

# UNIVERSITÀ DI PISA



Dipartimento di Farmacia

## CORSO DI LAUREA IN CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

Tesi di Laurea

Chitosani multifunzionali  
contenenti gruppi tiolici protetti:  
sintesi e valutazione delle caratteristiche mucoadesive

Relatori:

Prof.ssa Ylenia Zambito

Dott.ssa Angela Fabiano

Candidato:

Margherita Rainò

Anno Accademico 2014/15

## INDICE

1. INTRODUZIONE .....	3
1.1 Il chitosano .....	3
1.1.1 Modifiche chimiche del chitosano .....	5
1.1.2 I tiomeri .....	6
1.1.3 Chitosano-S-protetto .....	8
1.2 La membrana mucosale .....	9
1.2.1 Il muco .....	10
1.2.2 Le mucine .....	11
1.2.3 Proprietà protettive e di barriera del muco gastrointestinale .....	12
1.3 Bioadesione e Mucoadesione .....	12
1.3.1 Meccanismo della mucoadesione .....	13
1.3.2 Fattori influenti sul processo mucoadesivo .....	14
1.3.3 Vantaggi della mucoadesione .....	16
1.3.4 Potenziali siti di assorbimento dei sistemi mucoadesivi .....	17
2. PARTE SPERIMENTALE .....	21
2.1 Materiali e Metodi .....	22
2.1.1 Materiali .....	22
2.1.2 Sintesi del coniugato N <sup>+</sup> -Ch60 .....	23
2.1.3 Attacco covalente di gruppi tiolici sul derivato N <sup>+</sup> -Ch60 .....	23
2.1.4 Sintesi del ligando aromatico 6-mercaptonicotinammide (6-MNA) .....	24
2.1.5 Sintesi del coniugato N <sup>+</sup> -Ch60-S-protetto .....	25
2.1.6 Determinazione del contenuto di gruppi tiolo e disolfuro nei derivati N <sup>+</sup> -Ch60SH e N <sup>+</sup> -Ch60-S-protetto .....	26
2.1.7 Quantificazione del ligando aromatico 6-MNA .....	27
2.1.8 Analisi NMR del polimero N <sup>+</sup> -Ch60-S-protetto .....	27
2.1.9 Marcatura dei derivati N <sup>+</sup> -Ch60, N <sup>+</sup> -Ch60SH e N <sup>+</sup> -Ch60-S-protetto con FITC .....	27
2.1.10 Purificazione del muco .....	28
2.1.11 Studi di diffusione attraverso muco intestinale purificato con il metodo del tubo rotante .....	28
2.1.12 Studio in vitro del trasporto acqua-assistito attraverso il muco .....	29

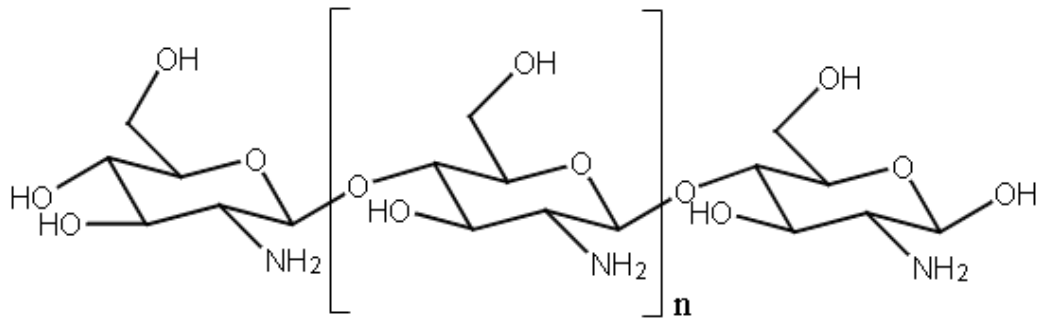
2.1.13 Sinergismo reologico delle miscele muco-polimeri N <sup>+</sup> -Ch60, N <sup>+</sup> -Ch60SH e N <sup>+</sup> -Ch60-S-protetto.....	29
3. RISULTATI E DISCUSSIONI.....	31
3.1 Sintesi del coniugato N <sup>+</sup> -Ch60 .....	31
3.2 Attacco covalente dei gruppi tiolici sul derivato N <sup>+</sup> -Ch60.....	31
3.3 Caratterizzazione del derivato N <sup>+</sup> -Ch60-S-protetto .....	32
3.4 Analisi NMR del derivato N <sup>+</sup> -Ch60-S-protetto .....	33
3.5 Studi di diffusione attraverso muco intestinale purificato col metodo del tubo rotante .....	34
3.6 Studio in vitro del trasporto acqua-assistito attraverso il muco.....	35
3.7 Sinergismo reologico delle miscele muco-polimeri N <sup>+</sup> -Ch60, N <sup>+</sup> -Ch60SH e N <sup>+</sup> -Ch60-S-protetto.....	36
4. CONCLUSIONI.....	37
5. FIGURE E TABELLE .....	38
BIBLIOGRAFIA.....	42

# 1. INTRODUZIONE

La via orale è la principale via di somministrazione dei farmaci poiché non è invasiva e molti farmaci sono ben assorbiti nel tratto gastroenterico. Tuttavia la mucosa gastrointestinale rappresenta una vera e propria barriera che limita la biodisponibilità di molecole farmacologicamente attive. Le strategie farmaceutiche utilizzate per superare questa barriera prevedono l'utilizzo di enzimi, promotori di permeazione e, in particolare, polimeri mucoadesivi. Tra i polimeri mucoadesivi, il chitosano è uno dei candidati preferenziali grazie alla sua biocompatibilità, biodegradabilità e relativa non tossicità. Le proprietà mucoadesive del chitosano sono fortemente aumentate mediante tiolazione. I polimeri tiolati (tiomeri) sono capaci di formare legami covalenti con le subunità ricche di cisteina dello strato di muco attraverso una reazione di scambio tiolo/disolfuro. I tiomeri però sono instabili in soluzione a causa dell'ossidazione dei gruppi tiolici a  $\text{pH} \geq 6.5$ . Pertanto in regioni quali il tratto distale dell'intestino tenue, il colon o il retto dove il pH è più alto, la loro mucoadesività si riduce drasticamente. Per tali ragioni, è necessario proteggere i gruppi tiolici dall'ossidazione mediante formazione di ponti disolfuro con 6-marcaptonicotinammide, generando così una nuova classe di derivati del chitosano chiamati chitosano-S-protetti.

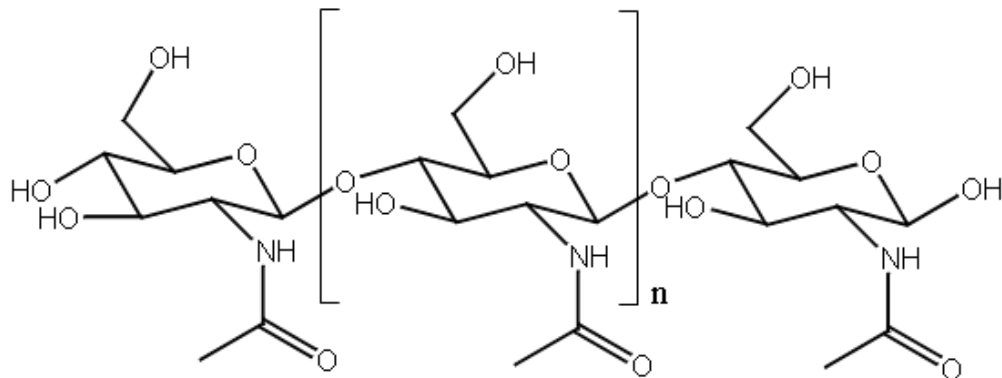
## 1.1 Il chitosano

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



**Figura 1:** Struttura del chitosano

A causa della sua scarsa reperibilità in natura, il chitosano è generalmente ottenuto dalla deacetilazione della chitina, il più abbondante biopolimero esistente dopo la cellulosa. Da un punto di vista chimico la chitina (**Figura 2**) è un omopolimero costituito da molteplici unità di N-acetil-D-glucosammina legate tra loro da legami  $\beta(1 \rightarrow 4)$ . In natura la chitina rappresenta il componente strutturale principale dell'esoscheletro di molti artropodi come insetti, ragni e crostacei; inoltre è anche un importante costituente della membrana cellulare di alghe, licheni e funghi.



**Figura 2:** Struttura della chitina

La deacetilazione dei gruppi amminici della chitina, effettuata in ambiente alcalino ed ad alte temperature, può essere eseguita sia in condizioni eterogenee che omogenee, ottenendo prodotti finali con diversa microstruttura. La differenza strutturale è essenziale nella determinazione

delle proprietà del chitosano, come ad esempio la solubilità: il polimero ottenuto in condizioni eterogenee risulta insolubile in acqua, sebbene diventi solubile a pH acido; al contrario la reazione in condizioni omogenee produce un chitosano solubile in acqua. La reazione di deacetilazione della chitina è parziale e a seconda dell'efficienza del processo è possibile ottenere vari tipi di chitosano commerciabili che differiscono per peso molecolare e grado di acetilazione.

Grazie alle sue eccellenti qualità biologiche il chitosano è un candidato perfetto per applicazioni in campo biomedico e farmaceutico. Oltre alla sua biocompatibilità e biodegradabilità, presenta un basso livello di tossicità e allergenicità; inoltre sono note le sue spiccate attività antimicrobiche, antivirali, immunoadiuvanti e antitumorali. Il chitosano ha la capacità di aumentare la permeabilità delle membrane cellulari, sia in vitro che in vivo e di aprire le giunzioni strette delle membrane cellulari permettendo il passaggio di molecole polari. Le riconosciute proprietà mucoadesive del chitosano derivano sia dalla formazione di legami chimici secondari, come i legami idrogeno, sia da interazioni ioniche tra i gruppi amminici carichi positivamente del chitosano e i residui di acido sialico carichi negativamente della mucina. Queste interazioni permettono ad un farmaco da esso veicolato, una volta a contatto con la mucosa, di essere rilasciato in situ, con aumento del tempo di residenza al sito di legame e conseguente incremento dell'assorbimento del farmaco stesso.

