



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Scienze e Tecnologie Farmaceutiche

Ciclo XXVIII

Studio di formulazione e caratterizzazione di nanoparticelle a base di trimetil chitosano e sodio alginato per il rilascio mirato di farmaci

Settore scientifico disciplinare di afferenza

CHIM/09

Presentata da: Dott.ssa Luisa Marci

Coordinatore Dottorato: Prof. Elias Maccioni

Tutor: Prof.ssa Anna Maria Maccioni

Esame finale anno accademico 2014 – 2015

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Scienze e Tecnologie Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2012/2013– XXVIII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1 "Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali".

Indice

ABSTRACT	IV
PARTE I	1
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE	2
1.1 I polimeri naturali come sistemi di <i>drug delivery</i>	2
1.2 Caratteristiche chimico-fisiche del chitosano.....	4
1.3 Derivati del chitosano: il trimetilchitosano (TMC)	7
1.4 Il sodio alginato	10
1.5 Complessi polielettrolitici e nanoparticelle	12
1.6 Scopo della ricerca.....	14
CAPITOLO 2 MATERIALI E METODI	15
2.1 Materiali	15
2.2 Metodi.....	16
2.2.1 Sintesi del TMC e determinazione del grado di quaternizzazione	16
2.2.2 Preparazione delle NPs di TMC/SA	18
2.2.3 Analisi dimensionale e della carica superficiale.....	19
2.2.4 Analisi al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)	21
2.2.5 Analisi di Spettroscopia Infrarossa in Trasformata di Fourier (FTIR)	22
2.2.6 Studi di stabilità delle dispersioni nanoparticellari.....	23
2.3 Analisi statistica.....	23
CAPITOLO 3 RISULTATI E DISCUSSIONE	24
3.1 Sintesi e caratterizzazione ¹ H-NMR del TMC	24
3.2 Studi di formulazione e caratterizzazione delle nanoparticelle di TMC/SA ...	27
3.2.1 Effetto della mass ratio TMC/SA	29
3.2.2 Effetto della variazione di concentrazione del sodio alginato	29
3.2.3 Effetto della variazione di concentrazione del TMC	30
3.2.4 Effetto della variazione di concentrazione del TPP	30

3.2.5 Effetto della sonicazione.....	32
3.3 Studi di stabilità.....	33
3.4 Analisi FTIR.....	34
3.5 Caratterizzazione ¹ H-NMR delle interazioni tra polimeri nelle NPs	36
3.6 Analisi al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM).....	38
CAPITOLO 4 CONCLUSIONI.....	39
PARTE II.....	41
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE GENERALE.....	42
1.1 La via di somministrazione nasale	42
1.2 Cenni di anatomia e fisiologia del naso.....	43
1.2.1 L'epitelio respiratorio e la clearance mucociliare.....	44
1.2.2 La regione olfattiva.....	45
1.3 <i>Nose to brain drug delivery</i>	46
1.4 Trasporto di carrier nanoparticellari attraverso la via <i>nose to brain</i>	49
1.5 Il chitosano e i suoi derivati per il delivery nasale di farmaci.....	50
1.6 Le malattie neurodegenerative.....	51
1.6.1 La malattia di Alzheimer	53
1.6.2 La malattia di Parkinson	55
1.7 Scopo della ricerca.....	57
CAPITOLO 2 NANOPARTICELLE DI TMC/SA VEICOLANTI IL PROGESTERONE.....	58
2.1 Introduzione.....	58
2.2 Materiali e metodi.....	60
2.2.1 Materiali.....	60
2.2.2 Metodi.....	60
2.3 Risultati e discussione	64
2.3.1 Preparazione e caratterizzazione delle PG-NPs.....	64
2.3.2 Determinazione dell'efficienza di incapsulazione.....	65
2.3.3 Studi di rilascio in vitro	65

2.3.4 Studi di stabilità delle dispersioni nanoparticellari.....	67
CAPITOLO 3 NANOPARTICELLE DI TMC/SA VEICOLANTI LA LEVODOPA	69
3.1 Introduzione.....	69
3.2 Materiali e metodi.....	72
3.2.1 Materiali.....	72
3.2.2 Metodi.....	73
3.3 Risultati e discussione	76
3.3.1 Preparazione e caratterizzazione delle NPs di LD _{HCl} e delle NPs di LD _{ME}	76
3.3.2 Determinazione dell'efficienza di incapsulazione	77
CAPITOLO 4 CONCLUSIONI	78
BIBLIOGRAFIA.....	80

ABSTRACT

The purpose of this study was to develop positively charged nanoparticles (NPs) based on trimethyl chitosan (TMC) and sodium alginate (SA) as drug delivery systems able to interact with the sialic residues of the mucous membranes. The TMC has been synthesised in our laboratory slightly modifying literature procedure, and characterised by $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. NPs were prepared with the ionotropic gelation method, using sodium tripolyphosphate (TPP) as cross-linking agent. Ten different nanoparticle formulations were developed by varying the concentration of one component, while keeping constant the other two, or by varying the ratio between the components. The aim of this formulation study was to determine the effect of both polymers and cross-linker concentrations and their ratios on nanoparticle dimensional parameters, such as mean size, size distribution, and surface charge. Overall results of the formulation study indicated that samples prepared with 2 mg/mL TMC concentration and different SA concentrations, namely 1 or 2 mg/mL, showed the best dimensional features, while the optimum concentration of cross-linking agent was 1 mg/mL. Moreover, nanoparticles showed a positive charge surface, suitable to interact with mucous membranes. Preliminary morphological examination of NPs was performed by scanning electron microscopy (SEM), and the interactions between polymers were examined by FTIR and $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy.

The formulations which show best results in terms of size, size distribution, and surface charge have been used for the encapsulation of two model drugs for

nose to brain drug delivery, progesterone (PG-NPs) and levodopa (LD-NPs), at different concentrations. Indeed, recent developments have proved the possibility of using the nasal pathway for direct transport of drugs from nose to brain. Both PG-NPs and LD-NPs have positive zeta potential ($\sim + 30$ mV) and particle size dependent on the drug concentration. Encapsulation efficiency (EE%) has been calculated for both series, and the obtained data demonstrated that the average EE% values are ranging around 85-90% for PG-NPs and less than 20% for LD-NPs. Therefore, the studied drug delivery system seems to be more suitable for the encapsulation of lipophilic drugs (as PG) than hydrophilic drugs (as LD). We deeper characterised PG-NPs, in terms of stability and drug release profile. We found out that the release of the drug is constant and prolonged and that NPs are almost stable in solution for a 30-day period.

In conclusion, this study reports on the preliminary results on TMC/SA NPs that could represent a promising strategy for nose to brain drug delivery. Further studies are required to confirm the potentiality of these systems, as cytotoxicity and *ex-vivo* permeation studies, and to evaluate their efficacy *in vivo*.

PARTE I

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1.1 I polimeri naturali come sistemi di *drug delivery*

I polimeri naturali possono essere distinti in quattro categorie principali: polisaccaridi, proteine, acidi nucleici e lipidi [1]. L'uso dei polimeri naturali, specialmente i polisaccaridi, come potenziali *carrier* per una vasta gamma di molecole con applicazioni terapeutiche costituisce un'importante e attuale area di ricerca. I polisaccaridi sono costituiti dalla ripetizione di unità monosaccaridiche legate da legami glicosidici. Sono particolarmente abbondanti in natura e facilmente ottenibili con processi a basso costo; possono essere infatti estratti da varie fonti: dalle alghe (alginati), da piante (pectina, cellulosa), da microorganismi (destrano, pullulano) o di origine animale (chitosano (CS), condroitina) [2]–[4]. In qualità di biopolimeri, i polisaccaridi sono biodegradabili, biocompatibili e non tossici; inoltre a causa della presenza di gruppi reattivi sulla loro catena (gruppi ossidrilici, carbossilici e amminici), possono essere facilmente modificati chimicamente e biochimicamente [3]. In virtù delle loro proprietà chimico-fisiche e biologiche, i polisaccaridi rappresentano un promettente substrato per la realizzazione di sistemi di *drug delivery* e *drug targeting* micro- e nanoparticellari [5]. In questi sistemi il principio attivo si può trovare adsorbito sulla superficie esterna oppure intrappolato nella struttura interna.

In questo lavoro la nostra attenzione si è rivolta ai sistemi nanoparticellari, realizzati utilizzando come substrato dei polimeri polisaccaridici.

Le nanoparticelle polimeriche hanno generalmente diametro compreso tra 1 e 1000 nm. I vantaggi nell'utilizzo di nanoparticelle (NPs) come sistemi di *drug delivery* riguardano la possibilità di ottenere un rilascio controllato e sostenuto del farmaco, alterandone la distribuzione e la conseguente *clearance*, in modo da avere un aumento dell'efficacia terapeutica e una riduzione degli effetti collaterali.

Il *targeting* sito specifico può essere ottenuto in vari modi, ad esempio per mezzo di ligandi sulla superficie delle particelle o di una guida magnetica. Un altro vantaggio consiste nel fatto che sono sistemi adatti alla somministrazione attraverso diverse vie: orale, nasale, parenterale, intraoculare, etc. Tuttavia l'utilizzo dei sistemi nanoparticellari, a dispetto dei loro notevoli vantaggi, presenta qualche limitazione, specialmente a causa delle loro piccole dimensioni e dell'elevata superficie specifica, che comportano problemi di aggregazione sia in dispersione che allo stato solido [5].

I *carrier* polimerici vengono selezionati in base a determinate caratteristiche che sono state ampiamente descritte da diversi studi [6], [7]: i polimeri devono essere non tossici per l'organismo e anti-immunogenici; biodegradabili e biocompatibili. I sistemi polimerici nanoparticellari devono essere inoltre in grado di preservare e proteggere il farmaco e garantirne il rilascio nel sito d'azione. Numerosi studi riportano come nanoparticelle a base di polimeri naturali sono in grado di proteggere il farmaco dalla degradazione e controllare il rilascio di farmaci incapsulati o adsorbiti [8], [9]. I sistemi nanoparticellari a base di polimeri naturali sono inoltre in grado di aumentare la solubilità di farmaci poco solubili in acqua [10], [11].

Le nanoparticelle possono essere distinte in due classi morfologiche principali: le nanocapsule, sistemi vescicolari costituiti da un nucleo oleoso

circondato da una sottile membrana polimerica, e le nanosfere, a struttura meno ordinata di tipo “matrice”. È tuttavia importante sottolineare che, a causa delle ridotte dimensioni di questi sistemi, risulta difficile dimostrare se vi sia una matrice continua o una parete ben definita [12].

Oltre ai sistemi sopracitati, si possono anche avere dei complessi di interazione di carica tra molecole, come polimeri carichi che interagiscono con molecole di carica opposta [13].

In particolare in questo lavoro è stato messo a punto un sistema nanoparticellare a base di due polimeri aventi carica opposta: il trimetilchitosano cloruro (TMC), ottenuto per modificazione sintetica del CS, avente carica positiva, e il sodio alginato (SA), carico negativamente.

1.2 Caratteristiche chimico-fisiche del chitosano

Il CS è un polisaccaride ottenuto per (parziale) deacetilazione alcalina della chitina, costituente tipico dell’esoscheletro degli artropodi e dei crostacei, al quale conferisce una grande resistenza meccanica (Figura 1).

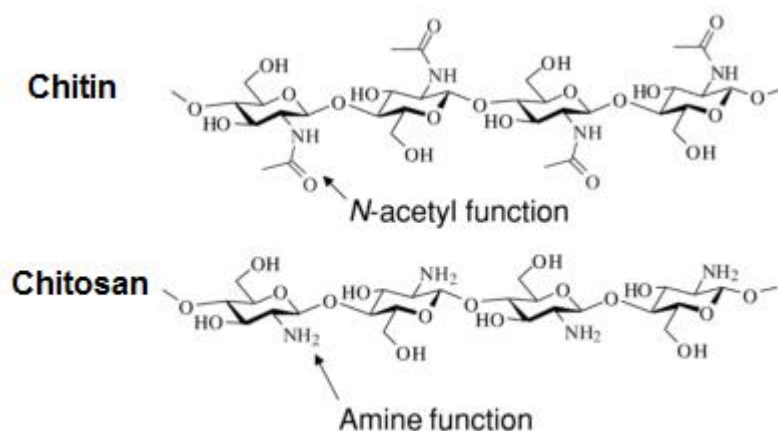


Figura 1. Rappresentazione della struttura chimica delle chitina e del chitosano

La chitina fu scoperta per la prima volta nei funghi dallo studioso francese H. Braconnot nel 1811, e pochi anni dopo fu isolata anche da corazze di insetti [14]. Costituisce la fibra più abbondante in natura dopo la cellulosa, alla quale somiglia sotto diversi aspetti; infatti come quest'ultima svolge una funzione strutturale nella costruzione del carapace dei crostacei ed ha una struttura terziaria, dovuta a legami idrogeno intercatena e intracatena.

A differenza della chitina, il CS è prodotto in natura solo da alcuni funghi della famiglia delle *Mucoraceae*, ma principalmente si ottiene a livello industriale a partire dalla chitina. Il CS è costituito chimicamente da un numero variabile di unità di 2-acetamido-2-deossi-D-glucopiranosio (GlcNAc) e 2-ammino-2-deossi-D-glucopiranosio (GLCN), unite da legami β (1 \rightarrow 4) [15], [16]. Il numero medio di unità di GlcNAc per 100 monomeri di CS (in percentuale) definisce il grado di deacetilazione del polimero. Il grado di deacetilazione (40–98%), il peso molecolare (50–2000 kDa) e qualsiasi altra modificazione chimica determinano le proprietà chimico-fisiche del CS, quali la solubilità, le interazioni chimiche e la conformazione molecolare [17], [18]. Queste proprietà sono importanti per l'efficacia del CS nelle formulazioni farmaceutiche. Anche la viscosità delle dispersioni di CS risulta essere di fondamentale importanza: essa cresce sia all'aumentare della concentrazione che del grado di deacetilazione del polimero, sia con il decrescere della temperatura.

Il CS è carico positivamente a pH acido e il suo pKa apparente (6,1-7,3) è direttamente correlato al suo grado di deacetilazione. Risulta pertanto insolubile a pH neutro e basico ma forma sali con acidi inorganici e organici, come HCl e acido glutammico, che sono solubili in acqua a pH maggiore di 6,3 (in relazione al peso molecolare, al grado di deacetilazione e al pKa). La conformazione e la solubilità del CS sono anche dipendenti dalla forza ionica. Più alta è la forza

ionica e minore è la solubilità, e la conformazione sarà più impaccata per la schermatura delle cariche positive [19].

Il CS viene ampiamente utilizzato in ambito farmaceutico come *carrier* per il rilascio controllato di farmaci, grazie alle sue peculiari proprietà di biodisponibilità, biodegradabilità [20], bassa tossicità [15], mucoadesione e capacità di aumentare il trasporto per via paracellulare di farmaci [21]. L'attività del CS dipende principalmente dalla protonazione dei gruppi amminici in soluzioni acide diluite. Infatti esso è in grado di interagire attraverso i gruppi amminici carichi positivamente con residui anionici, principalmente di acido sialico, presenti nelle mucose, ed è in grado di influenzare la permeabilità della membrana epiteliale mediante una combinazione di fenomeni di bioadesione e di apertura transitoria delle *tight junction* presenti tra le cellule epiteliali [22]. Questo fa sì che il CS sia in grado di aumentare il tempo di residenza dei sistemi di rilascio nel sito di assorbimento, e allo stesso tempo aumenta il trasporto del farmaco per via paracellulare. È stato dimostrato che nei monostrati di cellule Caco-2, il CS causa interruzione delle *tight junction* mediante traslocazione nel citosol delle proteine di membrana e citosoliche, occludina, claudina e ZO-1. Questo è causato dall'attivazione di meccanismi regolati dalla protein chinasi C [23]. Per questo motivo trova applicazione nel rilascio sito specifico dei farmaci, in particolare a livello del tratto gastrointestinale [24], [25], mucose buccale [26] e nasale [27].

Tuttavia l'uso del CS presenta alcuni svantaggi. La necessità di utilizzare soluzioni acide per solubilizzare il CS ne preclude l'utilizzo come *carrier* per la veicolazione di farmaci sensibili al pH e, in aggiunta, il conseguente basso valore di pH della formulazione finale può rappresentare un problema a seconda della via di somministrazione. Inoltre, a pH neutro e basico, come quello presente nell'ambiente intestinale, il CS perde la capacità di aumentare la permeabilità e l'assorbimento dei farmaci, specialmente farmaci peptidici e

proteici, condizione che si realizza soltanto quando si trova nella sua forma protonata, in ambiente acido [28]. Un'altra limitazione risiede nell'elevata capacità di *swelling* in ambiente acido acquoso che porta ad un rapido rilascio del farmaco. Per superare queste problematiche, sono stati sintetizzati e testati un gran numero di derivati del CS allo scopo di aumentarne la solubilità ed ampliarne le applicazioni come sistemi di rilascio controllato [29]. La realizzazione di derivati quaternizzati del CS si rivela una strategia efficace a tal proposito.

1.3 Derivati del chitosano: il trimetilchitosano (TMC)

Uno dei più studiati derivati del CS è il TMC (Figura 2), che viene ottenuto come elettrolita policationico per metilazione del CS.

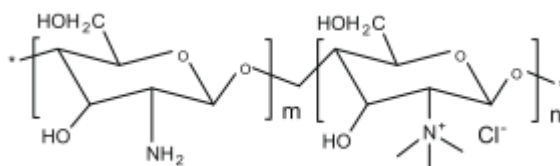


Figura 2. Rappresentazione della struttura chimica del TMC

Il TMC è un polimero non tossico, che presenta alta solubilità in un ampio *range* di pH, anche a bassi gradi di quaternizzazione (DQ). Il CS infatti è solubile solo a pH acido, mentre il TMC, anche quando il grado di quaternizzazione è più basso del 10%, è solubile sia in ambiente acido, che neutro, che basico (*range* di pH 1-9 fino alla concentrazione del 10% p/v). La più alta solubilità, dovuta alla presenza di gruppi amminici quaternari in posizione C-2 dell'anello glucosamminico, è riportata per il TMC con un grado di quaternizzazione intermedio (40%), a prescindere dal grado di dimetilazione (DD) e dal peso molecolare [30].

Il peso molecolare assoluto dei polimeri di TMC tende a diminuire all'aumentare del DQ. Il peso molecolare della catena polimerica aumenta durante il processo di metilazione a causa dell'aggiunta dei gruppi metilici sull'azoto del gruppo amminico nei vari monomeri. Tuttavia, si osserva un netto decremento del peso molecolare assoluto dovuto alla degradazione della catena polimerica nelle condizioni di sintesi, quali il pH alcalino e la temperatura elevata [31]. La viscosità intrinseca, come indicazione del peso molecolare, tende anch'essa a diminuire all'aumentare del grado di quaternizzazione del polimero.

Come il CS, il TMC presenta buone proprietà mucoadesive [32] e di assorbimento, principalmente a pH neutro [33], [34]. Inoltre, è stato riportato che il TMC può interagire con le *tight junction* e ciò favorisce la permeazione per via paracellulare di composti idrofili [35]. La mucoadesione intrinseca del TMC è risultata essere inferiore rispetto ai sali cloridrato e glutammato del CS, ma se comparata con il polimero di riferimento, la pectina, il TMC possiede maggiori proprietà mucoadesive [36]. Le proprietà mucoadesive del TMC con differenti DQ sono state studiate ma i risultati appaiono controversi. Ad esempio Snyman *et al.* hanno trovato che le proprietà mucoadesive del TMC diminuiscono all'aumentare del DQ tra il 22,1 e 48,8% [36]. Gli autori spiegano la diminuzione della mucoadesione con l'aumento del DQ sulla base delle modificazioni conformazionali cui va incontro il TMC a causa delle interazioni tra le cariche positive permanenti in posizione C-2 del polimero e i residui sialici carichi negativamente del muco. Queste interazioni potrebbero infatti forzare il polimero a cambiare la sua conformazione con una diminuzione della flessibilità della catena e dell'interpenetrazione della catena polimerica nello strato del muco. Inoltre, gli effetti sterici dovuti ai gruppi metilici potrebbero mascherare le cariche positive dei gruppi amminici, con conseguente ulteriore diminuzione della mucoadesione [33]. Per contro, Sandri *et al.* riportano un aumento delle

proprietà mucoadesive nei confronti della mucosa buccale all'aumentare del DQ, usando il destrano isotiocianato (PM 4400 Da) come farmaco modello [37], imputandole alla presenza delle cariche positive permanenti e alla loro interazione con i residui di acido sialico delle proteine del muco.

I risultati di questi studi mettono in evidenza come la densità di carica e la configurazione strutturale del CS e dei suoi derivati abbiano un importante ruolo nella loro capacità di agire come promotori dell'assorbimento.

Il gruppo di Du Plessis [38] è stato uno dei primi a studiare il TMC per il *drug delivery* nasale e orale, dopo che fu scoperto da Domard *et al.* [39] che derivati quaternizzati del CS con DQ maggiore del 25% erano solubili in acqua a qualsiasi valore di pH. Quindi è stato dimostrato che, in cellule Caco-2, il TMC è un potente promotore dell'assorbimento con efficienza simile al CS a valori di pH acidi, mentre a pH maggiori di 7 è in grado di esercitare un aumento più elevato dell'assorbimento [40]. Il gruppo di ricerca valutò l'effetto di diversi fattori, come il peso molecolare, il grado di quaternizzazione, e il tipo di formulazione sull'aumento dell'efficienza di assorbimento dei derivati metilati del CS [38], [41]. Per esempio, essi valutarono l'uso di due TMC a diverso grado di quaternizzazione (61,2% e 12,3%) e a differente concentrazione (0,25 e 0,5% p/v) sull'assorbimento dell'insulina per via nasale nei ratti. I risultati misero in evidenza come entrambi i polimeri aumentassero l'assorbimento dell'insulina a pH 4, mentre solo il TMC con il grado di quaternizzazione del 61,2% fosse in grado di farlo a pH fisiologico (7,4). In questo studio è stato utilizzato un TMC con DQ del 70%.

1.4 Il sodio alginato

Il sodio alginato (SA) è un polimero ampiamente utilizzato in campo farmaceutico per la realizzazione di sistemi di *drug delivery* micro- e nanoparticellari, in quanto presenta caratteristiche di biocompatibilità, biodegradabilità, bassa tossicità, proprietà mucoadesive e gelificanti.

In particolare le proprietà mucoadesive dell'alginato possono essere attribuite alla presenza dei gruppi carbossilici che generano forti interazioni bioadesive mediante la formazione di legami a idrogeno con le catene oligosaccaridiche della mucina [42].

