quanto riguarda la curva in DMSO (ottimo solvente di

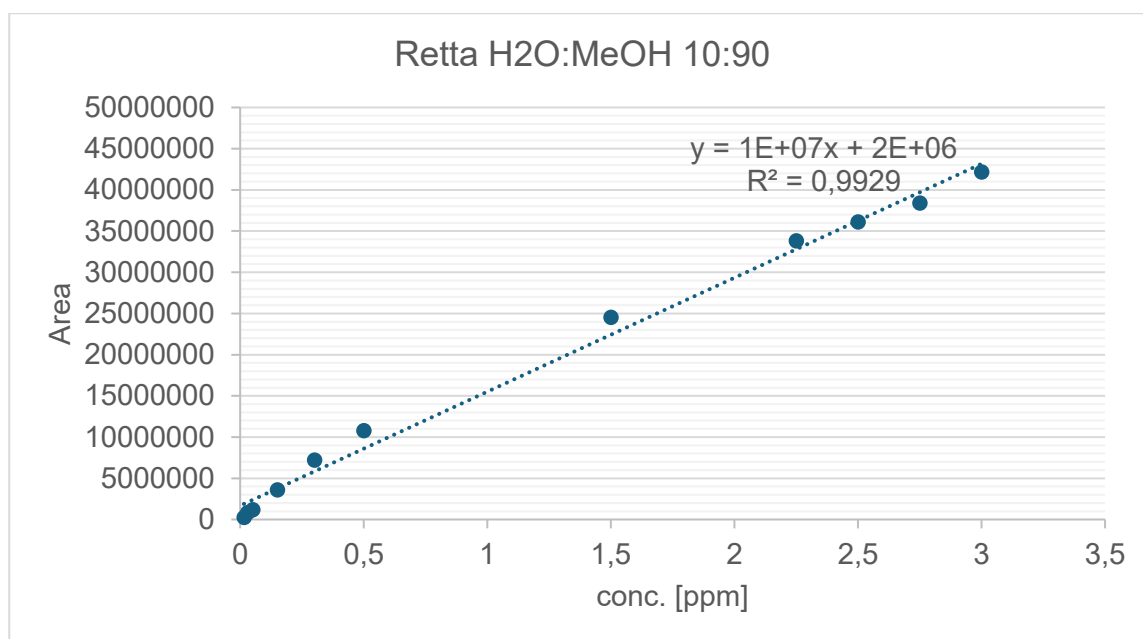
solubilizzazione) la differenza è da attribuirsi all'effetto di soppressione che questo può causare sulla risposta in massa.

Pertanto, la condizione di costruzione della curva ottimale è risultata essere quella in H₂O:MeOH 10:90, riducendo anche il range di analisi nell'intervallo 0.01-3.00 µg/mL. Queste sono anche le condizioni più vicine al solvente di estrazione/diluizione dei campioni in analisi, dove il MeOH svolge anche il ruolo di favorire la lisi delle vescicole per il rilascio di UA.

In queste condizioni la curva ha mostrato un'elevata linearità ($R^2 = 0,993$), consentendo così la determinazione semi-quantitativa dell'acido ursolico nei campioni analizzati. (Figura 4.9).

Tenute in considerazione le problematiche di solubilità dell'acido ursolico, è bene preparare la curva di calibrazione ogni volta che si effettua un set di analisi.

Figura 4.9 - Curva di calibrazione H₂O:MeOH 10:90



4.4.3 Determinazione semi-quantitativa acido ursolico in vescicole extracellulari

Dopo aver definito le condizioni cromatografiche e i parametri di spettrometria di massa, la fase successiva della ricerca si è focalizzata sull'applicazione del metodo ai campioni reali.

