



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI FARMACIA

CORSO DI LAUREA IN
CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

Tesi di Laurea

**CONFRONTO TRA NANOPARTICELLE E GOCCE OFTALMICHE
A BASE DI DERIVATI DEL CHITOSANO
PER IL TRATTAMENTO DI PATOLOGIE OCULARI**

Relatori

Dott.ssa Ylenia Zambito

Dott.ssa Angela Fabiano

Candidato

Giulia Mallegni

Anno accademico 2013/2014

Indice

1 – Parte introduttiva	4
1.1 – Anatomia e fisiologia dell’occhio	6
1.1.1 – Struttura del globo oculare	6
1.1.2 – Apparato lacrimale	7
1.1.3 – Film lacrimale	8
1.2 – Somministrazione oculare di farmaci	10
1.2.1 – Limiti	10
1.2.2 – Nuovi approcci	11
1.3 – Chitosano	12
1.3.1 – Vantaggi del chitosano nella somministrazione oculare	13
1.4 – Sistemi di trasporto per farmaci oftalmici a base di chitosano	14
1.4.1 – Soluzioni	14
1.4.2 – Microsfere	14
1.4.3 – Liposomi e sistemi rivestiti	15
1.4.4 – Nanoparticelle	15
1.5 – Meccanismo d’azione tossicità dei sistemi a base di chitosano	16
1.6 – Metodi di preparazione di nanoparticelle di chitosano	17
1.6.1 – Reticolazione ionotropica	17
1.6.2 – Coacervazione complessa	18
1.6.3 – Microemulsione	18
1.6.4 – Coalescenza di goccioline in emulsione	18
1.6.5 – Estrazione del solvente in emulsione	19
1.6.6 – Auto-assemblaggio di chitosano modificato idrofobicamente	19
2 – Parte sperimentale	20
2.1 – Materiali e metodi	21
2.1.1 – Materiali	21
2.1.2 – Depolimerizzazione di Ch e HA	22
2.1.3 – Determinazione viscosimetrica del peso molecolare di rCh e rHA	23
2.1.4 – Sintesi del coniugato N ⁺ -rCh	24
2.1.5 – Attacco covalente di gruppi tiolici sul derivato N ⁺ -rCh	24
2.1.6 – Determinazione del contenuto di gruppi tiolici	24

2.1.7 – Marcatura dei polimeri con FITC	25
2.1.8 – Preparazione di nanoparticelle medicate con MET	25
2.1.9 – Determinazione HPLC di MET	26
2.1.10 – Dialisi dinamica	26
2.1.11 – Determinazione della cinetica di eliminazione dei polimeri N ⁺ -rCh e N ⁺ -rCh-SH dal fluido lacrimale dei conigli	27
2.1.12 – Determinazione della cinetica di eliminazione della MET dal fluido lacrimale dei conigli	28
2.1.13 – Trattamento dei dati di eliminazione	28
2.2 – Risultati e discussioni	29
2.2.1 – Sintesi del coniugato N ⁺ -rCh	29
2.2.2 – Attacco covalente di gruppi tiolici sul derivato N ⁺ -rCh	29
2.2.3 – Caratterizzazione delle nanoparticelle medicate con MET	30
2.2.4 – Dialisi dinamica	30
2.2.4.1 – Analisi cinetica delle fasi	31
2.2.4.2 – Studio dell'interazione del farmaco con la superficie nanoparticellare	32
2.2.5 – Determinazione della cinetica di eliminazione dei polimeri N ⁺ -rCh e N ⁺ -rCh-SH e delle relative NP dal fluido lacrimale dei conigli	33
2.2.6 – Determinazione della cinetica di eliminazione di MET dal fluido lacrimale dei conigli	34
3 – Conclusioni	35
Figure e tabelle	36
Bibliografia	44

1 – Parte introduttiva

I colliri convenzionali sono facilmente somministrabili e dunque ben accettati dai pazienti, tuttavia presentano tre principali limiti: scarsa biodisponibilità, mancanza di specificità d'azione del farmaco verso un determinato target e inattivazione enzimatica.

Per superare queste difficoltà sono stati sviluppati nuovi sistemi di rilascio. Tra questi troviamo **sistemi gelificanti *in situ*** e **inserti oftalmici** che, sebbene offrano il vantaggio di un rilascio prolungato di farmaco, causano effetti indesiderati, quali visione offuscata e assorbimento sistemico, e sono poco accettati dal paziente. Un'alternativa più vantaggiosa è rappresentata dai **sistemi colloidali**; questi possono essere applicati in forma liquida come un collirio e in seguito all'interazione con la cornea e la congiuntiva possono costituire un deposito precorneale con conseguente rilascio prolungato del farmaco legato. Polimeri biodegradabili possono essere associati a un farmaco per formulare dei nanosistemi da cui esso venga rilasciato nell'occhio in modo attento e controllato. Tra i polimeri studiati, il chitosano è molto interessante per le sue proprietà uniche tra cui mucoadesività, biocompatibilità, non tossicità e capacità di aumentare il trasporto paracellulare dei farmaci.

I sistemi di rilascio basati sulla nanotecnologia consentono di ridurre il numero di somministrazioni necessarie per mantenere la concentrazione terapeutica di farmaco al sito d'azione e sono perciò eccellenti per il trattamento di disturbi oculari cronici come glaucoma, retinopatia diabetica e degenerazione maculare, patologie che normalmente richiedono frequenti somministrazioni.

Molto interessante è l'applicazione dei sistemi nanoparticellari a base di chitosano per la somministrazione oculare di farmaci peptidici; questi sono in genere scarsamente assorbiti a causa del loro elevato peso molecolare e sono inoltre soggetti a degradazione enzimatica. L'impiego di simili trasportatori consente di proteggere il peptide intrappolato all'interno dall'azione degli enzimi e allo stesso tempo di favorirne l'assorbimento attraverso i tessuti dell'occhio.

Recentemente i peptidi oppioidi endogeni hanno assunto un grande interesse per la loro potenzialità nella protezione della retina dai danni associati ad eventi ischemici.

Sono state identificate tre famiglie di oppioidi endogeni: *encefaline*, *dinorfine* ed *endorfine*, ognuna derivante da un diverso precursore polipeptidico. Le loro azioni sono mediate dal legame con i recettori oppioidi, classificati in tre tipi: μ , k e δ . Le encefaline (met-encefalina e leu-encefalina) sono state le prime ad essere isolate e possono essere considerate i ligandi naturali dei recettori δ , anche se mostrano una bassa selettività per questi recettori rispetto a quelli μ .

La **met-encefalina** (Figura 1.1) è un pentapeptide con sequenza amminoacidica Tyr-Gly-Gly-Phe-Met.

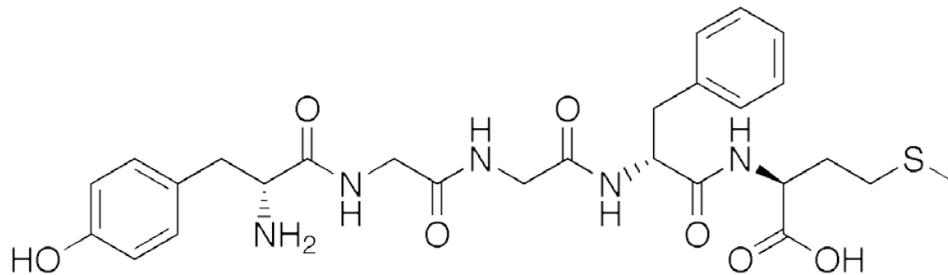


Figura 1.1 Struttura della met-encefalina

In situazioni di stress cellulare, quale l'ischemia, è stato registrato nell'uomo un incremento dei livelli di oppioidi nell'umor acqueo e una concomitante riduzione della pressione intraoculare (IOP), questo effetto viene antagonizzato dalla contemporanea somministrazione di naloxone, il che rafforza l'idea che i due fenomeni siano associati. Si ipotizza che l'azione ipotensiva degli oppioidi endogeni e di altri agonisti esogeni sia il risultato di un maggiore e più facile deflusso dell'umor acqueo.

L'attivazione dei recettori oppioidi prima di un evento ischemico può fornire una citoprotezione alle cellule: questo fenomeno viene chiamato preconditionamento oppioide. Si presume che la stimolazione dei recettori oppioidi, in particolare di quelli δ , attivi delle chinasi che riducono la tossicità indotta dal glutammato e conseguentemente la morte cellulare, e inibisca la produzione di radicali liberi, NO e citochine proinfiammatorie, tutti fattori implicati nella patofisiologia del danno ischemico. Appare chiaro che gli oppioidi endogeni rivestono un ruolo importante nella neuroprotezione della retina agendo a vari livelli per bloccare gli effetti della cascata di eventi che vengono innescati in condizioni ischemiche-ipossiche.

1.1 – Anatomia e fisiologia dell'occhio

1.1.1 – Struttura del globo oculare

Il globo oculare è costituito da tre strati concentrici: lo **strato esterno** è una lamina fibrosa che comprende la cornea e la sclera; lo **strato intermedio** o uvea è una lamina vascolare che comprende l'iride, il corpo ciliare e la coroide; lo **strato interno** è rappresentato dalla retina (Figura 1.2).

La *cornea* è una potente lente naturale e costituisce la porzione anteriore della tonaca esterna; è una membrana trasparente anteriormente convessa, costituita dall'esterno all'interno da cinque strati: l'epitelio, la membrana di Bowman, lo stroma, la membrana di Descemet e l'endotelio. Essa converge i raggi luminosi verso la fovea, un piccolo affossamento situato nella regione centrale della retina; inoltre fornisce protezione e sostegno al bulbo oculare. A livello della giunzione sclerocorneale la cornea aderisce alla *sclera*, che costituisce i 5/6 posteriori della tonaca esterna. La sclera è opaca e comprende due strati: l'episclera e la sclera propriamente detta. Ha una funzione strutturale e protettiva. La porzione anteriore della sclera e la superficie interna delle palpebre sono rivestite dalla *congiuntiva*, una membrana mucosa sottile e riccamente vascolarizzata che svolge funzioni meccaniche, difensive, nutrizionali ed emuntorie.

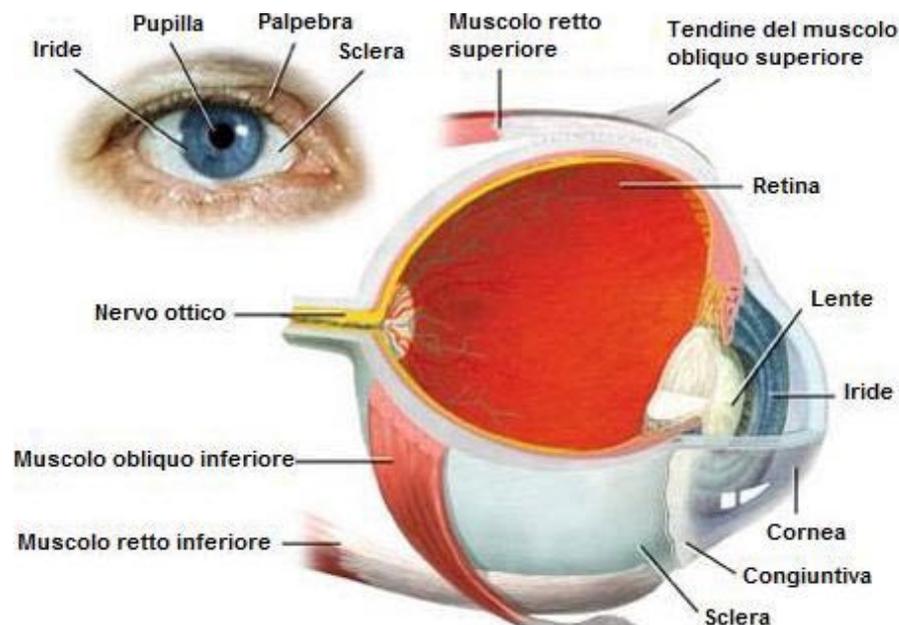


Figura 1.2 Rappresentazione schematica dell'occhio umano

L'*iride* è una membrana pigmentata posta dietro alla cornea e davanti al cristallino, è di forma circolare e reca un orifizio centrale, la pupilla, che permette il passaggio dei raggi luminosi. È formata da tre strati: l'endotelio, lo stroma e l'epitelio. L'iride funge da diaframma per regolare il diametro pupillare e, di conseguenza, la quantità di luce che colpisce la retina. Posteriormente all'iride è situato il *corpo ciliare*, che ne rappresenta la prosecuzione. Esso consta di una componente vascolare e di una muscolare, grazie a quest'ultima regola la curvatura del cristallino, una lente biconvessa che converge i raggi luminosi sulla retina con la funzione di mettere a fuoco le immagini; inoltre il corpo ciliare è responsabile della produzione dell'umor acqueo. La parte posteriore dell'uvea è la *coroide*, la vera e propria membrana vascolare dell'occhio, costituita da strati di vasi sovrapposti: provvede a nutrire e ossigenare gli strati retinici più esterni e partecipa all'irrorazione del nervo ottico.

La *retina* è una sottile membrana che riveste la superficie interna del globo oculare dal punto di uscita del nervo ottico fino all'orifizio pupillare; è la sede dei fotorecettori: coni e bastoncelli. È suddivisa in due aree: un'area centrale chiamata macula lutea, che contiene la fovea ricca di coni, e un'area periferica dove prevalgono i bastoncelli. Istologicamente la retina è composta da elementi nervosi ed elementi di sostegno che si dispongono a formare dieci strati sovrapposti.