Gli alginati vengono estratti dalle alghe brune marine (*Phaeophyceae*), ed in particolare le varietà commerciali di alginato derivano dalle alghe giganti *Macrocystis pyrifera*, dall'*Ascophyllum nodosum* e da vari tipi di *Laminaria* [43]. L'alginato è un copolimero costituito da residui di β -D-mannuronato (M) and α -L-gulonato (G), uniti da legami 1 \rightarrow 4 (Figura 3).

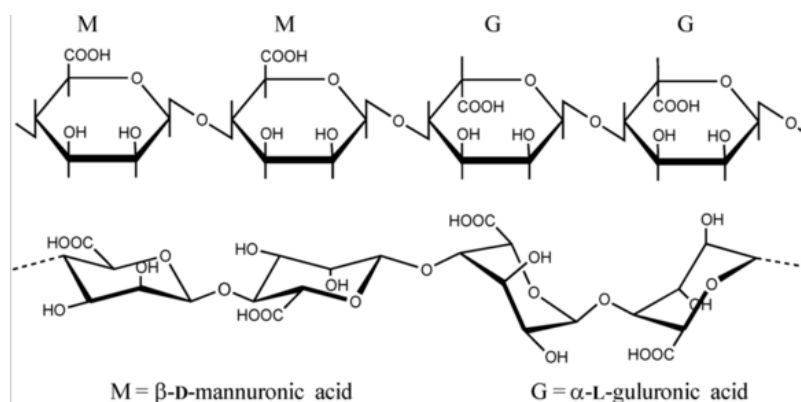


Figura 3. Rappresentazione della struttura chimica del sodio alginato

I blocchi possono essere composti da residui G consecutivi, da residui M consecutivi, o dall'alternanza dei due. A seconda della fonte di estrazione, gli alginati possono differire nel contenuto in G o M e nella lunghezza dei blocchi,

pertanto esistono oltre 200 tipi differenti di alginato. Anche le proprietà reologiche e il comportamento nei sistemi di *drug delivery* possono essere influenzati dal rapporto G/M, dal peso molecolare, dalla concentrazione e dal pH del mezzo.

Il peso molecolare del SA disponibile in commercio è compreso nel *range* 32000-400000 g/mol. La viscosità delle dispersioni di alginato aumenta al diminuire del pH, e raggiunge un massimo intorno a pH 3-3,5, in cui i gruppi carbossilici sono protonati e formano legami a idrogeno. Aumentando il peso molecolare dell'alginato, si possono migliorare le caratteristiche dei gel risultanti. Tuttavia le dispersioni ottenute dall'alginato ad alto peso molecolare diventano notevolmente viscosi, cosa indesiderabile nel processo di preparazione. Quindi il modulo elastico del gel può essere aumentato in maniera significativa, mentre la viscosità delle soluzioni minimizzata, usando una combinazione di polimeri di alginato a basso ed alto peso molecolare.

Una delle caratteristiche dell'alginato è la capacità di realizzare strutture tridimensionali stabili in ambiente acquoso (idrogel). Il meccanismo di gelazione è spiegato dal modello “*egg-box*”, in cui si ha lo scambio degli ioni sodio dei blocchi G appartenenti a due catene diverse, con cationi multivalenti, come il calcio (Ca^{2+}), per dar luogo ad una struttura tridimensionale stabile, le cui proprietà dipendono dalla concentrazione del polimero e dalla sua composizione chimica, dal momento che esistono diversi tipi di alginato [44]. Anche i blocchi MG partecipano alla formazione del network, ma con interazioni più deboli. Gli alginati con elevato contenuto di blocchi G portano perciò alla formazione di gel più rigidi. L'affinità dell'alginato per i cationi bivalenti diminuisce nel seguente ordine: $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Co}^{2+}, \text{Ni}^{2+}, \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$ [45]; tuttavia il Ca^{2+} è quello più comunemente utilizzato. Il processo può anche essere reversibile in presenza di agenti sequestranti come l'EDTA [46] e il sodio citrato [47].

I gel di alginato tendono ad essere erosi più velocemente a valori di pH neutro e basico rispetto ad un ambiente più acido [48]. Questa proprietà ha reso possibile il suo utilizzo nella stabilizzazione chimica di farmaci somministrati per via orale che si degradano facilmente in ambiente gastrico.

L'alginato può agire da reticolante anche in presenza di polimeri recanti una carica positiva [49], come ad esempio il TMC. Il processo di reticolazione è influenzato da un gran numero di fattori, tra i quali la dimensione del reticolante e la carica complessiva delle due specie coinvolte nella reazione. Le nanoparticelle ottenute in questo modo sono in genere sensibili al pH e pertanto sono meno stabili. Tuttavia, è proprio questa caratteristica a rendere tali sistemi interessanti per la progettazione di nanoparticelle adatte al rilascio sito-specifico dei farmaci. In virtù di queste proprietà l'alginato è stato ampiamente utilizzato in campo farmaceutico per l'incapsulazione di una vasta gamma di farmaci [50], di proteine [51] e di geni [52].

1.5 Complessi polielettrolitici e nanoparticelle

L'interazione tra biopolimeri anionici e cationici porta alla formazione di idrogel polielettrolitici che hanno dimostrato caratteristiche interessanti per l'incapsulazione e la veicolazione di farmaci. Il CS e l'alginato sono due biopolimeri che hanno ricevuto notevole attenzione e sono stati utilizzati a tale scopo [53]. Il CS, essendo un polimero cationico, è stato utilizzato per la produzione di microsfeere e nanoparticelle mediante gelazione ionotropica con polimeri carichi negativamente e in letteratura si trovano diversi esempi di complessi di CS/polianioni che sono stati studiati come sistemi di rilascio di farmaci, proteine, DNA e oligonucleotidi con risultati incoraggianti [54], [55]. Tra i vari tipi di complessi CS/polianioni riportati in letteratura, la combinazione del CS e del SA è considerata essere una delle più interessanti per realizzare

sistemi colloidali adatti alla veicolazione di farmaci [56]. I complessi polielettrolitici costituiti da CS/alginato si creano per interazione elettrostatica tra i gruppi amminici del CS ed i gruppi carbossilici dell'alginato. Questi complessi proteggono il farmaco incapsulato, hanno caratteristiche di biocompatibilità e biodegradabilità e limitano il rilascio del materiale incapsulato durante il processo di preparazione in maniera più efficiente del CS e dell'alginato da soli [57], [58]. Un notevole vantaggio di questi sistemi è la loro assenza di tossicità che permette la somministrazione ripetuta del farmaco. Sono state realizzate microsfeere e *bead* di CS/alginato per l'incapsulazione di diversi farmaci, proteine, oligonucleotidi con risultati promettenti [56], [59]. Nonostante le interessanti proprietà di questi sistemi, il loro sviluppo e la loro applicazione su scala submicronica sono tuttavia ancora poco studiati [53], [60].

In questo studio è stato messo a punto un metodo per realizzare nanoparticelle a base di TMC/SA basato sulla formazione di un complesso di natura polielettrolitica (PEC) tra i due polimeri, modificando la metodica riportata per la prima volta in letteratura nel 1997 da Calvo *et al.* [61], che si basa sulla gelazione ionotropica del CS con il tripolifosfato di sodio (TPP). La combinazione dei due polimeri in sistemi nanoparticellari è molto interessante perché consente di ottenere nanoparticelle con diametro medio molto piccolo, grazie alla capacità del SA e del TMC di formare PEC, seguito dalla reticolazione con il TPP.

Alcuni gruppi di ricerca riportano l'utilizzo di nanosistemi ibridi che introducono diversi polimeri rispetto alle classiche formulazioni contenenti soltanto CS/TPP. Ad esempio Goycoolea *et al.* [62] introducono l'alginato e riportano come il peso molecolare dell'alginato sia in grado di influenzare la durata della risposta ipoglicemica nei ratti, dopo somministrazione nasale di insulina (5 IU/kg). Questi sistemi nanoparticellari ibridi, con dimensioni < 500 nm, continuano a possedere carica superficiale positiva ($\zeta > +41$ mV). La

presenza dell'alginato prolunga in maniera significativa la riduzione dei livelli di glucosio nel giro di 5 ore, mentre se si considera soltanto la prima ora, i sistemi a base del solo CS/TPP mostrano capacità di ridurre i livelli di glucosio più alta (35%) rispetto ai sistemi ibridi (30%). I complessi del CS con l'alginato sono stati studiati anche come rivestimento di *bead* di alginato [63]–[65]. La complessazione riduce la porosità delle *bead* di alginato e diminuisce la perdita di farmaco incapsulato [66]. L'elevata solubilità del CS a bassi valori di pH è ridotta dalla presenza del *network* di alginato, dato che esso è insolubile nelle stesse condizioni di pH. Viceversa, a valori maggiori di pH, la dissoluzione dell'alginato viene impedita dalla presenza del CS, che è stabile in un *range* di pH più alto.

1.6 Scopo della ricerca

Il gruppo di ricerca nel quale ho svolto il mio dottorato si occupa da anni dello sviluppo di sistemi nanoparticellari a base di polisaccaridi [67]; in questo studio la nostra attenzione è stata rivolta alla realizzazione di nanoparticelle a base di TMC/SA, combinando i due polimeri in modo da ottenere un sistema carico positivamente, in grado di interagire con i residui sialici delle membrane mucose. Le NPs sono state preparate dapprima mediante la formazione di un PEC tra TMC/SA, seguita dalla reticolazione con il TPP. Questo lavoro riporta gli studi di formulazione e di caratterizzazione di NPs di TMC/SA, ottimizzate per il *nose to brain drug delivery*.

Capitolo 2

MATERIALI E METODI

2.1 Materiali

Il chitosano a basso peso molecolare (CS-Low, 50-190 KDa, grado di deacetilazione 75-85%), lo ioduro di sodio (NaI), lo ioduro di metile (CH_3I), l'N-metilpirrolidinone (NMP), l'idrossido di sodio (NaOH), il cloruro di sodio (NaCl), il sodio alginato (SA) e l'acqua deuterata sono di grado analitico e sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Il tripolifosfato di sodio (TPP, grado analitico) è stato acquistato da Carlo Erba (Milano, Italia).

La purificazione del TMC sintetizzato è stata eseguita mediante membrana da dialisi Spectra/Por® Dialysis Membrane MWCO: 12-14 kD. La liofilizzazione di tutti i campioni è stata effettuata utilizzando un liofilizzatore Amcota.

Il pH delle dispersioni nanoparticellari è stato misurato con il pH-metro FiveEasy (Mettler Toledo), precedentemente calibrato con soluzioni standard (pH 1,4 e 7,1). Tutte le misurazioni sono state eseguite in triplicato.

2.2 Metodi

2.2.1 Sintesi del TMC e determinazione del grado di quaternizzazione

In un pallone a tre colli da 500 mL, immerso in un bagnomaria, si introducono 2 g di CS-Low, 4,8 g di NaI e 80 mL di NMP, mantenendo la miscela sotto vigorosa agitazione a temperatura controllata (60°C) per 20 minuti. Alla miscela così ottenuta si aggiunge una soluzione acquosa di NaOH (11 mL, 15% p/p) e lo ioduro di metile (CH₃I, 12 mL) e si mantiene sotto vigorosa agitazione a 60°C per 60 minuti, collegando il sistema ad un refrigerante per evitare l'evaporazione del CH₃I. A questo punto si aggiungono 5 mL di CH₃I e 10 mL di NaOH 15% p/p, mantenendo sotto agitazione a 60°C per 6 ore, ed infine a temperatura ambiente per tutta la notte. La sospensione così ottenuta è stata concentrata sotto vuoto, quindi purificata mediante dialisi, senza l'utilizzo di solventi organici. Il polimero è stato liofilizzato e successivamente trattato con una soluzione di NaCl (10% p/p) a temperatura ambiente per un'intera notte, allo scopo di consentire lo scambio degli ioni I⁻ con gli ioni Cl⁻. Il derivato clorurato ottenuto viene sottoposto a liofilizzazione (Figura 4).

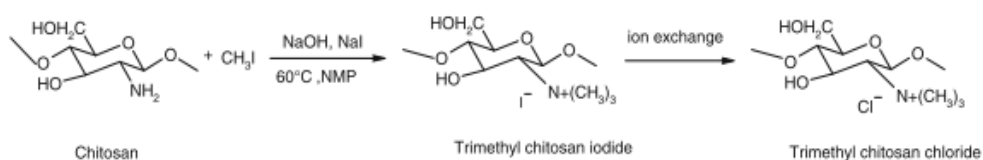


Figura 4. Sintesi del TMC

La caratterizzazione del TMC, e le analisi preliminari sull'interazione tra i polimeri nella dispersione e nelle NPs, sono state effettuate tramite spettroscopia ¹H-NMR, utilizzando come solvente l'acqua deuterata (D₂O). Gli spettri sono

stati registrati a 27°C utilizzando lo spettrometro Varian INOVA-500 (USA). Tutte le misurazioni sono state effettuate con la tecnica della soppressione del segnale del solvente (PRESAT). I campioni di TMC sono stati preparati solubilizzando in D₂O il TMC liofilizzato. I valori di *chemical shift* sono espressi in δ , le *J* in Hz.

Il grado di quaternizzazione (DQ) è stato calcolato utilizzando la seguente equazione riportata da Verheul *et al.* [68]:

$$DQ = \left[\frac{[N^+(CH_3)_3]}{[H^1]} \right] \times \frac{1}{9} \times 100$$

dove DQ è calcolato in percentuale; $[N^+(CH_3)_3]$ è l'integrale del picco relativo ai protoni dei gruppi N-metilici dell'azoto trimetilato; $[H^1]$ è il picco relativo ai protoni sul C-1 dell'anello glucosamminico, preso come riferimento.

Il calcolo della percentuale di dimetilazione (DD) è stato determinato con la seguente equazione:

$$DD = \left[\frac{[N(CH_3)_2]}{[H^1]} \right] \times \frac{1}{6} \times 100$$

nella quale DD rappresenta la percentuale di dimetilazione; $[N(CH_3)_2]$ è l'integrale del picco relativo all'azoto dimetilato.

Il calcolo della percentuale di metossilazione sugli ossidrili in posizione 3 e 6 dell'anello glucosamminico è stato ottenuto con le seguenti equazioni:

$$\text{DOM}(3) = \left[\frac{[\text{OCH}_3]}{[\text{H}^1]} \right] \times \frac{1}{3} \times 100$$

$$\text{DOM}(6) = \left[\frac{[\text{OCH}_3]}{[\text{H}^1]} \right] \times \frac{1}{3} \times 100$$

in cui DOM(3) e DOM(6) sono le percentuali di metossilazione degli ossidrili presenti rispettivamente in posizione 3 e 6 dell'anello glucosamminico.

2.2.2 Preparazione delle NPs di TMC/SA

La formazione delle NPs avviene mediante la combinazione di due fenomeni, la formazione di un complesso di natura polielettrolitica (PEC) tra il TMC e il SA [69] per interazione tra i gruppi amminici del TMC e i gruppi carbossilici del SA, seguita dalla gelazione ionotropica [70] tra il TMC e il TPP, l'agente reticolante.

La preparazione delle NPs avviene per aggiunta della dispersione del TMC a quella del SA. L'aggiunta viene fatta goccia a goccia e mantenendo la dispersione del SA sotto vigorosa agitazione (800-1000 rpm). Trascorsi circa 60 minuti, alla miscela così ottenuta si aggiunge, goccia a goccia, e sempre sotto vigorosa agitazione, l'agente reticolante, il TPP. Il sistema viene fatto stabilizzare per circa 30 minuti. La formazione delle NPs viene evidenziata dalla formazione di una leggera opalescenza.

Sono state realizzate dieci diverse formulazioni variando di volta in volta la concentrazione di uno dei componenti, e mantenendo costanti quelle degli altri due, in modo da ottenere diversi rapporti di concentrazione tra i componenti e diversi rapporti molari tra i polimeri.

In particolare, nello studio di formulazione, sono state utilizzate diverse concentrazioni di TMC (1, 2, 3, 4 mg/mL), di SA (1, 2, 3, 4 mg/mL), e diverse concentrazioni dell'agente reticolante, TPP (0,5, 1, 1,5, 2 mg/mL). I rapporti molari TMC/SA ottenuti sono: 3/1, 4/1, 6/1, 9/1, 12/1. Il rapporto volumetrico tra i vari componenti TMC/SA/TPP è stato mantenuto fisso a 6/1/2.

Dopo la preparazione, tutti i campioni sono stati sottoposti a cicli di sonicazione utilizzando lo strumento ad ultrasuoni Soniprep 150-MSE (ampiezza dell'onda 13 μ , durata dell'impulso 5"on-2"off, 5 cicli).

2.2.3 Analisi dimensionale e della carica superficiale

Tutte le formulazioni nanoparticellari sono state sottoposte ad analisi del diametro medio idrodinamico, dell'indice di polidispersione e del potenziale zeta utilizzando lo strumento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, London, United Kindom). I campioni nanoparticellari preparati di fresco sono stati analizzati dopo opportuna diluizione in acqua bidistillata. Ogni misurazione è stata eseguita tre volte e i valori riportati sono il risultato della media \pm deviazione standard delle tre serie.

La tecnica del *Dinamic Laser Light Scattering* (DLS), risulta essere, ad oggi, una delle tecniche più utilizzate per misurare le dimensioni di particelle nella regione sub-micronica. Essa sfrutta il fenomeno della diffusione della luce, (*scattering*), in base al quale onde o particelle vengono deflesse, ossia cambiano traiettoria, quando collidono con altre particelle o onde (dal punto di vista quantistico). La diffusione ottica rientra nei fenomeni di interazione radiazione-

materia ed è di solito riferita alla dispersione della luce da parte di oggetti più o meno microscopici come ad esempio le particelle colloidali in liquidi, o il pulviscolo o le molecole dell'atmosfera. Il DLLS permette di effettuare una misurazione continua, durante un determinato intervallo di tempo, dell'intensità di luce diffusa da particelle colpite da un raggio di luce (solitamente un raggio laser con λ di circa 600 nm). Le variazioni d'intensità misurate dal detector sono generate dal movimento browniano delle particelle all'origine dello *scattering*. A parità di temperatura e di viscosità le particelle di dimensioni più piccole si muovono rapidamente, creando delle variazioni rapide dell'intensità di *scattering*, mentre le particelle di dimensioni maggiori si muovono più lentamente, creando delle variazioni d'intensità lente. Questo fenomeno è alla base della tecnica DLLS [71]. Grazie ad un autocorrelatore, la velocità delle variazioni d'intensità viene misurata, e il coefficiente di diffusione delle particelle calcolato dalla funzione di correlazione. L'equazione di Stokes-Einstein consente poi di convertire il coefficiente di diffusione in diametro idrodinamico. Il detector è posto a 173° rispetto al raggio incidente sul campione. Il DLLS consente inoltre di ottenere la distribuzione dimensionale del campione sottoposto ad analisi, la quale permette di rilevare il carattere mono o polidisperso del sistema. Tale parametro è noto come Indice di Polidispersione (PDI). In linea generale un PDI inferiore a 0,4 indica una popolazione particellare omogenea.

Il potenziale zeta (ζ , PZ) è una misura della carica che una particella acquisisce in un particolare mezzo ed è dipendente dal pH, dalla forza ionica e dalla concentrazione di un particolare componente. Secondo la teoria del doppio strato elettrico diffuso, l'intorno ionico di una particella è costituito da una regione più interna che include ioni legati in modo relativamente forte alla superficie e uno strato esterno, o diffuso, nel quale la distribuzione degli ioni è determinata da un equilibrio tra le forze elettrostatiche ed i movimenti termici. Il

potenziale elettrico diminuisce all'aumentare della distanza dalla superficie particellare fino a raggiungere il valore della soluzione circostante, posto convenzionalmente uguale zero. Questo potenziale, presente alla superficie di taglio (ovvero la superficie teorica che racchiude anche gli ioni legati alla superficie della particella e che costituisce l'unità che si muove all'interno della soluzione) è detto potenziale zeta. Per misurarlo sperimentalmente è stata utilizzata la tecnica dell'*Electrophoretic Light Scattering*. Questa consente di misurare la mobilità elettroforetica di particelle sospese in un liquido, che è direttamente proporzionale al loro potenziale zeta come descritto dall'equazione di Henry. Per misurare la mobilità elettroforetica delle particelle si applica un campo elettrico tra gli elettrodi della cella di misura contenente il campione che, al contempo, viene illuminata da un raggio laser. Le particelle cariche si spostano verso l'elettrodo di segno opposto, creando una variazione di frequenza della luce diffusa dal campione direttamente proporzionale alla mobilità elettroforetica. Per le particelle abbastanza piccole o di bassa densità il valore del potenziale zeta consente di predire la loro stabilità. Infatti, un valore di potenziale zeta elevato (i.e. < -30 mV e $> +30$ mV) fa sì che le particelle rimangano lontane le une dalle altre, respingendosi abbastanza da limitare al minimo fenomeni di agglomerazione, aggregazione e/o flocculazione [71].

2.2.4 *Analisi al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)*

La morfologia delle NPs è stata studiata mediante le analisi di Microscopia Elettronica a Scansione (SEM), realizzate presso il Laboratorio di Microscopia del CRS4 del Parco Scientifico e Tecnologico della Sardegna, utilizzando un microscopio FEI Nova NanoLab 600 DualBeam, dotato di una sorgente FEG ad alta brillantezza che raggiunge risoluzioni fino a 5 nm. Le analisi sono state

eseguite sui campioni di NPs liofilizzati e, data la loro natura isolante, sono stati ricoperti con oro.

Il SEM sfrutta un fascio di elettroni primari focalizzati che colpiscono il campione. Il fascio primario non è fisso, ma viene fatto scandire su una piccola zona rettangolare del campione. Nell'interazione tra il fascio primario e gli atomi costituenti il campione, vengono emesse numerose particelle, fra le quali gli elettroni secondari. Questi elettroni sono catturati da uno speciale rivelatore e convertiti in impulsi elettrici che vengono inviati in tempo reale, ad uno schermo (un monitor) dove viene eseguita simultaneamente una scansione analogica. Il risultato è un'immagine in bianco e nero ad elevata risoluzione e grande profondità di campo. Il potere di risoluzione di un normale SEM a catodo di tungsteno si aggira intorno ai 5 nm, ma alcuni modelli arrivano a 1 nm. Il campione si trova sotto alto vuoto (10^{-5} Torr) poiché l'aria impedirebbe la produzione del fascio di elettroni, data la loro bassa energia, e deve essere conduttivo, altrimenti produce cariche elettrostatiche che disturbano la rivelazione del segnale. Nel caso di campioni non conduttivi, essi possono essere metallizzati con degli apparecchi specifici (*sputter coater*) o più semplicemente, nei microscopi elettronici che lo consentono, analizzati in basso vuoto con dei portacampioni (*holder*) adatti, con il metodo chiamato “*charge reduction*” [72].