I risultati ottenuti (Figura 4.10 e tabella 4.2) mostrano che, nel campione di H₂O esterna della dialisi la concentrazione di UA risulta non rilevabile o inferiore al limite inferiore di rilevabilità (LOD) di 0,01 µg/mL per tutti i campioni analizzati. Nelle frazioni di membrana sono state individuate tracce quantificabili di UA, ad eccezione di alcuni campioni i cui i livelli non sono stati rilevati, suggerendo un parziale intrappolamento del composto all'interno della componente lipidica delle membrane, anch'esse lipofile e quindi ad esso affini.

Tabella 4.2- Risultati campioni L245-255

Campione UA:EV 1:1	µg
L245 campione UA:EV 1:1	2,30
L245 membrana	0,69
L245 H2O	NF
L250 campione bianco UA 1:1	2,15
L250 membrana	0,2
L250 H2O	NF
L249 campione bianco EV 1:1	0,13
L249 membrana	0,07
L249 H2O	NF
Campione UA:EV 1:2	µg
L246 campione UA:EV 1:2	1,26
L246 membrana	0,35
L246 H2O	NF
L251 campione bianco UA 1:2	1,32
L251 membrana	0,17
L251 H2O	NF
L249 campione bianco EV 1:2	0,13
L249 membrana	0,07
L249 H2O	NF
Campione UA:EV 1:5	µg
L247 campione UA:EV 1:5	1,29
L247 membrana	0,05
L247 H2O	NF
L252 campione bianco UA 1:5	1,37
L252 membrana	NF
L252 H2O	NF
L254 campione bianco EV 1:5	0,17
L254 membrana	NF
L254 H2O	NF
Campione UA:EV 1:10	µg

L248 campione UA:EV 1:10	1,25
L248 membrana	NF
L248 H2O	NF
L253 campione bianco UA 1:10	0,58
L253 membrana	NF
L253 H2O	NF
L255 campione bianco EV 1:10	0,59
L255 membrana	NF
L255 H2O	NF

Tabella 4. 3 Risultati campioni L264-272

Campione UA:EV 1:1	µg
L264 campione UA:EV 1:1	2,89
L264 membrana	0,08
L264 H2O	NF
L269 campione bianco UA 1:1	2,26
L269 membrana	0,3
L269 H2O	NF
L268 campione bianco EV	NF
L268 membrana	NF
L268 H2O	NF
Campione UA:EV 1:2	µg
L265 campione UA:EV 1:2	1,51
L265 membrana	0,04
L265 H2O	NF
L270 campione bianco UA 1:2	1,27
L270 membrana	0,14
L270 H2O	NF
L268 campione bianco EV	NF
L268 membrana	NF
L268 H2O	NF
Campione UA:EV 1:5	µg
L266 campione UA:EV 1:5	0,68
L266 membrana	NF
L266 H2O	NF
L271 campione bianco UA 1:5	0,52
L271 membrana	0,07
L271 H2O	NF
L268 campione bianco EV 1:5	NF
L268 membrana	NF
L268 H2O	NF

Campione UA:EV 1:10	µg
L267 campione UA:EV 1:10	0,35
L267 membrana	NF
L267 H2O	NF
L272 campione bianco UA 1:10	0,27
L272 membrana	0,02
L272 H2O	NF
L268 campione bianco EV 1:10	NF
L268 membrana	NF
L268 H2O	NF

Dai dati di entrambi i set di analisi (che non stati statisticamente confrontati poiché preparati a monte in maniera diversa, vedi sezione 3.8.2) emerge come il quantitativo di acido ursolico quantificabile come molecola libera all'interno della membrana di dialisi sia pressochè costante in presenza o assenza di EV, ma sia sempre assente nel comparto acquoso; l'acido ursolico tende infatti a distribuirsi preferenzialmente nella componente lipidica delle membrane delle EV, presumibilmente per la sua spiccata lipofilia.