### *1.1.1* Modifiche chimiche del chitosano

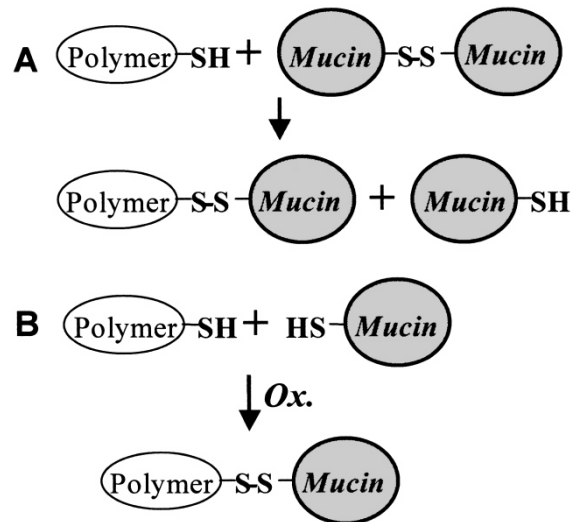
Al fine di migliorare la solubilità e le applicazioni farmaceutiche del chitosano, numerose correzioni sono state apportate alla sua struttura nel corso del tempo. Il chitosano è solubile in soluzioni acquose acide e, a valori di pH minori di 6,5, esibisce una carica positiva netta che gli consente di interagire con molecole o superfici cariche negativamente, formando legami di natura ionica. A pH neutro il polimero è insolubile in acqua e ciò ne limita

l'impiego in ambito farmaceutico. Per ovviare a questo inconveniente le catene del chitosano possono essere chimicamente modificate introducendo gruppi ammoniaci quaternari in grado sia di incrementare la solubilità in acqua per qualsiasi valore di pH, sia di rendere indipendente la carica del polimero dal pH. La quaternarizzazione preserva e migliora le proprietà mucoadesive del polimero, potenziando inoltre la capacità di promuovere l'assorbimento di farmaci polari e apolari attraverso i diversi epiteli mucosali.

### 1.1.2 I tiomeri

Solo alla fine degli anni '90 fu introdotta una nuova generazione di polimeri mucoadesivi capaci di formare legami covalenti più stabili nel tempo e marcatamente più forti delle interazioni ioniche tra il polimero e le subunità anioniche dello strato mucosale. Questa promettente classe di polimeri denominata tiomeri o polimeritiolati, è ottenuta tramite l'immobilizzazione di gruppi tiolici sui gruppi amminici primari del chitosano, trattando quest'ultimo con acido tioglicolico in opportune condizioni.

L'aumentato carattere mucoadesivo dei tiomeri può essere spiegato grazie alla formazione di legami covalenti dei gruppi tiolici del polimero con i domini ricchi di cisteina delle glicoproteine presenti nello strato mucosale. Questi legami si basano su una reazione di scambio tiolo/ disolfuro o su un semplice processo di ossidazione e vanno a mimare il naturale meccanismo di secrezione delle glicoproteine del muco, le quali sono covalentemente ancorate ad esso tramite ponti disolfuro (**Figura 3**).



**Figura 3:** Possibile meccanismo di formazione del legame disolfuro tra il tiomero e le glicoproteine del muco (mucina). **A)** reazione di scambio tiolo/disolfuro; **B)** processo di ossidazione.

[Verena M. Leitner, et al. (2003)].

Oltre all'incrementata mucoadesività, i tiomeri mostrano numerose caratteristiche vantaggiose rispetto al chitosano non funzionalizzato, tali da renderli più idonei come eccipienti per il rilascio controllato di farmaci. Infatti le proprietà coesive e adesive risultano fortemente incrementate e garantiscono il rilascio delle sostanze veicolate presso uno specifico sito di assorbimento mucosale. Inoltre i tiomeri, aderendo al tessuto mucosale per un tempo prolungato, sono capaci di promuovere l'assorbimento di farmaci e di aumentarne la biodisponibilità. Infine i tiomeri possono essere impiegati per la somministrazione orale di peptidi, proteine e altri agenti terapeutici in quanto, esibendo un'efficace attività inibitoria enzimatica, possono trasportare queste molecole suscettibili nell'intestino e proteggerle dall'attacco enzimatico.

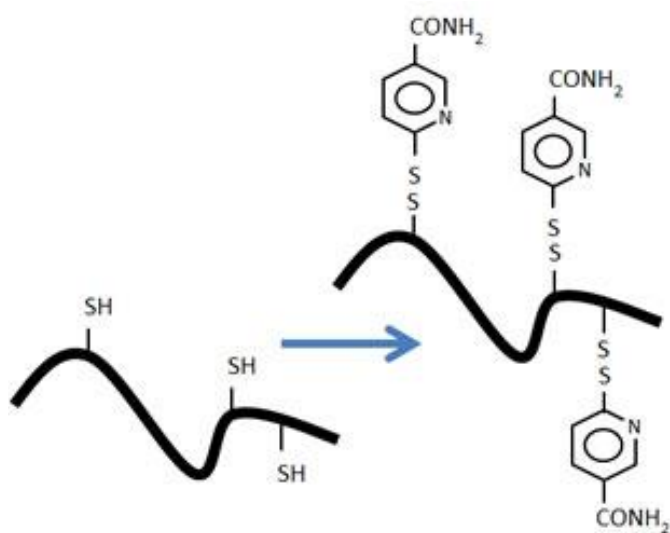
Nonostante le innumerevoli qualità, i tiomeri, in soluzione, presentano problemi di instabilità; in particolare i gruppi tiolici possono essere soggetti a ossidazione per valori di  $\text{pH} \geq 5$ , salvo conservazione in ambiente inerte. La precoce ossidazione dei tioli può limitare l'interazione con le glicoproteine del muco, diminuendo drasticamente l'efficacia di azione di questi polimeri.



### 1.1.3 Chitosano-S-protetto

Per ovviare alla problematica descritta, è stato necessario progettare e sviluppare una seconda generazione di polimeri tiolati stabili all'ossidazione, chiamata chitosano-S-protetti. La protezione delle estremità sulfidriliche con gruppi mercaptonicotinamidici (**Figura 4**) consente di incrementare le proprietà mucoadesive e coesive dei tiomeri, indipendentemente dal pH dell'ambiente; inoltre le amplificate proprietà adesive del polimero permettono di prolungare maggiormente il tempo di contatto con le membrane mucosali, il tempo di residenza degli eventuali farmaci veicolati, accrescendo così il gradiente di concentrazione di questi al sito di assorbimento. Di conseguenza il trasporto di tali farmaci risulta facilitato e ciò permette di incrementare la biodisponibilità con conseguente riduzione della dose e della frequenza di somministrazione e migliorare la compliance del paziente.

Dunque, i polimeri chitosano-S-protetti possono essere considerati una promettente categoria di polimeri mucoadesivi per il futuro sviluppo di nuovi, efficaci e sicuri sistemi per la somministrazione non invasiva di farmaci.



**Figura 4:** Protezione dei tiomeri con mercaptonicotinamide  
[Bernkop-Schnürch, A., et al. (2003)].

## 1.2 La membrana mucosale

La membrana mucosale rappresenta la tonaca che riveste le cavità dell'organismo appartenenti agli apparati respiratorio, digerente, urogenitale, che sono in continuità con le superfici esterne. La mucosa è generalmente costituita da un *epitelio superficiale* in cui sono localizzati i dotti delle ghiandole mucipare e da un tessuto connettivo lasso con funzione di sostegno, denominato *lamina propria*, il quale è irrorato da vasi sanguigni e linfatici. Al di sotto della mucosa si trovano altri strati che formano la parete: *muscolaris mucosae* (sottile strato di muscolatura liscia), *tonaca sottomucosa* (tessuto connettivo), *tonaca muscolare* (uno o più strati di tessuto muscolare liscio), *sierosa viscerale* (epitelio piatto e lamina di tessuto connettivo).

La tipicità delle mucose consiste nella produzione di muco, sostenuta dalla presenza di ghiandole mucipare nell'epitelio superficiale e nella sottomucosa. Nell'epitelio superficiale le ghiandole sono costituite da cellule caliciformi che riversano il loro secreto direttamente nel lume, mentre al livello della sottomucosa le ghiandole sono localizzate nel tessuto connettivo e secernono il muco nel lume grazie alla presenza di un dotto escretore. Nelle cellule mucipare caliciformi, durante il processo di secrezione, gocce di muco si accumulano nella regione di Golgi, situata tra il nucleo e la superficie libera della cellula. L'immagazzinamento del muco determina la distensione della porzione apicale delle cellule che assumono una tipica forma a calice, mentre il nucleo viene schiacciato al polo opposto. La produzione di muco da parte di queste cellule è provocata da stimoli indotti da agenti irritanti e/o variazione dei livelli ormonali e la successiva secrezione avviene mediante l'esocitosi di granuli secretori dalla membrana plasmatica. All'interno dei granuli il muco si trova in forma condensata ma, una volta liberato sulla superficie epiteliale, il muco si idrata, si espande e forma un materiale simile a un gel.

### 1.2.1 Il muco

Il muco è una secrezione traslucida e viscosa che riveste la superficie degli epitelii mucosali con uno strato sottile e continuo. Oltre a mantenere costantemente umide e lubrificate le mucose, per compensare la sua rimozione in seguito alla digestione, alla degradazione batterica e alla solubilizzazione delle molecole di mucina, il muco contribuisce anche al mantenimento dell'equilibrio idrico dell'epitelio. Allo stesso tempo svolge una funzione protettiva contro l'aggressione da agenti fisici, meccanici, chimici come il fumo e gli acidi gastrici, ma anche dall'azione di corpi estranei come virus ed agenti patogeni. Grazie alle forti proprietà adesive il muco è considerato un importante target in ambito farmaceutico per il legame di sistemi mucoadesivi a rilascio controllato.

Il comportamento fisico di questo fluido è di tipo non-Newtoniano e mostra proprietà intermedie tra un liquido viscoso e un solido elastico.

Il muco è composto (**Figura 5**) da un'alta percentuale di acqua, glicoproteine (mucine), ioni (ione potassio, sodio, cloruro, bicarbonato) ed enzimi (peptidasi, nucleasi ed enterochinasi), ma la sua composizione specifica può variare in base alla specie animale, all'età, al sesso, alla collocazione anatomica, alla sua funzione, all'eventuale presenza di malattie.

COMPOSIZIONE	PERCENTUALE
ACQUA	95%
GLICOPROTEINE E LIPIDI	0.5-5.0%
SALI MINERALI	1%
PROTEINE	0.5-1%

**Figura 5:** Composizione del muco

Le principali proteine costituenti il muco sono le mucine, le quali possono essere secrete o legate alle cellule. Le mucine sono responsabili delle proprietà tipo gel del muco, la cui viscoelasticità però è regolata anche dalla presenza di acqua, lipidi e ioni [Lai, Samuel K., et al. (2009)]. Le proprietà viscoelastiche del muco sono essenziali per la sua attività protettiva e lubrificante. Al fine di proteggere la mucosa epiteliale, un costante turnover di muco nel tratto gastrointestinale (GI) è necessario per rimuovere potenziali composti nocivi e organismi introdotti con la dieta. Dunque, è necessario un bilanciamento tra sintesi, degradazione e rimozione delle mucine che influenza lo spessore complessivo della barriera mucosale.