2.2.5 Analisi di Spettroscopia Infrarossa in Trasformata di Fourier (FTIR)

Le analisi di spettroscopia infrarossa FTIR sono state eseguite utilizzando uno spettrofotometro Bruker Vector 22. I campioni liofilizzati sono stati micronizzati insieme a polvere di KBr e compressi in dischi ad una forza di 10 kN per 2 minuti utilizzando una pressa manuale. Gli spettri FTIR sono stati registrati nella regione dello spettro che va da 700 a 4000 cm^{-1} .

2.2.6 Studi di stabilità delle dispersioni nanoparticellari

Le dispersioni nanoparticellari che hanno presentato caratteristiche ottimali per il nostro studio, sono state sottoposte a studi di stabilità, monitorando la variazione del diametro medio, dell'indice di polidispersione e del potenziale zeta nell'arco di 30 giorni, mantenendo i campioni alla temperatura di 4°C.

2.3 Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il software R – *The R Project for Statistical Computing* versione 3.1.2, Copyright © 2014.

I valori vengono riportati come media \pm deviazione standard (D.S.) di tre serie. Il t-test di Student e l'analisi della varianza (ANOVA) sono stati utilizzati per determinare differenze significative tra gruppi di dati. Le differenze tra i risultati sperimentali vengono considerate statisticamente significative ad un livello di confidenza pari al 95 ($p < 0,05$).

Capitolo 3

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Sintesi e caratterizzazione $^1\text{H-NMR}$ del TMC

La sintesi del TMC è stata effettuata modificando le procedure già riportate in letteratura da Sieval *et al.* [73] e Wang *et al.* [74]. Nello specifico, è stato ridotto il numero di aggiunte dell'agente metilante, lo ioduro di metile, ed è stato modificato il procedimento di purificazione del prodotto.

In breve, la reazione è stata eseguita a partire dal chitosano a basso peso molecolare (CS-Low, spettro $^1\text{H-NMR}$ riportato nella Figura 5), il quale viene trattato con lo ioduro di metile in ambiente basico per idrossido di sodio (15% p/p). Generalmente è necessaria più di un'aggiunta di agente metilante per ottenere un buon grado di quaternizzazione (DQ), anche se, in queste condizioni, si ha anche un alto grado di metossilazione in posizione 3 e 6 dell'anello glucosamminico, e il polimero che si ottiene risulta essere meno solubile in acqua [33], [75].

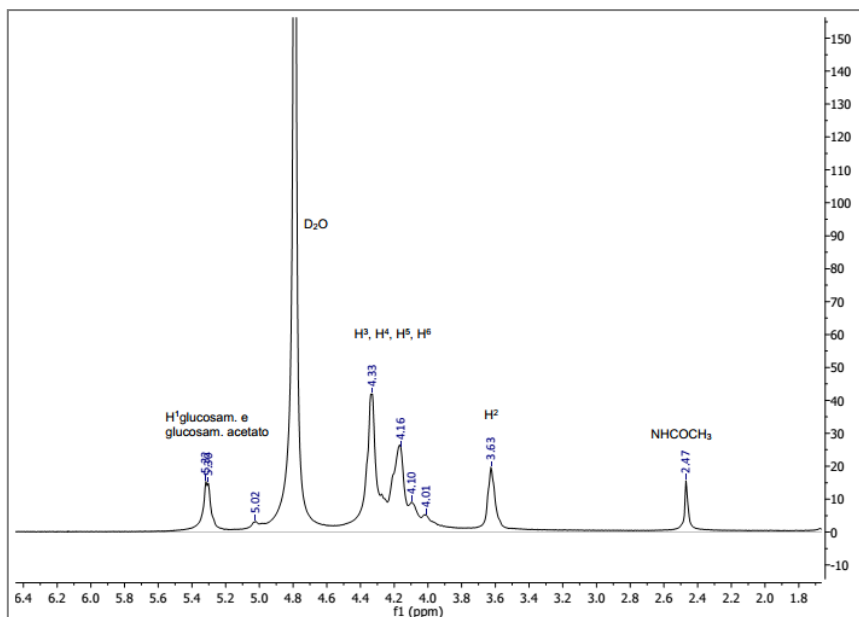


Figura 5. Spettro ¹H-NMR del CS-Low

Come già sperimentato [76], se il tempo di reazione è sufficientemente prolungato (fino a 7 ore), e se si lascia la miscela a temperatura ambiente durante tutta la notte, è possibile raggiungere un DQ di circa il 70% con una sola aggiunta di CH₃I (insieme all'aggiunta di 10 mL di una soluzione di NaOH). La riduzione dei tempi di reazione consente una riduzione dei costi e dei passaggi di purificazione. Inoltre, allo scopo di evitare l'uso di solventi per fare precipitare il polimero dalla miscela di reazione, quest'ultimo è stato concentrato sotto vuoto per mezzo di un evaporatore rotante. La miscela così ottenuta è stata trattata con una soluzione di NaCl 10% p/p (scambio I/Cl), quindi dializzata e liofilizzata. Tutti i passaggi di purificazione sono stati effettuati senza l'utilizzo di solventi organici.

La caratterizzazione del TMC è stata eseguita tramite spettroscopia ¹H-NMR, utilizzando come solvente l'acqua deuterata (D₂O). Il campione di TMC è stato preparato solubilizzando in D₂O il TMC liofilizzato. Tutte le misurazioni sono

state effettuate con la tecnica della soppressione del segnale del solvente (PRESAT).

La Figura 6 riporta lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del TMC. I valori di *chemical shift* sono espressi in δ , le *J* in Hz.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ 2.14 (s, $\text{CH}_3\text{-C=O-NH}$), 2.96 (s, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.41 (s, $\text{N}(\text{CH}_3)_3$); 3.50 (s, 6- OCH_3), 3.57 (s, 3- OCH_3), 3.81-4.46 (m, H^2 , H^3 , H^5 , H^6), 5.12 (br.s, H^1 , $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 5.47-5.54 (m, H^1 , GluNAc and $\text{N}(\text{CH}_3)_3$).

Pertanto, operando nelle condizioni descritte nel paragrafo 2.2.1, il DQ raggiunto si attesta intorno al 70%, mentre le percentuali di DOM(3) e DOM(6) sono rispettivamente 9% e 13%. Il polimero risulta essere perfettamente solubile in acqua nelle condizioni utilizzate.

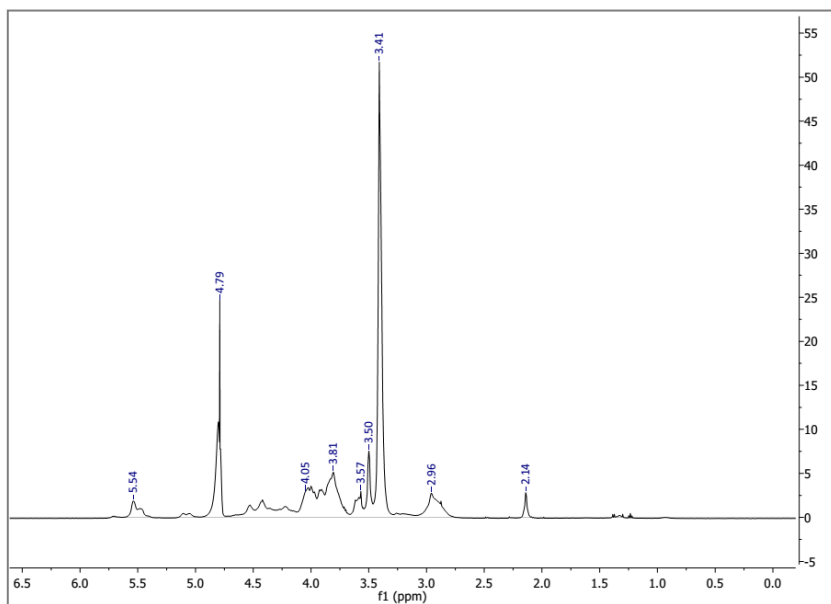


Figura 6. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del TMC

3.2 Studi di formulazione e caratterizzazione delle nanoparticelle di TMC/SA

In questo studio sono state realizzate nanoparticelle di TMC e SA mediante la formazione di un complesso di natura polielettrolitica tra i due polimeri, seguito dalla reticolazione con il TPP. I diversi componenti sono stati combinati in maniera tale da avere un sistema nanoparticellare carico positivamente, condizione necessaria per favorire l'interazione della formulazione con i residui sialici delle mucose.

Per non cambiare troppe variabili durante lo studio di formulazione, sono stati mantenuti costanti i rapporti volumetrici tra i componenti della formulazione TMC/SA/TPP a 6/1/2. Allo scopo di verificare quale fosse la concentrazione ottimale di ciascun componente e il rapporto tra i polimeri, si è variata di volta in volta la concentrazione di ognuno di essi e mantenute costanti quelle degli altri due, seguendo lo schema illustrato nella Tabella 1, in cui sono riportate le concentrazioni delle dispersioni utilizzate per la preparazione dei dieci campioni.

Tabella 1. Influenza delle concentrazioni di TMC, SA, TPP sulle dimensioni, distribuzione dimensionale (PDI) e carica superficiale (PZ) dei campioni nanoparticellari

Campioni	TMC (mg/mL)	SA (mg/mL)	TPP (mg/mL)	DM (nm±DS)	PDI (±DS)	PZ (mV±DS)	TMC/SA ratio (p/p)
1 _A	2	1	1	209 ± 9	0,22 ± 0,05	35 ± 4	12/1
1 _B	2	2	1	197 ± 5	0,28 ± 0,02	32 ± 1	6/1
1 _C	2	3	1	n.d.*	n.d.*	n.d.*	4/1
1 _D	2	4	1	n.d.*	n.d.*	n.d.*	3/1
2 _A	1	2	1	n.d.*	n.d.*	n.d.*	3/1
2 _B	3	2	1	310 ± 24	0,38 ± 0,03	41 ± 1	9/1
2 _C	4	2	1	375 ± 18	0,35 ± 0,04	47 ± 1	12/1
3 _A	2	2	0,5	308 ± 16	0,33 ± 0,06	36 ± 4	6/1
3 _B	2	2	1,5	n.d.*	n.d.*	n.d.*	6/1
3 _C	2	2	2	n.d.*	n.d.*	n.d.*	6/1

Come si può notare dai risultati riportati nella Tabella 1, sia la concentrazione dei singoli componenti, sia il rapporto molare tra i polimeri influenzano le dimensioni, la distribuzione dimensionale e la carica superficiale delle NPs. I campioni 1_A e 1_B (rapporto TMC/SA (p/p) 12/1 e 6/1 rispettivamente) sono quelli risultati ottimali dallo studio di formulazione, in termini di dimensioni medie, distribuzione dimensionale (PDI) e carica superficiale (PZ), indipendentemente dalla concentrazione di SA (1 mg/mL o 2 mg/mL). Infatti, entrambi mostrano valori di diametro medio di ~ 200 nm, valori di PDI di ~ 0,2 e PZ positivo > +30 mV. Il fatto che questi sistemi abbiano potenziale zeta positivo porta a presupporre che il TMC sia presente maggiormente sulla superficie delle nanoparticelle. Un sistema nanoparticellare stabilizzato da interazioni elettrostatiche ha un valore minimo di potenziale zeta di ± 30 mV. Valori più alti sia in positivo che in negativo rendono conto di un aumento della stabilità del sistema [77]. Il valore positivo del potenziale zeta, come si vedrà in seguito anche per le formulazioni contenenti i principi attivi, può facilitare l'adesione e le proprietà di trasporto delle NPs a causa delle interazioni elettrostatiche tra la formulazione carica positivamente e i residui carichi negativamente presenti sulla superficie delle cellule di membrana [78].

Per verificare la compatibilità del pH delle NPs con quello delle mucose è stato misurato il pH delle dieci formulazioni nanoparticellari realizzate, e i valori si attestano intorno a 6,7 per tutti i campioni.

3.2.1 *Effetto della mass ratio TMC/SA*

Le diverse formulazioni realizzate presentano i seguenti rapporti in peso tra TMC/SA: 3/1, 4/1, 6/1, 9/1, 12/1. Dai risultati ottenuti si evince che esistono dei rapporti ottimali tra i due componenti per la realizzazione delle nanoparticelle. In particolar modo, rapporti in peso TMC/SA inferiori a 6/1 non permettono ai polimeri di aggregarsi nella formazione di strutture nanoparticellari. Infatti i campioni 1_C, 1_D, 2_A non sono stati determinati (n.d. nella Tabella 1) poiché, durante la preparazione dei campioni, si è ottenuta la formazione di un precipitato.

3.2.2 *Effetto della variazione di concentrazione del sodio alginato*

Sono state utilizzate diverse concentrazioni di sodio alginato (1, 2, 3, 4 mg/mL), mantenendo costante la concentrazione del TMC a 2 mg/mL e quella del TPP a 1 mg/mL. All'aumentare della concentrazione del SA da 1 a 2 mg/mL (campioni 1_A-1_B) si può notare una diminuzione del diametro medio delle nanoparticelle, anche se non significativa ($p > 0,05$). Un simile comportamento è stato trovato anche da Chen *et al.* [79] e da Xu *et al.* [80] per cui all'aumentare della concentrazione del SA si ha una diminuzione delle dimensioni delle particelle. Questo comportamento può essere spiegato, a causa della somiglianza strutturale tra i due polisaccaridi, dalla presenza di una forte interazione tra le catene dei polimeri che porta alla formazione di un sistema più coeso. Un leggero aumento del PDI ($p > 0,05$) potrebbe essere dovuto al fatto che il SA causa leggera aggregazione locale. La diminuzione del PZ ($p > 0,05$) può essere spiegata dal fatto che è presente una quantità maggiore di polimero anionico nelle nanoparticelle. Concentrazioni di SA superiori (3-4 mg/mL, campioni 1_C-1_D) portano alla formazione di aggregati, probabilmente a causa di bassi valori del potenziale zeta.

3.2.3 *Effetto della variazione di concentrazione del TMC*

Sono state utilizzate diverse concentrazioni di TMC (1, 2, 3, 4 mg/mL) mantenendo costante la concentrazione del SA a 2 mg/mL e quella del TPP a 1 mg/mL. All'aumentare della concentrazione del TMC da 2 a 4 mg/mL (campioni 1_B-2_B-2_C) si può notare un aumento significativo delle dimensioni delle nanoparticelle ($p < 0,05$). Lo stesso andamento si riscontra per i valori del PZ. Per il PDI l'incremento non è significativo solo tra le formulazioni 2_B e 2_C. La concentrazione di TMC di 1 mg/mL porta invece alla formazione di aggregati di grosse dimensioni.

3.2.4 *Effetto della variazione di concentrazione del TPP*

Sono state utilizzate diverse concentrazioni di agente reticolante (0,5, 1, 1,5, 2 mg/mL). All'aumentare della concentrazione del TPP nel range 0,5-1 mg/mL (campioni 3_A e 1_B), e mantenendo costanti le concentrazioni del TMC e del SA entrambe a 2 mg/mL, le dimensioni delle nanoparticelle diminuiscono ($p < 0,05$). Pertanto la concentrazione di 1 mg/m si rivela quella ottimale nella formazione di nanoparticelle adatte al nostro scopo. Aumentando la concentrazione del TPP (1,5-2 mg/mL) si formano aggregati dotati di bassa stabilità (campioni 3_B e 3_C) [81], nonostante il rapporto (p/p) TMC/SA sia 6/1.

I risultati complessivi degli studi di formulazione, riportati in Figura 7 (A), (B), (C), mettono in evidenza come i campioni 1_A e 1_B possiedano le migliori caratteristiche in termini di diametro medio, distribuzione dimensionale (PDI) e carica superficiale (PZ).

Quindi si può concludere che differenti concentrazioni di SA (1 mg/mL o 2 mg/mL) e diversi rapporti p/p TMC/SA (12/1 e 6/1) sono ottimali per la

preparazione delle NPs, mentre la concentrazione più adatta di agente reticolante (TPP) è di 1 mg/mL.

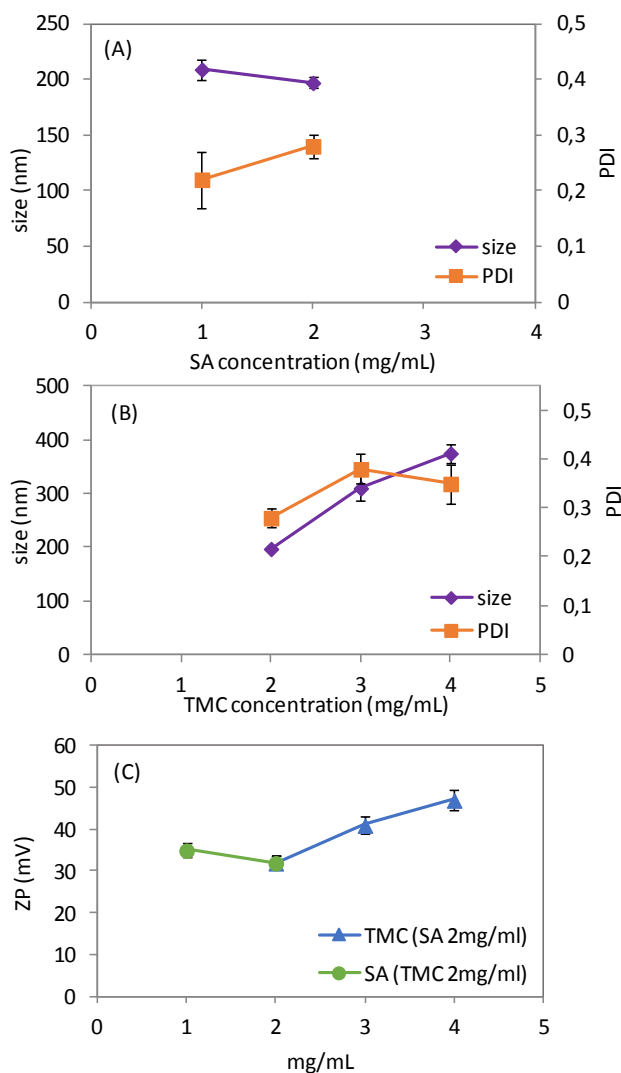


Figura 7. (A) Effetto della concentrazione del SA da 1 mg/mL a 2 mg/mL su dimensioni e distribuzione dimensionale (PDI) delle NPs. La concentrazione del TMC è di 2 mg/mL per tutti i campioni. (B) Effetto della concentrazione del TMC da 2 mg/mL a 4 mg/mL su dimensioni e distribuzione dimensionale (PDI) delle NPs. La concentrazione del SA è di 2 mg/mL per tutti i campioni. (C) Effetto delle concentrazioni del SA e del TMC sulla carica superficiale delle NPs. Valori medi \pm D.S. (n = 3)

3.2.5 Effetto della sonicazione

Allo scopo di ottimizzare le dimensioni e l'omogeneità dei sistemi nanoparticellari, le formulazioni sono state sottoposte alle radiazioni ultrasoniche e successivamente ne è stato valutato l'effetto sul diametro medio, sulla distribuzione dimensionale (PDI) e sulla carica superficiale (PZ) delle NPs.

Come riportato in letteratura, la sonicazione è una tecnica comune nella fase di realizzazione delle NPs dato che si rivela particolarmente efficace nel rompere gli aggregati e nel ridurre le dimensioni e l'indice di polidispersione delle nanoparticelle [67]. La Tabella 2 mostra i valori dimensionali dei campioni prima e dopo l'applicazione di 5 cicli di sonicazione (ampiezza dell'onda 13 μ , durata dell'impulso 5"on-2"off). I risultati mostrano che il trattamento ad ultrasuoni non diminuisce in maniera significativa le dimensioni medie delle nanoparticelle. Per questo motivo, considerando il fatto che gli ultrasuoni possono rappresentare uno stress per NPs incapsulanti farmaci sensibili al calore, tale procedura non è stata inclusa nella formazione delle NPs.

Tabella 2. Influenza della sonicazione sul diametro medio, distribuzione dimensionale (PDI) e carica superficiale (PZ) dei campioni nanoparticellari

Campioni	TMC (mg/mL)	SA (mg/mL)	TPP (mg/mL)	DM (nm \pm DS)	PDI (\pm DS)	PZ (mV \pm DS)	TMC/SA ratio (p/p)
1 _A	2	1	1	209 \pm 9	0,22 \pm 0,05	35 \pm 4	12/1
1 _{A sonic}	2	1	1	176 \pm 2	0,27 \pm 0,04	33 \pm 3	12/1
1 _B	2	2	1	197 \pm 5	0,28 \pm 0,02	32 \pm 1	6/1
1 _{B sonic}	2	2	1	210 \pm 30	0,28 \pm 0,04	31 \pm 3	6/1
2 _B	3	2	1	310 \pm 24	0,38 \pm 0,03	41 \pm 1	9/1
2 _{B sonic}	3	2	1	314 \pm 39	0,48 \pm 0,07	42 \pm 2	9/1
2 _C	4	2	1	375 \pm 18	0,35 \pm 0,04	47 \pm 1	12/1
2 _{C sonic}	4	2	1	314 \pm 46	0,46 \pm 0,02	53 \pm 3	12/1
3 _A	2	2	0,5	308 \pm 16	0,33 \pm 0,06	36 \pm 4	6/1
3 _{A sonic}	2	2	0,5	284 \pm 28	0,40 \pm 0,04	38 \pm 5	6/1

3.3 Studi di stabilità

Partendo dallo studio di formulazione, sono state selezionate le formulazioni migliori (1_A-1_B) e su queste è stata valutata la stabilità nel tempo, monitorando le variazioni del diametro medio, della distribuzione dimensionale (PDI) e della carica superficiale (PZ) nell'arco di 30 giorni mantenendo le dispersioni alla temperatura di 4°C. I risultati riportati in Figura 8 mostrano come non ci siano differenze rilevanti ($< \pm 20\%$) nella prima settimana di stoccaggio, mentre tra la prima e la seconda settimana i valori si mantengono pressoché costanti sia per quanto riguarda le dimensioni che per il potenziale zeta di entrambe le formulazioni. Successivamente, i valori aumentano nuovamente fino ad arrivare, dopo un mese, a circa 300 nm di diametro per entrambe le formulazioni. Questo indica la verosimile presenza di fenomeni di aggregazione e di conseguenza, i valori del potenziale zeta diminuiscono fino a 20 mV.