Inoltre, è possibile affermare che le EV possono contenere un quantitativo basale di UA naturalmente presente che va a sommarsi al quantitativo incapsulato, sebbene non è sempre rilevabile a causa dei diversi quantitativi che sono stati aggiunti nella preparazione del campione

L'efficacia di incapsulamento (Tabella n 4.4) dell'acido ursolico nelle EV è stato calcolato utilizzando la formula

$$EE\% = \frac{\mu g \text{ UA vescicole}}{(\mu g \text{ UA vescicole} + \mu g \text{ UA membrane} + \mu g \text{ UA acqua})} * 100$$

Per quanto riguarda l'efficacia di incapsulamento all'aumentare del rapporto EV rispetto all'acido ursolico, si osserva un incremento dell'efficienza di incapsulamento (EE%), accompagnato da una riduzione della quantità di composto adsorbita sulla membrana di dialisi. Tale comportamento è attribuibile alla natura lipofila dell'UA, che favorisce l'adesione del composto alla membrana, piuttosto che la sua diffusione nella fase acquosa di dialisi.

Tabella 4.4 efficienza di incapsulamento dell'acido ursolico nelle EV in funzione del rapporto UA:EV

	UA:EV	µg UA vescicole	EE%
L245	1:1	2,30	78
L246	1:2	1,26	77
L247	1:5	1,29	91
L248	1:10	1,25	97
L264	1:1	2,89	97
L265	1:2	1,51	97
L266	1:5	0,68	100
L267	1:10	0,35	100

Nel complesso, l'efficienza di incapsulamento (tabella 4.4) ha raggiunto il 91-100% già a partire dal rapporto UA:EV di 1:5, per assestarsi al 97-100% nella condizione UA:EV di 1:10 che si è pertanto dimostrato il più efficace nelle condizioni sperimentali adottate. Per UA:EV 1:1 e 1:2 l'efficienza di incapsulamento è stata solo del 77-97%.

L'andamento osservato sottolinea il ruolo cruciale della componente lipidica delle EV nel sequestrare l'acido ursolico, sottraendolo alla competizione con la membrana di dialisi. Il raggiungimento del 100% di EE% a partire dal rapporto 1:5 dimostra che, superata una soglia critica di concentrazione lipidica, la spiccata affinità idrofobica dell'UA verso le vescicole neutralizza completamente le perdite per adsorbimento, definendo così le condizioni ottimali per le future applicazioni di questo nuovo sistema di delivery.

Le analisi hanno permesso di affermare che le condizioni di incapsulamento migliori dovranno prevedere la preparazione del sistema di delivery in rapporto UA:EV 1:10, per avere la miglior garanzia di incapsulamento da parte delle vescicole.

5. CONCLUSIONI E SVILUPPI FUTURI

Il presente lavoro ha avuto come obiettivo lo sviluppo di un approccio analitico per l'individuazione dell'acido ursolico all'interno di un sistema di veicolazione basato su vescicole extracellulari di origine vegetale. Le vescicole extracellulari isolate dal residuo secco della lavorazione delle mele sono state impiegate come modello sperimentale, al fine di esplorare in maniera preliminare il loro potenziale utilizzo come carrier per composti lipofili.

È stata messa a punto una procedura di trattamento del campione finalizzata alla lisi delle vescicole e alla successiva solubilizzazione dell'analita incapsulato, al fine di renderlo disponibile per l'analisi strumentale. La determinazione è stata effettuata mediante un metodo basato sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS), selezionata per l'elevata sensibilità, specificità e idoneità alla determinazione di composti lipofili in matrici complesse. L'applicazione del metodo ha consentito la semi-quantificazione dell'analita in diversi lotti sperimentali, permettendo il confronto tra differenti rapporti UA/EV e l'individuazione delle formulazioni caratterizzate da maggiore efficienza di carico.

Il lavoro si configura pertanto come uno studio volto a valutare l'efficienza dell'incapsulamento dell'acido ursolico in vescicole extracellulari vegetali e a fornire una base metodologica per future indagini orientate alla valutazione della biodisponibilità e dell'efficacia biologica del sistema sviluppato.