All'interno dell'occhio si distinguono tre compartimenti: la *camera anteriore* tra la cornea e l'iride, la *camera posteriore* tra l'iride e il cristallino e la *camera vitrea* dietro il cristallino. Le prime due contengono l'umor acqueo, un liquido trasparente prodotto dal corpo ciliare che poi defluisce attraverso il canale di Schlemm nella circolazione venosa; la camera vitrea è occupata da una massa gelatinosa trasparente denominata corpo vitreo.

1.1.2 – Apparato lacrimale

L'apparato lacrimale consiste di una porzione secretoria, una parte distributiva e un sistema di drenaggio. La componente secretoria è formata dalla ghiandola lacrimale principale e dalle ghiandole lacrimali accessorie. Le lacrime secrete vengono distribuite sulla superficie oculare dalle palpebre durante l'ammiccamento. Il sistema di drenaggio è costituito dai puntini lacrimali e dai canalicoli lacrimali; questi ultimi comprendono un tratto verticale e uno orizzontale che si uniscono a formare un canalicolo comune per poi aprirsi nella parete laterale del sacco lacrimale, la cui continuazione costituisce il dotto nasolacrimale.

La produzione di lacrime può essere distinta in lacrimazione di base, lacrimazione dovuta a riflesso, ed emozionale.

Il flusso lacrimale basale origina un film, sulla superficie corneale, importante per scopi ottici, metabolici e di lubrificazione. Il flusso basale è di 1.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ e ciò si traduce in un turnover lacrimale del 16 %/min durante le ore di veglia. Non si osservano differenze sostanziali nella lacrimazione tra uomo e donna prima dei sessant'anni, tuttavia il turnover lacrimale varia con l'età e le persone anziane soffrono in misura maggiore di secchezza oculare.

La lacrimazione può essere un riflesso indotto da stimoli di varia natura (chimica, meccanica, termica, luminosa, ecc.) e in questi casi può incrementare fino a 300 $\mu\text{l}/\text{min}$, determinando il lavaggio dei corpi estranei presenti sulla superficie dell'occhio, inclusi i farmaci.

1.1.3 – Film lacrimale

La superficie corneo-congiuntivale è coperta da un sottile strato di fluido, il cosiddetto *film lacrimale* (Figura 1.3). L'osmolalità del film lacrimale in occhi normali è pari a 310-350 mOsm/kg ed è regolata dai principali ioni inorganici Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- e da proteine. Le lacrime hanno un pH circa 7.4 e la loro capacità tampone è determinata da ioni bicarbonato, proteine e mucine. La viscosità è di circa 3 mPa·s mentre la tensione superficiale ha un valore medio di 44 mN/m. Il film lacrimale ha uno spessore di circa 3-10 μm ed è formato da tre strati: uno strato esterno lipidico, uno strato intermedio acquoso e uno strato interno mucoso.

Lo *strato lipidico* è spesso circa 100 nm e viene secreto dalle ghiandole sebacee palpebrali tarsali di Meibonio e Zeiss. Esso si distribuisce sullo strato acquoso durante l'ammiccamento e consiste principalmente di esteri di steroli e acidi grassi liberi. Svolge importanti funzioni tra le quali ritarda l'evaporazione dello strato acquoso in modo da mantenere la normale osmolalità delle lacrime, aumenta la tensione superficiale, lubrifica le palpebre e fa sì che il film lacrimale rimanga entro i margini palpebrali, impedendone la fuoriuscita sulla cute.

Lo *strato acquoso* viene secreto dalle ghiandole lacrimali principali ed accessorie; contiene sali inorganici, glucosio, urea, retinolo, acido ascorbico, lipocaline, immunoglobuline, glicoproteine, lisozima e lactoferrina. Esso è responsabile dell'osmolalità delle lacrime, veicola sostanze trofiche per l'epitelio, ha un'attività antibatterica e lava via corpi estranei e detriti.

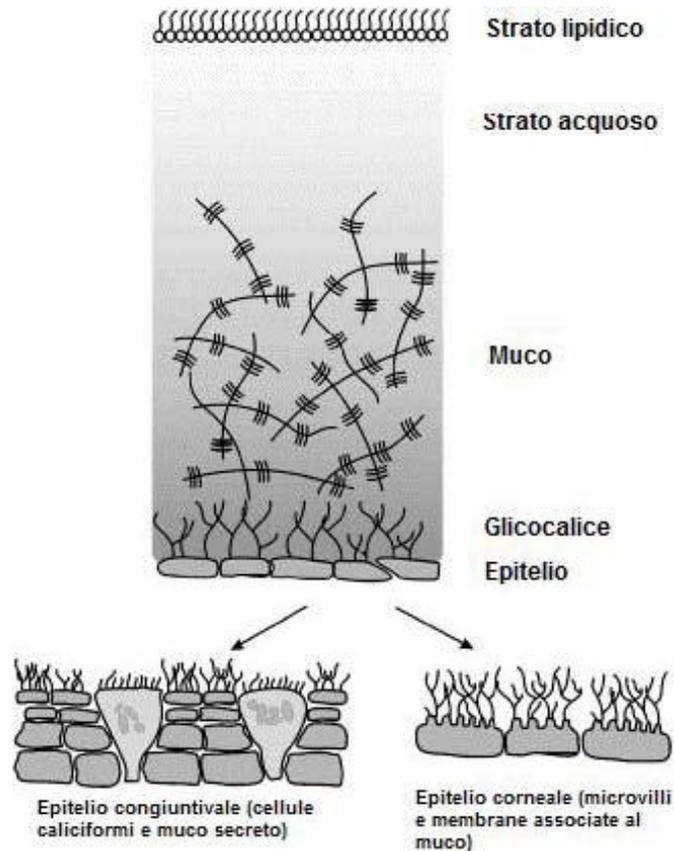


Figura 1.3 Rappresentazione schematica del film lacrimale

Lo *strato mucoso* è secreto dalle cellule caliciformi, dalle cripte di Henle e dalle ghiandole di Manz congiuntivali. Il muco è costituito da glicoproteine, proteine, lipidi, elettroliti, enzimi, mucopolisaccaridi e acqua. Il componente primario del muco è la *mucina*, una glicoproteina di elevato peso molecolare caratterizzata da subunità contenenti un nucleo proteico centrale al quale si legano centinaia di catene polisaccaridiche. Queste catene generalmente terminano con acido sialico o con fucosio, facendo sì che la glicoproteina a pH fisiologico sia caricata negativamente.

In soluzione, per oligomerizzazione di più subunità di mucina si formano vasti aggregati lineari flessibili che vengono stabilizzati dall'intreccio delle macromolecole e dalla formazione di legami idrogeno tra residui saccaridici adiacenti. Le mucine migliorano la distribuzione del film lacrimale e promuovono la sua stabilità e coesione.

Lo strato mucoso è intimamente associato con il glicocalice delle cellule epiteliali corneali e congiuntivali, e la sua funzione principale è quella di trasformare l'epitelio da una superficie idrofoba in una idrofila per permetterne l'idratazione. Inoltre protegge gli epitelii da danneggiamenti, facilita i movimenti delle palpebre, intrappola batteri, detriti cellulari e corpi estranei

per poi espellerli. Il muco può formare una barriera diffusiva per le macromolecole in dipendenza dal grado di intreccio delle catene, d'altro canto esso può legare sostanze cationiche grazie alla carica negativa delle mucine.

Data la composizione, le caratteristiche fisico-chimiche e la struttura del film lacrimale, diversi fattori influenzano la mucoadesione dei sistemi di rilascio oculari e per tale processo sono state proposte varie teorie: elettronica, assorbimento, umidificazione, diffusione o interpenetrazione. Per essere un buon coadiuvante della mucoadesione, il polimero del sistema di rilascio del farmaco deve stabilire un intimo contatto con lo strato mucoso: le catene polimeriche devono essere sufficientemente mobili e flessibili per diffondere nel muco e penetrare fino a profondità sufficienti a creare un intreccio. Esse devono poter interagire con le mucine attraverso la formazione di legami idrogeno, elettrostatici e interazioni idrofobiche.

1.2 – Somministrazione oculare di farmaci

1.2.1 – Limiti

La somministrazione topica di farmaci oftalmici può essere finalizzata alla risoluzione di disturbi superficiali quali infezioni o al trattamento intra-oculare attraverso la cornea di malattie come glaucoma e uveite (Alonso and Sánchez, 2003). Nonostante gli sforzi dedicati negli anni '80 alla progettazione di sistemi solidi per il rilascio oculare di farmaci, le forme di rilascio più accettate sono ancora quelle liquide, somministrate come gocce oculari. Uno dei principali problemi riscontrati con l'impiego locale di forme liquide è la rapida ed estesa perdita precorneale determinata dal drenaggio e dal turnover del fluido lacrimale. Dopo l'instillazione di una goccia, un'elevata frazione della dose instillata viene persa a causa della limitata capacità di ritenzione di liquido della superficie dell'occhio e del riflesso di ammiccamento. Inoltre una certa quantità di farmaco viene spesso assorbita sistemicamente attraverso la congiuntiva e il dotto nasolacrimale.

In aggiunta a questi limiti anatomici, il secondo maggior fattore che ostacola il trasporto di un farmaco all'occhio interno è la diffusione attraverso la cornea: sebbene questa ricopra solo un sesto dell'intera superficie del bulbo oculare, costituisce la più importante via di permeazione nei tessuti intra-oculari. Ovviamente la misura in cui un farmaco applicato topicamente rimane sulla superficie oculare o penetra internamente dipende non solo dalle

caratteristiche fisiologiche della cornea ma anche dalle proprietà chimico-fisiche della molecola e dal vettore utilizzato: è ben noto che con le classiche forme liquide per uso oftalmico meno del 5% del farmaco penetra nella cornea e raggiunge i tessuti interni. L'epitelio corneale rappresenta una barriera selettiva per il passaggio di composti idrofili e ionizzati grazie alle giunzioni strette tra le sue cellule che impediscono l'ingresso di molecole attraverso la via paracellulare; lo stroma invece blocca quei composti lipofili che non sono stati trattiene dall'epitelio e può fungere da riserva dalla quale il farmaco viene rilasciato gradualmente nell'umor acqueo.

La congiuntiva rappresenta un'importante via alternativa per il passaggio di un farmaco: per effetto dell'estesa area superficiale e del ricco flusso sanguigno, in seguito ad applicazione topica l'assorbimento congiuntivale generalmente supera quello corneale. Tuttavia questo è un evento indesiderabile perché la maggior parte del farmaco che attraversa la congiuntiva raggiunge la circolazione sanguigna, non sarà quindi in grado di agire a livello oculare e potrebbe essere responsabile di gravi effetti collaterali sistemici.

Dopo l'instillazione oculare di una soluzione di farmaco, questo viene dapprima miscelato con il fluido lacrimale e rimane in contatto con la mucosa oculare all'incirca per 1-2 minuti, perché il drenaggio attraverso il dotto nasolacrimale induce una rapida eliminazione delle convenzionali forme di dosaggio.

1.2.2 – Nuovi approcci

I ricercatori hanno dedicato notevoli sforzi alla progettazione di sistemi intesi ad aggirare questi ostacoli: nuovi dispositivi di rilascio sono stati pensati per migliorare la penetrazione oculare del farmaco prolungando il tempo di residenza nella cornea e nel sacco congiuntivale, controllare la velocità di rilascio dal sistema e minimizzare la perdita precorneale. Questi obiettivi primari possono essere raggiunti tramite diverse strategie che comprendono l'uso di polimeri bioadesivi, promotori di penetrazione e avanzati sistemi di trasporto micro- e nanoparticellari. All'interno di questo campo di ricerca il chitosano sta assumendo una posizione promettente.

1.3 – Chitosano

Il *chitosano* (Figura 1.4) è un polisaccaride naturale costituito da unità di glucosammina e N-acetilglucosammina unite da legami $\beta(1 \rightarrow 4)$ (Peniche and Peniche, 2011).

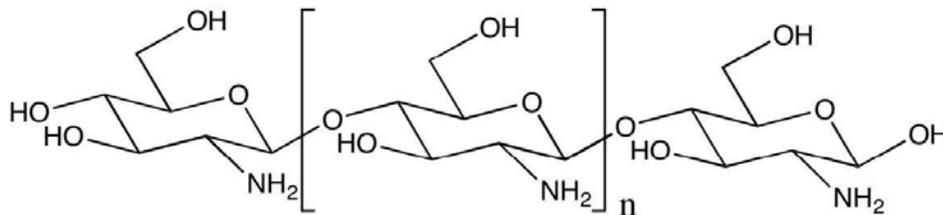


Figura 1.4 Struttura del chitosano

Il chitosano si trova raramente in natura ed è generalmente ottenuto per deacetilazione della chitina (Figura 1.5), un omopolimero di unità di N-acetil-D-glucosammina unite da legami $\beta(1 \rightarrow 4)$ presente nel guscio di crostacei e molluschi, nella parete cellulare dei funghi e nella cuticola degli insetti.

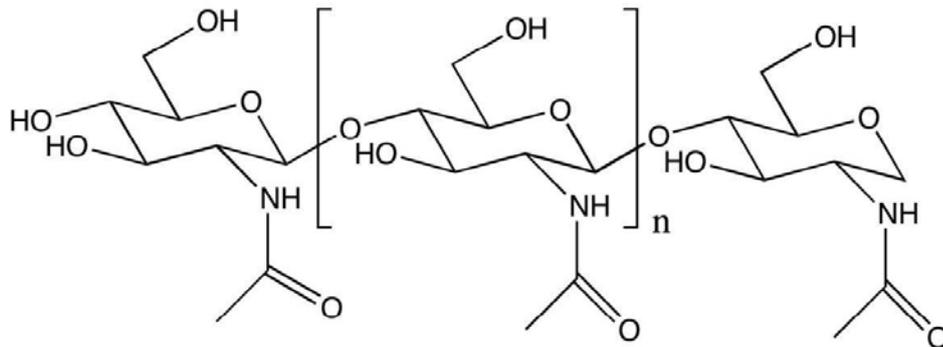


Figura 1.5 Struttura della chitina

La microstruttura del chitosano influenza le proprietà del polimero stesso e dipende dalle condizioni in cui è effettuata la reazione di deacetilazione: in condizioni eterogenee si ottiene un chitosano insolubile in acqua ma solubile a pH acido, al contrario la deacetilazione omogenea della chitina produce un chitosano solubile in acqua. Il chitosano è disponibile in una vasta gamma di pesi molecolari e gradi di acetilazione; inoltre può essere modificato chimicamente intervenendo sui gruppi $-\text{NH}_2$ e $-\text{OH}$ per generare derivati utili per lo sviluppo di nuove formulazioni.