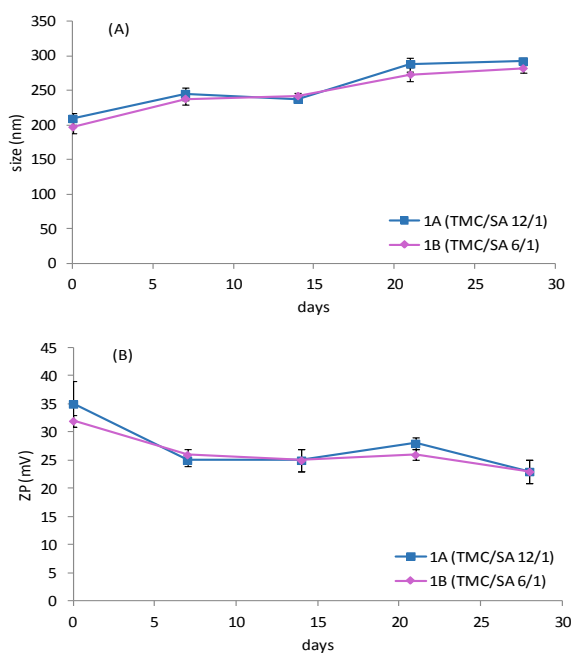


Figura 8. Dimensioni medie (A) e potenziale zeta (B) delle nanoparticelle 1_A (TMC/SA 12/1) e 1_B (TMC/SA 6/1) dopo 30 giorni di stoccaggio a 4°C. Valori medi \pm D.S. (n=3).

3.4 Analisi FTIR

Per confermare l'avvenuta sintesi del TMC e le interazioni che intercorrono tra i polimeri nelle NPs sono stati eseguiti studi di spettroscopia FTIR sui singoli polimeri (SA e TMC), sulla miscela TMC/SA (realizzata utilizzando la stessa concentrazione che i due polimeri hanno nelle NPs) e sulle NPs (Figura 9).

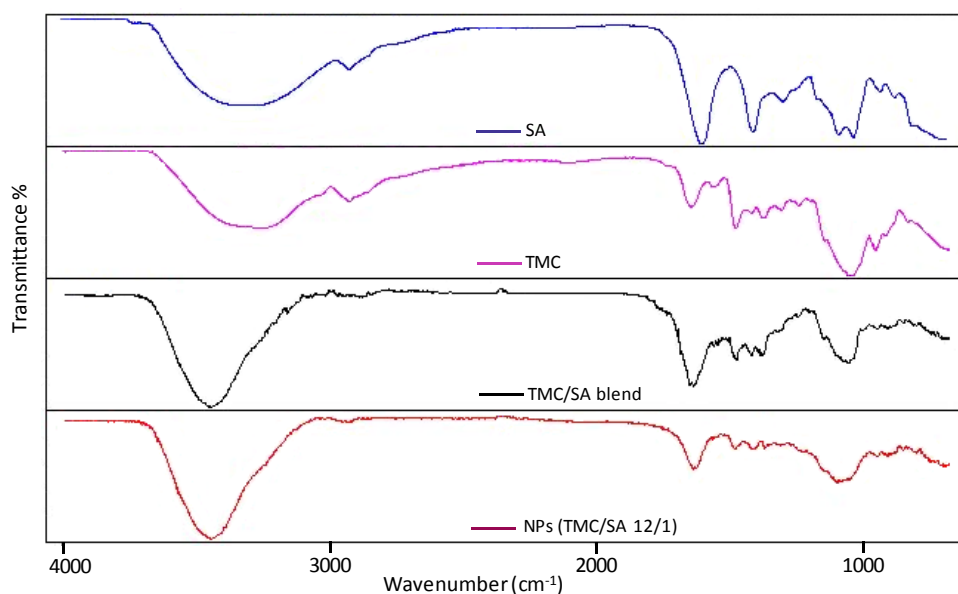


Figura 9. Spettri FTIR del SA, TMC, della miscela TMC/SA e delle NPs.

Le bande nella regione $3600-2850\text{ cm}^{-1}$ sono dovute alle vibrazioni di stiramento dei gruppi OH e NH_2 dei polimeri e sono praticamente sovrapponibili per tutti i campioni. Le differenze più evidenti si possono riscontrare nella regione intorno a $1500-1600\text{ cm}^{-1}$: nello spettro del TMC si possono notare, a questa lunghezza d'onda, due bande, rispettivamente a 1645 e 1558 cm^{-1} , che possono essere attribuite allo stiramento assiale del C=O del legame acetammidico e alla deformazione angolare dei legami NH, che non si possono invece mettere in evidenza nello spettro delle NPs, in cui in questa zona vi è un unico segnale a 1608 cm^{-1} . Sebbene quest'ultimo segnale si possa parzialmente

attribuire all'anione carbossilato del SA, se si paragona questo spettro a quello del solo polimero SA si può notare come l'intensità sia notevolmente diminuita. Questo primo dato conferma le interazioni tra l'anione carbossilato del SA e il gruppo ammonico quaternario del TMC.

Inoltre, paragonando lo spettro della miscela TMC/SA con quello delle NPs, si nota come in quest'ultimo caso la stessa banda sia notevolmente ridotta. Tenendo in considerazione che la differente intensità non può essere attribuita ad una differenza di concentrazione dei due polimeri nelle dispersioni, l'unica ragione verosimile di questa differenza può essere attribuita alle interazioni tra TMC e TPP, che portano alla formazione delle NPs.

La banda a 1477 cm^{-1} , relativa alle deformazioni angolari asimmetriche dei legami NH-CH_3 , che è il picco caratteristico indicante l'avvenuta sintesi del TMC, è notevolmente ridotta nella miscela e nelle NPs, ciò probabilmente dovuto alla formazione delle NPs stesse.

Gli spettri FTIR confermano l'esistenza delle interazioni tra i due polimeri nelle NPs. Le informazioni ottenute sono in perfetto accordo con i dati acquisiti mediante analisi DLLS e, come riportato in seguito, dagli spettri $^1\text{H-NMR}$.

L'analisi degli spettri FTIR è pertanto compatibile con l'ipotesi secondo cui per la formazione nelle nanoparticelle l'interazione tra il SA e il TMC porti alla formazione di un substrato iniziale che funge da "nucleo" della futura nanoparticella, la cui struttura viene "stabilizzata" dalla reticolazione con il TPP.

3.5 Caratterizzazione $^1\text{H-NMR}$ delle interazioni tra polimeri nelle NPs

Sui campioni nanoparticellari sono stati effettuati degli studi preliminari di spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ per verificare le interazioni esistenti tra i polimeri nella formulazione.

Per poter fare dei confronti sono stati eseguiti gli spettri $^1\text{H-NMR}$ dei singoli polimeri, della miscela in cui sono presenti i due polimeri TMC e SA negli stessi rapporti in cui si trovano nella formulazione nanoparticellare, ed infine delle NPs. Tutti i campioni sono stati disciolti nello stesso solvente (D_2O).

Una prima analisi degli spettri conferma sostanzialmente quanto evidenziato con la spettroscopia FTIR.

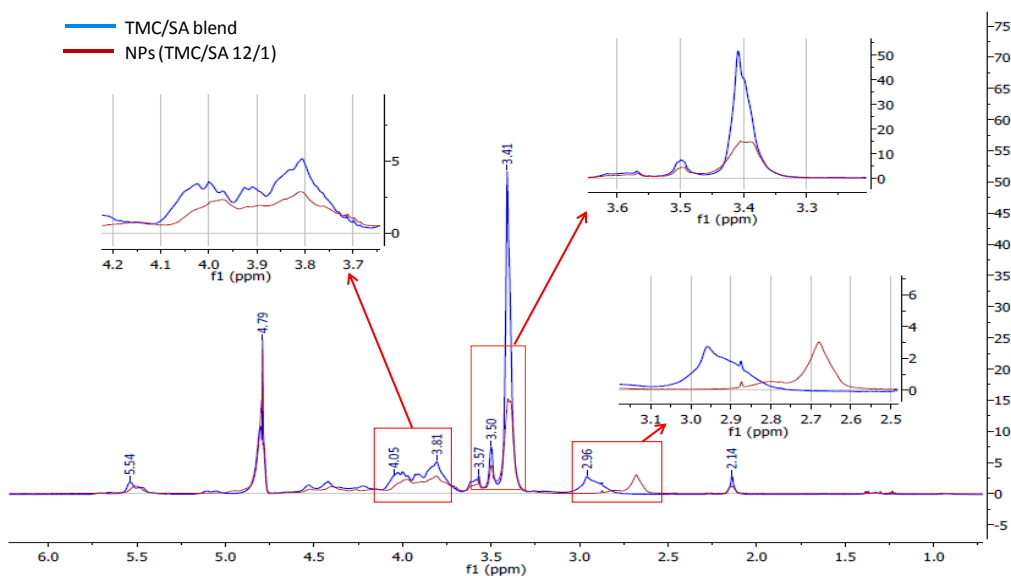


Figura 10. Caratterizzazione $^1\text{H-NMR}$ della miscela TMC/SA (linea blu) e delle NPs (linea viola)

Dalla Figura 10, che riporta il confronto diretto degli spettri, è possibile notare come lo spettro della dispersione dei due polimeri (linea blu) risulti quasi sovrapponibile a quello delle NPs (linea viola), anche se si possono evidenziare

alcune differenze nel *chemical shift* e nella morfologia di alcuni picchi. In modo particolare:

- il picco che cade a 3,41 ppm, relativo al segnale del gruppo N,N,N-trimetil ammonio, risulta affilato e di intensità decisamente maggiore nella miscela TMC/SA rispetto allo stesso picco presente nelle NPs, da cui differisce anche per la morfologia;
- il picco che cade a 2,96 ppm nello spettro della miscela TMC/SA, relativo al gruppo dimetilamminico, risulta schermato in quello delle NPs, con relativo spostamento intorno a 2.68 ppm;
- i picchi relativi ai protoni dell'anello glucosamminico, rilevabili nella regione compresa tra 3,81-4,05 ppm, mostrano una morfologia differente nel TMC/SA e nelle NPs.

Come già accennato l'analisi degli spettri $^1\text{H-NMR}$ deve essere approfondita, ma si possono comunque rilevare delle notevoli differenze che riguardano proprio i picchi relativi ai gruppi funzionali del TMC coinvolti nella formazione della struttura nanoparticellare, come già evidenziato dall'analisi FTIR.

3.6 Analisi al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)

La morfologia delle nanoparticelle è stata analizzata attraverso il microscopio elettronico a scansione SEM. La preparazione dei campioni è stata descritta nel paragrafo relativo della parte sperimentale.

La Figura 11 evidenzia la morfologia delle NPs, che si presentano come delle strutture pressoché sferiche e leggermente allungate, con diametro medio perfettamente comparabile con i dati riscontrati attraverso l'analisi DLLS, ed omogeneamente disperse. Inoltre, essendo il campione preparato mediante liofilizzazione, il SEM ci conferma che le NPs sono stabili se sottoposte a questo processo. Tale evidenza sperimentale è particolarmente positiva, perché suggerisce che questa tecnica possa essere utile per lo stoccaggio delle NPs e per preservare il sistema dalla degradazione.

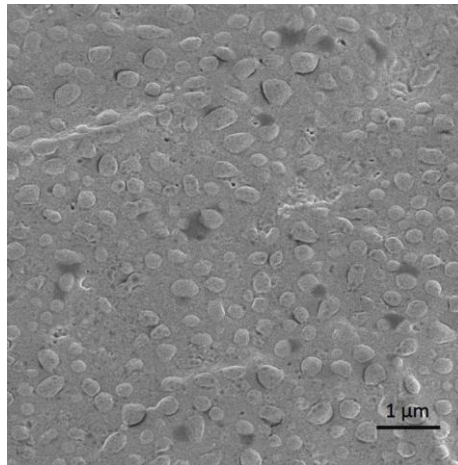


Figura 11. Micrografia SEM delle NPs (TMC/SA 12/1)

Capitolo 4

CONCLUSIONI

In questo studio sono stati realizzati dei sistemi nanoparticellari a base della miscela polimerica TMC/SA, utilizzando il TPP come agente reticolante, in modo da realizzare un *carrier* mucoadesivo adatto alla veicolazione di farmaci.

Il TMC è stato sintetizzato a partire dal chitosano a basso peso molecolare, ed è stato caratterizzato mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$, mediante la quale è stato possibile calcolare il grado di quaternizzazione del polimero.

È stato eseguito uno studio di formulazione per determinare il rapporto ottimale tra i componenti TMC/SA/TPP. Realizzando diversi rapporti di concentrazione e ottenendo differenti rapporti molari tra i polimeri, si sono ottenute dieci formulazioni, delle quali due in particolare hanno mostrato i migliori valori in termini di dimensioni, indice di polidispersione e potenziale zeta, ovvero la 1_A e la 1_B (TMC/SA 12/1 e 6/1 rispettivamente). Il trattamento della sonicazione sulle formulazioni realizzate non porta ad un miglioramento significativo delle caratteristiche dimensionali e quindi questa tecnica è stata esclusa dalla fase di realizzazione delle NPs.

La formazione delle NPs è stata confermata da analisi di spettroscopia FTIR e $^1\text{H-NMR}$, che hanno evidenziato le interazioni tra i gruppi funzionali del polimero coinvolti nella formazione della struttura nanoparticellare, e la loro morfologia è stata evidenziata da analisi di microscopia SEM.

Dai risultati di questa ricerca, specialmente tenendo in considerazione il diametro medio (intorno a 200 nm) e il potenziale zeta nettamente positivo, le

formulazioni realizzate si sono rivelate promettenti per il *delivery* di farmaci attraverso le mucose, pertanto, nella seconda parte di questo studio sono state valutate le potenzialità relative all'incapsulazione e al rilascio di agenti terapeutici per una possibile somministrazione *nose to brain*.

PARTE II

Capitolo 1

INTRODUZIONE GENERALE

1.1 La via di somministrazione nasale

La via nasale è convenzionalmente utilizzata per la somministrazione di farmaci per il trattamento di patologie locali come riniti, infezioni nasali e fenomeni allergici. Negli ultimi anni tuttavia questa via di somministrazione ha suscitato un crescente interesse, in quanto è stata sfruttata per la veicolazione sistemica di diversi farmaci, sia a basso peso molecolare che peptidici e proteici, come via alternativa a quella orale e parenterale, o nei casi in cui è richiesta una rapida insorgenza dell'azione, come ad esempio per il trattamento del dolore [82]. Altre recenti applicazioni riguardano la veicolazione di vaccini, e la possibilità di raggiungere nuovi target (cervello, liquido cerebrospinale) [83], [84].

La via intranasale quindi consente la somministrazione di farmaci sia a livello locale che sistemico, evitando la degradazione gastrointestinale tipica della somministrazione orale e l'effetto di primo passaggio epatico. La ricca vascolarizzazione della mucosa nasale inoltre aumenta la velocità di assorbimento del farmaco e, di conseguenza, permette una rapida insorgenza dell'effetto terapeutico. È una via di facile accesso rispetto ad altre mucose dell'organismo, non è invasiva ed è essenzialmente indolore. Tutti questi aspetti contribuiscono a massimizzare la *compliance* del paziente.

Tuttavia, rispetto alla via orale, ha lo svantaggio di offrire una minore superficie di assorbimento e bisogna considerare il rischio di fenomeni di irritazione locale o di danno alla mucosa dovuti al farmaco stesso o all'utilizzo di promotori dell'assorbimento. Inoltre, è necessario considerare che il sistema di *clearance* mucociliare nasale, che trasporta lo strato di muco che ricopre l'epitelio nasale verso la rinofaringe mediante il battito ciliare, ha anch'esso influenza sull'assorbimento del farmaco. Un'altra importante barriera per l'assorbimento nasale di farmaci è rappresentata dal metabolismo ad opera degli enzimi presenti nella mucosa nasale, che può limitare la biodisponibilità di alcuni farmaci, specialmente quelli peptidici o proteici [85].

1.2 Cenni di anatomia e fisiologia del naso

Le principali funzioni della cavità nasale sono rappresentate dall'olfatto, dalla regolazione dell'umidità e della temperatura dell'aria inalata, e dalla sua purificazione. Negli esseri umani, la superficie totale e il volume dei due lati della cavità nasale sono rispettivamente di circa 150 cm² (per via di tre sporgenze, o turbinati, all'interno della cavità) e 13 mL, misurati mediante tomografia computerizzata [86].

Il setto nasale divide la cavità nasale lungo il centro in due metà. Le due cavità si aprono dal lato del viso attraverso le aperture nasali anteriori e verso la rinofaringe attraverso le aperture nasali posteriori. Ogni cavità nasale può essere suddivisa in tre regioni: il vestibolo nasale, la regione respiratoria e la regione olfattiva.

1.2.1 *L'epitelio respiratorio e la clearance mucociliare*

La regione respiratoria contiene tre turbinati (superiore, medio e inferiore) che sporgono dalla parete laterale di ciascuna cavità nasale. La presenza di questi turbinati crea un flusso d'aria turbolento attraverso il naso, garantendo un miglior contatto tra l'aria inalata e la superficie della mucosa.

La mucosa respiratoria è costituita da un epitelio di rivestimento e da una tonaca propria. L'epitelio è di tipo colonnare pluristratificato, in cui la maggior parte delle cellule è provvista di ciglia vibratili, il cui movimento crea una corrente diretta verso la faringe. Intercalate tra queste vi sono numerose cellule caliciformi mucipare, responsabili della produzione del muco che umetta tutta la superficie della mucosa, svolgendovi un ruolo essenzialmente protettivo. Altri tipi cellulari che si possono riscontrare nell'epitelio di rivestimento della mucosa respiratoria sono le cellule basali, scarsamente differenziate, che agiscono da cellule staminali per sostituire le altre cellule epiteliali [87]. Le cellule basali, che variano notevolmente sia in numero che in forma, a differenza degli altri tipi di cellule, non raggiungono mai il lume delle vie aeree. Entrambi i tipi di cellule colonnari, ciliate e non ciliate, possiedono numerosi microvilli (circa 300-400 per cellula) [88]. Questo aumenta notevolmente la superficie di assorbimento della cavità nasale.

La tonaca propria, di natura connettivale, accoglie le ghiandole nasali, a secrezione mista, ed è riccamente vascolarizzata. Anche per tale motivo la regione respiratoria risulta essere un sito importante per la veicolazione di farmaci nella circolazione sistemica.

Il muco è una miscela complessa di materiali, costituita da circa 95% di acqua, 2% mucina, 1% di sali, 1% di altre proteine (albumina, immunoglobuline, lisozimi e lattoferrina) e meno dell'1% di lipidi [89]. Il muco è presente in due strati sull'epitelio, per facilitare la *clearance* mucociliare: uno strato a bassa viscosità (sol), che ricopre le ciglia, e uno strato di gel più viscoso

sopra lo strato di sol. Quindi il muco si muove solo in una direzione, dalla parte anteriore a quella posteriore della cavità nasale, verso la faringe. Il battito ciliare ha una frequenza di 1000 colpi al minuto, pertanto le particelle presenti nell'aria inspirata saranno trasportate sulla mucosa verso la parte posteriore della gola con una velocità di 5 mm al min [88]. Il pH normale delle secrezioni nasali negli adulti è compreso tra 5,5-6,5, mentre nei neonati e nei bambini varia da 5,0 a 6,7 [90]. Una variazione di pH del muco può influenzare la sua ionizzazione e pertanto può aumentare o diminuire la permeazione di un farmaco, a seconda della sua natura. Inoltre la riduzione del pH del muco ha un effetto negativo sul battito ciliare [91].

L'innervazione sensitiva della mucosa respiratoria è di pertinenza del nervo trigemino, con le sue branche oftalmica e mascellare.

1.2.2 La regione olfattiva

La regione olfattiva è situata appena sotto la lamina cribrosa dell'osso etmoide, nella parte superiore della cavità nasale, e giace in parte sul setto nasale e in parte sul turbinato superiore (Figura 12). La mucosa olfattiva è sopra il normale percorso del flusso d'aria, quindi gli odoranti normalmente raggiungono i recettori sensitivi dei neuroni per diffusione. Nell'uomo la regione olfattiva è limitata ad un'area di circa 10 cm² [92]. L'epitelio olfattivo è innervato dal nervo olfattivo che è responsabile del trasporto di farmaci dalla cavità nasale al SNC attraverso la regione di passaggio intra/extraneuronale.

Le cellule sensoriali olfattive sono dei veri e propri neuroni bipolari modificati localizzate nell'epitelio che riveste la mucosa della cavità nasale. Presentano un prolungamento periferico destinato a percepire gli stimoli e un assone che trasmette gli impulsi ai centri nervosi dell'olfatto. Il processo dendritico si estende dal corpo cellulare alla superficie apicale libera dove

termina come un piccolo rigonfiamento e dal quale si estendono numerosi microvilli, che rappresentano la superficie sensoriale di ricezione.

L'epitelio olfattivo è di tipo pseudostratificato, e comprende tre tipi di cellule: i neuroni olfattivi sensoriali o recettori olfattivi; le cellule di sostegno, cilindriche e dotate di microvilli; le cellule basali, che sono in grado di differenziarsi nei recettori neuronali e sostituirli circa ogni 40 giorni. La lamina propria sottostante contiene i fasci nervosi olfattivi e le ghiandole tubulo-alveolari di Bowman secernenti il muco.

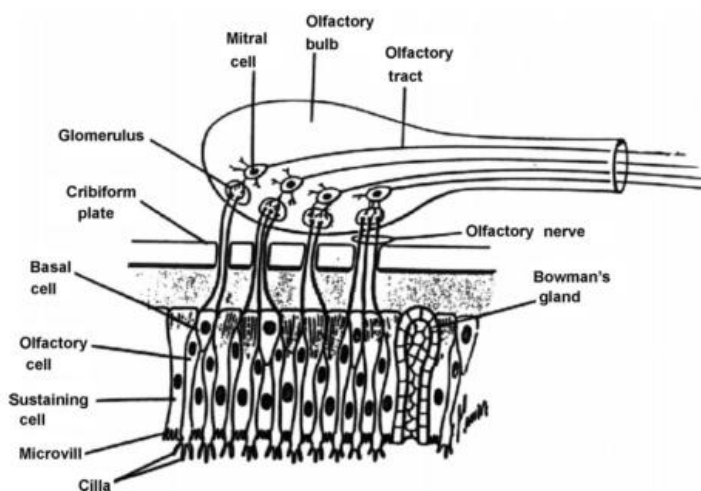


Figura 12. Rappresentazione schematica della regione olfattiva [94]

1.3 *Nose to brain drug delivery*

Da sempre la ricerca farmacologica è indirizzata a sviluppare nuove strategie terapeutiche capaci di modificare il decorso delle malattie e migliorare la qualità di vita dei pazienti. Si tratta di un'importante sfida soprattutto per quei settori terapeutici che prevedono un'azione del farmaco a livello di particolari distretti dell'organismo, quali il sistema nervoso centrale (SNC). In questo caso, la presenza della barriera ematoencefalica (BEE), che protegge il parenchima cerebrale dal torrente circolatorio, costituisce un grosso ostacolo che impedisce

alle terapie neuroriparatrici e neuroprotettive attualmente disponibili di arrivare a svolgere la loro azione farmacologica in situ. Il problema dei farmaci attivi sul SNC, infatti, è costituito dalla loro difficoltà di attraversare la BEE. I farmaci macromolecolari, come quelli peptidici e proteici, sono troppo grandi e troppo idrofili per penetrare la BEE dal circolo sistemico e se somministrati per via orale vengono rapidamente degradati dagli enzimi gastrointestinali e dai citocromi epatici.