Particolare attenzione è stata dedicata alle fasi di preparazione del campione, che si sono dimostrate determinanti per la qualità del dato analitico. L'ottimizzazione delle procedure di estrazione e di trasferimento ha contribuito a migliorare la riproducibilità complessiva del metodo, riducendo le variabilità associate al trattamento di molecole altamente lipofile. I risultati ottenuti suggeriscono una possibile associazione dell'acido ursolico alla componente membranale delle vescicole, in accordo con le sue proprietà chimico-fisiche, sebbene tale osservazione richieda ulteriori approfondimenti.

Nel complesso, il lavoro fornisce una prima base metodologica per studi futuri orientati sia alla validazione del metodo analitico sia alla valutazione del comportamento dell'acido ursolico in sistemi di vescicole extracellulari di origine vegetale. Ulteriori indagini saranno necessarie per confermare i risultati ottenuti, estendere l'analisi a matrici biologiche più

complesse e valutare l'effettivo impatto dell'incapsulamento sulla biodisponibilità e sull'attività biologica dell'analita.

BIBLIOGRAFIA

- [1] D. Kashyap, *et al*, "Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential," 2016. doi: 10.1016/j.lfs.2016.01.017.
- [2] I. S. Azenha, *et al*, "Adsorbents, mobile phases, and strategies for the chromatographic separation of betulinic, oleanolic, and ursolic acids," 2024. doi: 10.1007/s13399-022-03723-3.
- [3] Ł. Woźniak, *et al*, "Ursolic acid - A pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological activities," 2015. doi: 10.3390/molecules201119721.
- [4] P. Namdeo *et al.*, "Therapeutic potential and novel formulations of ursolic acid and its derivatives: an updated review," 2023. doi: 10.1002/jsfa.12423.
- [5] G. Chianese *et al.*, "Bioactive triterpenoids from the caffeine-rich plants guayusa and maté," *Food Research International*, vol. 115, 2019, doi: 10.1016/j.foodres.2018.10.005.
- [6] A. Lorincz, *et al*, "Effects of ursolic acid on the structural and morphological behaviours of dipalmitoyl lecithin vesicles," *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, vol. 1848, no. 5, 2015, doi: 10.1016/j.bbamem.2015.01.010.
- [7] M. Song, *et al*, "Advanced research on extracellular vesicles based oral drug delivery systems," 2022. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.09.043.
- [8] L. Urbanelli *et al.*, "The role of extracellular vesicles in viral infection and transmission," 2019. doi: 10.3390/vaccines7030102.
- [9] Y. Jia *et al.*, "Small extracellular vesicles isolation and separation: Current techniques, pending questions and clinical applications," 2022. doi: 10.7150/thno.74305.
- [10] P. Vader, *et al*, "Extracellular vesicles for drug delivery," 2016. doi: 10.1016/j.addr.2016.02.006.
- [11] M. P. Zaborowski, *et al*, "Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study," 2015. doi: 10.1093/biosci/biv084.