### 1.2.2 Le mucine

Le proprietà protettive esercitate dal muco derivano principalmente dalla sua porzione glicoproteica rappresentata dalle mucine, ovvero una famiglia di proteine altamente glicosilate. Da un punto di vista chimico queste glicoproteine sono costituite per il 20% circa da proteine e in quantità compresa tra il 70 ed il 90%, da catene glucidiche come galattosio, N-acetilgalattosamina, N-acetilglucosamina, fucosio e acido sialico. La porzione proteica è collegata tramite legami O-glicosidici a catene oligosaccaridiche e comprende circa 800 residui amminoacidici caratterizzati maggiormente dalla ripetizione di treonina, serina e prolina.

Grazie alle interazioni idrofobiche tra le catene e alla presenza di gruppi sulfidrilici capaci di formare ponti disolfuro intra- e inter-molecolari, le mucine possono associarsi in complessi macromolecolari, responsabili delle proprietà reologiche del muco. Inoltre le mucine possiedono porzioni acide dovute alla presenza di acido sialico e gruppi solfato nelle porzioni glucidiche che, a pH fisiologico, risultano completamente ionizzate, conferendo al muco una carica negativa, essenziale nel processo di mucoadesione con preparati farmaceutici.

### 1.2.3 Proprietà protettive e di barriera del muco gastrointestinale

Il meccanismo grazie al quale lo stomaco è capace di digerire i cibi senza auto-digerirsi è uno degli esempi più chiari delle proprietà barriera del muco. La mucosa gastrica sopporta un gradiente di pH da 1-2 a 7 su uno spessore di muco di soli 200  $\mu\text{m}$ . Per mantenere questo gradiente, il muco gastrico agisce come una barriera selettiva alla diffusione di acidi, basata su un'interazione pH-dipendente. A pH superiori a 4, acidi secreti dalle cellule parietali dello stomaco aprono canali nello strato di muco, consentendo agli acidi di raggiungere velocemente il lume e ri-acidificare il contenuto, facilitando la digestione ed esercitando attività antimicrobica. Al di sotto di questo pH, il muco rallenta la diffusione degli acidi, secernendo continuamente ioni bicarbonato per neutralizzare gli acidi prima che questi raggiungano l'epitelio. La presenza costante di acidi ed enzimi nello stomaco degrada il muco, e questo deve essere controbilanciato da una continua secrezione mucosale.

Un uomo adulto secerne ~10 L di acqua nel tratto GI al giorno dei quali 9.8 L sono riassorbiti [Cone, R. A. (1999)]. Il riassorbimento di quest'acqua incrementa il trasporto e l'assorbimento di nutrienti e piccole molecole che possono penetrare nel muco che è continuamente secreto dal tratto GI.

La lubrificazione è un'altra importante proprietà del muco nel tratto GI. Il muco si mantiene come uno strato aderente e non mescolato per tutto il tratto GI che aderisce all'epitelio grazie all'interazione con il glicocalice.

Il muco inoltre intrappola patogeni e sostanze estranee attraverso interazioni non-specifiche come quelle idrofobiche.

## 1.3 Bioadesione e Mucoadesione

La bioadesione può essere definita come la capacità di un materiale naturale o sintetico di aderire ad un altro materiale biologico per un periodo

prolungato di tempo, mediante forze interfacciali. In ambito farmaceutico, questo fenomeno si realizza quando un polimero aderisce a un tessuto biologico e in particolare se è coinvolta una membrana mucosale si parla di mucoadesione.

### 1.3.1 Meccanismo della mucoadesione

Generalmente, il fenomeno della mucoadesione si compone di tre momenti:

1. Idratazione e rigonfiamento del polimero bioadesivo per favorire l'intimo contatto con la mucosa;
2. Compenetrazione delle catene del bioadesivo con quelle del muco;
3. Formazione di legami chimici;

Nella prima fase del processo, il polimero bioadesivo si espande sulla superficie mucosale e aderisce ad essa grazie alla tensione superficiale e alle forze presenti al livello del sito di adsorbimento. Inoltre la presenza di acqua permette l'idratazione e il rigonfiamento del polimero, con conseguente aumento dell'area superficiale di contatto tra il sistema bioadesivo e le mucose.

Nella seconda fase le catene del polimero diffondono nella membrana mucosale, generando un intreccio di strutture. La velocità con cui il polimero penetra all'interno dello strato di muco dipende dalla flessibilità delle catene polimeriche e dal coefficiente di diffusione. Inoltre la forza del legame adesivo è direttamente proporzionale alla profondità di penetrazione delle catene del polimero stesso.

I legami chimici che si vengono a formare nella terza fase del processo, possono essere classificati in primari (legami covalenti) e secondari (interazioni elettrostatiche, Van der Waals, legami a idrogeno). Essenziale per la formazione delle interazioni deboli è la presenza di cariche anioniche

di superficie e di gruppi chimici, ossidrilici e carbossilici, in grado di originare legami a idrogeno.

### 1.3.2 Fattori influenti sul processo mucoadesivo

La capacità di un polimero adesivo di aderire alle membrane mucosali può essere condizionata da numerosi fattori relativi alle caratteristiche del polimero stesso, all'ambiente fisiologico e alle condizioni patologiche del paziente.

#### *Peso molecolare del polimero*

Il peso molecolare ideale per assicurare il massimo grado di mucoadesione dipende dal tipo di polimero e dal tessuto interessato. Generalmente, affinché si raggiunga un buon livello di mucoadesione, adeguato all'uso farmaceutico, i polimeri devono disporre di un peso molecolare superiore ai 100 000 Da. Inoltre, maggiore è l'incremento del peso molecolare delle catene del polimero, migliore sarà la capacità mucoadesiva.

#### *Concentrazione del polimero*

Al fine di raggiungere la massima mucoadesione è necessario conoscere per ogni polimero la sua concentrazione ottimale. Nel caso di sistemi liquidi altamente concentrati, si possono formare interazioni intermolecolari tra le molecole del polimero che limitano la capacità di interpenetrazione delle catene bioadesive. Per i sistemi liquidi e semiliquidi a bassa concentrazione, la muco adesione risulta debole in quanto il numero delle interazioni possibili è estremamente ridotto. Infine per forme farmaceutiche solide, maggiore è la concentrazione di polimero, tanto più forte risulterà il legame mucoadesivo.

### *Conformazione spaziale del polimero*

I polimeri bioadesivi possono presentare una conformazione spaziale elicoidale capace di nascondere gran parte dei gruppi funzionali mucoadesivi, riducendo la possibilità di formare legami e limitando il successo del processo adesivo. La flessibilità delle catene in questo caso gioca un ruolo fondamentale e permette di esporre i siti adesivi alle superfici mucosali, favorendo il fenomeno dell'interpenetrazione.

### *Grado di idratazione del polimero*

L'idratazione è essenziale per i polimeri mucoadesivi in quanto permette loro di rigonfiare e espandersi sulla superficie di interesse ed inoltre agevola la mobilità delle catene, promuovendo l'interpenetrazione del polimero con la mucina. La massima forza di adesione si raggiunge solo in presenza di una quantità ottimale di acqua, infatti se il grado di idratazione supera quello ideale si formeranno mucillagini prive di capacità mucoadesive.

### *pH dell'ambiente*

Il pH dell'ambiente può promuovere la dissociazione di gruppi funzionali presenti sulle porzioni aminoacidiche e saccaridiche, modificando la carica formale sulla superficiale del muco.

### *Tempo di contatto*

La durata del tempo di contatto tra le mucose e il sistema bioadesivo definisce l'entità di idratazione e rigonfiamento del polimero, oltre al grado di compenetrazione delle catene. Tuttavia, quando il tempo di contatto si protrae per un tempo troppo lungo, le catene del polimero risultano sovraidratate formando mucillagini non adesive.



### *Turnover della mucina*

Il naturale turnover delle molecole di mucina limita il tempo di contatto con il sistema adesivo, indipendentemente dalla forza con cui le due superfici sono legate. Il tempo di turnover varia tra i 47 e i 270 minuti.

### *Stati patologici*

Le proprietà chimico fisiche del muco possono essere alterate in seguito all'insorgenza di alcune malattie e ciò si ripercuote sulla capacità delle glicoproteine della mucina di interagire con un eventuale sistema polimerico adesivo. I quadri clinici che possono indurre questa alterazione sono ad esempio: il raffreddore, l'ulcera gastrica, la colite ulcerosa, la fibrosi cistica, infezioni batteriche e fungine del tratto riproduttivo femminile, infiammazione dell'occhio.

### *1.3.3 Vantaggi della mucoadesione*

Un importante obiettivo del settore farmaceutico odierno si fonda sullo sviluppo e perfezionamento di tecnologie innovative, adatte al trasposto di agenti terapeutici nell'organismo. L'uso di sistemi polimerici mucoadesivi, ad esempio, ha migliorato enormemente le prestazioni terapeutiche dei preparati farmaceutici.

Le formulazioni bioadesive, infatti, sono capaci di rilasciare farmaci presso uno specifico sito target e di prolungare il tempo di residenza di questi al sito, incrementandone l'assorbimento.

Interessante è la capacità di questi materiali di modificare la permeabilità delle mucose, facilitando l'adsorbimento di molecole bioattive e di conseguenza incrementando il gradiente di concentrazione di queste al sito target. L'aumento di concentrazione permette di ridurre in maniera significativa sia la dose di farmaco necessaria, sia la frequenza di somministrazione, migliorando anche la compliance del paziente. Inoltre il

marginale di sicurezza delle sostanze somministrate risulta incrementato grazie al migliore controllo dei livelli plasmatici di queste.

Il rilascio controllato e prolungato nel tempo permette di ridurre le fluttuazioni della concentrazione plasmatica allo stato stazionario e l'intensità degli effetti avversi sia a livello locale che sistemico [Ganga, S.(2007); Rajput, G.C. et al. (2010)]. Inoltre garantisce anche un miglior effetto sulle condizioni patologiche.

I sistemi polimerici bioadesivi sono di facile somministrazione e oltre alla via orale, possono essere assunti anche attraverso la via oculare, nasale, vaginale e rettale.

Molecole instabili all'ambiente acido, sensibili alla degradazione enzimatica o soggette al metabolismo di primo passaggio epatico, possono essere trasportate da questi sistemi con successo [Punitha, S., Girish, Y. (2010); Sachan Nikhil, K., Bhattacharya, A. (2009)].