Per i disturbi che richiedono un trattamento cronico, come quelli collegati alla demenza, sarebbero desiderabili terapie non invasive. Come dimostrato da studi sugli animali e sull'uomo, una potenziale strategia per by-passare la BEE è rappresentata dal trasporto di molecole attive attraverso la via *nose to brain* [14].

Questa via coinvolge i sistemi del nervo olfattivo e trigemino che iniziano nel cervello e terminano nella cavità nasale, rispettivamente nel neuroepitelio olfattivo e nell'epitelio respiratorio. La regione olfattiva rappresenta l'unica porzione in cui il SNC è direttamente a contatto con l'ambiente esterno, e pertanto la via più diretta e non invasiva di accesso al cervello.

In linea generale, si possono prevedere tre diversi percorsi attraverso l'epitelio olfattivo [93]: (1) Trasporto per via transcellulare, attraverso le cellule di sostegno, probabilmente tramite diffusione passiva o endocitosi mediata da recettore. Questo percorso è particolarmente adatto per le piccole molecole lipofile o per molecole di grandi dimensioni. (2) Trasporto per via paracellulare (piccole molecole idrofile), attraverso le giunzioni strette tra le cellule di sostegno o le cosiddette fessure tra le cellule di sostegno e i neuroni olfattivi. (3) Attraverso le vie dei nervi olfattivo e trigemino, in cui il farmaco viene internalizzato dai neuroni mediante meccanismi di endocitosi o pinocitosi e trasportato al bulbo olfattivo mediante trasporto assonale.

La via utilizzata per il trasporto di un determinato principio attivo dal naso al cervello dipende da vari fattori, come il peso molecolare del farmaco, la sua

lipofilicità, o la presenza di specifici recettori nei neuroni olfattivi. Generalmente, la rapida comparsa del farmaco nel liquido cerebrospinale e nel cervello indica l'utilizzo preferenziale della via transcellulare e paracellulare. Un trasporto più lento invece indica che la via dei neuroni olfattivi è quella preferenziale. È probabile tuttavia che i farmaci usino una combinazione di più meccanismi nel trasporto dal naso al SNC.

La presenza di una via di trasporto diretto dal naso al cervello è stata evidenziata da alcuni studi riportati in letteratura. Reiss *et al.* [94] hanno inoculato il virus della stomatite vescicolare nell'epitelio nasale di topi e hanno verificato come il virus si è trasmesso al SNC, lungo il nervo olfattivo. Chow *et al.* [95] trovarono che, immediatamente dopo la somministrazione nasale di cocaina nel ratto, la concentrazione del farmaco nel cervello era più alta che dopo un'iniezione endovenosa, confermando in tal modo l'esistenza di una via di comunicazione diretta tra naso e cervello. Altri studi che confermano il trasporto di farmaci nel SNC attraverso la via nasale sono stati condotti su molecole usate per il trattamento della malattia di Alzheimer [96], dell'epilessia [97], di tumori cerebrali [98], del dolore [99] e dei disturbi del sonno [100].

Tuttavia, la quantità di farmaco somministrato attraverso la via nasale per poi essere trasportata direttamente al cervello è molto bassa, meno dell'1% e pertanto il sistema non è correntemente utilizzato in terapia [15].

Alla luce di quanto detto, comunque, è evidente che in situazioni in cui è fondamentale il target cerebrale, come per esempio nel trattamento della malattia di Alzheimer o di Parkinson, o nel trattamento del dolore, a meno che non si tratti di farmaci molto potenti, sarebbe necessario sviluppare dei sistemi di *drug delivery* in grado di migliorare l'assorbimento del farmaco dalla regione olfattiva della cavità nasale al cervello. Tali sistemi dovrebbero contenere eccipienti bioadesivi e dovrebbero essere somministrati mediante dispositivi che consentano alla formulazione di raggiungere la regione olfattiva. La strategia di

incapsulare i farmaci in *carrier* (come le nanoparticelle) e veicolarli attraverso tale via di somministrazione, potrebbe pertanto aumentare potenzialmente l'accesso degli stessi al SNC. Se i farmaci raggiungessero il cervello in quantità sufficiente, questa via potrebbe rappresentare un nuovo approccio nel *delivery* di principi attivi al SNC e potrebbe generare un nuovo interesse anche per quelle molecole precedentemente abbandonate.

1.4 Trasporto di carrier nanoparticellari attraverso la via *nose to brain*

Le nanoparticelle possono rappresentare un vantaggio nella somministrazione di farmaci al SNC attraverso la via *nose to brain* dal momento che sono in grado di proteggere il farmaco dalla degradazione biologica e/o chimica, aumentandone la biodisponibilità. Avendo un'elevata superficie specifica, rilasciano il farmaco più rapidamente di particelle di dimensioni maggiori, una proprietà desiderabile in caso di trattamento del dolore acuto. Allo scopo di migliorarne la stabilità e la penetrazione transmembrana, e di aumentare il tempo di permanenza della formulazione nella cavità nasale, questi sistemi possono includere, oltre al farmaco, inibitori enzimatici, promotori d'assorbimento e polimeri mucoadesivi. Le nanoparticelle ottenute a partire da materiali polimerici hanno dimostrato avere maggiore capacità di trasportare il farmaco al bulbo olfattivo [101], o di incrementarne l'attività farmacologica [102], quando somministrate per via nasale, rispetto alla semplice soluzione del farmaco.

Seju *et al.* [103] hanno valutato l'assorbimento al SNC di olanzapina a seguito di una somministrazione intranasale di NPs di PLGA contenenti il farmaco. Essi hanno scoperto che i livelli di olanzapina, a seguito di una somministrazione intranasale di NPs, erano di circa 6 e 10 volte superiori rispetto alla soluzione del farmaco somministrata per via endovenosa e

intrasale. Questo ha evidenziato un possibile trasporto diretto del farmaco al cervello dopo somministrazione intranasale di NPs; tuttavia non è ancora chiaro se il miglioramento dell'assorbimento del farmaco sia dovuto o alla capacità delle NPs di attraversare la membrana, o al maggiore tempo di permanenza della formulazione nella cavità nasale o alla minore degradazione enzimatica a cui il farmaco è soggetto. Un'altra spiegazione potrebbe essere l'assorbimento di intere nanoparticelle all'interno dei neuroni presenti nella regione olfattiva tramite un processo di endocitosi.

Haque *et al.* [104], hanno realizzato delle NPs mucoadesive a base di CS contenenti la venlafaxina, le quali si sono dimostrate efficaci nella veicolazione del farmaco al cervello in seguito a somministrazione intranasale. Anche in questo studio, la concentrazione del farmaco nel cervello è risultata essere significativamente più alta per le NPs somministrate per via intranasale, rispetto alla soluzione del farmaco somministrata per la stessa via e per via endovenosa.

Questi risultati rafforzano l'appropriatezza dei sistemi di *delivery* intranasali per il *targeting* cerebrale e suggeriscono anche che i farmaci possano essere trasportati al cervello attraverso la via olfattiva, evitando così la circolazione sistemica.

Gli studi, tuttavia, richiedono ancora notevoli dati clinici su idonei modelli animali per valutare il rapporto rischi/benefici delle formulazioni e la loro efficacia nell'uomo.

1.5 Il chitosano e i suoi derivati per il delivery nasale di farmaci

Da quando Illum *et al.* [105] circa vent'anni fa dimostrarono per primi le proprietà del chitosano nell'aumentare l'assorbimento di farmaci idrofili e peptidici attraverso la membrana epiteliale nasale, sono stati pubblicati dai ricercatori un gran numero di lavori sugli effetti di assorbimento del chitosano a

diverso peso molecolare, diverso grado di acetilazione, diversi sali e derivati, e differenti formulazioni come soluzioni, polveri liofilizzate, gel, microsfeere e nanoparticelle [106], [107]. Il miglioramento dell'assorbimento del farmaco attraverso la via *nose to brain* può essere attribuibile ad una combinazione di due fattori: la mucoadesione, con conseguente aumento del tempo di residenza della formulazione nella regione olfattiva e l'aumento della permeabilità degli epitelii nasali al farmaco, a causa dell'apertura delle giunzioni strette tra le cellule apicali, con conseguente aumento del trasporto per via paracellulare del farmaco.

In letteratura sono riportati diversi studi su NPs di CS veicolanti farmaci attraverso la via *nose to brain* [77], [108], [109], mentre per NPs di TMC ci sono ancora pochi studi in proposito. Nella mia ricerca ho pensato di realizzare delle NPs a base di TMC e SA come *drug delivery system*.

1.6 Le malattie neurodegenerative

Le malattie neurodegenerative sono caratterizzate da una progressiva e irreversibile perdita di neuroni in specifiche regioni del cervello, che può comportare deficit cognitivi, demenza, alterazioni motorie, disturbi comportamentali e psicologici, fino a rendere il paziente inabile alla vita sociale e lavorativa. Le più comuni sono la malattia di Parkinson (PD-Parkinson disease), nella quale la perdita di neuroni nei gangli della base comporta anomalie nel controllo dei movimenti, e la malattia di Alzheimer (AD-Alzheimer disease), in cui la degenerazione di neuroni ippocampali e corticali comporta perdita delle capacità mnesiche e cognitive. Patologie meno comuni sono la malattia di Huntington, la sclerosi laterale amiotrofica, la demenza frontotemporale, la demenza da corpi di Lewy, la paralisi sopranucleare progressiva, e la malattia di Creutzfeldt-Jakob.

Nel 2012 un dettagliato rapporto dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) descriveva le demenze come “una priorità mondiale di salute pubblica” [110]. L'impatto socio-economico di queste patologie, altamente invalidanti, rappresenta senza dubbio uno dei problemi sanitari più gravi del millennio. Se si considerano i dati sull'invecchiamento demografico e sull'aumento dell'aspettativa di vita [111], lo studio dell'OMS assume una dimensione ancor più preoccupante. L'età, infatti, rappresenta il maggiore fattore di rischio associato all'insorgenza delle demenze. Si stima che nei paesi industrializzati la loro incidenza sia dell'8% nei soggetti ultrasessantacinquenni e di oltre il 40% negli ultraottantenni [112]. La popolazione anziana (> 65anni) in Italia rappresenta oltre il 17% del totale, percentuale che è destinata a crescere a livello nazionale e globale. Si ritiene che le varie forme di demenza rappresentino, dopo il cancro e i disordini cardiovascolari, il terzo fattore di morte. Per fronteggiare queste problematiche, nel 2014 il Ministero della Salute ha stilato il “piano nazionale sulle demenze” per favorire e migliorare gli interventi sociosanitari a sostegno del malato e dei familiari. Tuttavia, la natura cronica di queste malattie insieme alle difficoltà relative alla prevenzione, alla diagnosi ed alla terapia delle stesse, rendono sempre più urgente la necessità di trovare delle cure realmente efficaci e non solo palliative. Considerata l'irreversibilità del danno neuronale, la strada più promettente è rappresentata dalla prevenzione ed in tale direzione si sta muovendo la comunità scientifica, rivolgendo in particolar modo la sua attenzione alle cause dell'insulto ed allo studio di meccanismi di neuroprotezione.

1.6.1 *La malattia di Alzheimer*

La AD è una patologia neurodegenerativa che oggi rappresenta la più comune forma di demenza progressiva ed invalidante nell'anziano. L'età avanzata costituisce il principale fattore di rischio per la malattia, tranne che in rare forme genetiche familiari "*early-onset*" (ad esordio giovanile), ma il tasso di incidenza non è uguale per tutte le età: molto rara sotto i 65 anni, tende a raggiungere una diffusione significativa oltre gli 85 anni. Inoltre l'incidenza di questa patologia è diversa nei due sessi, con maggiore rischio per il sesso femminile, specialmente nella popolazione sopra gli 85 anni [113].

La AD è stata per la prima volta descritta nel 1906 dallo psichiatra tedesco Alois Alzheimer, con la pubblicazione di un caso di una paziente di 51 anni che soffriva di un tipo di demenza non conosciuta all'epoca, caratterizzata da allucinazioni ed alterazioni regressive corticali. Agli esami autoptici il cervello risultava atrofico e caratterizzato dalla presenza di depositi proteici anomali, poi conosciuti come placche senili e ammassi neurofibrillari [114].

La regione cerebrale più colpita dalla degenerazione neuronale è il lobo temporale mediale che comprende l'ippocampo e la corteccia entorinale. I sintomi tipici dipendono da una disfunzione a carico di queste aree, che in genere causa perdita della memoria anterograda e successivamente deficit della funzione visivo-spaziale ed esecutiva [115]. Nella maggioranza dei casi, la diagnosi iniziale è quella di declino cognitivo lieve e in questi pazienti la malattia progredisce di circa il 10% all'anno [116]. La degenerazione cognitiva e funzionale arriva a coinvolgere gradualmente altri domini cognitivi, fino ad arrivare ad uno stato di acinesia-mutismo nello stadio finale della malattia. La morte sopraggiunge generalmente entro 6-12 anni dall'insorgenza dei primi sintomi, di solito a causa di complicazioni dovute all'immobilità del paziente.

Le caratteristiche fisiopatologiche principali della AD sono le placche senili, caratterizzate da un accumulo extracellulare di proteina β -Amiloide (β A) ed i

grovigli neurofibrillari intracellulari composti da proteina tau ($P\tau$) associata ai microtubuli. Mentre lo sviluppo delle placche amiloidi è un aspetto iniziale della AD, la progressione del danno ed il peggiorare dei sintomi sono correlati in maniera più marcata con l'aumento dei grovigli di $P\tau$.

Le cause di questi accumuli possono essere molteplici. In particolare, nelle forme di tipo ereditario l'accumulo di βA dipende da mutazioni che causano una produzione eccessiva di tale proteina, mentre nelle forme sporadiche a esordio tardivo la compromissione riguarda maggiormente i meccanismi di eliminazione. Sembra inoltre che sia l'accumulo di βA a provocare l'insorgere dei grovigli di $P\tau$, compromettendo la funzione neuronale e la perdita cellulare. Questa è causata da diversi meccanismi tra cui stress ossidativo, eccitotossicità e neuroinfiammazione.

Non sono tuttavia ancora chiariti i motivi della vulnerabilità selettiva di alcune popolazioni neuronali della zona corticale e ippocampale.

Dal punto di vista neurochimico, il disturbo più evidente della AD è il deficit di acetilcolina. La riduzione del tono colinergico è dovuta all'atrofia e degenerazione dei neuroni colinergici sottocorticali, in particolare quelli dei nuclei della base (nucleo basale di *Meynert*), che supportano l'innervazione della corteccia cerebrale.

Tuttavia, come anche riportato in diversi studi [117], è importante notare come il deficit della AD sia molto complesso, causando uno squilibrio neurochimico anche a livello di altri neurotrasmettitori. Infatti sono coinvolti anche il sistema serotoninergico e il sistema glutammatergico, poiché la distruzione non si limita ai neuroni colinergici, ma interessa anche le cellule neuronali che ricevono l'innervazione colinergica nell'ippocampo e nella corteccia.

Sebbene la AD sia conosciuta e studiata da oltre un secolo, i farmaci attualmente in commercio per la terapia sono solamente cinque: quattro di essi

(tacrina, donepezil, galantamina, rivastigmina) appartengono alla classe degli inibitori dell'acetilcolinesterasi, mentre la memantina è un antagonista dei recettori dell'N-metil-D-aspartato. La loro azione è dunque quella di modulare la trasmissione neuronale: i primi aumentano il tono colinergico mentre la memantina riduce la trasmissione glutammatergica. Tuttavia questi farmaci possiedono un effetto meramente palliativo e non agiscono in alcun modo sulla progressione della patologia [118]. Il motivo dell'insuccesso delle terapie attuali risiede principalmente nel fatto che la AD è una patologia assai complessa e multifattoriale.

Negli ultimi anni sono stati fatti numerosi passi avanti nello studio della sua fisiopatologia, con scoperte importanti riguardo all'eziopatogenesi e la progressione del danno neuronale. Nonostante gli impegni scientifici mirati alla sintesi di nuove molecole attive, i farmaci finora sintetizzati non hanno raggiunto i risultati sperati, e solo una piccola parte di essi è giunta alla fase clinica. Tra le molecole conosciute, tuttavia, ve ne sono alcune che potrebbero essere utilizzate per la terapia delle demenze. Tra di esse, il progesterone, è una delle più interessanti per la sua capacità di ridurre l'infiammazione e lo stress ossidativo a livello del SNC.

1.6.2 *La malattia di Parkinson*

La PD è la patologia neurologica degenerativa più diffusa dopo la malattia di Alzheimer, e colpisce circa l'1,5% della popolazione mondiale sopra i 65 anni d'età [119]. Non esistono differenze significative di incidenza nei due sessi, sebbene alcuni studi indichino una lieve prevalenza maschile [120]. Le prime caratteristiche cliniche della malattia di Parkinson sono state descritte e pubblicate da James Parkinson nel 1817. Nel suo lavoro, Parkinson diede una descrizione dettagliata dei sintomi e definì la malattia come paralisi agitante.

La PD è caratterizzato dalla progressiva degenerazione dei neuroni dopaminergici pigmentati della *pars compacta* della *substantia nigra* del mesencefalo, che proiettano allo striato (caudato e putamen), con formazione di inclusioni intracellulari note come “corpi di *Lewy*”, costituiti da aggregati della proteina α -sinucleina. I sintomi principali comprendono bradicinesia, rigidità muscolare, tremore a riposo e alterazioni dell’equilibrio. Questa perdita cellulare ha come conseguenza una ridotta proiezione dopaminergica allo striato e dunque una disfunzione dei gangli della base. L’effetto finale netto è una riduzione dello stimolo eccitatorio della corteccia motoria da parte del talamo, che porta ai sintomi ipocinetici tipici della malattia. Anche altre aree non-dopaminergiche del cervello sono colpite, ma con minore gravità. Queste aree includono il tronco encefalico, l’ippocampo e la corteccia cerebrale [121]. Le vie nervose non-dopaminergiche potrebbero essere responsabili dei sintomi non motori tra cui la depressione, i disturbi del sonno e i disturbi cognitivi. La PD diventa clinicamente apprezzabile solo quando viene perso approssimativamente il 70-80% dei neuroni dopaminergici. Se non curata, progredisce in 5-10 anni fino ad uno stato di acinesia rigida, ed infine alla morte, che sopraggiunge per complicanze dell’immobilità.

Nella maggior parte dei casi di sindromi parkinsoniane non è possibile identificare una precisa causa, ma, probabilmente, sono implicati sia fattori genetici che ambientali. In questi casi la malattia può essere multifattoriale, cioè più elementi esterni influiscono su un substrato genetico suscettibile.

1.7 Scopo della ricerca

La prosecuzione della ricerca ha riguardato lo studio preliminare di formulazioni nanoparticellari incapsulanti farmaci per il trattamento dell'Alzheimer e del Parkinson attraverso la via di somministrazione *nose to brain*. I principi attivi scelti sono rispettivamente il progesterone e la levodopa.

Gli studi effettuati sono trattati singolarmente nelle sezioni seguenti.

Capitolo 2

NANOPARTICELLE DI TMC/SA VEICOLANTI IL PROGESTERONE

2.1 Introduzione

Il progesterone (PG) è un ormone steroideo a 21 atomi di carbonio (Figura 13), che nella donna è sintetizzato principalmente dalle ovaie e dalle ghiandole surrenali. Nell'uomo, sebbene in quantità inferiore, è prodotto dalle ghiandole surrenali e dalle cellule di Leydig.

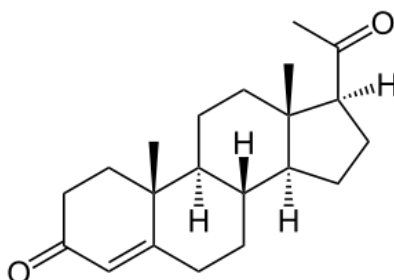


Figura 13. Rappresentazione della struttura chimica del progesterone

La sintesi del PG parte dal colesterolo, il quale viene convertito dal citocromo P450 in pregnenolone, precursore del PG. Il pregnenolone viene poi convertito in progesterone dall'enzima 3β -idrossisteroide deidrogenasi.

Il meccanismo d'azione classico del PG prevede il legame a dei recettori specifici (PG_R -A e PG_R -B) situati nel nucleo cellulare. Il complesso PG- PG_R funge da fattore di trascrizione, agendo sul promotore di specifici geni e regolandone l'espressione. Oltre che a livello dell'utero, della prostata, delle

ghiandole mammarie e delle ossa, il PG_R è ampiamente espresso e distribuito a livello cerebrale, in particolar modo a livello dell'ipotalamo, dell'ipofisi e della corteccia cerebrale [122].

Studi su ratti adulti sottoposti ad ovariectomia hanno evidenziato un deficit colinergico e cognitivo (simile a quello osservato nella malattia di Alzheimer) collegato con la diminuzione della concentrazione plasmatica degli ormoni ovarici (estrogeni e progestinici) [123]. Gli stessi studi hanno inoltre dimostrato come il trattamento farmacologico con PG e/o estrogeni ripristini, almeno parzialmente, le normali capacità cognitive degli animali testati. I dati raccolti da queste ricerche hanno inoltre evidenziato un ruolo cruciale dell'ippocampo e della corteccia prefrontale come bersaglio degli ormoni steroidei nei processi cognitivi. Nonostante numerosi studi attestino l'efficacia del PG sulla memoria, nella comunità scientifica non vi è però un ampio consenso al riguardo [124]. Le discrepanze riscontrate negli studi finora condotti sono probabilmente attribuibili all'eterogeneità dei parametri applicati, quali la dose di PG somministrato, il momento della somministrazione (pre-test o post-test), la durata del trattamento, le specie analizzate e il tipo di test di apprendimento utilizzato.