- [12] M. Nemati *et al.*, “Plant-derived extracellular vesicles: a novel nanomedicine approach with advantages and challenges,” 2022. doi: 10.1186/s12964-022-00889-1.
- [13] R. Latella *et al.*, “Isolation of Extracellular Vesicles from Agri-Food Wastes: A Novel Perspective in the Valorization of Agri-Food Wastes and By-Products,” May 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/foods13101492.
- [14] S. Buratta *et al.*, “Characterization of Nanovesicles Isolated from Olive Vegetation Water,” *Foods*, vol. 13, no. 6, 2024, doi: 10.3390/foods13060835.
- [15] B. Kürtösi, *et al.*, “A Systematic Review on Plant-Derived Extracellular Vesicles as Drug Delivery Systems,” Jul. 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/ijms25147559.
- [16] M. C. López de las Hazas *et al.*, “Therapeutic potential of plant-derived extracellular vesicles as nanocarriers for exogenous miRNAs,” *Pharmacol. Res.*, vol. 198, 2023, doi: 10.1016/j.phrs.2023.106999.
- [17] J. A. Welsh *et al.*, “Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches,” *J. Extracell. Vesicles*, vol. 13, no. 2, 2024, doi: 10.1002/jev2.12404.
- [18] K. Poudel *et al.*, “Dual stimuli-responsive ursolic acid-embedded nanophytoliposome for targeted antitumor therapy,” *Int. J. Pharm.*, vol. 582, 2020, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119330.
- [19] B. Carletto, *et al.*, “Ursolic acid-loaded lipid-core nanocapsules reduce damage caused by estrogen deficiency in wound healing,” *Colloids Surf. B Biointerfaces*, vol. 203, 2021, doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.111720.
- [20] E. Antonio *et al.*, “Chitosan modified poly (lactic acid) nanoparticles increased the ursolic acid oral bioavailability,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 172, 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.041.
- [21] Z. J. Rong *et al.*, “Ursolic Acid Ameliorates Spinal Cord Injury in Mice by Regulating Gut Microbiota and Metabolic Changes,” *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 16, 2022, doi: 10.3389/fncel.2022.872935.

- [22] E. C. Vargas de Oliveira, Z *et al*, "Development and Evaluation of a Nanoemulsion Containing Ursolic Acid: a Promising Trypanocidal Agent: Nanoemulsion with Ursolic Acid Against *T. cruzi*," *AAPS PharmSciTech*, vol. 18, no. 7, 2017, doi: 10.1208/s12249-017-0736-y.
- [23] S. Caldeira De Araújo Lopes *et al.*, "Preparation, physicochemical characterization, and cell viability evaluation of long-circulating and pH-sensitive liposomes containing ursolic acid," *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/467147.
- [24] A. Ahmad, M. F. Abuzinadah, *et al*, "Ursolic acid rich ocimum sanctum L leaf extract loaded nanostructured lipid carriers ameliorate adjuvant induced arthritis in rats by inhibition of COX-1, COX-2, TNF- α and IL-1: Pharmacological and docking studies," *PLoS One*, vol. 13, no. 3, 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0193451.
- [25] T. Li *et al.*, "pH-Sensitive mesoporous silica nanoparticles anticancer prodrugs for sustained release of ursolic acid and the enhanced anti-cancer efficacy for hepatocellular carcinoma cancer," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 96, 2017, doi: 10.1016/j.ejps.2016.10.019.
- [26] M. Jamal, *et al*, "Transdermal potential and anti-arthritic efficacy of ursolic acid from niosomal gel systems," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 29, no. 2, 2015, doi: 10.1016/j.intimp.2015.10.029.
- [27] A. K. Singh, *et al*, "Nano-suspension of ursolic acid for improving oral bioavailability and attenuation of type II diabetes: A histopathological investigation," *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 22, 2019, doi: 10.1016/j.bcab.2019.101433.
- [28] H. L. Alvarado, *et al*, "Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the quantification of ursolic/oleanic acids mixture isolated from *Plumeria obtusa*," *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 983–984, 2015, doi: 10.1016/j.jchromb.2015.01.009.
- [29] L. Zhao *et al.*, "Simultaneous determination of oleanolic and ursolic acids in rat plasma by HPLC-MS: Application to a pharmacokinetic study after oral administration of different combinations of qinggansanjie decoction extracts," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 53, no. 7, 2015, doi: 10.1093/chromsci/bmu217.
- [30] A. Caligiani, *et al*, "A simple GC-MS method for the screening of betulinic, corosolic, maslinic, oleanolic and ursolic acid contents in commercial botanicals used as food

supplement ingredients," *Food Chem.*, vol. 136, no. 2, 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.08.011.