#### 1.3.4 Potenziali siti di assorbimento dei sistemi mucoadesivi

La scelta di un'opportuna via per la somministrazione di farmaci è essenziale in quanto può influire fortemente sul processo farmacocinetico della sostanza introdotta nel nostro organismo. Fattori come forma farmaceutica, sito bersaglio, durata dell'effetto e condizioni di salute del paziente sono determinanti.

Nel caso di sistemi polimerici mucoadesivi l'obiettivo è garantire l'intimo contatto della formulazione farmaceutica con le mucose, assicurando l'aumento del tempo di contatto e potenziando l'azione farmacologica.

Vie di somministrazione come quella buccale, oculare, nasale, vaginale e rettale vengono di norma utilizzate per trattamenti topici, ma anche sistemici, mentre quella orale è specifica per ottenere un effetto sistemico.

La *via buccale* viene utilizzata generalmente per la cura di stomatiti e gengiviti tramite uso di geli adesivi, colluttori, paste, compresse. L'epitelio non cheratinizzato è una barriera relativamente permeabile per il trasporto di farmaci e offre il vantaggio di raggiungere direttamente il ventricolo destro, evitando il metabolismo di primo passaggio epatico con incremento della biodisponibilità del farmaco e della compliance del paziente. La mucosa sublinguale è più permeabile di quella buccale, ma a causa della locale grande produzione di saliva è destinata a trattamenti che richiedono una rapida insorgenza di azione e un effetto breve.

La via buccale è stata studiata anche per il rilascio prolungato di farmaci; l'uso di compresse mucoadesive a doppio strato (esterno protettivo e interno mucoadesivo), ha ovviato al dilavamento dei preparati da parte della saliva.

La somministrazione topica per *via oculare* prevede l'utilizzo di forme farmaceutiche come colliri, sospensioni o soluzioni oleose, geli, unguenti e inserti oftalmici. Il rilascio di farmaci a livello oculare è difficoltoso a causa della presenza della barriera corneale e di alcuni meccanismi protettivi che proteggono l'occhio da agenti esterni come il riflesso dell'ammicciamento, la produzione di lacrime e il drenaggio naso-lacrimale. Per aumentare il tempo di residenza dei farmaci sulla superficie dell'occhio e quindi l'assorbimento, è possibile utilizzare polimeri mucoadesivi, in grado di incrementare la viscosità dei preparati farmaceutici e di creare interazioni con le glicoproteine della mucosa oculare [Burgalassi et al, (1996); Herrero-Vanrell et al, (2000)].

Per quanto riguarda la *via nasale*, i preparati farmaceutici più comunemente usati sono soluzioni, geli, microparticelle. Fattori come il tempo di turnover del muco (10-15 minuti) e la rapida clearance muco ciliare possono limitare l'assorbimento dei farmaci, ma anche in questo caso, tramite l'ausilio di polimeri bioadesivi, è possibile estendere il tempo di permanenza nella cavità nasale [Shaikh et al, (2001)].

A causa dell'ampia superficie di vascolarizzazione dell'epitelio nasale, questa via di somministrazione può essere impiegata anche per uso sistemico.

La *via vaginale* è usata per trattamenti locali e per il rilascio di ormoni. Le forme farmaceutiche generalmente impiegate sono soluzioni, sospensioni, geli, creme, unguenti, schiume, ovuli, compresse e inserti. Il vantaggio principale di questa via è la possibilità di mantenere per un lungo periodo di tempo i preparati all'interno della vagina, diminuendo la frequenza di somministrazione.

L'assorbimento di sostanze bioattive attraverso la *via rettale*, avviene tramite un processo di diffusione semplice attraverso i plessi venosi. Questa via permette di evitare il metabolismo di primo passaggio e la conseguente riduzione della concentrazione plasmatica del farmaco. Le forme farmaceutiche utilizzate sono soluzioni, schiume, geli e supposte.

Certamente la via di somministrazione più comune, versatile, economica, di facile impiego e sicura è la *via orale*, particolarmente indicata anche per l'impiego di sistemi polimerici mucoadesivi.

La forma farmaceutica, una volta ingerita, attraversa il tubo gastroenterico arrivando allo stomaco dove l'assorbimento è generalmente basso. A questo livello la permanenza è influenzata dal tempo di svuotamento gastrico che si riflette sulla velocità di assorbimento da parte dell'intestino e sulla rapidità di insorgenza dell'effetto farmacologico. La motilità gastrica infatti può essere alterata da farmaci (metoclopramide aumenta la motilità, sali di calcio e alluminio la rallentano), da situazioni particolari (presenza di alimenti, di secrezioni, digiuno, emicrania) e dal pH (aumento del pH accelera lo svuotamento a digiuno).

Il tratto GI è un canale muscolare cavo con una parete formata da tessuti organizzati in quattro strati concentrici, dal lume all'esterno: mucosa, sottomucosa, strati muscolare e fibro-sieroso. Il farmaco attraversa lo strato più interno, la mucosa, per raggiungere i vasi sanguigni presenti nella sottomucosa. La parte della mucosa più interna è costituita dall'epitelio di rivestimento, ricoperto da uno strato di muco. Le superfici di assorbimento dello stomaco, del tenue e del colon variano per anatomia e dimensioni: la presenza nella mucosa di pieghe, villi (circa 1 mm) e microvilli (orletto a spazzola, circa 1 micron) aumenta l'area di superficie dell'intestino tenue, disponibile per l'assorbimento.

L'assorbimento dal lume gastrointestinale al sangue avviene principalmente per diffusione passiva a livello del piccolo intestino, grazie all'elevata superficie assorbente (circa 200 m<sup>2</sup>), alla ricca vascolarizzazione (flusso ematico circa 1L/min), alla grande permeabilità e alla presenza di carrier specifici per il trasporto attivo, durante un tempo di transito di circa 3 ore.

Nello stomaco, nonostante la limitata area disponibile, si possono assorbire acidi deboli. Nel colon invece l'assorbimento è generalmente basso.

Nel tratto gastroenterico i farmaci possono subire degradazione chimica (es. idrolisi catalizzata da acidi nello stomaco) e enzimatica (idrolisi enzimatica) con importanti ripercussioni sull'efficacia di azione farmacologica. La protezione dei principi attivi mediante l'uso di sistemi bioadesivi a base di chitosano, limita tali effetti negativi.

Il maggior svantaggio della via orale consiste nel metabolismo di primo passaggio: i farmaci assorbiti, prima di raggiungere la circolazione sistemica, penetrano nei capillari e confluiscono nella vena mesenterica superiore e poi nella vena porta passando attraverso il fegato, dove possono essere metabolizzati e/o inattivati con riduzione o annullamento dell'attività farmacologica.

Pertanto, la biodisponibilità di un farmaco è definita come la percentuale della dose somministrata che entra nella circolazione sistemica ed è in grado di distribuirsi a tutto l'organismo.

## 2. PARTE SPERIMENTALE

L'uptake della maggior parte dei farmaci dalle membrane mucosali avviene mediante diffusione passiva e pertanto, è necessario garantire un gradiente di concentrazione sulla mucosa. Affinché ciò avvenga, il sistema di rilascio deve essere mantenuto in contatto con la membrana di assorbimento il più a lungo possibile. La strategia migliore è l'utilizzo di polimeri mucoadesivi che possono prolungare il tempo di contatto con la superficie mucosale provocando un aumento della concentrazione del farmaco al sito di assorbimento e conseguentemente aumentandone la biodisponibilità. Tra i polimeri mucoadesivi, il chitosano è il candidato preferenziale grazie alle sue innumerevoli proprietà. Tuttavia il chitosano a pH neutro è insolubile in acqua e dunque è incapace di aumentare l'assorbimento dei farmaci negli ambienti più basici dell'intestino tenue. Per superare questi ostacoli, nel nostro laboratorio in passato sono stati preparati derivati del chitosano a partire da chitosano a basso PM, caratterizzati da piccole catene laterali formate da gruppi ammoniacali quaternari adiacenti. Successivamente, su tali derivati sono stati introdotti gruppi tiolici mediante formazione di legami ammidici con acido tioglicolico. È noto che i residui tiolici presenti sul polimero sono in grado di aumentare la sua mucoadesività ed il tempo di residenza del sistema terapeutico al sito di assorbimento. I derivati così ottenuti, chiamati anche derivati tiolati o tiomeri, sono però instabili in soluzione poiché i gruppi tiolici sono soggetti a ossidazione a  $\text{pH} \geq 6$  e questo limita il loro carattere mucoadesivo.

Lo scopo della presente tesi è sintetizzare e caratterizzare una nuova classe di composti, chiamati chitosano-S-protetti, in cui i gruppi tiolici liberi sono protetti dall'ossidazione mediante addizione del ligando aromatico 6-mercaptonicotinammide. Durante questa reazione avviene la formazione di legami disolfuro tra i gruppi  $-\text{SH}$  del polimero e quelli del ligando aromatico che fa sì che i polimeri interagiscano maggiormente con le subunità ricche di

cisteina dello strato di muco. Pertanto la presente tesi si è articolata nelle seguenti fasi: 1) preparazione di coniugati chitosano-ammonio quaternario a partire da chitosano a basso peso molecolare; 2) introduzione di gruppi tiolici sui suddetti coniugati mediante formazione di legami ammidici con acido tioglicolico; 3) protezione dei gruppi tiolici mediante addizione di 6-mercaptonicotinammide; 4) caratterizzazione dei polimeri ottenuti per contenuto in gruppi tiolici e in ligando aromatico; 5) valutazione delle caratteristiche mucoadesive dei polimeri ottenuti.

## **2.1 Materiali e Metodi**

### **2.1.1 Materiali**

Sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- Chitosano a basso peso molecolare (Ch) (Sigma);
- Acido tioglicolico (TGA) (Sigma);
- 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil) carbodimmide cloridrato (EDAC) (Sigma);
- 2-dietilamminoetil cloruro (DEAE-Cl) (Fluka);
- Tiourea (Sigma);
- 6-cloronicotinammide (Sigma);
- Acido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (Reagente di Ellman) (Sigma);
- Glutatione ridotto (Sigma);
- Fluoresceina isotiocianato (FITC) (Sigma).

Tutte le soluzioni/dispersioni acquose sono state preparate con acqua deionizzata.