Il chitosano è biocompatibile, biodegradabile, non tossico e mucoadesivo, caratteristiche che lo rendono interessante per applicazioni in campo medico e

farmaceutico. Viene degradato dal lisozima nel siero e dalla lipasi, un enzima presente nella saliva e nei fluidi gastrici e pancreatici; i prodotti della degradazione enzimatica non sono tossici. Il chitosano aumenta la permeabilità delle membrane cellulari, è un promotore di assorbimento perché prolunga il tempo di residenza dei sistemi di rilascio al sito di assorbimento, ed è in grado di aprire le giunzioni strette delle membrane cellulari. Inoltre mostra attività antimicrobica, antivirale, antitumorale e immunoadiuvante.

1.3.1 – Vantaggi del chitosano nella somministrazione oculare

Il tempo di residenza di un farmaco oftalmico per uso topico si riferisce alla durata del contatto con la superficie oculare (Alonso and Sánchez, 2003). Quando nella formulazione sono presenti polimeri mucoadesivi la clearance del farmaco è controllata dalla velocità di ricambio del muco, che è molto più lenta di quella del fluido lacrimale. Questa maggiore ritenzione della formulazione farmaceutica, per un farmaco con una buona permeabilità, si traduce in una maggiore biodisponibilità oculare.

Il chitosano rientra nella categoria dei polimeri mucoadesivi, tale proprietà è connessa all'attrazione tra i suoi gruppi amminici, caricati positivamente, e i residui di acido sialico del muco che portano una carica negativa. Oltre alla mucoadesività altre interessanti caratteristiche lo rendono il candidato ideale per la somministrazione oculare di farmaci.

Aumenta la permeabilità delle cellule epiteliali, sia per via paracellulare sia intracellulare, agendo in modo reversibile senza intaccare la loro vitalità o danneggiare la membrana.

È biodegradabile e ciò consente una sicura somministrazione e la successiva degradazione di formulazioni oculari applicate localmente. La sua biodegradazione è mediata dall'azione idrolitica del lisozima e di altri enzimi che producono chito-oligomeri e monomeri. È stato riportato che la velocità del processo in presenza di lisozima dipende dal grado di acetilazione del polimero, sebbene gli studi abbiano fornito dei risultati contraddittori.

Ha un'eccellente tollerabilità oculare, che è stata verificata tramite prove sui conigli dopo applicazione topica di soluzioni di chitosano, ricorrendo alla oftalmoscopia confocale a scansione laser combinata con la colorazione della cornea con fluoresceina (Felt et al., 1999).

Ha un favorevole comportamento reologico: le sue soluzioni esibiscono proprietà pseudoplastiche e viscoelastiche, essenziali in quanto il film lacrimale precorneale ha un carattere pseudoplastico che non deve essere alterato dall'instillazione di preparazioni liquide. In più questo comportamento è

particolarmente importante nelle formulazioni oftalmiche perché agevola la ritenzione mentre ne permette la diffusione grazie all'ammiccamento.

Sulla base di queste proprietà biologiche nonché per la sua adattabilità, sono stati progettati diversi sistemi di rilascio per uso oftalmico a base di chitosano.

1.4 – Sistemi di trasporto per farmaci oftalmici a base di chitosano

1.4.1 – Soluzioni

Le forme di dosaggio più accettate per la somministrazione di farmaci oftalmici sono quelle liquide: la formulazione liquida più semplice è costituita da una soluzione.

Queste soluzioni possono essere preparate a diverse concentrazioni e utilizzando tipi di chitosano differenti per peso molecolare e grado di deacetilazione, anche se in genere si preferisce quello altamente deacetilato perché più solubile in acqua. È possibile modulare la viscosità e le proprietà mucoadesive delle soluzioni variando il peso molecolare e la concentrazione; in alternativa si possono incorporare altri polimeri idrofili che interagiscono con il chitosano.

1.4.2 – Microsfere

Microsfere di chitosano sono state preparate principalmente usando due metodi: emulsione acqua/olio con evaporazione del solvente e spray drying. In entrambi i casi il chitosano viene solubilizzato in un mezzo acquoso, poi emulsionato in una fase oleosa in cui avviene l'evaporazione o semplicemente spruzzato ed essiccato per accelerare il processo di evaporazione.

Nel 2002 Di Colo e collaboratori hanno incorporato microsfere di chitosano all'interno di un inserto oculare di poli(etilen ossido) (PEO) con l'idea di migliorare il rilascio di farmaco dal sistema avvantaggiandosi dei benefici del chitosano. Microsfere di chitosano contenenti ofloxacin sono state preparate con la tecnica dello spray-drying e quindi aggiunte al gel di PEO. In seguito all'inserzione nel sacco congiuntivale inferiore dell'occhio del coniglio, questo inserto non ha prodotto benefici sostanziali, ma è stato osservato un picco di concentrazione di ofloxacin nell'umor acqueo che è

stato attribuito alla capacità del chitosano di aumentare la permeabilità del farmaco attraverso la cornea.

Lo scarso uso di microsfele di chitosano a livello oftalmico può trovare giustificazione in una scarsa accettabilità di grandi particelle, come dimostra il fatto che le dimensioni particellari sono critiche per la loro tolleranza oculare. Questo potrebbe aver contribuito all'orientamento della ricerca verso la progettazione di sistemi colloidali (dimensioni inferiori a 1 μm) che comprendono liposomi, emulsioni submicroniche e nanoparticelle.

1.4.3 – Liposomi e sistemi rivestiti

I trasportatori colloidali sono sistemi promettenti per migliorare la ritenzione oculare di farmaci applicati localmente.

I liposomi hanno una bassa clearance precorneale, influenzata dalle piccole dimensioni e dalla carica superficiale positiva. Alcuni svantaggi dei liposomi, come la loro ridotta capacità di carico e la bassa stabilità, hanno ostacolato ulteriori sviluppi in questa direzione.

Una seconda generazione di trasportatori colloidali è rappresentata da quelli rivestiti con polimeri mucoadesivi. L'obiettivo dei ricercatori è stato quello di combinare i vantaggi delle nanoparticelle, in qualità di carriers oculari, con le proprietà del chitosano (mucoadesività e capacità di aumentare la permeabilità) per accertare se un rivestimento polimerico potenzi o meno l'efficacia di questi trasportatori. La preparazione di questi sistemi ha avuto successo: interagiscono favorevolmente con l'epitelio corneale e consentono una maggiore penetrazione del farmaco nelle cellule. Sono molto versatili per quanto riguarda la loro capacità di trasportare e rilasciare farmaci; infatti variando la composizione del nucleo e la tecnica di preparazione, è possibile caricarli con composti idrosolubili o idrofobici. Inoltre hanno una buona tolleranza oculare.

1.4.4 – Nanoparticelle

Le nanoparticelle hanno dimensioni variabili da 10 a 1000 nm. È possibile fare una distinzione tra *nanosfere* e *nanocapsule*: le prime hanno una struttura monolitica con il farmaco disperso nella matrice polimerica o adsorbito sulla sua superficie; le altre presentano una membrana esterna e in questo caso il farmaco può essere intrappolato nel nucleo o adsorbito sulla superficie esterna.

Nanoparticelle di chitosano possono essere preparate con diverse tecniche e possono essere costituite interamente da chitosano o da una combinazione di questo con altri polimeri idrofili e macromolecole. L'introduzione di un secondo componente nella formulazione delle nanoparticelle aumenta la loro versatilità in termini di associazione e trasporto di farmaci e la loro attitudine a interagire con le superfici biologiche.

A causa delle condizioni particolarmente blande richieste per la formazione di nanoparticelle a base di chitosano, esse acquistano un notevole interesse per la somministrazione di macromolecole labili: l'anatossina tetanica e l'insulina sono esempi di macromolecole che sono state incapsulate con successo.

Per quanto riguarda la fase di rilascio dalle nanoparticelle, studi in vitro indicano che la velocità del processo è fortemente influenzata dal fatto che il principio attivo sia intrappolato in forma solida o esista come dispersione molecolare all'interno della matrice e, in quest'ultimo caso, dalla natura delle forze di interazione tra principio attivo e chitosano. Laddove il farmaco sia incapsulato in forma solida, la sua velocità di dissoluzione, piuttosto che le forze di legame con il polimero, è il fattore cineticamente determinante.

1.5 – Meccanismo d'azione e tossicità dei sistemi a base di chitosano

Vari studi condotti per chiarire il meccanismo d'azione dei sistemi a base di chitosano hanno rilevato che il carattere mucoadesivo di questo polimero prolunga la ritenzione delle sue soluzioni sulla superficie oculare.

Più recentemente è stato fatto un confronto, tra il comportamento in vivo di nanoparticelle e soluzioni a base di chitosano, dal quale emerge che l'affinità del polimero per la superficie oculare (cornea e congiuntiva) è più marcata quando esso si trova sottoforma di particelle. Questo è dovuto a un diverso meccanismo di interazione della forma solubile e di quella particellare con la mucosa dell'occhio; le nanoparticelle di chitosano penetrano nell'epitelio corneale per via paracellulare e transcellulare, mentre le sue soluzioni solo per via paracellulare.

L'aumentata permeabilità delle cellule attraverso la via paracellulare sembra dovuta a un'azione temporanea e reversibile del chitosano sulle giunzioni strette degli epitelii.

Una serie di studi ha provato la bassa tossicità e la buona biocompatibilità del chitosano per somministrazione intravenosa, orale e nasale. Similmente la

sua tossicità e tolleranza oculare sono state saggiate attraverso test in vivo sui conigli e l'uso di colture cellulari. Dato che esistono numerose evidenze della capacità dei sistemi a base di chitosano di penetrare negli epitelii è fondamentale valutare se essi siano in grado di provocare irritazioni in seguito ad applicazioni locali ripetute: è stata confermata una buona tolleranza alle nanoparticelle di chitosano da parte delle strutture superficiali dell'occhio dal momento che non sono state osservate variazioni cliniche o patologiche. Inoltre studi di tossicità su colture di cellule congiuntivali mostrano una vitalità cellulare di circa il 90% subito dopo l'esposizione a nanoparticelle di chitosano (92%) e dopo un periodo di 24 ore (86%).

1.6 – Metodi di preparazione di nanoparticelle di chitosano

Sono stati riportati vari metodi per la preparazione di nanoparticelle di chitosano, ma la scelta di una tecnica in particolare deve tenere conto di fattori come la natura del farmaco da incapsulare, il tipo di sistema di rilascio, la via di somministrazione e il sito bersaglio.

Alcuni di questi metodi sono: reticolazione ionotropica, coacervazione complessa, tecniche di emulsione e di microemulsione, auto-assemblaggio di chitosano modificato idrofobicamente.

1.6.1 – Reticolazione ionotropica

Questa tecnica si basa sulla formazione di interazioni elettrostatiche tra i gruppi amminici del chitosano e gruppi caricati negativamente di un polianione come il tripolifosfato. È un processo semplice con blande condizioni di preparazione, poiché viene condotto in un mezzo acquoso e non richiede l'impiego di solventi organici. Per prima cosa il chitosano viene solubilizzato in una soluzione acida in presenza o meno di un agente stabilizzante, poi si procede con l'aggiunta del polianione. Le nanoparticelle si formano sotto agitazione meccanica a temperatura ambiente. Le dimensioni e la carica superficiale delle particelle possono essere modificate variando le proporzioni del chitosano e dell'agente stabilizzante.

Le principali difficoltà che si incontrano con questa tecnica sono la bassa stabilità nel tempo della dispersione colloidale, che può richiedere l'aggiunta di

stabilizzanti, e la necessità di usare soluzioni molto diluite, il che può essere un problema quando si vogliono preparare grandi quantità di nanoparticelle.

1.6.2 – Coacervazione complessa

La coacervazione complessa si ottiene miscelando due polielettroliti di carica opposta. Si forma un complesso polielettrolitico che si separa in una fase ricca di polimero e una fase molto diluita e va a costituire un film insolubile o una barriera che riveste le particelle.

La coacervazione complessa è una tecnica molto blanda ed efficiente per allestire nanoparticelle, ma è necessario partire da soluzioni molto diluite e controllare il pH durante la preparazione, la purificazione e lo stoccaggio per evitare l'aggregazione. Il peso molecolare e il grado di acetilazione del chitosano, così come la stechiometria della miscela di reazione e l'ordine di aggiunta, possono influenzare la composizione, la carica e la stabilità delle nanoparticelle.

1.6.3 – Microemulsione

La microemulsione si ottiene disperdendo una soluzione acquosa di chitosano contenente il farmaco in una fase continua oleosa, costituita da un solvente organico e da un tensioattivo, sotto continua agitazione per evitare l'intorbidimento. Successivamente si aggiunge un agente reticolante e si fa evaporare il solvente organico. Dalla massa secca ottenuta deve essere eliminato il tensioattivo mediante lavaggio, prima con una soluzione acetone-acqua e poi con acqua distillata, o sciogliendo il pellet in acqua e aggiungendo un sale per far precipitare il tensioattivo; in quest'ultimo caso la soluzione viene dializzata e liofilizzata per ottenere una polvere secca.