- [31] E. Giménez, *et al*, "A sensitive liquid chromatography-mass spectrometry method for the simultaneous determination in plasma of pentacyclic triterpenes of *Olea europaea* L.," *Food Chem.*, vol. 229, 2017, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.02.116.
- [32] P. Yang, *et al*, "Determination of free isomeric oleanolic acid and ursolic acid in *Pterocephalus hookeri* by capillary zone electrophoresis," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 43, no. 4, 2007, doi: 10.1016/j.jpba.2006.10.042.
- [33] H. Liu, *et al*, "MECC determination of oleanolic acid and ursolic acid isomers in *Ligustrum lucidum* Ait.," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 32, no. 3, 2003, doi: 10.1016/S0731-7085(03)00235-8.
- [34] S. Qi, *et al*, "Novel and simple nonaqueous capillary electrophoresis separation and determination bioactive triterpenes in Chinese herbs," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 40, no. 1, 2006, doi: 10.1016/j.jpba.2005.06.003.
- [35] Kartini, *et al*, "HPTLC simultaneous quantification of triterpene acids for quality control of *Plantago major* L. and evaluation of their cytotoxic and antioxidant activities," *Ind. Crops Prod.*, vol. 60, 2014, doi: 10.1016/j.indcrop.2014.06.020.
- [36] V. G. Kontogianni, *et al*, "Rapid and novel discrimination and quantification of oleanolic and ursolic acids in complex plant extracts using two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy-Comparison with HPLC methods," *Anal. Chim. Acta*, vol. 635, no. 2, 2009, doi: 10.1016/j.aca.2009.01.021.
- [37] M. K. Lee, *et al*, "Development of a validated liquid chromatographic method for the quality control of *Prunellae Spica*: Determination of triterpenic acids," *Anal. Chim. Acta*, vol. 633, no. 2, 2009, doi: 10.1016/j.aca.2008.12.038.
- [38] Q. Chen, *et al*, "Development of a liquid chromatography - Mass spectrometry method for the determination of ursolic acid in rat plasma and tissue: Application to the pharmacokinetic and tissue distribution study," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 399, no. 8, 2011, doi: 10.1007/s00216-011-4651-x.
- [39] Z. R. Tan *et al.*, "LC-MS-MS quantitative determination of ursolic acid in human plasma and its application to pharmacokinetic studies," *Chromatographia*, vol. 72, no. 11–12, 2010, doi: 10.1365/s10337-010-1797-1.

- [40] Q. Liao, *et al*, "LC-MS determination and pharmacokinetic studies of ursolic acid in rat plasma after administration of the traditional Chinese medicinal preparation Lu-Ying extract," *Yakugaku Zasshi*, vol. 125, no. 6, 2005, doi: 10.1248/yakushi.125.509.
- [41] L. Lacikova, *et al*, "A rapid tandem mass spectrometric assay for determination of ursolic acid - Application to analysis of ursolic acid in four species of *Staphylea* L. and leaves of *staphylea Pinnata* L. gathered during ontogenesis," *Chromatographia*, vol. 63, no. 3–4, 2006, doi: 10.1365/s10337-006-0724-y.
- [42] L. Novotny, *et al*, "Development of LC-MS method for determination of ursolic acid: Application to the analysis of ursolic acid in *Staphylea holocarpa* Hemsl.," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 31, no. 5, 2003, doi: 10.1016/S0731-7085(02)00706-9.
- [43] B. CARLETTO *et al.*, "DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A FAST AND SENSITIVE UHPLC-PDA METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF URSOLIC ACID IN POLY (L-LACTIC ACID) NANOCAPSULES," *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2020, doi: 10.22159/ajpcr.2020.v13i9.38993.
- [44] Destefanis Margherita "Vescicole extracellulari isolate da mele per la veicolazione e il direzionamento dell'acido ursolico" tesi di laurea, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE Amedeo Avogadro, Anno Accademico 2023-2024