### 2.1.2 Sintesi del coniugato N<sup>+</sup>-Ch60

Grammi 0.5 di Ch furono disciolti in 20 mL di HCl 0.11 M (pH 4.7). Alla soluzione di Ch furono aggiunti in sequenza 2 g di DEAE-Cl HCl e 3 mL di NaOH al 15% sotto vigorosa agitazione alla temperatura di 60°C. In seguito all'aggiunta della soluzione di NaOH si formò una mucillagine per precipitazione del chitosano. 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 pHmetro immerso nella miscela di reazione ed aggiungendo NaOH acquoso concentrato quando necessario. Dopo completa dissoluzione della mucillagine, la miscela fu portata a pH7 con HCl 1 M. Quindi fu chiarificata per filtrazione, dializzata contro acqua per 3 giorni ed infine liofilizzata.

Il derivato così ottenuto viene indicato con la sigla N<sup>+</sup>-Ch60.

### 2.1.3 Attacco covalente di gruppi tiolici sul derivato N<sup>+</sup>-Ch60

Sul derivato N<sup>+</sup>Ch60 erano ancora presenti significative frazioni di unità di glucosammina non sostituite. Queste unità erano potenzialmente disponibili per l'attacco covalente di gruppi tiolici tramite la formazione di legami amidici 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<sup>+</sup>Ch60SH.

Nel corso della dialisi fu mantenuto un pH acido perché l'ossidazione del tiolo a disolfuro è favorita da ambienti neutri/alcalini. Il polimero rimase facilmente solubile in acqua. Il contenuto in tiolo del polimero tiolato rimase virtualmente immodificato dopo un anno dalla conservazione allo stato di liofilizzato a -20°C al buio.

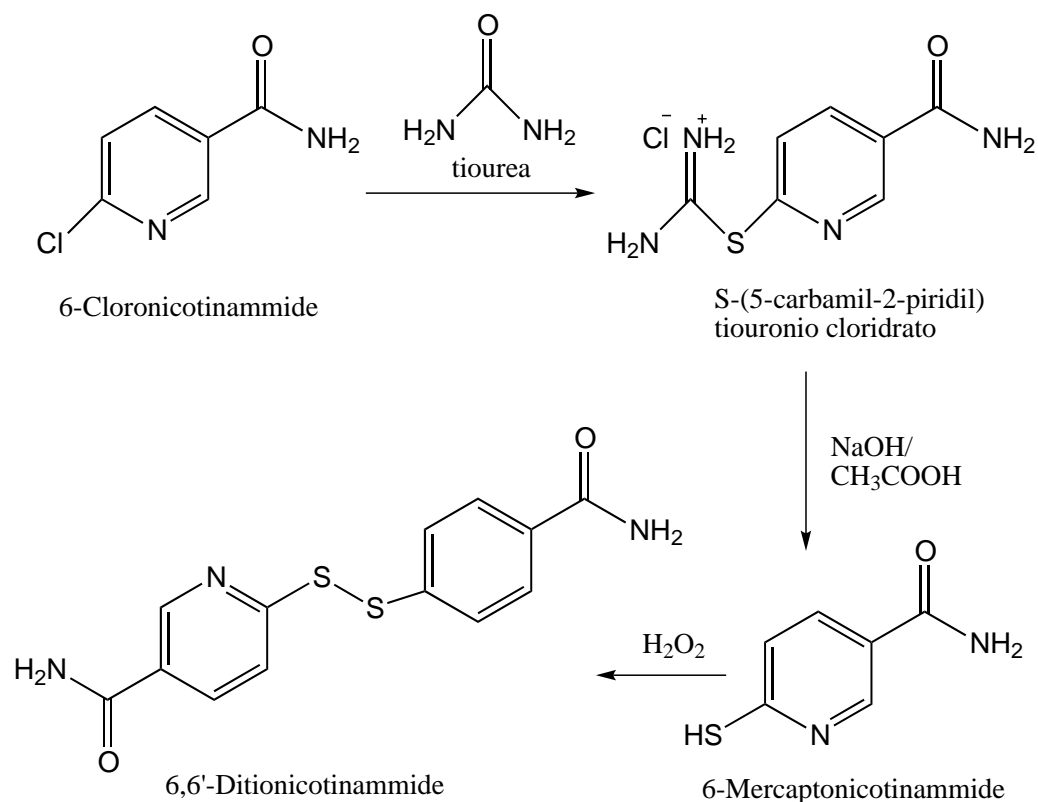


#### 2.1.4 Sintesi del ligando aromatico 6-mercaptonicotinammide (6-MNA)

Poiché la 6-mercaptonicotinammide (6-MNA) non è commercialmente disponibile, è stata sintetizzata secondo la procedura riportata da Forrest et al. (1948) e riportata schematicamente in **Figura 6**. Brevemente, 6-cloronicotinammide e tiourea (1:1) furono sospese in etanolo e reflusse per 6h sotto atmosfera inerte. La miscela di reazione fu poi raffreddata e agitata per 12h a temperatura ambiente. Il risultante sale S-(5-carbamil-2-piridil)-tiouronio cloridrato fu separato per filtrazione ed essiccato. Il sale secco fu decomposto attraverso l'aggiunta di una soluzione alcalina, e agitato per 45min a temperatura ambiente. Il pH fu portato a 4 con acido acetico glaciale. La risultante 6-MNA fu poi isolata per filtrazione, lavata con acqua ed essiccata.

Al fine di evitare l'ossidazione della 6-MNA, fu sintetizzato il dimero 6,6'-dithionicotinammide (6,6'-DTNA). In breve, 6-MNA fu sospesa in acqua e il pH fu portato a 7 prima dell'aggiunta di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e la miscela fu agitata per 1h a temperatura ambiente. La 6,6'-DTNA fu isolata per filtrazione, lavata con acqua ed essiccata.

Entrambi i reagenti erano solubili in DMSO ma non in acqua o altri solventi convenzionali.



**Figura 6:** Sintesi del ligando aromatico 6-mercaptonicotinamide

### 2.1.5 Sintesi del coniugato N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto

Il ligando aromatico 6-MNA fu legato covalentemente al derivato N<sup>+</sup>-Ch60SH attraverso la formazione di legami disolfuro tra la 6-MNA e i gruppi tiolici liberi del derivato N<sup>+</sup>-Ch60SH.

200 mg di N<sup>+</sup>-Ch60SH furono disciolti in 50 mL di una miscela acqua/DMSO (3:7) sotto agitazione. Per evitare la precipitazione del ligando aromatico, dovuta alla sua insolubilità in acqua, 50 mg di 6,6'-DTNA furono disciolti in 50 mL di DMSO e aggiunti alla soluzione polimerica. La miscela fu portata a pH 6.2, agitata per 6h a temperatura ambiente, chiarificata per filtrazione, dializzata 7 volte contro acqua ed infine liofilizzata previa centrifugazione per allontanare 6,6'-DTNA non reagito che precipitava nel tubo durante la dialisi.

Il derivato così ottenuto viene indicato con la sigla N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto.

### 2.1.6 Determinazione del contenuto di gruppi tiolo e disolfuro nei derivati N<sup>+</sup>-Ch60SH e N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto

Per determinare i gruppi tiolici i polimeri N<sup>+</sup>-Ch60SH o N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto (15 mg) furono sciolti in 10 mL di acqua, fu aggiunta una soluzione acquosa all'1% di amido (1mL), il pH fu aggiustato a 3 con HCl 1 M e la soluzioni furono titolate con una soluzione acquosa di iodio 1 mM fino ad una permanente colorazione azzurra [Kast and Bernkop-Schürch (2001)].

Per determinare i gruppi disolfuro, questi furono ridotti a tioli aggiungendo 8 mL di sodio boroidruo acquoso al 10% ad una soluzione di 15 mg di polimero in 2 mL di acqua ed agitando per 1 ora. Quindi l'eccesso di sodio boroidruo fu distrutto portando la soluzione a pH3 con HCl 1 M ed il contenuto di tioli fu determinato mediante titolazione iodometrica descritta precedentemente.

Per confronto i gruppi tiolici furono quantificati anche mediante reazione di Ellman. Milligrammi 0.5 di ciascun derivato N<sup>+</sup>-Ch60SH o N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto furono sciolti in 0.5 mL di tampone fosfato pH8, 0.5 M (TBS) e fu aggiunto il reagente di Ellman. Dopo incubazione per 120 minuti a 37 °C e al riparo dalla luce, l'assorbanza di ciascun campione fu misurata a  $\lambda=450$  nm con riferimento alla retta di calibrazione ottenuta a concentrazioni crescenti di TGA. Per determinare i gruppi disolfuro, la reazione di Ellman fu effettuata dopo riduzione di questi a tioli aggiungendo 1 mL di sodio boroidruo acquoso al 10% ad una soluzione di polimero alla concentrazione 1mg/mL in TBS ed agitando per 1 ora. Dopo l'aggiunta del reagente di Ellman le miscele furono incubate per 120 minuti a 37 °C e al riparo dalla luce e l'assorbanza fu determinata come descritto precedentemente.

Il contenuto in disolfuro fu ottenuto per differenza tra i contenuti in tiolo dei derivati N<sup>+</sup>-Ch60SH e N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto ridotti e non ridotti. I contenuti in tiolo libero e disolfuro furono espressi come  $\mu\text{mol}$  per g di polimero.

### 2.1.7 Quantificazione del ligando aromatico 6-MNA

Per determinare il contenuto in ligando aromatico, a soluzioni del derivato N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto allo 0.1% fu aggiunta una soluzione di glutatione ridotto (GSH) allo 0.1%. In queste condizioni, il ligando aromatico fu scambiato e la quantificazione del monomero rilasciato fu determinata spettrofotometricamente a  $\lambda=307$  nm con riferimento alla retta di calibrazione ottenuta a concentrazioni crescenti di 6-MNA.

### 2.1.8 Analisi NMR del polimero N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto

Le misure NMR sono state condotte impiegando uno spettrometro Varian INOVA 600 operante a 600 MHz per i nuclei <sup>1</sup>H. Durante l'acquisizione la temperatura (25 °C) è stata controllata per mezzo dell'unità di controllo Varian (accuratezza  $\pm 0.1$  °C). I campioni sono stati analizzati in una miscela di DMSO-d<sub>6</sub> e D<sub>2</sub>O (7:3).

### 2.1.9 Marcatura dei derivati N<sup>+</sup>-Ch60, N<sup>+</sup>-Ch60SH e N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto 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 N<sup>+</sup>-Ch60 o N<sup>+</sup>-Ch60SH o N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto (20 mL, 2mg/mL) e la miscela fu incubata a 4°C per 8 ore. Successivamente la soluzione fu passata 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 G-15 trattene fluorescenza e ciò indicò in tutti i casi l'assenza di FITC non reagita e quindi la completa marcatura del polimero. Quindi il legame fluoroforo legato al polimero fu calcolato e risultò essere il 5% della massa totale (0.13 mmol/g).