Con questo metodo si generano nanoparticelle più piccole di 200 nm con una ridotta distribuzione dimensionale. I maggiori limiti di questo processo sono rappresentati dall'uso di solventi organici, dalla procedura di preparazione e dalla complessità della fase di lavaggio.

1.6.4 – Coalescenza di goccioline in emulsione

Questo metodo consiste nel preparare un'emulsione acqua/olio stabile di una soluzione di chitosano in olio di paraffina e una simile utilizzando una

soluzione di NaOH come fase acquosa. Miscelando le due emulsioni sotto vigorosa agitazione, le goccioline coalescono e si ha la precipitazione di piccole particelle di chitosano.

Le dimensioni particellari e l'incapsulamento del farmaco sono influenzati dal grado di acetilazione e dal peso molecolare del chitosano e dal tipo di farmaco.

1.6.5 – Estrazione del solvente in emulsione

Si prepara un'emulsione olio/acqua, aggiungendo sotto agitazione meccanica un solvente organico parzialmente miscibile in acqua ad una soluzione di chitosano contenente un agente stabilizzante, procedendo poi con un'omogeneizzazione ad alta pressione. L'emulsione viene poi diluita con grandi volumi d'acqua per estrarre il solvente organico. Le nanoparticelle si formano come risultato della diffusione del solvente organico nell'acqua. Questa procedura è adatta a farmaci idrofobici e con essa si raggiunge un'elevata percentuale di farmaco incapsulato.

Gli svantaggi più importanti di questo metodo includono l'uso di solventi organici e l'applicazione di elevate forze di taglio.

1.6.6 – Auto-assemblaggio di chitosano modificato idrofobicamente

È possibile ottenere nanoparticelle a base di chitosano anche per modificazione idrofobica di un suo derivato solubile. Con questa tecnica sono state preparate nanoparticelle utilizzando N-palmitoilchitosano: è stato osservato che un grado di sostituzione del 5% di gruppi palmitoilici sullo scheletro del chitosano era sufficiente per consentire la formazione di nanoparticelle, a causa di un significativo aumento delle interazioni idrofobiche intra- e intermolecolari.

2 – Parte sperimentale

Il trattamento topico di malattie extraoculari o intraoculari, specialmente con gocce oftalmiche, è il più accettato dai pazienti. Il trattamento con le gocce, tuttavia, pone il problema di una bassa biodisponibilità a causa del rapido allontanamento dei farmaci dall'area precorneale. Ciò implica il bisogno di frequenti instillazioni e quindi il rischio di effetti collaterali.

L'aumento della biodisponibilità oculare rimane una sfida stimolante per i formulatori di sistemi topici. Un approccio al problema è stato l'utilizzo di polimeri mucoadesivi. La ritenzione oculare di farmaci somministrati per mezzo di gocce oftalmiche è potenzialmente aumentata da trasportatori colloidali, come liposomi, nanoemulsioni, nanoparticelle e nanocapsule. Il farmaco viene incorporato in questi nanosistemi, che possono essere internalizzati nelle cellule corneali e in quelle congiuntivali.

La considerazione primaria, quando si mira a preparare nanoparticelle polimeriche mucoadesive è il materiale di base, che si suppone sia un polimero mucoadesivo, biocompatibile e biodegradabile. I derivati del chitosano con carica positiva sulla loro unità di ripetizione, sono i materiali indicati a questo scopo.

Lo scopo della presente tesi è quello di valutare il tempo di residenza medio (MRT) di met-enkefalina (MET) incapsulata in nanoparticelle in confronto a soluzioni contenenti gli stessi polimeri mucoadesivi impiegati per preparare le nanoparticelle. Infatti appare interessante valutare se sistemi innovativi quali nanoparticelle siano realmente più efficaci di sistemi tradizionali quali gocce oftalmiche.

I polimeri utilizzati sono derivati tiolati del chitosano a peso molecolare ridotto contenenti gruppi ammonici quaternari, con i quali vengono preparate nanoparticelle per reticolazione ionotropica con acido ialuronico depolimerizzato. E' noto che residui tiolici presenti sul polimero sono in grado di aumentare la sua mucoadesività e dunque il tempo di residenza del sistema terapeutico al sito di assorbimento. Sarà tentata anche la preparazione di nanoparticelle con i derivati del chitosano ammonici quaternari non contenenti residui tiolici per valutare l'influenza della mucoadesività sull'effetto terapeutico.

Per questo sarà necessario valutare la mucoadesività delle nanoparticelle tiolate e non e delle soluzioni contenenti gli stessi polimeri. Ciò verrà

effettuato mediante un metodo basato sullo studio della clearance precorneale in vivo sull'occhio del coniglio.

La presente si è articolata nelle seguenti fasi: 1) preparazione di coniugati chitosano-ammonio quaternario a partire da chitosano depolimerizzato; 2) introduzione di gruppi tiolici sui suddetti coniugati per formazione di gruppi ammidici con acido tioglicolico; 3) preparazione di nanoparticelle stabili di adeguate dimensioni per gelificazione ionotropica con acido ialuronico depolimerizzato, che è un polisaccaride polianionico mucoadesivo contenente unità di acido glucuronico; 4) caratterizzazione delle nanoparticelle per le loro dimensioni e la stabilità nel tempo di tali dimensioni; 5) studio del rilascio di MET dalle nanoparticelle; 6) determinazione del tempo di residenza di MET nell'area precorneale.

2.1 – Materiali e metodi

2.1.1 – Materiali

Sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- Acido tioglicolico (TGA) (Sigma)
- 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodimmide cloridrato (EDAC) (Sigma)
- 2-dietilamminoetil cloruro (DEAE-Cl) cloridrato (Fluka)
- Acido ialuronico (HA) PM 950 kDa (Contipro, Dolní Dobrouč, Czech Republic)
- Chitosano deacetilato almeno al 90% ottenuto da guscio di gamberetto (Ch) (Chitoclear FG90, Primex, Drammen, Norway)
- Met-enkefalina acetato (MET) (Sigma)
- Metanolo per HPLC, $\geq 99.9\%$ (Sigma-Aldrich)
- Acido trifluoroacetico (Sigma-Aldrich)
- Fluoresceina isotiocianato (FITC) (Sigma-Aldrich)
- Membrane di cellulosa cut-off 12.5 kDa (Sigma)

Il chitosano commerciale aveva un PM medio viscosimetrico di 590 kDa e un grado di deacetilazione, determinato attraverso IR o NMR, del 90% o dell'82% (Zambito et al., 2006). Prima dell'uso la membrana di cellulosa fu

immersa in acqua almeno per 24 ore. Tutte le soluzioni/dispersioni acquose furono preparate con acqua distillata di fresco.

2.1.2 – Depolimerizzazione di Ch e HA

La depolimerizzazione ossidativa del Ch commerciale con NaNO_2 è stata descritta in numerose pubblicazioni (vedi e.g. Janes and Alonso, 2003; Liu et al., 1997; Mao et al., 2004).

2 g di Ch furono sospesi in 200 mL di acqua, quindi furono aggiunti 7.3 mL di HCl 1 M e la miscela fu tenuta in agitazione per una notte a temperatura ambiente in modo da avere la completa solubilizzazione del polimero. Successivamente furono aggiunti goccia a goccia 5 mL di NaNO_2 0.1 M e l'agitazione fu proseguita a temperatura ambiente per altre 12 ore. La miscela fu quindi trasferita in un tubo da dialisi e dializzata contro acqua per 3 giorni, quindi fu portata a pH 8 con NaOH 1 M in modo da avere la precipitazione del Ch a PM ridotto (rCh). Questo fu raccolto per centrifugazione, lavato diverse volte con acqua ed infine liofilizzato.

HA (Figura 2.1) a basso peso molecolare (rHA) fu ottenuto per degradazione acida di HA commerciale secondo la procedura descritta da Shu et al. (2002). 1 g di HA fu solubilizzato in 100 mL di acqua, la soluzione fu portata a pH 0.5 con acido cloridrico concentrato e mantenuta per 24 ore a 37°C . Per aggiunta di NaOH 1 M fu poi portata a pH 7 e quindi dializzata contro acqua per 3 giorni. Infine la soluzione fu chiarificata per filtrazione e liofilizzata.

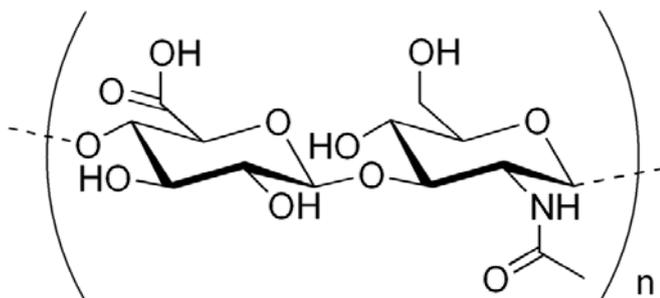


Figura 2.1 Struttura di HA

2.1.3 – Determinazione viscosimetrica del peso molecolare di rCh e rHA

La determinazione del PM medio di rCh e rHA fu effettuata utilizzando un viscosimetro a capillare di Ostwald (Cannon-Fenske serie ASTM 75) secondo la procedura descritta da Khalid et al. (1999).

La viscosità ridotta (η_{red}) di soluzioni di rCh in acido acetico 0.1 M/NaCl 0.2 M a concentrazioni comprese nell'intervallo 0.2-1.6 mg/mL fu determinata applicando l'equazione:

$$\eta_{red} = \frac{(t - t_0)}{t_0 C} \quad (2.1)$$

dove t e t_0 rappresentano rispettivamente il tempo di flusso della soluzione e del solvente, C è la concentrazione della soluzione espressa in g/mL. Il grafico sperimentale η_{red} vs C era una retta la cui intercetta sull'asse delle ordinate a $C = 0$ fornì la viscosità intrinseca (η); utilizzando questo dato, il peso molecolare viscosimetrico (M_v) di rCh espresso in Dalton fu calcolato con l'equazione di Mark-Houwink:

$$\eta = K M_v^\alpha \quad (2.2)$$

I coefficienti K e α per Ch in acido acetico 0.1 M/NaCl 0.2 M, determinati da Robert and Domszy (1982), hanno i seguenti valori:

$$K = 1.81 \times 10^{-3} \text{ mL/g}$$

$$\alpha = 0.93$$

Sostituendo questi valori e il valore estrapolato di $\eta = 101.9 \text{ mL/g}$ ($r^2 = 0.9926$; $n = 5$) nell'equazione 2.2, si ricavò un valore di $M_v = 128 \text{ kDa}$.

In modo analogo a quanto visto per rCh, la viscosità ridotta di soluzioni di rHA in NaCl 0.1 M a concentrazioni comprese nell'intervallo 0.1-0.8 mg/mL fu determinata mediante l'equazione 2.1. I coefficienti K e α per HA in NaCl 0.1 M hanno i seguenti valori:

$$K = 0.0336 \text{ mL/g}$$

$$\alpha = 0.79$$

Sostituendo questi valori e il valore estrapolato di $\eta = 269.3 \text{ mL/g}$ ($r^2 = 0.9523$; $n = 5$) nell'equazione 2.2 si ricavò un valore di $M_v = 87 \text{ kDa}$.

2.1.4 – Sintesi del coniugato N⁺-rCh

0.5 g di rCh liofilizzato furono disciolti in 20 mL di HCl 0.11 M (pH 4.7). 2 g di DEAE-Cl HCl e 3 mL di NaOH al 15% furono aggiunti in sequenza alla soluzione di chitosano sotto vigorosa agitazione alla temperatura di 60°C. In seguito all'aggiunta della soluzione di NaOH si formò una mucillagine per precipitazione del chitosano solido. L'agitazione e il riscaldamento furono mantenuti per un tempo di 2 ore, durante le quali il pH fu mantenuto sotto stretto controllo al valore di 8, mantenendo l'elettrodo di un pH-metro immerso nella miscela di reazione ed aggiungendo NaOH acquoso concentrato quando necessario. Dopo completa dissoluzione della mucillagine, la miscela fu portata a pH 7 con HCl 1 M. Quindi fu chiarificata per filtrazione, dializzata contro acqua per 3 giorni ed infine liofilizzata. Il derivato così sintetizzato viene indicato con la sigla N⁺-rCh.

2.1.5 – Attacco covalente di gruppi tiolici sul derivato N⁺-rCh

La tiolazione del derivato N⁺-rCh fu ottenuta per attacco di TGA ai gruppi amminici primari non sostituiti ancora presenti sulle catene di N⁺-rCh attraverso la formazione di gruppi ammidici mediata da EDAC (Kast and Bernkop-Schnürch, 2001).

EDAC fu aggiunto a 25 mL di una soluzione acquosa limpida di (2% peso/peso) N⁺-rCh fino ad una concentrazione di 50 mM. Dopo la completa dissoluzione di EDAC fu aggiunto un eccesso di TGA (0.8 g) ed il pH fu aggiustato a 5 con NaOH 1 M. La miscela di reazione fu incubata per 3 ore a temperatura ambiente sotto agitazione e quindi sottoposta a dialisi per 3 giorni. La fase esterna della dialisi fu cambiata quotidianamente: il primo giorno era HCl 5 mM; il secondo giorno HCl 5 mM contenente l'1% di NaCl; il terzo giorno HCl 1 mM. Dopo dialisi, la soluzione del polimero fu liofilizzata per ottenere N⁺-rCh-SH purificato. Il derivato tiolato liofilizzato fu conservato a -20°C al buio.