Mentre il ruolo del PG sui processi cognitivi ed i meccanismi d'azione devono ancora essere chiariti, l'azione neuroprotettiva di questa molecola è ben nota [125]. Vari studi hanno infatti dimostrato l'effetto protettivo del PG in diversi modelli sperimentali di disfunzione cerebrale, che vengono utilizzati per la simulazione delle condizioni fisiopatologiche tipiche delle malattie neurodegenerative. In particolare si è visto come concentrazioni rilevanti di PG attenuino il danno ossidativo causato dal glutammato [126], dalla tossicità per privazione di glucosio e dalla tossicità indotta dal peptide β -Amiloide su una coltura di cellule ippocampali [127]. È inoltre importante menzionare un trial

clinico di fase II condotto sull'uomo, dal quale sono stati ottenuti buoni risultati per il trattamento del trauma cranico acuto moderato [128].

Alla luce dei dati esposti, l'impiego del PG nella terapia e nella prevenzione della malattia di Alzheimer appare promettente. Tuttavia, parallelamente all'aspetto farmacologico, deve essere sviluppata e migliorata anche la modalità di veicolazione del farmaco affinché esso possa raggiungere il SNC, evitando i noti effetti sistemici. Per veicolare il PG a livello del SNC è possibile sfruttare le potenzialità della tecnologia farmaceutica, che permette di migliorare il *targeting* dei principi attivi, per esempio attraverso la loro inclusione in sistemi *carrier*.

2.2 Materiali e metodi

2.2.1 Materiali

Il progesterone Ph. Eur. è stato acquistato dalla ditta Galeno (Italia). L'acido acetico e il metanolo per HPLC, e l'etanolo 96% (v/v) sono stati acquistati presso Sigma Aldrich (Milano, Italia). Tutti gli altri materiali usati per la realizzazione delle NPs sono descritti nella Parte I, paragrafo 2.1.

2.2.2 Metodi

2.2.2.1 Preparazione delle NPs di TMC/SA a base di PG

Il PG è stato incapsulato nella formulazione nanoparticellare 1_A (TMC/SA ratio (p/p) 12/1). Sono stati eseguiti degli studi preliminari incapsulando il farmaco sia nella formulazione 1_A che in quella 1_B, risultate ottimali dallo studio

di formulazione descritto nella Parte I. I dati relativi al diametro medio, alla distribuzione dimensionale (PDI) e alla carica superficiale (PZ) hanno evidenziato che le NPs 1_A che contengono il PG si sono dimostrate addirittura più piccole rispetto al campione senza il principio attivo, mentre in quelle 1_B gli stessi parametri risultavano peggiorati se comparati con quelli delle rispettive NPs senza principio attivo (analisi effettuate in triplicato). Per questo motivo è stato deciso di utilizzare la formulazione 1_A per incapsulare il PG.

Per la preparazione delle NPs, il farmaco è stato disperso nella soluzione di SA, e sono stati realizzati tre campioni: PG-NP_A, PG-NP_B, PG-NP_C, contenenti rispettivamente il farmaco alle concentrazioni di 0,1 - 0,5 - 1 mg/mL. La preparazione delle NPs è stata eseguita seguendo la procedura riportata nella Parte I, paragrafo 2.2.2. In particolare, la dispersione del TMC (2 mg/mL) è stata aggiunta a quella del SA (1 mg/mL), nella quale è stato preventivamente disperso il farmaco alle diverse concentrazioni. L'aggiunta viene fatta goccia a goccia, mantenendo la dispersione del SA sotto vigorosa agitazione (800-1000 rpm). Trascorsi circa 60 minuti, alla miscela così ottenuta si aggiunge, goccia a goccia, sempre sotto vigorosa agitazione, l'agente reticolante, il TPP (1 mg/mL). Il sistema viene fatto stabilizzare per circa 30 minuti. La formazione delle NPs viene evidenziata dalla formazione di una leggera opalescenza.

Ciascun campione è stato realizzato in triplicato.

2.2.2.2 *Analisi dimensionale e della carica superficiale*

Le dimensioni, la distribuzione dimensionale (PDI) e la carica superficiale (PZ) delle PG-NPs sono stati determinati mediante la tecnica del DLLS, utilizzando lo strumento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, London, United Kindom). I campioni nanoparticellari preparati di fresco sono stati analizzati dopo opportuna diluizione in acqua bidistillata. Ogni misurazione è stata eseguita in triplicato e i valori riportati sono il risultato della media \pm deviazione standard delle tre serie.

2.2.2.3 *Determinazione dell'efficienza di incapsulazione*

Per il calcolo dell'efficienza di incapsulazione (EE%), le NPs sono state isolate tramite centrifugazione ($15000 \times g$, 15 min, 4°C) utilizzando una microcentrifuga refrigerata (Scilogex D3024R). Il surnatante ottenuto è stato analizzato mediante analisi HPLC, utilizzando un cromatografo Flexar Perkin Elmer dotato di un rivelatore UV-VIS, e di un sistema computerizzato di integrazione dei dati (TotalChrom). È stata utilizzata una colonna Spherisorb ODS2 C18 5 μm (dimensioni 4,5 x 250 mm) (Waters, Ireland). I campioni sono stati eluiti con fase mobile composta da soluzione acquosa acetica (0,5% v/v) / metanolo in rapporto 10:90 v/v, ad un flusso di 1,2 mL/min e volume di iniezione pari a 50 μL . Il PG è stato rilevato alla lunghezza d'onda di 254 nm (tempo di ritenzione: $3,7 \pm 0,05$ min).

La quantità di PG libera presente nel surnatante è stata determinata mediante una retta di calibrazione: $y = 381695x - 125,37$ ($R^2 = 0,9992$), essendo y e l'area espressa in $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ e x la quantità di PG libero nel surnatante.

L'efficienza di incapsulazione (EE%) è stata determinata indirettamente attraverso la differenza tra la quantità totale di PG in ciascuna formulazione

(PG_{tot}) e la quantità presente nel surnatante (PG_{surn}), mediante l'applicazione della seguente formula:

$$EE\% = \frac{PG_{tot} - PG_{surn}}{PG_{tot}} \times 100$$

2.2.2.4 Studi di rilascio in vitro

Gli studi di rilascio sono stati eseguiti usando le celle di diffusione di Franz. Queste celle sono costituite da un compartimento donatore e uno ricevente, tra i quali viene posizionata una membrana [129]. È stata usata una membrana da dialisi avente *molecular weight cut off* tra 12-14 kD, precedentemente idratata per 12 ore e tagliata in modo tale da avere dimensioni adatte per essere utilizzata nella cella di Franz (area diffusionale di 1,5 cm²). Il volume del compartimento ricevente è di 6,5 mL. Le formulazioni nanoparticellari contenenti il PG alle diverse concentrazioni (100 µL) sono state caricate nel compartimento donatore, mentre il compartimento ricevente di ciascuna cella è stato riempito con una soluzione di acqua bidistillata ed etanolo (80:20 p/p, pH 7,0) e il tutto è stato mantenuto a 37°C. Il volume e la composizione del fluido ricevente sono stati scelti in modo da garantire le *sink condition* per tutta la durata dell'esperimento. Ad intervalli stabiliti (0, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 min) è stato prelevato l'intero volume di soluzione della camera ricevente e rimpiazzato con un uguale volume di solvente. I campioni sono stati poi analizzati mediante HPLC usando le condizioni operative riportate in questa sezione nel paragrafo 2.2.4.

2.2.2.5 Studi di stabilità delle dispersioni nanoparticellari

I campioni PG-NP_A, PG-NP_B, PG-NP_C sono stati sottoposti a studi di stabilità, monitorando la variazione del diametro medio, della carica superficiale (PZ) e dell'efficienza di incapsulazione (EE%) nell'arco di 30 giorni, mantenendo i campioni in dispersione alla temperatura di 4°C.

2.3 Risultati e discussione

2.3.1 Preparazione e caratterizzazione delle PG-NPs

La formulazione migliore in termini di diametro medio, distribuzione dimensionale (PDI) e carica superficiale (PZ) è risultata PG-NP_A, con concentrazione di principio attivo pari a 0,1 mg/mL (Tabella 3). Essa presenta inoltre dimensioni significativamente inferiori rispetto al bianco di riferimento preparato senza il farmaco, il campione nanoparticellare 1_A ($p < 0,05$). Questo fenomeno è verosimilmente dovuto ad interazioni tipo legami a idrogeno che si vengono a creare tra il farmaco e i polimeri. Inoltre, all'aumentare della concentrazione del PG, si ha un aumento del diametro medio e del PDI delle nanoparticelle, e una diminuzione del PZ ($p > 0,05$). Anche in questo caso, come per il bianco, il PZ è positivo, confermando la preponderante presenza del TMC sulla superficie delle NPs.

È stato inoltre misurato il pH delle formulazioni realizzate, e i valori si attestano intorno a 6,5 per tutti i campioni.

Tabella 3 Diametro medio, distribuzione dimensionale (PDI), carica superficiale (PZ), pH ed efficienza di incapsulazione (EE%) dei campioni 1_A-bianco, PG-NP_A, PG-NP_B, PG-NP_C.

Campioni	PG (mg/mL)	DM (nm ± DS)	PDI (± DS)	PZ (mV ±DS)	pH	EE (%)
1 _A -bianco	-	209 ± 9	0,22 ± 0,05	35 ± 4	6,65 ± 0,01	-
PG-NP _A	0,1	162 ± 6	0,18 ± 0,03	28 ± 4	6,49 ± 0,01	85 ± 3
PG-NP _B	0,5	381 ± 89	0,36 ± 0,15	25 ± 1	6,52 ± 0,02	88 ± 2
PG-NP _C	1	1082 ± 66	0,81 ± 0,20	24 ± 1	6,57 ± 0,01	90 ± 4

2.3.2 Determinazione dell'efficienza di incapsulazione

Le PG-NPs realizzate mostrano interessanti proprietà per quel che riguarda l'efficienza di incapsulazione del farmaco. I valori ottenuti, riportati in Tabella 3, sono compresi tra 85-90% per le tre formulazioni, indicando che il sistema è adatto ad incorporare efficacemente il principio attivo.

2.3.3 Studi di rilascio in vitro

Lo studio di rilascio del PG dalle PG-NPs è stato condotto con tutte le formulazioni preparate, che hanno mostrato profili simili tra loro. Nello specifico, i tre sistemi non mostrano l'effetto di *burst release*, ma presentano un *lag time* di 20-25 minuti, trascorso il quale rilasciano il farmaco in modo costante nel tempo. Questo comportamento lascia ipotizzare che il farmaco sia realmente incapsulato all'interno delle NPs e non adsorbito, anche solo parzialmente, sulla superficie.

La formulazione PG-NP_A, avendo caricato rispetto alle altre una quantità inferiore di PG, dopo circa 4 ore ha rilasciato il totale del farmaco incapsulato, mentre le altre due formulazioni continuano a rilasciare con velocità costante, dimostrando che il sistema è in grado di modulare la velocità di cessione del farmaco (Figura 14, (A)).

La percentuale cumulativa di rilascio è riportata nella Figura 14, (B). Dopo circa 7 ore, la formulazione PG-NP_A ha rilasciato quasi il 100% della quantità di farmaco incapsulato, mentre la formulazione PG-NP_B circa il 60% e la PG-NP_C solo circa il 5%. Questi dati ci inducono a ritenere che la quantità ottimale di PG da caricare in questo sistema sia compresa tra 0,1 e 0,5 mg/mL. Considerando il ridotto tempo di residenza delle formulazioni nel caso della via di somministrazione *nose to brain*, la formulazione PG-NP_C risulta più adatta per una via di somministrazione in cui il principio attivo può stare *in situ* più a lungo e/o sia richiesto un rilascio più lento.

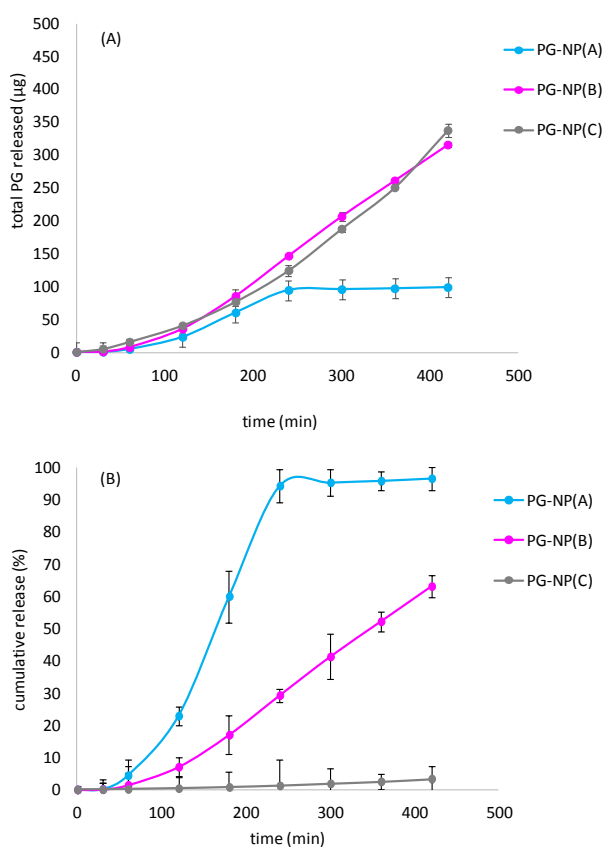


Figura 14. Rilascio in vitro del PG dalle formulazioni PG-NP_A, PG-NP_B, PG-NP_C (A) espresso come quantità assoluta (µg) e (B) espresso come %. Valori medi ± D.S. (n=3).

2.3.4 *Studi di stabilità delle dispersioni nanoparticellari*

La stabilità delle formulazioni PG-NP_A, PG-NP_B, PG-NP_C è stata valutata nel tempo, monitorando la variazione del diametro medio, del potenziale zeta e dell'efficienza di incapsulazione per 30 giorni, mantenendo i campioni in dispersione alla temperatura di 4°C.

In Figura 15 è mostrato l'andamento delle tre formulazioni e il confronto con il campione 1_A bianco senza farmaco. Per quanto riguarda il diametro medio, i campioni (ed il bianco) mantengono dimensioni pressoché stabili nel tempo con aumento di circa il 20% del diametro medio dopo 30 giorni. Anche i valori del PZ restano costanti, e si osserva una variazione percentuale in accordo con le variazioni delle dimensioni. Le NPs di dimensioni più grandi, PG-NP_C, tendono comunque ad aggregarsi maggiormente, avendo già un potenziale zeta iniziale più basso.

Nella Figura 16 è riportata la variazione dell'efficienza di incapsulazione (EE%) dei tre campioni nanoparticellari nell'arco di 30 giorni, mantenendo gli stessi in dispersione a temperatura controllata (4°C). Anche per quanto riguarda l'EE%, la variazione è minima nell'arco di tempo considerato (diminuzione di circa il 10-15% per le tre formulazioni), a riprova del fatto che il sistema è in grado di trattenere il farmaco nel tempo.

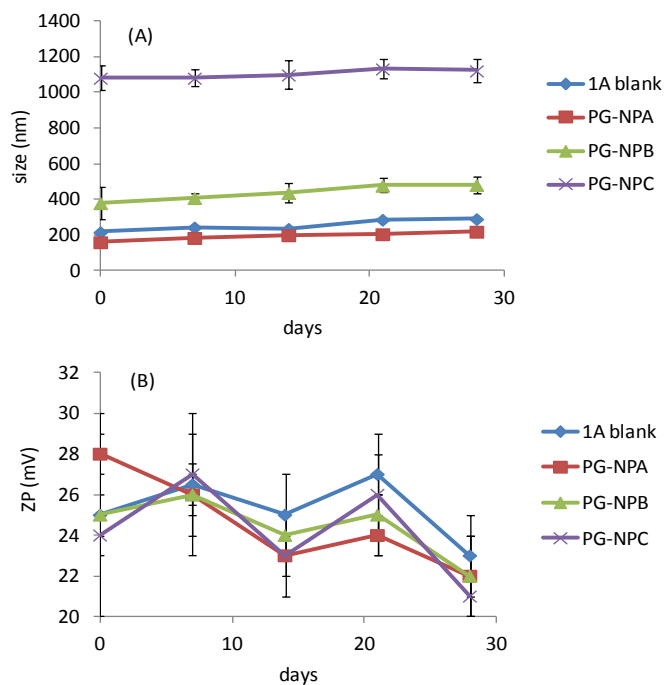


Figura 15. Variazione del diametro medio (A) e del potenziale zeta (B) di 1_A bianco, PG-NP_A, PG-NP_B, PG-NP_C nell'arco di 30 giorni (4°C). Valori medi ± D.S. (n=3).

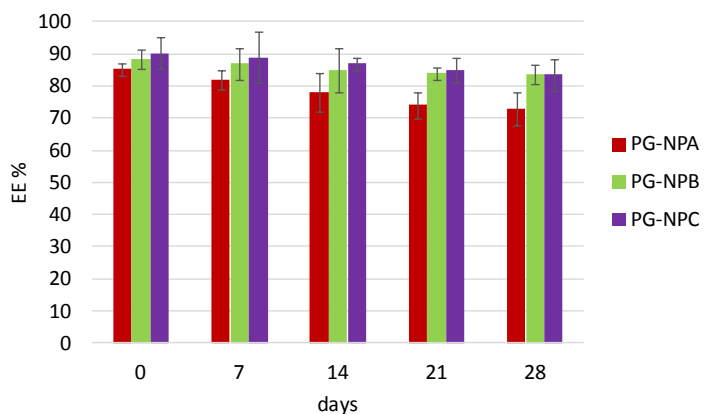


Figura 16. Variazione dell'EE% delle nanoparticelle PG-NP_A, PG-NP_B, PG-NP_C dopo 30 giorni di stoccaggio a 4°C. Valori medi ± D.S. (n=3).

Capitolo 3

NANOPARTICELLE DI TMC/SA VEICOLANTI LA LEVODOPA

3.1 Introduzione

La levodopa (LD, L-3,4-diidrossifenilalanina), precursore metabolico della dopamina, rappresenta il farmaco più efficace e più utilizzato per il trattamento della PD (Figura 17).

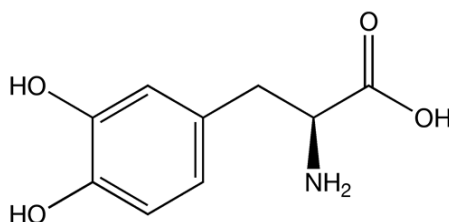


Figura 17. Rappresentazione della struttura chimica della levodopa

A differenza della dopamina, la LD può essere trasportata nel SNC attraverso la barriera ematoencefalica mediante il trasportatore di membrana per gli aminoacidi aromatici. Nel cervello, principalmente nei terminali presinaptici dei neuroni dopaminergici dello striato, la LD viene convertita a dopamina per decarbossilazione enzimatica; quest'ultima è responsabile dell'efficacia terapeutica del farmaco. Dopo somministrazione orale, la LD è assorbita a livello dell'intestino tenue. L'assorbimento presenta variabilità intra- e interindividuale dovuta a fattori dietetici, alla velocità di svuotamento gastrico e al pH dello stomaco, alla somministrazione contemporanea di farmaci antiacidi o anticolinergici. L'emivita plasmatica è breve (1-3 ore). Nella pratica clinica la

LD è somministrata generalmente con un inibitore periferico delle decarbossilasi degli aminoacidi L-aromatici (carbidopa, benserazide), per ridurre la decarbossilazione del farmaco a livello del tratto gastrointestinale (GI) e in altri siti periferici. Si ritiene che la maggior parte degli effetti collaterali risultanti dalla somministrazione orale di LD derivino dalla formazione di grandi quantità di dopamina durante il metabolismo di primo passaggio nel tratto GI. Questi includono nausea, vomito ed irregolarità cardiache [130]. I vantaggi nell'uso degli inibitori delle decarbossilasi periferiche consistono nell'aumento della biodisponibilità del farmaco, nella riduzione degli effetti collaterali e della dose [131]. Se somministrata da sola per via orale, circa il 30% della dose raggiunge la circolazione sistemica; mentre la percentuale aumenta di 2-3 volte in associazione agli inibitori delle decarbossilasi periferiche.

La terapia con la LD migliora i sintomi della PD, quali il tremore, la rigidità e la bradicinesia, negli stadi iniziali della malattia. Tuttavia, nell'uso a lungo termine, la LD perde la capacità di controllare il deficit dopaminergico, con comparsa dei fenomeni di *wearing-off* e *on/off*. Una stimolazione continua potrebbe invece risultare in una maggiore tollerabilità e portare a minori effetti collaterali [132].

Sono state perciò messe in atto delle strategie per ovviare a questi inconvenienti. D'Aurizio *et al.* [133] hanno sintetizzato il pro-farmaco levodopa-acido- α -lipoico (LD-LA) con emivita plasmatica maggiore rispetto alla LD, in quanto meno suscettibile alla conversione enzimatica, e con più alta lipofilia, caratteristica che facilita il trasporto attraverso la barriera ematoencefalica e permette di mantenere più a lungo alti livelli di dopamina. Il pro-farmaco è stato poi incapsulato all'interno di microparticelle (LD-LA-MP), ottenendo una soddisfacente protezione dalla degradazione enzimatica e chimica e controllandone il rilascio. In particolare, la somministrazione sottocutanea di LD-LA-MP, ha permesso di ottenere *in vivo* alti livelli striatali di DA fino a 4

giorni, dopo singola somministrazione. Ren *et al.* [134] incapsularono la levodopa metil estere, un pro-farmaco altamente solubile e idrolizzabile dalle esterasi plasmatiche, insieme alla benserazide, in microparticelle di PLGA. La loro somministrazione cutanea migliora le funzioni motorie e riduce l'insorgenza di movimenti involontari anomali e delle discinesie indotte da LD in un modello animale di Parkinson causato dalla 6-idrossidopamina, rispetto al solo farmaco libero.

Sharma *et al.*, [135] progettarono un sistema a base di LD incapsulata in nanoparticelle di chitosano (LP-CS-NP), incorporandole in un gel termoreversibile di Pluronic F127 per il *delivery* nasale. Il chitosano è stato utilizzato per le sue proprietà mucoadesive, per la sua capacità di aumentare l'assorbimento del farmaco attraverso la mucosa nasale mediante apertura transitoria delle *tight junction* tra le cellule epiteliali e per ritardare la *clearance* mucociliare. Studi *in vivo* hanno dimostrato che la somministrazione intranasale di LP-CS-NP aumenta significativamente il contenuto cerebrale di farmaco. L'incorporazione di LP-CS-NP nel gel facilita la somministrazione della formulazione e ne aumenta il tempo di residenza nella cavità nasale. Tuttavia la viscosità del gel riduce la migrazione delle NPs ed il loro *uptake*, dato che le NPs disperse in soluzione salina determinano più elevati livelli cerebrali di farmaco rispetto a quelle incorporate nel gel.