### *2.1.10 Purificazione del muco*

Il muco porcino fu prelevato dall'intestino tenue di un maiale macellato di fresco. Il muco fu purificato e omogeneizzato mediante addizione di 5 mL di NaCl 0.1 M per grammo di muco, seguita da agitazione per 1h a 10 °C. Successivamente, la miscela fu centrifugata (9000 rpm, 4°C, 2h), il surnatante allontanato ed il muco separato dal materiale granulare.

### *2.1.11 Studi di diffusione attraverso muco intestinale purificato con il metodo del tubo rotante*

Per studiare il trasporto dei polimeri N<sup>+</sup>-Ch60 o N<sup>+</sup>-Ch60SH o N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto attraverso la barriera mucosale, 300 µL di muco purificato e 50µL di una soluzione 2 mg/mL dei polimeri N<sup>+</sup>-Ch60 o N<sup>+</sup>-Ch60SH o N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto marcati con FITC in tampone fosfato pH 7.4, 0.13 M (TP) furono inseriti in un tubo di silicone di diametro interno 3 mm e altezza 30 mm e chiuso alle estremità con piccoli tappi di silicone. Il tubo fu mantenuto a 37 °C sotto continua rotazione per 5h al termine delle quali fu congelato a -20 °C e tagliato in fette da 2 mm ciascuna, iniziando dall'estremità in cui furono inserite le soluzioni polimeriche. Ogni fetta fu poi analizzata fluorometricamente con riferimento alla relativa curva di calibrazione.

### 2.1.12 Studio in vitro del trasporto acqua-assistito attraverso il muco

Lo strato di muco fu realizzato riempiendo una siringa di plastica da 1 mL con 300  $\mu$ L di muco purificato. La siringa fu mantenuta in posizione verticale e fu impedito al muco di fuoriuscire dalla punta della siringa utilizzando un filtro da 0.2  $\mu$ m. 50 $\mu$ L di una soluzione 2 mg/mL dei polimeri N<sup>+</sup>-Ch60 o N<sup>+</sup>-Ch60SH o N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto marcati con FITC in TP sul filtro prima dell'aggiunta del muco. Un flusso di tampone fosfato pH 6.8 (PBS) attraverso lo strato di muco fu realizzato collegando la punta della siringa ad un serbatoio mediante un tubo flessibile, riempiendo il serbatoio con PBS in modo che il livello tra siringa e serbatoio fosse uguale. In questo modo fu creato un flusso di PBS di 125  $\mu$ L/h che non causò miscelazione dello strato di muco. Il sistema fu mantenuto in posizione verticale a 37 °C per 5h, al termine delle quali il surnatante presente sullo strato di muco fu prelevato e la siringa fu congelata e tagliata in fette da 2 mm ciascuna, iniziando dall'estremità in cui furono inserite le soluzioni polimeriche. Ogni fetta e il surnatante furono poi analizzati fluorometricamente con riferimento alla relativa curva di calibrazione.

### 2.1.13 Sinergismo reologico delle miscele muco-polimeri N<sup>+</sup>-Ch60, N<sup>+</sup>-Ch60SH e N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto

Le proprietà mucoadesive furono determinate mediante sinergismo reologico misurando la viscosità delle miscele dei polimeri N<sup>+</sup>-Ch60 o N<sup>+</sup>-Ch60SH o N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto a 37 $\pm$ 0.1 °C con un viscosimetro (RheoWave 1, Haake) utilizzando un piatto-cono C-60/4°. Il gap fu impostato a 0.5 mm e lo shear rate a 50 sec<sup>-1</sup>. Le miscele furono ottenute aggiungendo 1 mL di una soluzione di ciascun polimero N<sup>+</sup>-Ch60 o N<sup>+</sup>-Ch60SH o N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto in TP (concentrazione 2 mg/mL) a 3 mL di muco purificato. Dopo preparazione, i campioni furono equilibrati a 37 °C per 30 min e fu

determinata la loro viscosità.

In accordo con Hassan-Gallo (1990) il coefficiente di viscosità  $\eta$ , di una soluzione idrofilica di mucina e di un polimero mucoadesivo deriva dal contributo additivo dei coefficienti di viscosità della mucina,  $\eta_m$ , e del polimero  $\eta_p$  e della viscosità dovuta all'interazione mucina-polimero,  $\eta_{mp}$ . Dopo aver misurato  $\eta$ ,  $\eta_m$ , e  $\eta_p$ , l'interazione fu calcolata come:

$$\eta_{mp} = \eta - \eta_m - \eta_p \quad (1)$$

I valori di  $\eta_{mp}$  furono usati per una valutazione comparativa della mucoadesività dei polimeri.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONI

#### 3.1 Sintesi del coniugato N<sup>+</sup>-Ch60

La reazione di Ch commerciale ( $M_w = 590$  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<sup>+</sup>Ch, precisamente, N,O-[N,N-dietilamminometil(dietildimetilene ammonio)<sub>n</sub>] metilchitosani, contenenti piccole catene pendenti costituite da un piccolo numero di gruppi ammonici 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 ammonici quaternari in ogni piccola catena (n) dipendeva fortemente dal pH della miscela di reazione, che doveva essere strettamente controllato al valore di 8 affinché la reazione di sintesi fosse riproducibile (Zambito et al., 2008).

Nella presente tesi, la reazione fu effettuata a partire da Ch ( $M_w = 524$  kDa). Il coniugato ottenuto portava la media di una carica positiva per unità di ripetizione, che è forse la massima possibile per questo tipo di polimeri.

I rispettivi valori di GS e n sono riportati nella **Tabella 5.1**.

#### 3.2 Attacco covalente dei gruppi tiolici sul derivato N<sup>+</sup>-Ch60

Dai valori di GS e di acetilazione riportati nella **Tabella 5.1**, risulta che sul derivato N<sup>+</sup>-Ch60 erano ancora presenti significative frazioni di unità di glucosammina non sostituite potenzialmente disponibili per l'attacco covalente di gruppi tiolici tramite la formazione di legami ammidici tra il gruppo amminico primario della glucosammina ed il gruppo carbossilico del TGA. La nostra analisi ha infatti dimostrato la presenza di gruppi tiolo e



disolfuro legati in modo covalente, le cui frazioni nei prodotti N<sup>+</sup>-Ch60-SH si trovano nella **Tabella 5.2**. Nella fase ricevente della dialisi è stato introdotto NaCl, usata per purificare i polimeri tiolati, allo scopo di facilitare l'allontanamento del TGA anionico non reagito e la sua sostituzione con cloruro come controanione. Nel corso della dialisi fu mantenuto un pH acido perché l'ossidazione del tiolo a disolfuro è favorita da ambienti neutri/alcalini. Nonostante tutto, la maggior parte dei tioli subì ossidazione, come appare dal confronto tra contenuto di disolfuro e tioli.

### **3.3 Caratterizzazione del derivato N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto**

Il contenuto in gruppi tiolo e disolfuro è stato determinato mediante titolazione iodometrica e reazione di Ellman come descritto nel paragrafo 2.1.6 ed è riportato nella **Tabella 5.2**. I risultati indicano che la formazione dei legami disolfuro tra i gruppi tiolici del derivato N<sup>+</sup>-Ch60SH e il ligando aromatico 6,6'-DTNA è stata ottenuta.

La struttura piridinica è stata covalentemente attaccata al tiomero e può essere rilasciata mediante addizione di agenti riducenti o composti contenenti gruppi tiolici. Per determinare il contenuto in ligando aromatico, glutatione ridotto fu aggiunto alla soluzione del polimero N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto per il rilascio di 6-MNA come descritto nel paragrafo 2.1.7. Il risultante derivato N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto aveva 73.6 μmol di 6-MNA per grammo di tiomero. Polimeri titolati senza aggiungere previamente GSH mostravano di contenere una quantità di 6-MNA non significativa. Confrontando il contenuto in disolfuro del campione N<sup>+</sup>-Ch60SH con il campione N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto si osserva che il valore relativo al primo è circa la metà del secondo, ciò indica che tutti i gruppi tiolici presenti in N<sup>+</sup>-Ch60SH risultano completamente protetti. Infatti nella titolazione del polimero N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto dopo riduzione dei ponti disolfuro andremo a titolare gli SH del polimero e quelli di 6-MNA.

### 3.4 Analisi NMR del derivato N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto

Nella **Figura 5.1** è riportato lo spettro <sup>1</sup>H NMR del polimero in D<sub>2</sub>O. Esso presenta segnali nella regione a basse frequenze, in una regione intermedia compresa tra 5 e 2 ppm e segnali di bassa intensità nella regione tipica dei nuclei aromatici. Per quanto riguarda la regione a basse frequenze sono individuabili i segnali che originano dai protoni dei raggruppamenti metilici delle catene polimeriche e un singoletto attribuibile al metile acetilico del chitosano (1.92 ppm). I protoni di anello risuonano, invece, nella regione intermedia caratterizzata da un'elevata sovrapposizione spettrale. In tale regione risuonano, infatti, anche i protoni dei raggruppamenti metilenici legati all'azoto delle catene polimeriche e quelli dei gruppi adiacenti allo zolfo. Il protone anomero del polimero risuona a 4.40 ppm. Nella regione ad alte frequenze sono principalmente presenti due set di segnali in rapporto 7:3 compatibili con lo scheletro della nicotinammide: il set di segnali più intensi è costituito da un doppietto con costante di accoppiamento vicinale di 8.5 Hz (7.86 ppm), un doppiodoppietto a 8.05 ppm con una costante di accoppiamento vicinale (8.5 Hz) e una costante a quattro legami (2.3 Hz) ed un doppietto centrato a 8.65 ppm (J=2.3 Hz). A 7.80 ppm, 8.07 ppm e 8.66 ppm risuonano i corrispondenti protoni del secondo set di risonanze. Il confronto tra lo spettro protonico del reattivo 6,6'-dithionicotinammide, praticamente insolubile in H<sub>2</sub>O ma solubile in miscela di DMSO e H<sub>2</sub>O (7:3), e lo spettro del polimero N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto è stato possibile registrando gli spettri nella medesima miscela. Tale confronto permette di concludere che i segnali presenti nella regione ad alte frequenze dello spettro del polimero non sono attribuibili ai segnali del reattivo e, quindi, sono dovuti a nicotinammide legata al polimero. La natura della derivatizzazione ed il contenuto della componente contenente la nicotinammide sono oggetto di investigazioni spettroscopiche tuttora in corso.