2.1.6 – Determinazione del contenuto di gruppi tiolici

Per determinare i gruppi tiolici, 30 mg del derivato N⁺-rCh-SH furono disciolti in 20 mL di acqua, a questa soluzione fu aggiunto 1 mL di soluzione di amido all'1% e il pH fu portato a 3 con HCl 1 M. La soluzione fu titolata

con una soluzione acquosa di iodio 1 mM fino ad una permanente colorazione azzurra (Kast and Bernkop-Schnürch, 2001).

Il contenuto di tioli fu espresso come grado di sostituzione (%) per unità di ripetizione del polimero o come μmol per g di polimero.

2.1.7 – Marcatura dei polimeri con FITC

Fu seguito un procedimento descritto in precedenza da Di Colo et al. (2009). Una soluzione di FITC in dimetilsolfossido (1 mL, 2 mg/mL) fu aggiunta ad una soluzione acquosa di ciascun polimero $\text{N}^+\text{-rCh}$ o $\text{N}^+\text{-rCh-SH}$ (20 mL, 2 mg/mL) e la miscela fu incubata a 4°C per 8 ore. Successivamente la soluzione venne fatta passare attraverso una colonna di Sephadex G15 per liberare il polimero marcato da FITC non reagita e quindi liofilizzata. In nessun caso la colonna di Sephadex G15 trattenne fluorescenza e ciò indicò in tutti i casi l'assenza di FITC non reagita e quindi la completa marcatura del polimero. Quindi il fluoroforo legato al polimero fu calcolato e risultò essere il 5% della massa totale (0.13 mmol/g).

2.1.8 – Preparazione di nanoparticelle medicate con MET

Per preparare nanoparticelle (NP) medicate con MET a base di $\text{N}^+\text{-rCh}$ e $\text{N}^+\text{-rCh-SH}$ o con questi polimeri marcati con FITC, un volume di 450 μL di tampone fosfato (TF) pH 7.4 isotonic 0.13 M, contenente rHA 0.025 mg/mL e MET 5 mg/mL, fu aggiunto, a porzioni da 100 μL , a 5 mL 2 mg/mL di ciascun derivato in TF a differenti valori di forza ionica (0.13 M isotonic e 0.013 M). Le nanoparticelle così formate furono caratterizzate dimensionalmente mediante light scattering (Nano Z690 Malvern).

Per ottenere formulazioni stabili e manipolabili, le dispersioni nanoparticellari furono liofilizzate (Virtis, Advantage-53, Stereoglass, Perugia, Italia. Congelamento: -35°C , 180 min; essiccamento: 1) -30°C , 360 min; 2) -10°C , 360 min; 3) 10°C , 240 min; 4) 25°C , 180 min).

Le dispersioni nanoparticellari furono rigenerate dai rispettivi liofilizzati mediante aggiunta di un volume opportuno di acqua tale da originare una sospensione isoosmotica a quella di partenza. La rigenerazione dei liofilizzati fu condotta subito dopo la liofilizzazione o dopo 1 mese di conservazione in essiccatore a temperatura ambiente, in frigo e in freezer a -20°C . Le dispersioni rigenerate furono controllate per opportune dimensioni nanoparticellari.

Per valutare l'efficienza di incapsulamento (*EI*) di MET nelle nanoparticelle, immediatamente dopo la preparazione furono sottoposte a ultracentrifugazione per 1 ora a 4°C e 28800 rpm. Il surnatante fu analizzato mediante HPLC come descritto nel paragrafo 2.1.9.

L'efficienza di incapsulamento fu determinata mediante la seguente formula:

$$EI = \left[\frac{(M_t - M_s)}{M_t} \right] \cdot 100 \quad (2.3)$$

dove M_t rappresenta la massa totale di MET usata nella preparazione, M_s la massa di MET trovata nel surnatante.

Al fine di eliminare il farmaco non intrappolato, le nanoparticelle, preparate come descritto precedentemente, furono sottoposte a dialisi dinamica (paragrafo 2.1.10). Il tempo necessario affinché il farmaco non intrappolato passasse in fase ricevente, risultò essere 5 ore. Le nanoparticelle così purificate, furono liofilizzate.

2.1.9 – Determinazione HPLC di MET

L'apparato (Perkin-Elmer) era costituito da una pompa Series 200, un iniettore 20 μ L Rheodyne, un detector spettrofotometrico UV/vis LC 290 e un software Turbochrom Navigator HPLC per l'integrazione dei dati. Fu utilizzata una colonna Aquapore OD-300 7 μ m 4.6 x 250 mm. La fase mobile (velocità di flusso 1.2 ml/min) era costituita da acqua-metanolo-acido trifluoroacetico (75:25:0.1). Il detector UV fu impostato ad una lunghezza d'onda di 214 nm.

2.1.10 – Dialisi dinamica

Per misurare la cinetica di rilascio fu usato il metodo della dialisi dinamica. Una membrana porosa di cellulosa (cut-off 12.5 kDa) fu montata nella cella dell'apparato da dialisi e fu usata per separare la fase donatrice, contenente le nanoparticelle medicate, dalla fase ricevente, mantenendo le condizioni di sink.

Al tempo $t = 0$, 5 mL di nanoparticelle medicate con MET, ottenute come descritto nel paragrafo 2.1.8, furono poste nel compartimento donatore della cella e fu iniziata l'agitazione della fase ricevente e donatrice, mantenendo il

termostato ad una temperatura di 37°C. La massa di farmaco introdotta tramite le nanoparticelle era di 1 mg ed il volume di fase donatrice (TF 0.013 M) era di 100 mL.

Il trasporto del farmaco attraverso la membrana fu valutato mediante analisi HPLC della fase ricevente al tempo t . Al termine di ogni corsa, la fase donatrice fu analizzata al fine di valutare le dimensioni nanoparticellari medie. Per confronto, dati cinetici furono ottenuti usando la stessa membrana e la stessa metodica per le soluzioni dei polimeri N^+ -rCh e N^+ -rCh-SH contenenti quantità di MET uguale a quella presente nelle nanoparticelle.

In alcuni esperimenti, la dialisi fu interrotta dopo prestabiliti intervalli di tempo (1, 3, 5 ore) e a ciascuno di tali tempi fu determinata la frazione di farmaco passata nella fase ricevente (FFR), quella presente nella fase donatrice ma esterna alle NP (FFD) e quella ancora associata alle NP (FNP). Questa procedura fu ripetuta diverse volte al fine di costruire il grafico della frazione di farmaco in ogni fase in funzione del tempo (t). L'ultracentrifugazione della fase donatrice, seguita da analisi HPLC del surnatante, permise di determinare la FFD e calcolare la FNP.

2.1.11 – Determinazione della cinetica di eliminazione dei polimeri N^+ -rCh e N^+ -rCh-SH dal fluido lacrimale dei conigli

Furono utilizzati conigli albini maschi, New Zealand, di peso compreso tra 4.5 e 5.0 kg. Questi furono trattati come descritto nella pubblicazione 'Guide for the care and use of laboratory animals' (NIH Publication No 92-93, revised 1985). Tutti gli esperimenti furono condotti sotto supervisione veterinaria e il protocollo fu approvato dalla commissione Etico-Scientifica dell'Università di Pisa.

Per determinare la capacità dei derivati N^+ -rCh e N^+ -rCh-SH e delle relative nanoparticelle di aderire alla superficie oculare, furono instillate nel sacco congiuntivale inferiore dell'occhio del coniglio 4 diverse preparazioni:

1. Soluzione contenente il polimero N^+ -rCh (concentrazione 2 mg/mL) marcato con FITC;
2. Soluzione contenente il polimero N^+ -rCh-SH (concentrazione 2 mg/mL) marcato con FITC;
3. Nanoparticelle preparate da N^+ -rCh marcato con FITC;
4. Nanoparticelle preparate da N^+ -rCh-SH marcato con FITC.

A prestabiliti intervalli di tempo, furono prelevati dalla rima palpebrale inferiore dell'occhio del coniglio campioni di fluido lacrimale, usando capillari di vetro da 1 μL (Microcaps, Drummond Scientific Co., USA).

I campioni di fluido lacrimale, dopo opportuna diluizione, furono analizzati fluorimetricamente con riferimento alla relativa curva di calibrazione.

2.1.12 – Determinazione della cinetica di eliminazione della MET dal fluido lacrimale dei conigli

La cinetica di scomparsa di MET dal fluido lacrimale fu determinata secondo il procedimento descritto nel paragrafo 2.1.11. Furono instillate nel sacco congiuntivale inferiore dell'occhio del coniglio 5 differenti preparazioni:

1. Controllo: MET (0.34 mg/mL) in TF ipotonico;
2. Soluzione contenente il polimero N⁺-rCh (concentrazione 2 mg/mL) e MET alla stessa concentrazione del controllo;
3. Soluzione contenente il polimero N⁺-rCh-SH (concentrazione 2 mg/mL) e MET alla stessa concentrazione del controllo;
4. Nanoparticelle preparate da N⁺-rCh (NP1) e MET alla stessa concentrazione del controllo;
5. Nanoparticelle preparate da N⁺-rCh-SH (NP2) e MET alla stessa concentrazione del controllo.

Il fluido lacrimale, dopo opportuna diluizione, fu analizzato mediante HPLC per il farmaco.

2.1.13 – Trattamento dei dati di eliminazione

I dati relativi alla concentrazione nel fluido lacrimale (C_{FL}) vs tempo (t) ottenuti con le preparazioni descritte nei paragrafi 2.1.11 e 2.1.12, furono utilizzati per calcolare il tempo di residenza medio (MRT) di MET e dei derivati polimerici (in soluzione o in forma nanoparticellare) nel fluido lacrimale. Questo parametro risulta dal rapporto tra l'AUMC (Area Under Momentum Curve), che è l'area sotto la curva $C_{\text{FL}} t$ vs t , e l'AUC (Area Under Curve), che è l'area sotto la curva C_{FL} vs t . AUMC e AUC furono calcolate con il metodo dei trapezi, tra il tempo 0 e il tempo a cui C_{FL} scendeva al di sotto del minimo valore quantificabile. Per ogni curva di eliminazione determinata in ogni singolo occhio fu calcolato il rispettivo valore di MRT.

Furono così ottenuti dagli animali diversi valori, dei quali furono calcolati media e DS.

2.2 – Risultati e discussioni

2.2.1 – Sintesi del coniugato N⁺-rCh

La reazione di Ch commerciale ($M_v = 590$ kDa) con DEAE-Cl è stata studiata in passato da Zambito et al. (2006, 2008). L'analisi NMR basata su mappe bidimensionali mostrò che i risultanti derivati avevano la struttura di coniugati N⁺-rCh, precisamente, N,O-[N,N-dietilamminometil(dietildimetilene ammonio)_n] metil chitosani, contenenti piccole catene pendenti costituite da un piccolo numero di gruppi ammoniaci quaternari adiacenti, parzialmente sostituiti sulle unità di ripetizione di Ch (Zambito et al., 2006). Il grado di sostituzione (GS) e il numero medio di gruppi ammoniaci quaternari in ogni piccola catena (n) dipendeva fortemente dal pH della miscela di reazione, che doveva essere strettamente controllato al valore di 7 o 8 affinché la reazione di sintesi fosse riproducibile (Zambito et al., 2008).

Nella presente tesi la reazione fu effettuata a partire da rCh ($M_v = 128$ kDa) nella prospettiva di ottenere coniugati di più basso PM, con i quali preparare nanoparticelle di appropriate dimensioni. Il coniugato ottenuto a una temperatura di 60°C (N⁺-rCh) portava la media di una carica positiva per unità di ripetizione, che è forse la massima possibile per questo tipo di polimeri.

2.2.2 – Attacco covalente di gruppi tiolici sul derivato N⁺-rCh

Sul derivato N⁺-rCh erano ancora presenti significative frazioni di unità di glucosammina non sostituite, precisamente, circa il 35%. Queste unità erano potenzialmente disponibili per l'attacco covalente di gruppi tiolici tramite la formazione di legami ammidici tra il gruppo amminico primario della glucosammina e il gruppo carbossilico del TGA.

Durante la purificazione nella fase ricevente della dialisi fu introdotto NaCl, usato per purificare i polimeri tiolati, allo scopo di facilitare l'allontanamento del TGA anionico non reagito e la sua sostituzione con cloruro come controanione di N⁺-rCh-SH. Nel corso della dialisi fu mantenuto un pH acido perché l'ossidazione del tiolo a disolfuro è favorita da ambienti neutri/alcalini.

Ciò nonostante, la maggior parte dei tioli subì ossidazione. Malgrado questo, il polimero rimase facilmente solubile in acqua. Il contenuto in tiolo del polimero tiolato rimase virtualmente immutato dopo un anno dalla conservazione allo stato di liofilizzato a -20°C al buio.

2.2.3 – Caratterizzazione delle nanoparticelle medicate con MET

Le dimensioni medie delle nanoparticelle, preparate con ciascun derivato $\text{N}^+\text{-rCh}$ o $\text{N}^+\text{-rCh-SH}$ in tampone fosfato pH 7.4 isotonic 0.13 M o ipotonico 0.013 M, determinate immediatamente dopo la loro preparazione erano sempre comprese nell'intervallo 250-370 nm, come riportato nella Tabella 3.1. In questa tabella sono riportati anche i valori di efficienza di incapsulamento (*EI*).