Altri studi sono stati condotti su nanoparticelle di chitosano incapsulanti un agonista dopaminergico, la bromocriptina [77], utilizzando un modello animale di Parkinson indotto dall'aloiperidolo. Queste nanoparticelle, di dimensioni di circa 160 nm, risultavano essere compatibili col trasporto transcellulare attraverso i neuroni olfattivi fino al cervello. La forza mucoadesiva è stata dimostrata *in vitro* studiando l'efficienza di *binding* della mucina alle NPs. La somministrazione intranasale di formulazioni contenenti il farmaco radiomarcato, se messe a confronto con la soluzione del farmaco, hanno

confermato, mediante studi farmacocinetici e di biodistribuzione nel ratto, un aumento significativo dell'*uptake* cerebrale del farmaco incapsulato nelle NPs mucoadesive e il trasporto diretto al cervello. La bromocriptina, sia in soluzione che incapsulata nelle NPs, è stata somministrata attraverso le narici dell'animale 15 minuti dopo la somministrazione orale di aloperidolo. L'agonista è stato in grado di invertire la catalessi e l'acinesia indotti dall'aloferidolo, portando a migliori risultati nel caso del farmaco incapsulato nelle NPs.

Sulla base di tutte queste considerazioni, si è pensato di utilizzare una delle migliori formulazioni precedentemente studiate per veicolare la LD (sia cloridrato che metilestere), allo scopo di ottenere un sistema di *drug delivery* per la somministrazione *nose to brain*. Questo studio consente di completare la ricerca, verificando la validità della formulazione sia su farmaci lipofili (PG visto nella sezione precedente), sia su farmaci idrofili (LD e derivati).

3.2 Materiali e metodi

3.2.1 Materiali

La LD base, la LD metilestere cloridrato (LD_{ME}), l'acido acetico e il metanolo per HPLC, sono stati acquistati presso Sigma Aldrich (Milano, Italia). La LD cloridrato (LD_{HCl}) è stata realizzata a partire dalla LD base per aggiunta di una quantità stechiometrica di HCl 0,1 N.

Tutti gli altri materiali usati per la realizzazione delle NPs sono descritti nella Parte I, paragrafo 2.1.

3.2.2 Metodi

3.2.2.1 Preparazione delle NPs di LD_{HCl} e delle NPs di LD_{ME}

Allo scopo di evitare i problemi di scarsa solubilità e di facile ossidazione della LD base, è stato realizzato il derivato cloridrato, utilizzando una quantità stechiometrica di HCl 0,1 N. Il campione così realizzato è stato liofilizzato, conservato alla temperatura di 4°C, e successivamente caricato nelle NPs. La LD_{HCl} è perfettamente solubile in acqua alle concentrazioni utilizzate.

Sono state quindi realizzate due differenti formulazioni nanoparticellari, una contenente la LD_{HCl} e l'altra la LD_{ME}, anch'essa ad elevata solubilità in acqua. I campioni realizzati sono stati: LD_{HCl}-NP_D, LD_{HCl}-NP_E, LD_{HCl}-NP_F contenenti rispettivamente il farmaco alle concentrazioni di 0,1 - 0,5 - 1 mg/mL; LD_{ME}-NP_G, LD_{ME}-NP_H, LD_{ME}-NP_I, contenenti rispettivamente il farmaco alle concentrazioni di 0,1 - 0,5 - 1 mg/mL.

Le NPs contenenti la LD_{HCl} e la LD_{ME} sono state preparate a partire dalla formulazione 1_B (TMC/SA ratio (p/p) 6/1). Sono stati eseguiti degli studi preliminari di incapsulazione dei farmaci sia nella formulazione 1_A che in quella 1_B, in quanto entrambe le formulazioni avevano mostrato buone caratteristiche in seguito allo studio di formulazione descritto nella Parte I. I risultati migliori in termini di diametro medio, distribuzione dimensionale (PDI) e carica superficiale (PZ), in questo caso, si sono ottenuti utilizzando la formulazione 1_B, anche se le analisi (effettuate in triplicato) hanno mostrato per entrambe le formulazioni un aumento delle dimensioni per le NPs cariche rispetto ai corrispondenti campioni 1_A e 1_B vuoti.

La preparazione delle NPs è stata eseguita seguendo la procedura riportata nelle Parte I, paragrafo 2.2.2. In particolare, la dispersione del TMC (2 mg/mL) è stata aggiunta a quella del SA (2 mg/mL), nella quale è stato preventivamente

solubilizzato il farmaco alle diverse concentrazioni. L'aggiunta viene fatta goccia a goccia, mantenendo la dispersione del SA sotto vigorosa agitazione (800-1000 rpm). Trascorsi circa 60 minuti, alla miscela così ottenuta si aggiunge, goccia a goccia, sempre sotto vigorosa agitazione, l'agente reticolante, il TPP (1 mg/mL). Il sistema viene fatto stabilizzare per circa 30 minuti. La formazione delle NPs viene evidenziata dalla formazione di una leggera opalescenza. Ciascun campione è stato realizzato in triplicato.

3.2.2.2 Analisi dimensionale e della carica superficiale

Le dimensioni, la distribuzione dimensionale (PDI) e la carica superficiale (PZ) delle LD-NPs sono stati determinati mediante la tecnica del DLLS, utilizzando lo strumento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, London, United Kingdom). I campioni nanoparticellari preparati di fresco sono stati analizzati dopo opportuna diluizione in acqua bidistillata. Ogni misurazione è stata eseguita in triplicato e i valori riportati sono il risultato della media \pm deviazione standard delle tre serie.

3.2.2.3 Determinazione dell'efficienza di incapsulazione

Per il calcolo dell'efficienza di incapsulazione (EE%), tutti i campioni nanoparticellari sono stati dapprima isolati tramite centrifugazione ($15000 \times g$, 15 min, 4°C) usando una microcentrifuga refrigerata (Scilogex D3024R). Il surnatante ottenuto è stato analizzato mediante analisi HPLC, utilizzando un cromatografo Flexar Perkin Elmer dotato di un rivelatore UV-VIS, e di un sistema computerizzato di integrazione dei dati (TotalChrom). È stata utilizzata

per entrambe le serie una colonna Spherisorb ODS2 C18 5 μm (dimensioni 4,5 x 250 mm) (Waters, Ireland).

Nel caso delle LD_{HCl}-NPs, i campioni sono stati eluiti con fase mobile composta da soluzione acquosa acetica (0,5% v/v) / metanolo in rapporto 30:70 v/v, ad un flusso di 1,2 mL/min e volume di iniezione pari a 50 μL . La LD_{HCl} è stata rilevata alla lunghezza d'onda di 284 nm (tempo di ritenzione: $4,5 \pm 0,2$ minuti).

La quantità di LD_{HCl} libera presente nel surnatante è stata determinata mediante una retta di calibrazione: $y = 107020x - 50992$ ($R^2 = 0,9994$), essendo y e x rispettivamente l'area espressa in $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ e la quantità di LD_{HCl} libera nel surnatante.

L'efficienza di incapsulazione (EE%) è stata determinata indirettamente attraverso la differenza tra la quantità totale di LD_{HCl} in ciascuna formulazione (LD_{HCl_{tot}}) e la quantità presente nella fase acquosa separata per centrifugazione (LD_{HCl_{sur}}), mediante l'applicazione della seguente formula:

$$EE\% = \frac{LD_{HCl_{tot}} - LD_{HCl_{sur}}}{LD_{HCl_{tot}}} \times 100$$

Nel caso delle LD_{ME}-NPs, i campioni sono stati eluiti con fase mobile composta da soluzione acetica acquosa (0,5% v/v) / metanolo in rapporto 30:70 v/v, ad un flusso di 1,2 mL/min e volume di iniezione pari a 50 μL . La LD_{ME} è stata rilevata alla lunghezza d'onda di 284 nm (tempo di ritenzione: $5 \pm 0,2$ minuti).

La quantità di LD_{ME} libera presente nel surnatante è stata determinata mediante una retta di calibrazione: $y = 108865x - 131,08$ ($R^2 = 0,9973$), essendo y e x rispettivamente l'area espressa in $\mu\text{V}\cdot\text{s}$ e la quantità di LD_{ME} libera nel surnatante.

L'efficienza di incapsulazione (EE%) è stata determinata indirettamente attraverso la differenza tra la quantità totale di LD_{ME} in ciascuna formulazione (LD_{ME_{tot}}) e la quantità presente nella fase acquosa separata per centrifugazione (LD_{ME_{sum}}), mediante l'applicazione della seguente formula:

$$EE\% = \frac{LDME_{tot} - LDME_{sum}}{LDME_{tot}} \times 100$$

3.3 Risultati e discussione

3.3.1 Preparazione e caratterizzazione delle NPs di LD_{HCl} e delle NPs di LD_{ME}

In Tabella 4 sono riportati i valori dimensionali, la distribuzione dimensionale (PDI) e la carica superficiale (PZ) dei diversi campioni nanoparticellari. La serie LD_{HCl}-NPs presenta valori di diametro medio compreso tra circa 260-320 nm, PDI tra 0,2-0,5 e PZ di circa 30 mV. La serie LD_{ME}-NPs presenta valori medi comparabili per i parametri considerati. Rispetto ai campioni vuoti, le nanoparticelle contenenti i principi attivi risultano avere dimensioni maggiori, con tendenza all'incremento dei valori dimensionali all'aumentare della concentrazione del farmaco (p>0,05). I valori del PZ di tutte le formulazioni sono positivi (~ +30 mV), confermando la preponderante presenza del TMC sulla superficie delle NPs.

È stato inoltre misurato il pH delle formulazioni realizzate, e i valori si attestano tra 6-6,5 per tutti i campioni.

3.3.2 Determinazione dell'efficienza di incapsulazione

I campioni realizzati mostrano purtroppo valori di efficienza di incapsulazione molto bassi, < 20% per entrambe le serie e comunque più bassi per le LD_{HCl}-NPs. I dati dimostrano che le NPs a base di TMC/SA sono verosimilmente poco adatte ad incapsulare farmaci con caratteristiche idrofile.

Tabella 4. Diametro medio, distribuzione dimensionale (PDI), carica superficiale (PZ), pH ed efficienza di incapsulazione (EE%) dei campioni 1_B-bianco, LD_{HCl}-NP_(D,E,F), LD_{ME}-NP_(G,H,I)

Campioni	p.a. (mg/mL)	DM (nm ± DS)	PDI (± DS)	PZ (mV ± DS)	pH	EE (%)
1 _B -bianco	-	197 ± 5	0,28 ± 0,02	32 ± 1	6,58 ± 0,02	-
LD _{HCl} -NP _D	0,1	264 ± 11	0,18 ± 0,02	27 ± 1	6,27 ± 0,02	8 ± 6
LD _{HCl} -NP _E	0,5	288 ± 35	0,49 ± 0,03	29 ± 4	6,01 ± 0,01	9 ± 7
LD _{HCl} -NP _F	1	315 ± 41	0,51 ± 0,02	28 ± 2	5,89 ± 0,03	12 ± 2
LD _{ME} -NP _G	0,1	236 ± 43	0,15 ± 0,07	27 ± 2	6,66 ± 0,02	14 ± 2
LD _{ME} -NP _H	0,5	229 ± 17	0,14 ± 0,03	26 ± 3	6,46 ± 0,01	16 ± 5
LD _{ME} -NP _I	1	270 ± 14	0,15 ± 0,03	29 ± 1	6,25 ± 0,04	13 ± 3

Capitolo 4

CONCLUSIONI

Il *carrier* mucoadesivo costituito da nanoparticelle a base di trimetil chitosano e sodio alginato messo a punto nella prima parte di questa ricerca è stato utilizzato per incorporare due farmaci modello, il progesterone e la levodopa, per una possibile veicolazione *nose to brain*.

In particolare, le due migliori formulazioni già caratterizzate 1_A e 1_B sono state utilizzate: la prima per la veicolazione del progesterone, principio attivo con carattere lipofilo, che, veicolato al sistema nervoso centrale, potrebbe esplicare attività neuroprotettiva nel trattamento di patologie degenerative come la malattia di Alzheimer; la seconda per la veicolazione della levodopa, principio attivo idrofilo, farmaco d'elezione nel trattamento della malattia di Parkinson, anche se responsabile dell'insorgere di effetti collaterali nel lungo termine (discinesie, fenomeni on-off, ecc.), che potrebbero essere minimizzati con un *targeting* specifico e un rilascio modulato del principio attivo.

La scelta dei due principi attivi con caratteristiche chimico-fisiche diverse è stata effettuata per verificare se le formulazioni fossero più adatte per veicolare principi attivi a carattere idrofilo oppure lipofilo.

I dati di efficienza di incapsulazione (%) hanno chiaramente dimostrato che la formulazione 1_A è in grado di caricare quantità di progesterone vicine al 90% e di rilasciare il principio attivo in maniera ottimale per la via di somministrazione ipotizzata, se la concentrazione stessa del progesterone è compresa tra 0,1 e 0,5 mg/mL.

Inoltre il sistema nano particellare studiato ha dimostrato di essere sufficientemente stabile per un periodo di 30 giorni, se conservato in dispersione alla temperatura di 4°C.

La formulazione 1_B non si è dimostrata idonea per l'incapsulazione della levodopa, dal momento che l'efficienza di incapsulazione delle formulazioni contenenti diverse concentrazioni del farmaco si è sempre attestata su valori inferiori al 20%.

I dati ottenuti per le nanoparticelle contenenti progesterone sono sicuramente promettenti, per cui lo sviluppo futuro della presente ricerca sarà rivolto ad effettuare studi di permeazione *ex-vivo*, studi di citotossicità, e soprattutto a verificare l'efficacia delle nanoparticelle in vivo.

BIBLIOGRAFIA

- [1] S. N. Krylov, “Book Review of Probes and Tags to Study Biomolecular Function for Proteins, RNA, and Membranes Probes and Tags to Study Biomolecular Function for Proteins, RNA, and Membranes . Edited by Lawrence W. Miller (University of Illinois, Chicago). Wiley-VCH Ver,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 4, pp. 1621–1622, Feb. 2009.
- [2] V. R. Sinha and R. Kumria, “Polysaccharides in colon-specific drug delivery,” *Int. J. Pharm.*, vol. 224, no. 1–2, pp. 19–38, Aug. 2001.
- [3] Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, and Z. Zhang, “Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 15, pp. 1650–62, Dec. 2008.
- [4] K. Raemdonck, T. F. Martens, K. Braeckmans, J. Demeester, and S. C. De Smedt, “Polysaccharide-based nucleic acid nanoformulations,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 9, pp. 1123–47, Aug. 2013.
- [5] N. Jawahar and S. Meyyanathan, “Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review,” *Int. J. Heal. Allied Sci.*, vol. 1, no. 4, pp. 217–223, 2012.
- [6] C. Verdun, P. Couvreur, H. Vranckx, V. Lenaerts, and M. Roland, “Development of a nanoparticle controlled-release formulation for human use,” *J. Control. Release*, vol. 3, no. 1–4, pp. 205–210, Jan. 1986.
- [7] A. K. Bajpai, S. K. Shukla, S. Bhanu, and S. Kankane, “Responsive polymers in controlled drug delivery,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 33, no. 11, pp. 1088–1118, Nov. 2008.
- [8] B. Calija, N. Cekić, S. Savić, R. Daniels, B. Marković, and J. Milić, “pH-sensitive microparticles for oral drug delivery based on alginate/oligochitosan/Eudragit(®) L100-55 ‘sandwich’ polyelectrolyte complex,” *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 110, pp. 395–402, Oct. 2013.
- [9] Y. Luo, T. T. Y. Wang, Z. Teng, P. Chen, J. Sun, and Q. Wang, “Encapsulation of indole-3-carbinol and 3,3’-diindolylmethane in zein/carboxymethyl chitosan nanoparticles with controlled release

- property and improved stability.,” *Food Chem.*, vol. 139, no. 1–4, pp. 224–30, Aug. 2013.
- [10] A. Trapani, J. Sitterberg, U. Bakowsky, and T. Kissel, “The potential of glycol chitosan nanoparticles as carrier for low water soluble drugs.,” *Int. J. Pharm.*, vol. 375, no. 1–2, pp. 97–106, Jun. 2009.
- [11] B. Li, S. Konecke, L. A. Wegiel, L. S. Taylor, and K. J. Edgar, “Both solubility and chemical stability of curcumin are enhanced by solid dispersion in cellulose derivative matrices.,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 98, no. 1, pp. 1108–16, Oct. 2013.
- [12] K. Letchford and H. Burt, “A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes.,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 65, no. 3, pp. 259–69, Mar. 2007.
- [13] S. M. Hartig, R. R. Greene, J. DasGupta, G. Carlesso, M. M. Dikov, A. Prokop, and J. M. Davidson, “Multifunctional nanoparticulate polyelectrolyte complexes.,” *Pharm. Res.*, vol. 24, no. 12, pp. 2353–69, Dec. 2007.
- [14] A. Odier, “Mémoire sur la composition chimique des parties cornées des insectes,” 1823.
- [15] R. A. Muzzarelli, “Natural chelating polymers; alginic acid, chitin and chitosan,” 1973.
- [16] R. Ravindra, K. R. Krovvidi, and A. A. Khan, “Solubility parameter of chitin and chitosan,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 36, no. 2–3, pp. 121–127, Jul. 1998.
- [17] H. Honarkar and M. Barikani, “Applications of biopolymers I: chitosan,” *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.*, vol. 140, pp. 1403–20, 2009.
- [18] R. Nair, B. Reddy, C. Kumar, and K. Kumar, “Application of chitosan microspheres as drug carriers: a review,” *J Pharma Sci Res*, vol. 17, pp. 1–12, 2009.
- [19] B. Sarmiento and J. das Neves, Eds., *Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2012.
- [20] P. Baldrick, “The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient.,” *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 56, no. 3, pp. 290–9, Apr. 2010.
- [21] L. Ilium, “Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient,” *Pharm. Res.*, vol. 15, no. 9, pp. 1326–1331, 1998.
- [22] D. Vllasaliu, R. Exposito-Harris, A. Heras, L. Casettari, M. Garnett, L.

- Illum, and S. Stolnik, "Tight junction modulation by chitosan nanoparticles: Comparison with chitosan solution," *Int. J. Pharm.*, vol. 400, no. 1–2, pp. 183–193, Nov. 2010.
- [23] J. M. Smith, M. Dornish, and E. J. Wood, "Involvement of protein kinase C in chitosan glutamate-mediated tight junction disruption," *Biomaterials*, vol. 26, no. 16, pp. 3269–3276, Jun. 2005.
- [24] C. Remunan-Lopez and A. Portero, "Chitosan microspheres for the specific delivery of amoxicillin to the gastric cavity," *STP pharma Sci.*, vol. 10, no. 1, pp. 69–76, 2000.
- [25] J. Shimoda, H. Onishi, and Y. Machida, "Bioadhesive characteristics of chitosan microspheres to the mucosa of rat small intestine," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 27, no. 6, pp. 567–576, 2001.
- [26] S. Miyazaki, A. Nakayama, and M. Oda, "Drug release from oral mucosal adhesive tablets of chitosan and sodium alginate," *Int. J. Pharm.*, vol. 118, no. 2, pp. 257–263, 1995.
- [27] A. Naik and H. Nair, "Formulation and Evaluation of Thermosensitive Biogels for Nose to Brain Delivery of Doxepin," *Biomed Res. Int.*, 2014.
- [28] A. F. Kotzé, H. L. Lueßen, A. G. de Boer, J. C. Verhoef, and H. E. Junginger, "Chitosan for enhanced intestinal permeability: Prospects for derivatives soluble in neutral and basic environments," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 7, no. 2, pp. 145–151, Jan. 1999.
- [29] S. Sumit, L. Shikha, and R. S. R. Murthy, "Potential of chitosan for nose to brain drug delivery," *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, vol. 16, no. 1, pp. 47–55, 2012.
- [30] A. Jintapattanakit, S. Mao, T. Kissel, and V. B. Junyaprasert, "Physicochemical properties and biocompatibility of N-trimethyl chitosan: Effect of quaternization and dimethylation," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 70, no. 2, pp. 563–571, Oct. 2008.
- [31] D. Snyman, J. . Hamman, J. . Kotze, J. . Rollings, and A. . Kotzé, "The relationship between the absolute molecular weight and the degree of quaternisation of N-trimethyl chitosan chloride," *Carbohydr. Polym.*, vol. 50, no. 2, pp. 145–150, Nov. 2002.
- [32] V. Cardile, G. Frasca, L. Rizza, F. Bonina, C. Puglia, A. Barge, N. Chiambretti, and G. Cravotto, "Improved adhesion to mucosal cells of water-soluble chitosan tetraalkylammonium salts," *Int. J. Pharm.*, vol. 362, no. 1–2, pp. 88–92, Oct. 2008.
- [33] V. K. Mourya and N. N. Inamdar, "Trimethyl chitosan and its

- applications in drug delivery,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 20, no. 5, pp. 1057–1079, May 2009.
- [34] M. M. Thanou, J. C. Verhoef, S. G. Romeijn, J. F. Nagelkerke, F. W. H. . Merkus, and H. E. Junginger, “Effects of N-trimethyl chitosan chloride, a novel absorption enhancer, on Caco-2 intestinal epithelia and the ciliary beat frequency of chicken embryo trachea,” *Int. J. Pharm.*, vol. 185, no. 1, pp. 73–82, Aug. 1999.
- [35] P. Artursson, T. Lindmark, S. S. Davis, and L. Illum, “Effect of Chitosan on the Permeability of Monolayers of Intestinal Epithelial Cells (Caco-2),” *Pharm. Res.*, vol. 11, no. 9, pp. 1358–1361.
- [36] D. Snyman, J. H. Hamman, and A. F. Kotze, “Evaluation of the mucoadhesive properties of N-trimethyl chitosan chloride.,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 29, no. 1, pp. 61–9, Jan. 2003.
- [37] G. Sandri, S. Rossi, M. C. Bonferoni, F. Ferrari, Y. Zambito, G. Di Colo, and C. Caramella, “Buccal penetration enhancement properties of N-trimethyl chitosan: Influence of quaternization degree on absorption of a high molecular weight molecule.,” *Int. J. Pharm.*, vol. 297, no. 1–2, pp. 146–55, Jun. 2005.
- [38] L. H. du Plessis, A. F. Kotzé, and H. E. Junginger, “Nasal and rectal delivery of insulin with chitosan and N-trimethyl chitosan chloride.,” *Drug Deliv.*, vol. 17, no. 6, pp. 399–407, 2010.
- [39] A. Domard, M. Rinaudo, and C. Terrassin, “New method for the quaternization of chitosan,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 8, no. 2, pp. 105–107, Apr. 1986.
- [40] A. F. Kotzé, M. M. Thanou, H. L. Lueßen, (A)Bert G de Boer, J. C. Verhoef, and H. E. Junginger, “Effect of the degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (Caco-2),” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 47, no. 3, pp. 269–274, May 1999.
- [41] M. Amidi, S. G. Romeijn, G. Borchard, H. E. Junginger, W. E. Hennink, and W. Jiskoot, “Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system.,” *J. Control. Release*, vol. 111, no. 1–2, pp. 107–16, Mar. 2006.
- [42] T. Andreani, L. Miziara, E. N. Lorenzón, A. L. R. de Souza, C. P. Kiill, J. F. Figueiro, M. L. Garcia, P. D. Gremião, A. M. Silva, and E. B. Souto, “Effect of mucoadhesive polymers on the in vitro performance of insulin-loaded silica nanoparticles: Interactions with mucin and biomembrane models.,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 93, pp. 118–26, Jun. 2015.