### 3.5 Studi di diffusione attraverso muco intestinale purificato col metodo del tubo rotante

La diffusione di polimeri carichi positivamente attraverso il muco potrebbe essere ridotta a causa dell'interazione con le molecole di mucina cariche negativamente. Questa diffusione potrebbe essere ulteriormente ridotta nel caso di polimeri contenenti gruppi tiolici capaci di interagire con le subunità ricche di cisteina dello strato di muco.

I dati riportati nella **Figura 5.2** indicano che il polimero N<sup>+</sup>-Ch60, sebbene mucoadesivo, è capace di diffondere attraverso il tubo di silicone insieme al muco intestinale fino all'ultima fetta. Nel caso del derivato N<sup>+</sup>-Ch60SH, essendo questo maggiormente mucoadesivo, la concentrazione di polimero nelle fette 10 e 11 è significativamente più bassa rispetto al caso precedente, mentre nella fetta 1 è significativamente maggiore proprio a causa del maggiore carattere mucoadesivo dovuto alla presenza di gruppi tiolici liberi. Il derivato N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto era capace di diffondere attraverso il muco fino alla fetta 8 e nelle fette successive la sua concentrazione era al di sotto della concentrazione minima determinabile. Nelle fette 1, 2 e 3 la sua concentrazione era circa il doppio rispetto ai derivati N<sup>+</sup>-Ch60 e N<sup>+</sup>-Ch60SH. La ragione di questa più bassa diffusione può essere dovuta al fatto che così come avevamo previsto nel rationale di questo studio i derivati S-protetti grazie ad una reazione di scambio tiolo/disolfuro con le subunità cisteiniche all'interno del muco, sono più mucoadesivi dei rispettivi polimeri progenitori N<sup>+</sup>-Ch60 e N<sup>+</sup>-Ch60SH. Ciò dimostra che la protezione dei gruppi tiolici rende i gruppi tiolici più stabili al pH neutro del muco. Ciò si traduce in una maggiore capacità di formazione di ponti disolfuro con le subunità cisteiniche del muco piuttosto che nell'ossidazione dei gruppi tiolici che si osserva in ambiente neutro.

### **3.6 Studio in vitro del trasporto acqua-assistito attraverso il muco**

Il metodo del tubo rotante potrebbe non essere rappresentativo di ciò che accade in vivo, infatti non tiene conto del movimento dell'acqua esistente nell'intestino. Nell'intestino esistono infatti due flussi d'acqua, quello longitudinale dal duodeno al colon e quello trasversale dal lume all'epitelio attraverso il muco che lo ricopre e viceversa. Infatti il ruolo fondamentale dell'intestino è l'assorbimento di nutrienti e sali che implicano l'assorbimento di acqua per bilanciare l'osmolarità del sangue. Il metodo sperimentale del tubo rotante, i cui risultati sono stati descritti nel paragrafo precedente, non tiene conto della presenza di questo flusso longitudinale di acqua che potrebbe influenzare enormemente la diffusione di macromolecole mucoadesive attraverso il muco.

I risultati dello studio effettuati secondo il procedimento descritto nel paragrafo 2.1.11 sono riportati in **Figura 5.3**. La distribuzione dei polimeri N<sup>+</sup>-Ch60, N<sup>+</sup>-Ch60-SH e N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto nelle sezioni di muco dopo 5h di esperimento, mostra una distribuzione irregolare che può essere dovuta alla naturale variabilità dell'esperimento. Nonostante questo, la distribuzione di ogni polimero nello strato di muco è sostanzialmente uniforme. Dall'analisi della concentrazione di ogni polimero nel surnatante si può dedurre che il trasporto attraverso il muco nel caso del derivato N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto è più lento rispetto al derivato N<sup>+</sup>-Ch60-SH e ciò è in accordo con i risultati ottenuti con il metodo del tubo rotante. Tuttavia se si confrontano questi dati con quelli riportati in **Figura 5.2** si osserva che anche il polimero più mucoadesivo N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto riesce ad attraversare completamente strato di muco tanto che la concentrazione di questo polimero che si ritrova nel surnatante non è significativamente differente da quella relativa al polimero N<sup>+</sup>-Ch60-SH non protetto, ma è significativamente più bassa di quella del polimero N<sup>+</sup>-Ch60, che ha un minore carattere mucoadesivo.

Questi dati dimostrano quanto il naturale flusso di acqua dal lume all'epitelio possa influenzare il trasporto di macromolecole mucoadesive attraverso il muco.

### **3.7 Sinergismo reologico delle miscele muco-polimeri N<sup>+</sup>-Ch60, N<sup>+</sup>-Ch60SH e N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto**

I risultati dell'analisi viscosimetrica sono riportati in **Figura 5.4** e in **Tabella 5.3**. Dai valori di viscosità si vede che c'è un sinergismo reologico delle miscele muco-polimeri. Questo effetto è maggiore con il derivato N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto, rispetto ai N<sup>+</sup>-Ch60 e N<sup>+</sup>-Ch60SH. I dati sono in accordo con i risultati ottenuti con gli studi di diffusione attraverso il muco intestinale purificato e dimostrano che il derivato N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto permane nello strato di muco per un tempo maggiore rispetto ai polimeri progenitori in virtù del suo maggiore carattere mucoadesivo.

## 4. CONCLUSIONI

Derivati del chitosano multifunzionali, chiamati chitosano-S-protetti sono stati sintetizzati e caratterizzati in termini di mucoadesione.

La protezione dei gruppi tiolici liberi sulle catene polimeriche riduce il rischio dell'ossidazione precoce dei tioli, rendendo i derivati maggiormente mucoadesivi. Gli studi di diffusione, usando il tubo di silicone rotante e il sinergismo reologico delle miscele muco-polimeri, hanno infatti dimostrato che i derivati del chitosano-S-protetti rimangono nello strato di muco per un tempo maggiore rispetto ai polimeri progenitori, poiché il trasporto attraverso il muco è fortemente influenzato dalla loro mucoadesività. Tuttavia, mediante lo studio del trasporto acqua-assistito attraverso il muco, è stato dimostrato che, nonostante i polimeri mucoadesivi interagiscano in maniera efficace con lo strato di muco, sono capaci di oltrepassare questa barriera per effetto del movimento dell'acqua dal lume all'epitelio dello strato mucosale.

Dunque, tali derivati del chitosano multifunzionale, possono essere considerati il punto di partenza per la preparazione di nanoparticelle mucoadesive come veicolo per il trasporto dei farmaci attraverso la mucosa gastrointestinale.

## 5. FIGURE E TABELLE

**Tabella 5.1:** Grado di acetilazione (GA), grado di sostituzione (GS), rapporto tra atomi di azoto quaternari e terziari (n), grado di sostituzione dei gruppi tiolici (GS tioli) e densità di carica positiva (DC)<sup>a</sup>. Ciascun valore rappresenta la media di almeno tre preparazioni.

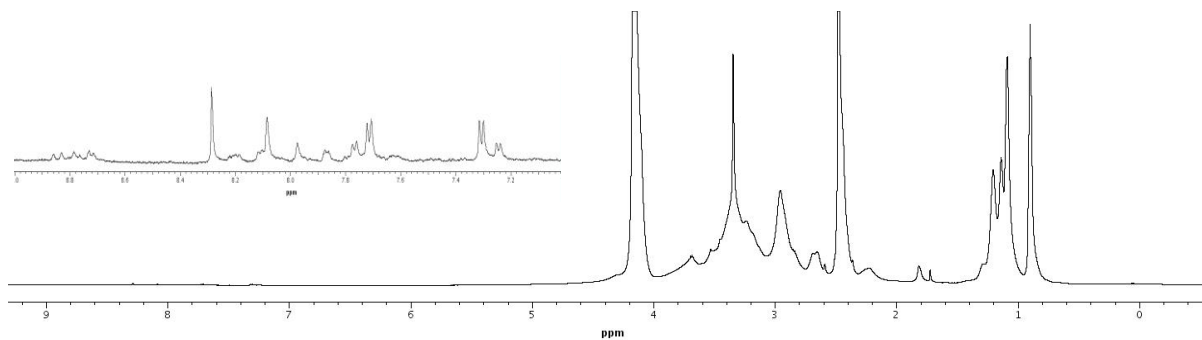
Polimero	GA (%±DS)	GS (%±DS)	n±DS	DC
N <sup>+</sup> -Ch60	14.9±0.5	59.1±3.1	2.0±0.1	1.2

<sup>a</sup> numero di ioni ammonio quaternario per unità di ripetizione.

**Tabella 5.2:** Medie dei risultati dell'analisi iodometrica e della reazione di Ellman dei polimeri N<sup>+</sup>-Ch60SH e N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto. Media ± DS di almeno 3 preparazioni.

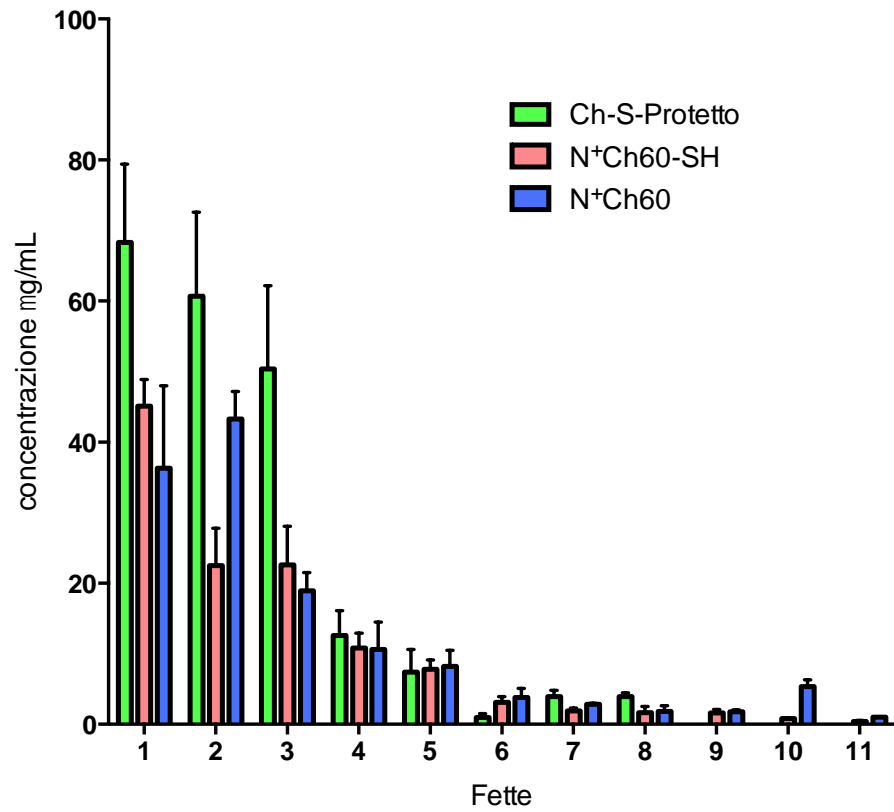
Polimero	GS <sup>a</sup> Tioli (%)	Contenuto in tiolo (µmol/g)	Contenuto in disolfuro (µmol/g)
N <sup>+</sup> -Ch60SH	1.1±0.5	24.6±0.9	271±75.0
N <sup>+</sup> -Ch60-S-protetto	0.8±0.4	19.0±0.7	600±64.1

<sup>a</sup>grado di sostituzione sulle unità di ripetizione del polimero.