Dopo 24 ore dalla preparazione delle nanoparticelle, le loro dimensioni rimasero immutate, mentre dopo ridispersione dei loro liofilizzati immediatamente dopo la liofilizzazione, le dimensioni medie mostrarono un lieve aumento nel caso delle nanoparticelle preparate con tampone TF isotonic, mentre se preparate con TF ipotonico le dimensioni rimasero immutate, come si osserva nella Tabella 3.2. L'indice di polidispersione dà informazioni sulla omogeneità della dimensione media delle nanoparticelle, un indice di polidispersione vicino ad 1 indica una elevata disomogeneità delle dimensioni. I dati in Tabella 3.1 mostrano un indice di polidispersione in tutti i casi piuttosto elevato, maggiore nel caso delle nanoparticelle preparate in TF isotonic. Nella Tabella 3.2 notiamo che dopo ridispersione del liofilizzato, le dimensioni appaiono più omogenee così come indicato dall'indice di polidispersione, in tutti i casi significativamente più basso di quello riportato in Tabella 3.1.

2.2.4 – Dialisi dinamica

Nella fase ricevente furono mantenute le condizioni di sink in modo da rendere trascurabile la diffusione in senso inverso, dal compartimento accettore a quello donatore (Zambito et al., 2012). Quando il permeante è completamente disciolto nella fase donatrice e il mezzo è lo stesso in entrambi i compartimenti, le condizioni di sink si realizzano nel caso in cui la concentrazione nella fase ricevente non superi il 10% di quella nella fase donatrice. Quando il farmaco subiva qualche fenomeno di binding nella fase donatrice (ad es., si legava con il $\text{N}^+\text{-rCh}$ o $\text{N}^+\text{-rCh-SH}$ o con le nanoparticelle),

il quale abbassava il suo coefficiente di attività termodinamica, il rispetto delle condizioni di sink veniva valutato a posteriori per ogni caso, ad ogni tempo. Tutti i dati riportati furono ottenuti in condizioni di sink.

Caso del polimero N⁺-rCh: la Figura 1 mostra come il trasporto transmembrana del farmaco per la soluzione N⁺-rCh non era differente da quello della semplice soluzione contenente il farmaco e questo indica l'assenza di un'interazione significativa tra MET e N⁺-rCh in soluzione. D'altra parte, le nanoparticelle (NP1) non diminuirono in maniera notevole tale trasporto e pertanto neanche in questo caso si osservava una forte interazione della MET con la matrice nanoparticellare.

Caso del polimero N⁺-rCh-SH: la Figura 2 mostra che il trasporto del farmaco nel caso in cui la fase donatrice conteneva la dispersione nanoparticellare era più basso rispetto al caso in cui tale fase conteneva la semplice soluzione del farmaco o la soluzione N⁺-rCh-SH. Questi risultati indicano una significativa interazione della MET con le nanoparticelle. Si possono dare due interpretazioni alternative dell'interazione tra MET e nanoparticelle. La prima ipotizza un rilascio rapido del farmaco dalle nanoparticelle al loro mezzo di dispersione, e lo stabilirsi di un equilibrio quasi-stazionario nella fase donatrice tra farmaco libero e farmaco legato alle nanoparticelle. In questo caso la membrana di dialisi sarebbe la barriera limitante del trasporto di massa nella fase ricevente. L'altra ipotesi considera che il farmaco, intrappolato nella matrice nanoparticellare, è rilasciato da questa in modo sostenuto. Ciò implicherebbe condizioni di sink sia nella fase donatrice a contatto con le nanoparticelle che nella fase ricevente oltre la membrana. La membrana opporrebbe una resistenza trascurabile al trasporto di massa in confronto a quella opposta dalla matrice nanoparticellare. Sono necessari ulteriori dati per poter dare credito ad una piuttosto che all'altra delle due suddette ipotesi.

2.2.4.1 – Analisi cinetica delle fasi

Per determinare il fattore limitante il processo di rilascio dalle nanoparticelle, la dialisi fu interrotta dopo prestabiliti intervalli di tempo e a ciascuno di tali tempi fu determinata la frazione di farmaco passata nella fase ricevente (FFR), quella presente nella fase donatrice ma esterna alle NP (FFD) e quella ancora associata alle NP (FNP).

Caso del polimero N⁺-rCh: i dati riportati nella Figura 3 indicano che in 1 ora la maggior parte della frazione del farmaco (circa il 75%) venne rilasciata nella fase donatrice esterna alle nanoparticelle, mentre solo il 10% attraversò la

membrana nella fase ricevente. Conducendo la dialisi per 24 h, circa il 25% del farmaco passò dal mezzo donatore a quello accettore e circa il 18% di farmaco rimase costantemente intrappolato nelle nanoparticelle. Dunque, il rilascio dalle nanoparticelle non risultò significativo e il trasporto del farmaco dalla fase donatrice a quella ricevente fu controllato dalla permeazione attraverso la membrana da dialisi.

Caso del polimero N⁺-rCh-SH: i dati riportati nella Figura 4 indicano che circa il 45% del farmaco totale venne rilasciato dalla matrice nanoparticellare in 5 ore, mentre circa il 18% rimase intrappolato nella matrice. Come nel caso del polimero N⁺-rCh, la frazione di MET incapsulata nelle nanoparticelle non diminuì in maniera significativa e la cinetica di rilascio del farmaco nella fase ricevente fu controllata dalla permeazione attraverso la membrana da dialisi e non dal rilascio dalle nanoparticelle.

2.2.4.2 – Studio dell'interazione del farmaco con la superficie nanoparticellare

La permeazione molecolare attraverso una membrana da una fase donatrice a una ricevente, entrambe mantenute in agitazione, in condizioni di sink e stato quasi-stazionario, come nel presente caso, è un processo di primo ordine e la velocità del processo è espressa dalla seguente equazione (e.g., Flynn et al., 1974; Bottari et al., 1975):

$$\frac{dC_d}{dt} = -K_m C_d \quad (2.4)$$

dove C_d è la concentrazione del farmaco nella fase donatrice al tempo t e K_m è la costante della velocità di dialisi.

Integrando l'equazione 2.4, si ottiene la seguente equazione:

$$\ln \left[\frac{C_d}{C_{d0}} \cdot 100 \right] = 4.605 - K_m t \quad (2.5)$$

dove C_{d0} è la concentrazione del farmaco nella fase donatrice al tempo $t = 0$.

Se le molecole di farmaco nella fase donatrice hanno interazioni di equilibrio, l'equazione 2.4 è così modificata (Bottari et al., 1975):

$$\frac{dC_d}{dt} = -K_m C_{df} \quad (2.6)$$

dove C_{df} rappresenta la concentrazione del farmaco libero dal legame al tempo t .

Dividendo entrambi i membri dell'equazione 2.6 per C_d ed assumendo che il rapporto farmaco libero/farmaco totale nella fase donatrice ($F_f = C_{df}/C_d$) sia costante con il variare di C_d , si ottiene l'equazione:

$$\ln \left[\frac{C_d}{C_{d0}} \cdot 100 \right] = 4.605 - K_m F_f t \quad (2.7)$$

I dati di dialisi per la semplice soluzione contenente il farmaco, per il farmaco in presenza dei polimeri $N^+ \text{-rCh}$ o $N^+ \text{-rCh-SH}$ e per le nanoparticelle medicate sono riportati come $\ln (C_d/C_{d0}) \cdot 100$ vs t nelle Figure 5 e 6 per il polimero $N^+ \text{-rCh}$ e $N^+ \text{-rCh-SH}$, rispettivamente.

Nel caso delle nanoparticelle, dalle Figure 3 e 4, si vede che una frazione tempo-dipendente della MET totale, venne intrappolata all'interno della matrice polimerica. In entrambi i casi la quantità intrappolata fu sottratta dalla massa totale del farmaco nella fase donatrice, al fine di calcolare il valore effettivo di C_d .

Tutte le rette riportate nelle Figure 5 e 6 sono significativamente lineari, come dimostrato dai valori di r^2 riportati in Tabella 3.3.

I dati riportati nella Figura 5 e nella Tabella 3.3, se confrontati con quelli della Figura 3, dimostrano che non ci fu significativa interazione del farmaco con le nanoparticelle (caso del polimero $N^+ \text{-rCh}$).

La velocità di dialisi della MET nel caso polimero $N^+ \text{-rCh-SH}$ fu più bassa soprattutto in presenza della dispersione particellare (vedi Figura 6 e Tabella 3.3) e questo è, presumibilmente, dovuto alla reversibile interazione della MET con la superficie della dispersione nanoparticellare.

2.2.5 – Determinazione della cinetica di eliminazione dei polimeri $N^+ \text{-rCh}$ e $N^+ \text{-rCh-SH}$ e delle relative NP dal fluido lacrimale dei conigli

Le preparazioni instillate nel sacco congiuntivale inferiore dell'occhio del coniglio, preparate come descritto nel paragrafo 2.1.11, furono confrontate per studiare la capacità dei derivati $N^+ \text{-rCh}$ e $N^+ \text{-rCh-SH}$ e delle relative nanoparticelle, marcati con FITC, di aderire alla superficie oculare. Ciascuna curva di eliminazione dei derivati $N^+ \text{-rCh}$ e $N^+ \text{-rCh-SH}$ e delle relative nanoparticelle dal fluido lacrimale, fu determinata in un singolo occhio di animali differenti. Per ciascuna curva fu calcolato un valore di MRT come rapporto AUMC/AUC (Area Under Momentum Curve/Area Under Curve),

ed il tempo di residenza massimo nel fluido lacrimale a concentrazioni misurabili (RT_{max}).

I dati riportati in Tabella 3.4 indicano che i valori di MRT di entrambi i polimeri, sia in soluzione, sia in forma di dispersione nanoparticellare, non sono significativamente diversi tra loro, indicando che non c'è alcuna differenza di mucoadesività tra le soluzioni dei polimeri e le relative nanoparticelle.

2.2.6 – Determinazione della cinetica di eliminazione di MET dal fluido lacrimale dei conigli

Le preparazioni instillate nel sacco congiuntivale inferiore dell'occhio del coniglio, preparate come descritto nel paragrafo 2.1.12, furono confrontate per il tempo di residenza medio della MET nel fluido lacrimale dei conigli. Ciascuna curva di eliminazione di MET dal fluido lacrimale, fu determinata in un singolo occhio di animali differenti.

I dati riportati in Tabella 3.5 mostrano che entrambi i polimeri in soluzione non facevano aumentare l'MRT rispetto al controllo. Invece, la presenza di dispersioni nanoparticellari (NP1 o NP2) faceva aumentare in maniera significativa l'MRT che passava da 3.3 ± 0.9 min, nel caso del controllo, a 11.0 ± 1.9 min, nel caso delle NP1, o a 12.5 ± 1.3 min, nel caso delle NP2. I dati di RT_{max} sono in accordo con i dati di MRT. Infatti, come si vede dai grafici C_{FL} vs t riportati nelle Figure 7 e 8 in presenza di NP1 e NP2, ciascuna a base di N^+-rCh e $N^+-rCh-SH$ rispettivamente, il tempo di residenza di MET nell'area precorneale è più lungo rispetto a quello che si ottiene in presenza dei polimeri mucoadesivi N^+-rCh o $N^+-rCh-SH$ in soluzione. Dal momento che la mucoadesività delle soluzioni dei polimeri non è risultata differente da quella delle relative nanoparticelle (vedi Tabella 3.4), la differenza negli MRT di MET non può essere spiegata imputandola alla mucoadesività. Tale differenza del resto non può essere attribuita neanche al binding del farmaco con i polimeri o relative nanoparticelle, perché in tal caso avremmo dovuto osservare un MRT maggiore nel caso del sistema risultato più mucoadesivo, cioè quello a base di NP2. Dunque l'incremento del MRT di MET riscontrato con i due tipi di nanoparticelle è da imputare alla loro capacità di proteggere il peptide dalla degradazione ad opera degli enzimi presenti nel fluido lacrimale.

3 – Conclusioni

I derivati ottenuti facendo reagire il chitosano depolimerizzato con DEAE-Cl avevano la stessa struttura di N,O-[N,N-dietilamminometil(dietildimetilene ammonio)_n] metil chitosano di quelli ottenuti a partire dal chitosano commerciale. La temperatura di reazione esercita un'influenza significativa sulle proprietà strutturali di tali derivati, come il grado di sostituzione delle strutture cariche positivamente sulle unità di ripetizione del chitosano ed il numero di gruppi ammonici quaternari adiacenti in ciascuna struttura. Il tentativo di immobilizzare gruppi tiolici sulle unità di ripetizione dei coniugati chitosano-ammonio ha avuto successo. Nanoparticelle di adeguate dimensioni furono ottenute mediante gelificazione ionotropica dei polimeri N⁺-rCh e N⁺-rCh-SH con acido ialuronico depolimerizzato. Le nanoparticelle erano abbastanza stabili per quanto riguarda le dimensioni, immediatamente dopo la loro preparazione e dopo ridispersione dei rispettivi liofilizzati. Gli studi di rilascio dimostrarono che è possibile allontanare il farmaco non intrappolato sottoponendo le nanoparticelle a dialisi per 5 ore. Infatti, per la durata dell'esperimento la met-enkefalina intrappolata non venne rilasciata. Le nanoparticelle così purificate, instillate nel sacco congiuntivale inferiore dell'occhio del coniglio, fecero aumentare il tempo di residenza medio della met-enkefalina nel fluido lacrimale dell'occhio del coniglio in misura maggiore rispetto alle soluzioni contenenti i polimeri N⁺-rCh e N⁺-rCh-SH e met-enkefalina in soluzione. Questi risultati suggeriscono che nonostante i polimeri siano mucoadesivi, non sono in grado di proteggere la met-enkefalina dalla degradazione degli enzimi presenti nel fluido lacrimale al contrario delle nanoparticelle.

La dispersione liofilizzata di nanoparticelle in tampone fosfato 0.013 M ipotonico, potrebbe costituire una formulazione di pratica utilità per applicazione oftalmica dal momento che potrebbe essere rigenerata immediatamente prima dell'utilizzo.