- [43] K. Y. Lee and D. J. Mooney, "Alginate: properties and biomedical applications.," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 1, pp. 106–126, Jan. 2012.
- [44] J. P. Paques, E. van der Linden, C. J. M. van Rijn, and L. M. C. Sagis, "Preparation methods of alginate nanoparticles.," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 209, pp. 163–171, Mar. 2014.
- [45] S. N. Pawar and K. J. Edgar, "Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications.," *Biomaterials*, vol. 33, no. 11, pp. 3279–305, Apr. 2012.
- [46] B. Chueh, Y. Zheng, Y. Torisawa, A. Y. Hsiao, C. Ge, S. Hsiong, N. Huebsch, R. Franceschi, D. J. Mooney, and S. Takayama, "Patterning alginate hydrogels using light-directed release of caged calcium in a microfluidic device.," *Biomed. Microdevices*, vol. 12, no. 1, pp. 145–51, Feb. 2010.
- [47] I. Machida-Sano, Y. Matsuda, and H. Namiki, "A novel harvesting method for cultured cells using iron-cross-linked alginate films as culture substrates.," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 55, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2010.
- [48] L. W. Chan, A. L. Ching, C. V. Liew, and P. W. S. Heng, "Mechanistic Study on Hydration and Drug Release Behavior of Sodium Alginate Compacts," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 33, no. 6, pp. 667–676, Sep. 2008.
- [49] S. Mizrahy and D. Peer, "Polysaccharides as building blocks for nanotherapeutics.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 7, pp. 2623–40, Apr. 2012.
- [50] C. H. Goh, P. W. S. Heng, and L. W. Chan, "Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications," *Carbohydr. Polym.*, vol. 88, no. 1, pp. 1–12, Mar. 2012.
- [51] Gombotz, "Protein release from alginate matrices," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 31, no. 3, pp. 267–285, 1998.
- [52] J. M. Dang and K. W. Leong, "Natural polymers for gene delivery and tissue engineering.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 58, no. 4, pp. 487–99, Jul. 2006.
- [53] K. L. Douglas and M. Tabrizian, "Effect of experimental parameters on the formation of alginate–chitosan nanoparticles and evaluation of their potential application as DNA carrier," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 16, no. 1, pp. 43–56, Jan. 2005.
- [54] S. A. Agnihotri, N. N. Mallikarjuna, and T. M. Aminabhavi, "Recent

- advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery.,” *J. Control. Release*, vol. 100, no. 1, pp. 5–28, Nov. 2004.
- [55] K. A. Janes, P. Calvo, and M. J. Alonso, “Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 47, no. 1, pp. 83–97, Mar. 2001.
- [56] F. Mi, “Drug release from chitosan–alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 48, no. 1, pp. 61–72, Apr. 2002.
- [57] X.-L. Yan, E. Khor, and L.-Y. Lim, “Chitosan-alginate films prepared with chitosans of different molecular weights,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 58, no. 4, pp. 358–365, 2001.
- [58] M. George and T. E. Abraham, “Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review.,” *J. Control. Release*, vol. 114, no. 1, pp. 1–14, Aug. 2006.
- [59] M. . González-Rodríguez, M. . Holgado, C. Sánchez-Lafuente, A. . Rabasco, and A. Fini, “Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release,” *Int. J. Pharm.*, vol. 232, no. 1–2, pp. 225–234, Jan. 2002.
- [60] S. De, “Polymer relationships during preparation of chitosan–alginate and poly-l-lysine–alginate nanospheres,” *J. Control. Release*, vol. 89, no. 1, pp. 101–112, Apr. 2003.
- [61] P. Calvo and C. Remunan-Lopez, “Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 63, no. 1, pp. 125–132, 1997.
- [62] F. M. Goycoolea, G. Lollo, C. Remuñán-López, F. Quaglia, and M. J. Alonso, “Chitosan-alginate blended nanoparticles as carriers for the transmucosal delivery of macromolecules.,” *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 7, pp. 1736–43, Jul. 2009.
- [63] M. L. Huguet, R. J. Neufeld, and E. Dellacherie, “Calcium-alginate beads coated with polycationic polymers: Comparison of chitosan and DEAE-dextran,” *Process Biochem.*, vol. 31, no. 4, pp. 347–353, May 1996.
- [64] H. Tamura, Y. Tsuruta, and S. Tokura, “Preparation of chitosan-coated alginate filament,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 20, no. 1–2, pp. 143–147, May 2002.
- [65] A. Ribeiro, “Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres,” *Int. J. Pharm.*, vol. 187, no. 1, pp. 115–123, Sep. 1999.

- [66] J. A. A. D. Sezer, "Release characteristics of chitosan treated alginate beads: II. Sustained release of a low molecular drug from chitosan treated alginate beads," *J. Microencapsul.*, vol. 16, no. 6, pp. 687–696, Sep. 2008.
- [67] A. Floris, M. C. Meloni, F. Lai, F. Marongiu, A. M. Maccioni, and C. Sinico, "Cavitation effect on chitosan nanoparticle size: a possible approach to protect drugs from ultrasonic stress.," *Carbohydr. Polym.*, vol. 94, no. 1, pp. 619–25, Apr. 2013.
- [68] R. J. Verheul, M. Amidi, S. van der Wal, E. van Riet, W. Jiskoot, and W. E. Hennink, "Synthesis, characterization and in vitro biological properties of O-methyl free N,N,N-trimethylated chitosan.," *Biomaterials*, vol. 29, no. 27, pp. 3642–9, Sep. 2008.
- [69] S. K. Motwani, S. Chopra, S. Talegaonkar, K. Kohli, F. J. Ahmad, and R. K. Khar, "Chitosan-sodium alginate nanoparticles as submicroscopic reservoirs for ocular delivery: formulation, optimisation and in vitro characterisation.," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 68, no. 3, pp. 513–25, Mar. 2008.
- [70] A. M. M. Sadeghi, F. A. Dorkoosh, M. R. Avadi, P. Saadat, M. Rafiee-Tehrani, and H. E. Junginger, "Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods.," *Int. J. Pharm.*, vol. 355, no. 1–2, pp. 299–306, May 2008.
- [71] "Dynamic Light Scattering e Potenziale zeta - Alfatest SRL." [Online]. Available: <http://www.alfatest.it/pagina.php?p=67>. [Accessed: 27-Sep-2015].
- [72] "SEM microscopia elettronica a scansione - Alfatest SRL." [Online]. Available: <http://www.alfatest.it/pagina.php?p=24>. [Accessed: 27-Sep-2015].
- [73] A. B. Sieval, M. Thanou, A. F. Kotze', J. C. Verhoef, J. Brussee, and H. E. Junginger, "Preparation and NMR characterization of highly substituted N-trimethyl chitosan chloride," *Carbohydr. Polym.*, vol. 36, no. 2–3, pp. 157–165, Jul. 1998.
- [74] S. Wang, T. Jiang, M. Ma, Y. Hu, and J. Zhang, "Preparation and evaluation of anti-neuroexcitation peptide (ANEP) loaded N-trimethyl chitosan chloride nanoparticles for brain-targeting," *Int. J. Pharm.*, vol. 386, no. 1–2, pp. 249–255, 2010.
- [75] A. Polnok, G. Borchard, J. . Verhoef, N. Sarisuta, and H. . Junginger,

- “Influence of methylation process on the degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 57, no. 1, pp. 77–83, Jan. 2004.
- [76] M. L. Manca, J. E. Peris, V. Melis, D. Valenti, M. C. Cardia, D. Lattuada, E. Escribano Ferrer, A. M. Fadda, and M. Manconi, “Nanoincorporation of Curcumin in Polymer-Glycosomes and Evaluation of their In Vitro-In Vivo Suitability as Pulmonary Delivery Systems,” *RSC Adv.*, vol. 5, no. 127, pp. 105149–105159, 2015.
- [77] S. Md, R. A. Khan, G. Mustafa, K. Chuttani, S. Baboota, J. K. Sahni, and J. Ali, “Bromocriptine loaded chitosan nanoparticles intended for direct nose to brain delivery: Pharmacodynamic, Pharmacokinetic and Scintigraphy study in mice model,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 48, no. 3, pp. 393–405, Dec. 2012.
- [78] R. Fernández-Urrusuno, P. Calvo, C. Remuñán-López, J. L. Vila-Jato, and M. J. Alonso, “Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles,” *Pharmaceutical Research*, vol. 16, no. 10, pp. 1576–1581, 1999.
- [79] F. Chen, Z.-R. Zhang, and Y. Huang, “Evaluation and modification of N-trimethyl chitosan chloride nanoparticles as protein carriers,” *Int. J. Pharm.*, vol. 336, no. 1, pp. 166–73, May 2007.
- [80] Y. Xu, Y. Du, R. Huang, and L. Gao, “Preparation and modification of N-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride nanoparticle as a protein carrier,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 27, pp. 5015–5022, Dec. 2003.
- [81] Q. Gan, T. Wang, C. Cochrane, and P. McCarron, “Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery,” *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 44, no. 2–3, pp. 65–73, Aug. 2005.
- [82] L. Illum, “Bioadhesive formulations for nasal peptide delivery,” *Drugs Pharm. Sci.*, vol. 98, pp. 507–539, 1999.
- [83] H. R. Costantino, L. Illum, G. Brandt, P. H. Johnson, and S. C. Quay, “Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects,” *Int. J. Pharm.*, vol. 337, no. 1–2, pp. 1–24, Jun. 2007.
- [84] C. Behl and H. Pimplaskar, “Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 29, no. 1–2, pp. 89–116, 1998.
- [85] F. Chung and M. Donovan, “Nasal pre-systemic metabolism of peptide

- drugs: substance P metabolism in the sheep nasal cavity,” *Int. J. Pharm.*, vol. 128, no. 1–2, pp. 229–237, 1996.
- [86] M. G. Ménache, L. M. Hanna, E. A. Gross, S. R. Lou, S. J. Zinreich, D. A. Leopold, A. M. Jarabek, and F. J. Miller, “Upper respiratory tract surface areas and volumes of laboratory animals and humans: considerations for dosimetry models.,” *J. Toxicol. Environ. Health*, vol. 50, no. 5, pp. 475–506, Apr. 1997.
- [87] V. Jahnke, “Ultrastructure of endonasal polyposis,” *Zeitschrift für Laryngol. Rhinol. Otol. und ihre Grenzgebiete*, vol. 51, no. 5, pp. 323–30, May 1972.
- [88] N. Mygind, C. B. Pedersen, S. Prytz, and H. Sorensen, “Treatment of nasal polyps with intranasal beclomethasone dipropionate aerosol,” *Clin. Exp. Allergy*, vol. 5, no. 2, pp. 159–164, Jun. 1975.
- [89] M. Kaliner, Z. Marom, C. Patow, and J. Shelhamer, “Human respiratory mucus,” *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 73, no. 3, pp. 318–323, Mar. 1984.
- [90] P. Arora, S. Sharma, and S. Garg, “Permeability issues in nasal drug delivery,” *Drug Discov. Today*, vol. 7, no. 18, pp. 967–975, Sep. 2002.
- [91] Z. Sutto, G. E. Conner, and M. Salathe, “Regulation of human airway ciliary beat frequency by intracellular pH.,” *J. Physiol.*, vol. 560, no. 2, pp. 519–32, Oct. 2004.
- [92] E. Morrison and R. Costanzo, “Morphology of the human olfactory epithelium,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 297, no. 1, pp. 1–13, 1990.
- [93] L. Illum, “Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–18, Jul. 2000.
- [94] C. Reiss, I. Plakhov, and T. Komatsu, “Viral Replication in Olfactory Receptor Neurons and Entry into the Olfactory Bulb and Brain,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 855, pp. 751–761, 1998.
- [95] H. S. Chow, “Direct transport of cocaine from the nasal cavity to the brain following intranasal cocaine administration in rats,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 88, no. 8, pp. 754–758, 1999.
- [96] V. V. Jogani, P. J. Shah, P. Mishra, A. K. Mishra, and A. R. Misra, “Nose-to-brain delivery of tacrine.,” *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 59, no. 9, pp. 1199–205, Sep. 2007.
- [97] N. Barakat, “Carbamazepine uptake into rat brain following intra-olfactory transport,” *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 58, no. 1, pp. 63–72,

2006.

- [98] R. Hashizume, T. Ozawa, S. M. Gryaznov, A. W. Bollen, K. R. Lamborn, W. H. Frey, and D. F. Deen, "New therapeutic approach for brain tumors: Intranasal delivery of telomerase inhibitor GRN163.," *Neuro. Oncol.*, vol. 10, no. 2, pp. 112–20, Apr. 2008.
- [99] U. Westin, E. Piras, and B. Jansson, "Transfer of morphine along the olfactory pathway to the central nervous system after nasal administration to rodents," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 24, no. 5, pp. 565–573, 2005.
- [100] K. Yamada and M. Hasegawa, "Nose-to-brain delivery of TS-002, prostaglandin D2 analogue," *J. Drug Target.*, vol. 15, no. 1, pp. 59–66, 2007.
- [101] Q. Zhang, X. Jiang, W. Jiang, W. Lu, L. Su, and Z. Shi, "Preparation of nimodipine-loaded microemulsion for intranasal delivery and evaluation on the targeting efficiency to the brain.," *Int. J. Pharm.*, vol. 275, no. 1–2, pp. 85–96, May 2004.
- [102] D. Betbeder, S. Spérandio, J.-P. Latapie, J. de Nadaí, A. Etienne, J.-M. Zajac, and B. Francés, "BiovectorTM Nanoparticles Improve Antinociceptive Efficacy of Nasal Morphine," *Pharm. Res.*, vol. 17, no. 6, pp. 743–748.
- [103] U. Seju, A. Kumar, and K. K. Sawant, "Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: in vitro and in vivo studies.," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 12, pp. 4169–76, Dec. 2011.
- [104] S. Haque, S. Md, J. K. Sahni, J. Ali, and S. Baboota, "Development and evaluation of brain targeted intranasal alginate nanoparticles for treatment of depression.," *J. Psychiatr. Res.*, vol. 48, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2014.
- [105] L. Illum, N. F. Farraj, and S. S. Davis, "Chitosan as a Novel Nasal Delivery System for Peptide Drugs," *Pharm. Res.*, vol. 11, no. 8, pp. 1186–1189.
- [106] B. Luppi, F. Bigucci, A. Abruzzo, G. Corace, T. Cerchiara, and V. Zecchi, "Freeze-dried chitosan/pectin nasal inserts for antipsychotic drug delivery.," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 75, no. 3, pp. 381–7, Aug. 2010.
- [107] S. B. Patil and K. K. Sawant, "Chitosan microspheres as a delivery system for nasal insufflation.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 84, no. 2, pp. 384–9, Jun. 2011.
- [108] Y.-Y. Wang, S. K. Lai, J. S. Suk, A. Pace, R. Cone, and J. Hanes,

- “Addressing the PEG mucoadhesivity paradox to engineer nanoparticles that ‘slip’ through the human mucus barrier.,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 47, no. 50, pp. 9726–9, Jan. 2008.
- [109] M. Fazil, S. Md, S. Haque, M. Kumar, S. Baboota, J. K. Sahni, and J. Ali, “Development and evaluation of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles for brain targeting.,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 47, no. 1, pp. 6–15, Aug. 2012.
- [110] Organization W. H., “Dementia : a public health priority.” World Health Organization, 2012.
- [111] “Q&A From PRB’s Webinar on the 2011 World Population Data Sheet.” [Online]. Available: <http://www.prb.org/Publications/Datasheets/2011/world-population-data-sheet/webinar-questions-answers>. [Accessed: 12-Feb-2016].
- [112] “<http://www.salute.gov.it/> [Accessed: 09-Nov-2015].”
- [113] K. Andersen, L. J. Launer, M. E. Dewey, L. Letenneur, A. Ott, J. R. M. Copeland, J.-F. Dartigues, P. Kragh-Sorensen, M. Baldereschi, C. Brayne, A. Lobo, J. M. Martinez-Lage, T. Stijnen, and A. Hofman, “Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies,” *Neurology*, vol. 53, no. 9, pp. 1992–1992, Dec. 1999.
- [114] M. Strassnig and M. Ganguli, “About a peculiar disease of the cerebral cortex: Alzheimer’s original case revisited.,” *Psychiatry (Edgmont)*, vol. 2, no. 9, pp. 30–3, Sep. 2005.
- [115] L. Brunton, B. Chabner, and B. Knollman, *Goodman and Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics, Twelfth Edition*. McGraw Hill Professional, 2011.
- [116] R. C. Petersen, R. G. Thomas, M. Grundman, D. Bennett, R. Doody, S. Ferris, D. Galasko, S. Jin, J. Kaye, A. Levey, E. Pfeiffer, M. Sano, C. H. van Dyck, and L. J. A. D. C. S. G. U. Thal, “Vitamin E and Donepezil for the Treatment of Mild Cognitive Impairment.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 352, no. 23, pp. 2379–2388, 2005.
- [117] A. Kumar and A. Singh, “A review on Alzheimer’s disease pathophysiology and its management: an update,” *Pharmacol. Reports*, vol. 67, no. 2, pp. 195–203, Apr. 2015.
- [118] R. Anand, K. D. Gill, and A. A. Mahdi, “Therapeutics of Alzheimer’s disease: Past, present and future,” *Neuropharmacology*, vol. 76, no. Part A, pp. 27–50, Jan. 2014.

- [119] E. Garbayo, E. Ansorena, and M. J. Blanco-Prieto, "Drug development in Parkinson's disease: from emerging molecules to innovative drug delivery systems.," *Maturitas*, vol. 76, no. 3, pp. 272–8, Nov. 2013.
- [120] M. Baldereschi, A. Di Carlo, W. A. Rocca, P. Vanni, S. Maggi, E. Perissinotto, F. Grigoletto, L. Amaducci, and D. Inzitari, "Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: Two-fold higher incidence in men," *Neurology*, vol. 55, no. 9, pp. 1358–1363, Nov. 2000.
- [121] H. Braak and K. Del Tredici, "Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease.," *Neurology*, vol. 70, no. 20, pp. 1916–25, May 2008.
- [122] C. M. Luetjens, A. Didolkar, S. Kliesch, W. Paulus, A. Jeibmann, W. Böcker, E. Nieschlag, and M. Simoni, "Tissue expression of the nuclear progesterone receptor in male non-human primates and men.," *J. Endocrinol.*, vol. 189, no. 3, pp. 529–39, Jun. 2006.
- [123] C. A. Frye, C. K. Duffy, and A. A. Walf, "Estrogens and progestins enhance spatial learning of intact and ovariectomized rats in the object placement task.," *Neurobiol. Learn. Mem.*, vol. 88, no. 2, pp. 208–16, Sep. 2007.
- [124] L. A. Barros, S. Tufik, and M. L. Andersen, "The role of progesterone in memory: an overview of three decades.," *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 49, pp. 193–204, Feb. 2015.
- [125] M. Singh and C. Su, "Progesterone and neuroprotection.," *Horm. Behav.*, vol. 63, no. 2, pp. 284–90, Feb. 2013.
- [126] P. Kaur, P. K. Jodhka, W. A. Underwood, C. A. Bowles, N. C. de Fiebre, C. M. de Fiebre, and M. Singh, "Progesterone increases brain-derived neurotrophic factor expression and protects against glutamate toxicity in a mitogen-activated protein kinase- and phosphoinositide-3 kinase-dependent manner in cerebral cortical explants.," *J. Neurosci. Res.*, vol. 85, no. 11, pp. 2441–9, Aug. 2007.
- [127] Y. Goodman, A. J. Bruce, B. Cheng, and M. P. Mattson, "Estrogens Attenuate and Corticosterone Exacerbates Excitotoxicity, Oxidative Injury, and Amyloid β -Peptide Toxicity in Hippocampal Neurons," *J. Neurochem.*, vol. 66, no. 5, pp. 1836–1844, Nov. 2002.
- [128] G. Xiao, J. Wei, W. Yan, W. Wang, and Z. Lu, "Improved outcomes from the administration of progesterone for patients with acute severe traumatic brain injury: a randomized controlled trial.," *Crit. Care*, vol. 12, no. 2, p. R61, Jan. 2008.

- [129] T. J. Franz, "Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 64, no. 3, pp. 190–195, Mar. 1975.
- [130] H. D. Kao, A. Traboulsi, S. Itoh, L. Dittert, and A. Hussain, "Enhancement of the Systemic and CNS Specific Delivery of L-Dopa by the Nasal Administration of Its Water Soluble Prodrugs," *Pharm. Res.*, vol. 17, no. 8, pp. 978–984.
- [131] D. Deleu, M. G. Northway, and Y. Hanssens, "Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs used in the treatment of Parkinson's disease.," *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 41, no. 4, pp. 261–309, Jan. 2002.
- [132] J. A. Obeso and W. Olanow, "Continuing efforts to obtain continuous delivery of levodopa.," *Mov. Disord.*, vol. 26, no. 12, pp. 2149–50, Oct. 2011.
- [133] E. D'Aurizio, P. Sozio, L. S. Cerasa, M. Vacca, L. Brunetti, G. Orlando, A. Chiavaroli, R. J. Kok, W. E. Hennink, and A. Di Stefano, "Biodegradable microspheres loaded with an anti-Parkinson prodrug: an in vivo pharmacokinetic study.," *Mol. Pharm.*, vol. 8, no. 6, pp. 2408–15, Dec. 2011.
- [134] T. Ren, X. Yang, N. Wu, Y. Cai, Z. Liu, and W. Yuan, "Sustained-release formulation of levodopa methyl ester/benserazide for prolonged suppressing dyskinesia expression in 6-OHDA-leisoned rats.," *Neurosci. Lett.*, vol. 502, no. 2, pp. 117–22, Sep. 2011.
- [135] S. Sharma, S. Lohan, and R. S. R. Murthy, "Formulation and characterization of intranasal mucoadhesive nanoparticulates and thermo-reversible gel of levodopa for brain delivery," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, Jun. 2014.