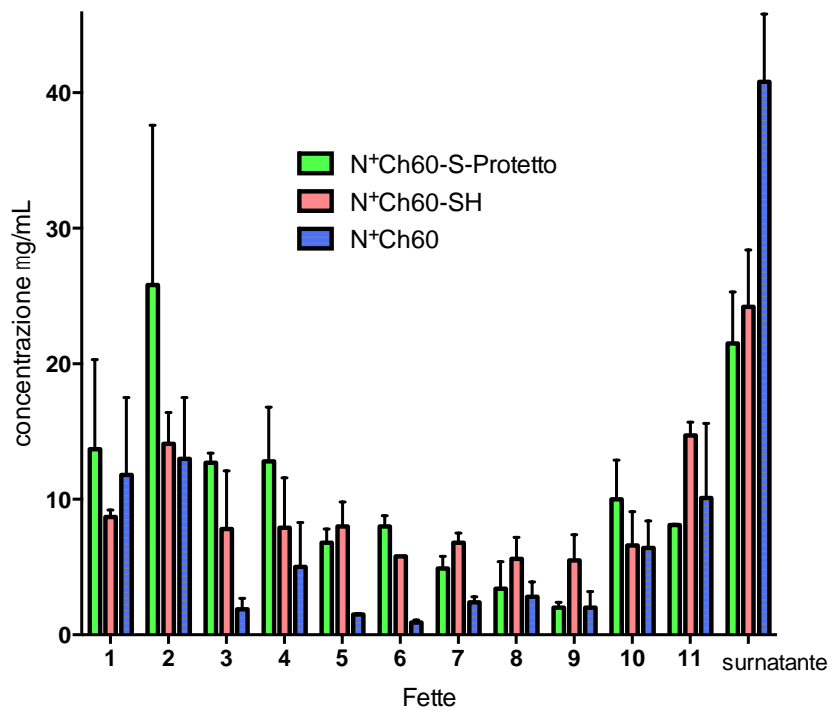


**Figura 5.1:** Spettro  $^1\text{H}$  NMR(600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}= 7:3$ ,  $25\text{ }^\circ\text{C}$ ) di  $\text{N}^+$ -Ch60-S-protetto.





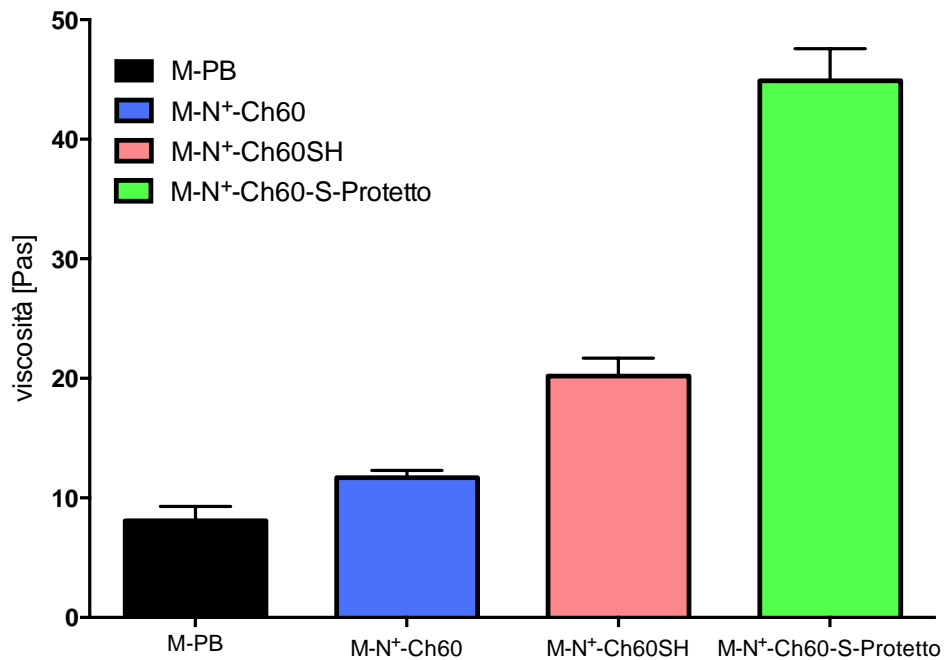
**Figura 5.2:** Studi di diffusione dei polimeri N<sup>+</sup>-Ch60, N<sup>+</sup>-Ch60-SH e N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto attraverso il muco intestinale di maiale purificato per 5h a 37 °C. (Media±DS, n=3).



**Figura 5.3:** Risultati del trasporto acqua-assistito dei polimeri N<sup>+</sup>-Ch60, N<sup>+</sup>-Ch60-SH e N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto per 5h a 37 °C. (Media±DS, n=3).

**Tabella 5.3:** Effetto dei polimeri N<sup>+</sup>-Ch60, N<sup>+</sup>-Ch60-SH e N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto sulla viscosità della miscela muco-polimero. Viscosità del polimero ( $\eta_p$ ), viscosità dovuta all'interazione muco-polimero ( $\eta_{mp}$ ), contributo di questa interazione alla viscosità del sistema muco-polisaccaride ( $\eta_{mp}/\eta$ ).

Formulazione	$\eta_{mp}^a$ , Pas	$\eta_{mp}/\eta^a$ %
N <sup>+</sup> -Ch60	2.9	24.5
N <sup>+</sup> -Ch60-SH	11.4	56.3
N <sup>+</sup> -Ch60-S-protetto	36.1	80.3



**Figura 5.4:** Valori di viscosità dei polimeri N<sup>+</sup>-Ch60, N<sup>+</sup>-Ch60-SH e N<sup>+</sup>-Ch60-S-protetto in miscela con muco intestinale purificato. (Media $\pm$ DS, n=3).

## BIBLIOGRAFIA

Burgalassi S, Chetoni P, Saettone M. F., 1996. Hydrogels for ocular delivery of pilocarpine: preliminary evaluation in rabbits of the influence of viscosity and of drug solubility. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 42:385-392.

Cone R. A., 1999. Mucus. *In Mucosal Immunology*, 2nd edition. P. L. Ogra, J. Mestecky, M. E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, and J. R. McGhee, editors. Academic Press, San Diego.

Di Colo, G., Zambito, Y., Zaino, C., and Sanso, M., 2009. 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(8):941-949.

Dünnhaupt S., Barthelmes J., Rahmat D., Leithner K., Thurner C.C., Friedl H., Bernkop-Schnürch A, (2012). S-protected thiolated chitosan for oral delivery of hydrophilic macromolecules: evaluation of permeation enhancing and efflux pump inhibitory properties. *Molecular Pharmaceutics*. 9(5), 1331-1341.

Forrest, H.S.; Walker, J. 1948. Chemotherapeutic agents of the sulphone type. Part V. 2: 5-Disubstituted derivatives of pyridine. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 393:1939–1945

Ganga S., 2007. Mucosal Drug Delivery. Pharmainfo.net, Vol. 5.

Hassan, E.E., Gallo, J.M., 1990. A simple rheological method for the in vitro assessment of mucin-polymer bioadhesive bond strength. *Pharmaceutical research* 7 (5), 491-495

Herrero-Vanrell R., Fernandez-Carballido A., Frutos G., Cadorniga R., 2000. Enhancement of the mydriatic response to tropicamide by bioadhesive polymers. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 16:419-428.

Iqbal, J.; Shahnaz, G.; Dünnhaupt, S.; Müller, C.; Hintzen, F.; Bernkop-Schnürch, A., 2012. Preactivated thiomers as mucoadhesive polymers for drug delivery. *Biomaterials*, 33, 1528-1535.

Kast, C.E., Bernkop-Schnürch, A., 2001. Thiolated polymers–thiomers: Development and in vitro evaluation of chitosan–thioglycolic acid conjugates. *Biomaterials*. 22:2345–2352

Lai S. K., Wang Y. Y. & Hanes J., 2009. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 158–171.

Leitner, V.M., Walker, G.F., Bernkop-Schnürch, A., 2003. Thiolated polymers: evidence for the formation of disulphide bonds with mucus glycoproteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 56, 207–214.

Peniche, H. and Peniche, C., 2011. Chitosan nanoparticles: a contribution to nano medicine. *Polymer International*, 60(6): 883 889.

Punitha, S., Girish, Y., 2010. Polymers in mucoadhesive buccal drug delivery system. *International Journal of Research and Pharmaceutical Sciences*, Vol.-1, 170-186.

Rajput, G.C., Dr. Majmudar, F.D., Dr. Patel, J.K., Patel, K.N., Thakor, R.S., Patel, B.P., Rajgor, N.B., 2010. Stomach Specific Mucoadhesive Tablets as Controlled Drug Delivery System. *International Journal on Pharmaceutical and Biological Research*, Vol.- 1, 30-41.

Riva, R., Ragelle, H., Des Rieux, A., Duhem N., Jérôme, C., Prémat, V., 2011. Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Advances in Polymer Science*, 244: 19–44

Sachan Nikhil, K., Bhattacharya, A., 2009. Basics and Therapeutic Potential of Oral Mucoadhesive Microparticulate Drug Delivery Systems, *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, Vol.-1,10-14.

Shaikh R, Raj Singh T. R, Garland M. J, Woolfson A. D, Donnelly R. F., 2011 Mucoadhesive drug delivery systems. *Journal of pharmacy and bioallied Sciences*, 3:89-100.

Zambito, Y., Uccello-Barretta, G., Zaino, C., Balzano, F., Di Colo, G., 2006. Novel transmucosal absorption enhancers obtained by aminoalkylation of chitosan. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(5):460-9.

Zambito, Y., Zaino, C., Uccello-Barretta, G., Balzano, F., and Di Colo, G. 2008. Improved synthesis of quaternary ammonium-chitosan conjugates (n+ch) for enhanced intestinal drug permeation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33:343 - 350.