Figure e tabelle

Tabella 3.1 Dimensioni medie delle nanoparticelle determinate immediatamente dopo la loro preparazione in TF ipotonico o isotonico e relative Efficienze di incapsulamento

Nanoparticelle	Tampone, M	Dimensioni medie nm \pm DS	Indice di polidispersione \pm DS	Efficienza di incapsulamento (%) \pm DS
NP N ⁺ -rCh (NP1)	0.13	243.1 \pm 58.2	0.895 \pm 0.004	20.0 \pm 2.8
	0.013	343.7 \pm 32.5	0.756 \pm 0.104	22.0 \pm 2.4
NP N ⁺ -rCh-SH (NP2)	0.13	234.4 \pm 47.2	0.812 \pm 0.119	28.3 \pm 2.1
	0.013	361.3 \pm 21.5	0.729 \pm 0.030	21.0 \pm 2.1

Tabella 3.2 Dimensioni medie delle nanoparticelle determinate dopo ridispersione dei liofilizzati immediatamente dopo liofilizzazione

Nanoparticelle	Volume di H ₂ O usato per la rigenerazione	Dimensioni medie \pm DS	Indice di polidispersione \pm DS
NP N ⁺ -rCh (NP1)	5 mL	508.9 \pm 52.3	0.563 \pm 0.052
	500 μ L	367.1 \pm 37.6	0.376 \pm 0.077
NP N ⁺ -rCh-SH (NP2)	5 mL	442.5 \pm 49.3	0.386 \pm 0.103
	500 μ L	357.1 \pm 25.91	0.369 \pm 0.068

Tabella 3.3 Parametri derivanti dall'analisi dei dati nelle Tabelle 5 e 6 mediante le equazioni 2.5 e 2.7

Substrato	Costante di velocità ^a h ⁻¹ ± DS	r ²	Interazione ^b (%)
MET in TF	0.125 ± 0.007	0.993	–
MET + N ⁺ -rCh in TF	0.117 ± 0.012	0.965	n.s. ^c
NP1	0.126 ± 0.009	0.993	n.s. ^c
MET + N ⁺ -rCh-SH	0.102 ± 0.004	0.998	18.4
NP2	0.068 ± 0.005	0.990	45.1

^a Modulo della pendenza della retta. ^b Frazione di farmaco legata reversibilmente.

^c Non significativa

Tabella 3.4 Effetto su MRT e RT_{max} dei polimeri in soluzione e delle rispettive nanoparticelle marcati con FITC

Veicolo	MRT ± DS, min	RT _{max} , min
Soluzione N ⁺ -rCh-FITC	9.3 ± 1.3	30
NP1-FITC	6.7 ± 0.7	30
Soluzione N ⁺ -rCh-SH-FITC	8.3 ± 1.5	30
NP2-FITC	7.2 ± 0.7	30

Tabella 3.5 Effetto su MRT e RT_{max} di MET misurata dopo instillazione di cinque diversi veicoli

Veicolo	MRT ± DS, min	RT _{max} , min
Controllo	3.3 ± 0.86	6
Soluzione N ⁺ -rCh	4.5 ± 1.53	12
NP1	11.0 ± 1.9*	30
Soluzione N ⁺ -rCh-SH	3.8 ± 0.7	12
NP2	12.5 ± 1.3*	30

I dati marcati con (*) sono significativamente diversi dal controllo

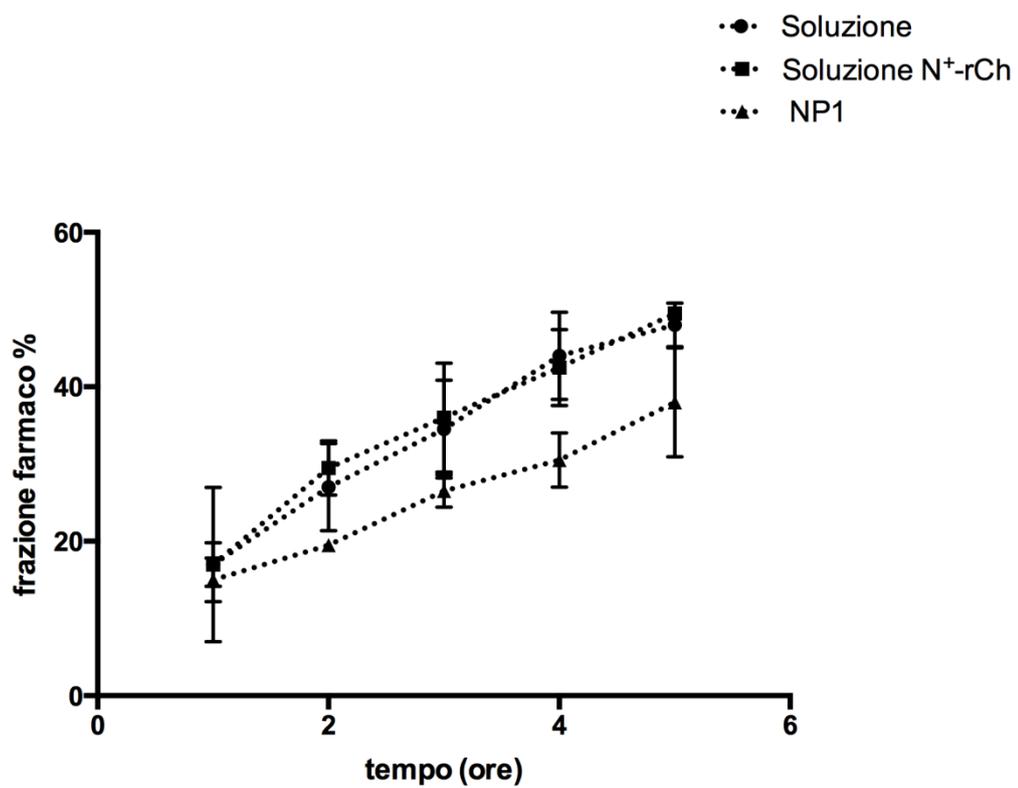


Figura 1 Frazione di MET nella fase ricevente della dialisi vs tempo. Fase donatrice: soluzione contenente il farmaco; soluzione contenente farmaco e polimero N⁺-rCh; dispersione nanoparticellare (NP1). Media \pm DS di 3 esperimenti

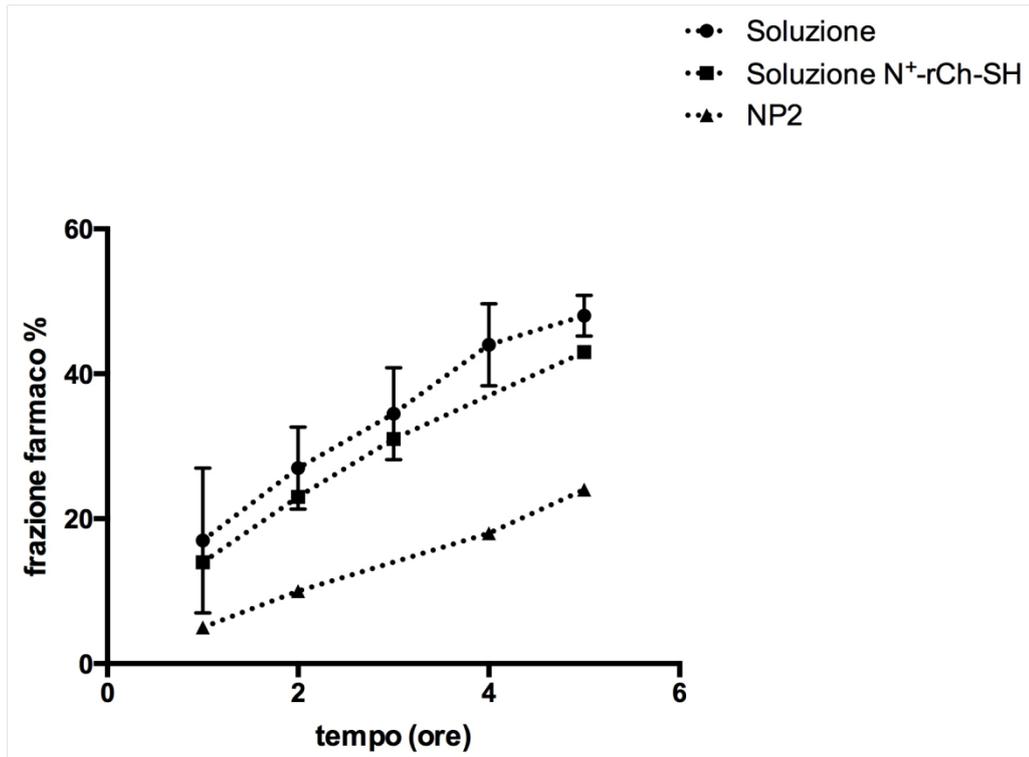


Figura 2 Frazione di MET nella fase ricevente della dialisi vs tempo. Fase donatrice: soluzione contenente il farmaco; soluzione contenente farmaco e polimero N⁺-rCh-SH; dispersione nanoparticellare (NP2). Media \pm DS di 3 esperimenti

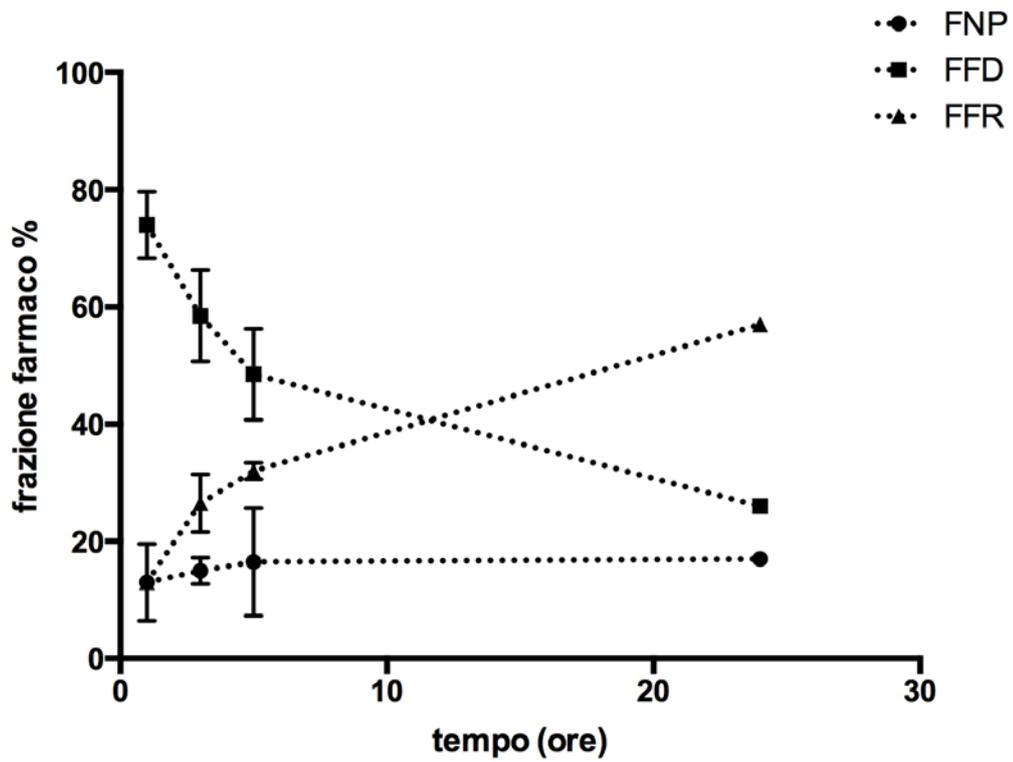


Figura 3 Cinetica della MET in ogni fase della dialisi, in presenza del polimero N^+-rCh : dispersione nanoparticellare (NP); fase donatrice esterna alle nanoparticelle (FD); fase ricevente (FR). Media \pm DS di 3 esperimenti

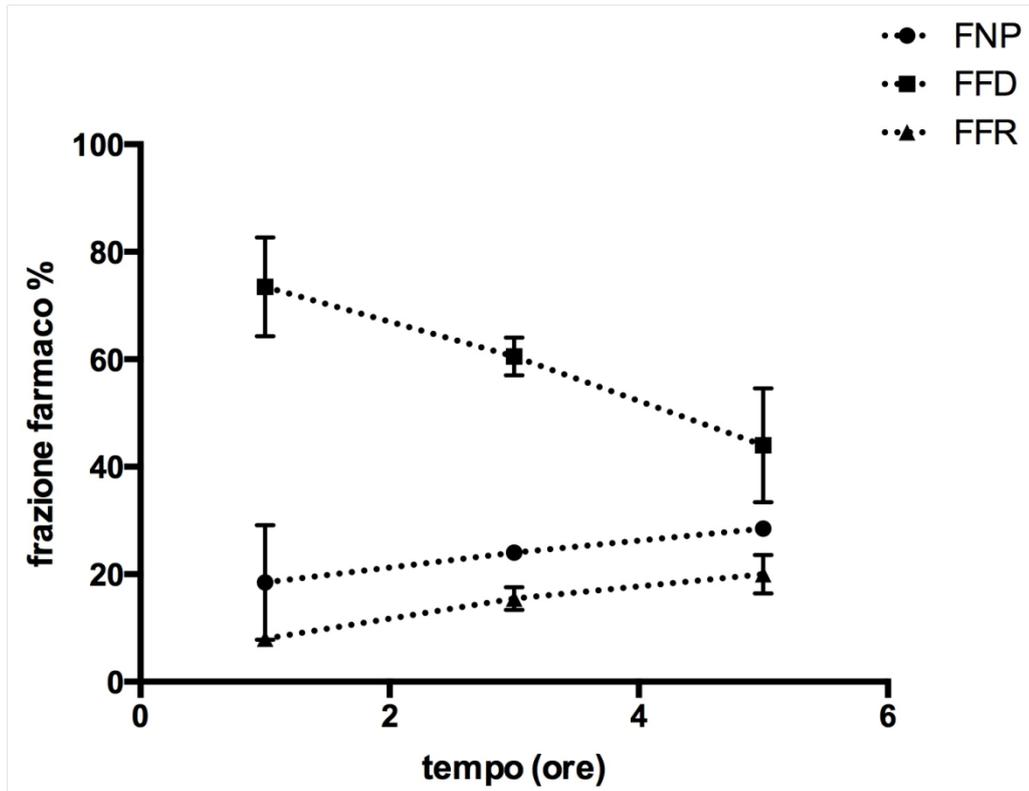


Figura 4 Cinetica della MET in ogni fase della dialisi, in presenza del polimero N^+ -rCh-SH: dispersione nanoparticellare (NP); fase donatrice esterna alle nanoparticelle (FD); fase ricevente (FR). Media \pm DS di 3 esperimenti

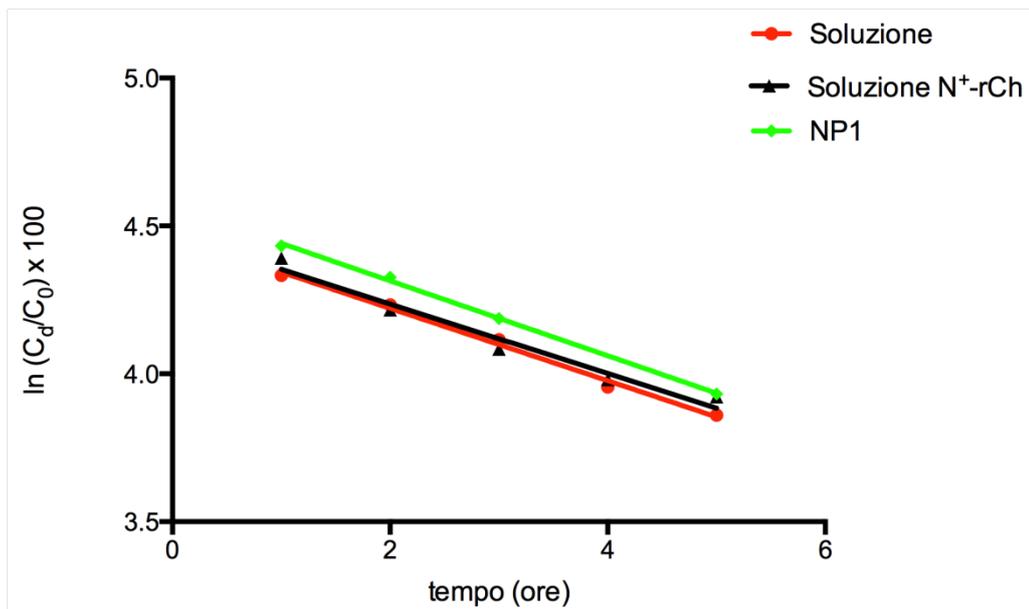


Figura 5 $\ln(C_d/C_{d0}) \times 100$ vs tempo della MET nel caso del polimero N⁺-rCh

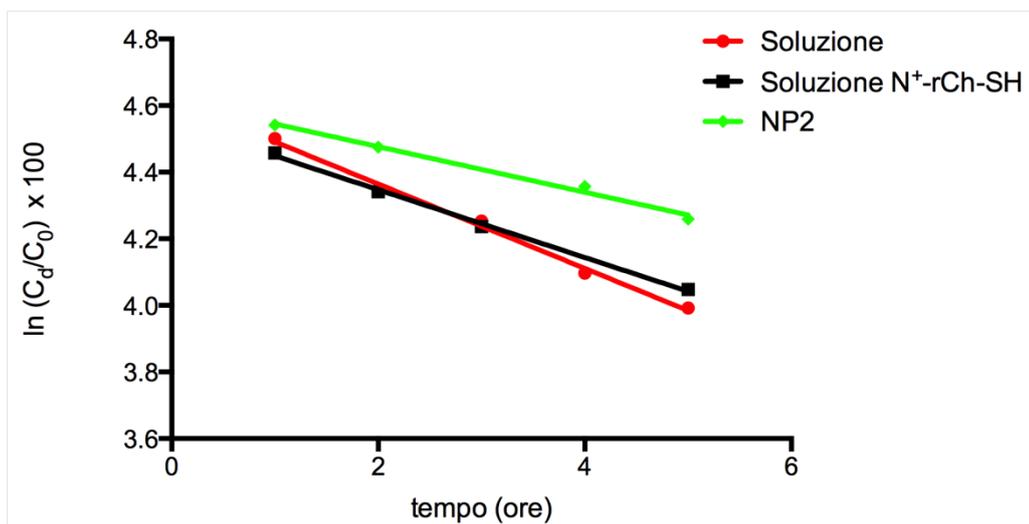


Figura 6 $\ln(C_d/C_{d0}) \times 100$ vs tempo della MET nel caso del polimero N⁺-rCh-SH

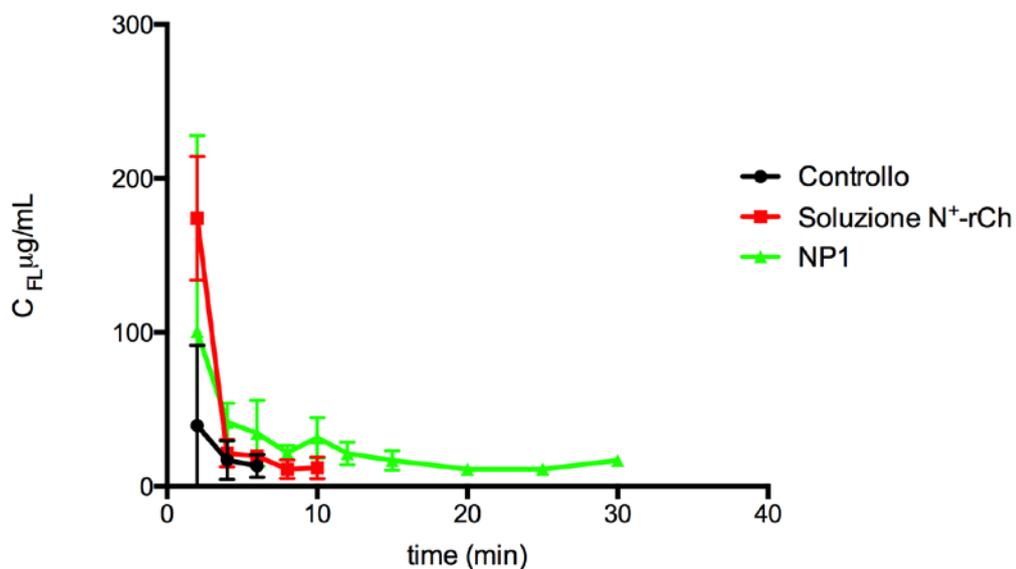


Figura 7 Profilo di eliminazione della MET dal fluido lacrimale dei conigli dopo instillazione di una goccia (50 μ L) mediante differenti veicoli. (Caso del polimero N⁺-rCh)

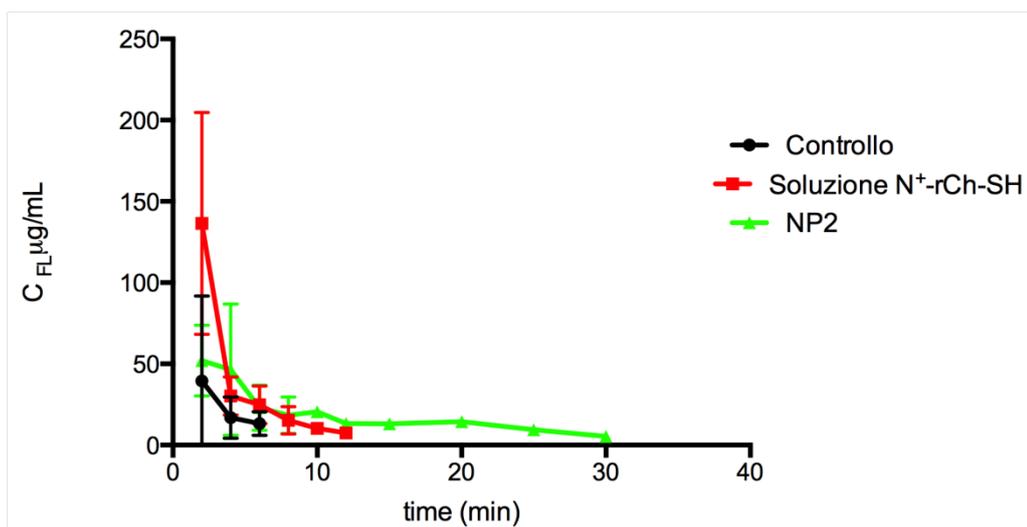


Figura 8 Profilo di eliminazione della MET dal fluido lacrimale dei conigli dopo instillazione di una goccia (50 μ L) mediante differenti veicoli. (Caso del polimero N⁺-rCh-SH)

Bibliografia

- ALONSO M. J., SÁNCHEZ A., “The potential of chitosan in ocular drug delivery”, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55 (2003) pp. 1451-1463
- BOTTARI F., DI COLO G., NANNIPIERI E., SAETTONI M. F., SERAFINI M. F., “Evaluation of a dynamic permeation technique for studying drug-macromolecule interactions”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64 (1975) pp. 946-949
- DI COLO G., ZAMBITO Y., BURGALASSI S., SERAFINI A., SAETTONI M. F., “Effect of chitosan on in vitro release and ocular delivery of ofloxacin from erodible inserts on poly(ethylene oxide)”, *International Journal of Pharmaceutics*, 248 (2002) pp. 115-122
- DI COLO G., ZAMBITO Y., ZAINO C., SANSÒ M., “Selected polysaccharides at comparison for their mucoadhesiveness and effect on precorneal residence of different drugs in the rabbit model”, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 35 (2009) pp. 941-949
- FELT O., FURRER P., MAYER J. M., PLAZONNET B., BURI P., GURNY R., “Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention”, *International Journal of Pharmaceutics*, 180 (1999) pp. 185-193
- FLYNN G. L., YALKOWSKY S. H., ROSEMAN T. J., “Mass transport phenomena and models: Theoretical concepts”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63 (1974) pp. 479-510
- HUSAIN S., ABDUL Y., POTTER D. E., “Non-Analgesic Effects of Opioids: Neuroprotection in the Retina”, *Current Pharmaceutical Design*, 18 (2012) pp. 5919-5926
- HUSAIN S., POTTER D. E., “The Opioidergic System: Potential Roles and Therapeutic Indications in the Eye (Invited Review)”, *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 24 (2008) pp. 117-140

- JANES K. A., ALONSO M. J., “Depolymerized Chitosan Nanoparticles for Protein Delivery: Preparation and Characterization”, *Journal of Applied Polymer Science*, 88 (2003) pp. 2769-2776
- KAST C. E., BERNKOP-SCHNÜRCH A., “Thiolated polymers-thiomers: development and in vitro evaluation of chitosan-thioglycolic acid conjugates”, *Biomaterials*, 22 (2001) pp. 2345-2352
- KHALID M. N., HO L., AGNELY F., GROSSIORD J. L., COUARRAZE G., “Swelling properties and mechanical characterization of a semi-interpenetrating chitosan/polyethylene oxide network: Comparison with a chitosan reference gel”, *STP Pharma Sciences*, 9 (1999) pp. 359-364
- LIU Y., CHEN S., YU P., “Preparation of water-soluble low-molecular weight chitosan and its complex with calcium ions”, *Fujian Shifan Daxue Xuebao*, 13 (1997) pp. 67-70
- MAO S., SHUAI X., UNGER F., SIMON M., BI D., KISSEL T., “The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties”, *International Journal of Pharmaceutics*, 281 (2004) pp. 45-54
- NAGARWAL R. C., KANT S., SINGH P. N., MAITI P., PANDIT J. K., “Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery”, *Journal of Controlled Release*, 136 (2009) pp. 2-13
- PENICHE H., PENICHE C., “Chitosan nanoparticles: a contribution to nanomedicine”, *Polymer International*, 60 (2011) pp. 883-889
- ROBERTS G. A. F., DOMSZY J. G., “Determination of the viscometric constants for chitosan”, *International Journal of Biological Macromolecules*, 4 (1982) pp. 374-377
- SHU X. Z., LIU Y., LUO Y., ROBERTS M. C., PRESTWICH G. D., “Disulfide Cross-Linked Hyaluronan Hydrogels”, *Biomacromolecules*, 3 (2002) pp. 1304-1311
- WILLOUGHBY C. E., PONZIN D., FERRARI S., LOBO A., LANDAU K., OMIDI Y., “Anatomy and physiology of the human eye: effects of

mucopolysaccharidoses disease on structure and function – a review”, *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 38 (2010) pp. 2-11

ZAMBITO Y., DI COLO G., “Thiolated quaternary ammonium-chitosan conjugates for enhanced precorneal retention, transcorneal permeation and intraocular absorption of dexamethasone”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75 (2010) pp. 194-199

ZAMBITO Y., PEDRESCHI E., DI COLO G., “Is dialysis a reliable method for studying drug release from nanoparticulate systems? - A case study”, *International Journal of Pharmaceutics*, 434 (2012) pp. 28-34

ZAMBITO Y., UCCELLO-BARRETTA G., ZAINO C., BALZANO F., DI COLO G., “Novel transmucosal absorption enhancers obtained by aminoalkylation of chitosan”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29 (2006) pp. 460-469