

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE

Settore Concorsuale di afferenza: 03/D2
Settore Scientifico disciplinare: CHIM/09
Ciclo XXVI

***Strategie formulative
per la veicolazione nasale
di farmaci***

Presentata da
Bruno Saladini

Relatore
Dott.ssa Barbara Luppi

Co-relatore
Dott. Stefano Luca Giaffreda

Coordinatore Dottorato
Prof. Aldo Roda

Esame finale anno 2014

Indice

1. INTRODUZIONE.....	5
2. LA VIA DI SOMMINISTRAZIONE NASALE	10
2.1. Anatomia e fisiologia del naso	13
2.1.1. La regione respiratoria	15
2.1.2. La regione olfattiva.....	17
2.1.3. La secrezione nasale.....	18
2.2. Assorbimento dei farmaci attraverso la mucosa nasale	19
2.2.1. Deposito e sito di deposizione.....	20
2.2.2. Assorbimento transmucosale	21
2.2.3. Rilascio locale.....	21
2.2.4. Rilascio sistemico	22
2.2.5. Vaccini nasali.....	22
2.2.6. SNC: veicolazione dei farmaci attraverso la via nasale	23
2.3. Fattori che influenzano l'assorbimento nasale	24
2.3.1. Fattori anatomici e fisiologici	24
2.3.2. Caratteristiche chimico-fisiche del farmaco	27
2.3.3. Gli enhancer d'assorbimento	29
2.4. Forme farmaceutiche nasali.....	34
2.4.1. Aerosol nasale	34
2.4.2. Formulazioni liquide	35
2.4.3. Formulazioni semisolide.....	36
2.4.4. Formulazioni solide	37
2.5. Dispositivi nasali.....	39
2.5.1. Preparazioni liquide.....	39

2.5.2. Preparazioni solide.....	40
2.6. Microcarriers e nanocarriers nasali.....	42
2.6.1. Microsfere.....	42
2.6.2. Nanoparticelle.....	45
2.6.3. Liposomi.....	47

3. MICROPARTICELLE DI CHITOSANO/PECTINA PER IL RILASCIO NASALE DI TACRINA CLORIDRATO.....51

3.1. La malattia di Alzheimer.....	53
3.1.1. Trattamento della malattia.....	55
3.2. La Tacrina.....	56
3.3. Gli idrogeli polielettrolitici.....	58
3.3.1. Chitosano.....	59
3.3.2. Pectina.....	61
3.3.3. L'idrogelo chitosano-pectina.....	62
3.4. Parte Sperimentale.....	65
3.4.1. Materiali.....	65
3.4.2. Preparazione delle microparticelle liofilizzate.....	65
3.4.3. Preparazione delle microparticelle Spray Dried.....	66
3.4.4. Studi dell'efficienza di caricamento.....	67
3.4.5. Misura delle dimensioni delle microparticelle.....	67
3.4.6. Analisi al microscopio a scansione elettronica.....	68
3.4.7. Analisi termogravimetriche (TGA).....	68
3.4.8. Calorimetria a scansione differenziale (DSC).....	69
3.4.9. Diffrazione di raggi X su polveri (XRPD).....	69
3.4.10. Capacità d'idratazione delle microparticelle.....	69
3.4.11. Capacità mucoadesive delle microparticelle.....	70
3.4.12. Studi di rilascio in-vitro.....	71
3.4.13. Studi di permeazione ex-vivo.....	72

<i>3.5. Risultati e discussioni</i>	<i>74</i>
<i>3.5.1. Preparazione e caricamento delle microparticelle.....</i>	<i>74</i>
<i>3.5.2. Misura delle dimensioni delle microparticelle</i>	<i>75</i>
<i>3.5.3. Analisi al microscopio a scansione elettronica</i>	<i>77</i>
<i>3.5.4. TGA.....</i>	<i>78</i>
<i>3.5.5. X-Ray Powder Diffraction.....</i>	<i>79</i>
<i>3.5.6. DSC.....</i>	<i>81</i>
<i>3.5.7. Capacità d'idratazione delle microparticelle</i>	<i>82</i>
<i>3.5.8. Capacità mucoadesive delle microparticelle</i>	<i>83</i>
<i>3.5.9. Studi di rilascio in-vitro.....</i>	<i>85</i>
<i>3.5.10. Studi di permeazione ex-vivo.....</i>	<i>86</i>
<i>3.6. Conclusioni</i>	<i>87</i>

4. NANOPARTICELLE DI CHITOSANO RETICOLATE CON SODIO CROMOGLICATO PER IL TRATTAMENTO DELLA RINITE ALLERGICA.....88

<i>4.1. La rinite allergica.....</i>	<i>89</i>
<i>4.1.1. Trattamento della malattia</i>	<i>90</i>
<i>4.2. Sodio Cromoglicato</i>	<i>91</i>
<i>4.3. Preparazione di nanoparticelle polimeriche.....</i>	<i>94</i>
<i>4.3.1. Emulsione semplice con evaporazione del solvente.....</i>	<i>94</i>
<i>4.3.2. Doppia emulsione con evaporazione del solvente</i>	<i>95</i>
<i>4.3.3. Omogeneizzazione a caldo</i>	<i>95</i>
<i>4.3.4. Omogeneizzazione a freddo</i>	<i>96</i>
<i>4.3.5. Polimerizzazione di monomeri.....</i>	<i>96</i>
<i>4.3.6. Coacervazione o gelazione ionica.....</i>	<i>97</i>
<i>4.4. Parte Sperimentale.....</i>	<i>98</i>
<i>4.4.1. Materiali</i>	<i>98</i>
<i>4.4.2. Preparazione delle nanoparticelle.....</i>	<i>98</i>

4.4.3. Determinazione della resa.....	99
4.4.4. Analisi dimensionale e morfologica.....	99
4.4.5. Caricamento del farmaco ed efficienza di incapsulazione	100
4.4.6. Stabilità delle NPs in soluzione fisiologica ed acqua.....	101
4.4.7. Studi di mucoadesione.....	101
4.4.8. Studi di rilascio in-vitro	102
4.4.9. Studi di permeazione/penetrazione in-vitro.....	102
4.5. Risultati e discussioni.....	104
4.5.1. Preparazione delle nanoparticelle e resa.....	104
4.5.2. Analisi dimensionale e morfologica.....	105
4.5.3. Caricamento, efficienza di incapsulazione e potenziale Z	107
4.5.4. Stabilità delle NPs in soluzione fisiologica ed acqua.....	108
4.5.5. Studi di mucoadesione.....	109
4.5.6. Studi di rilascio in-vitro	109
4.5.7. Studi di permeazione in-vitro.....	110
4.6. Conclusioni.....	113

5. ANALISI QUANTITATIVA DI BUDESONIDE AMORFA TRAMITE CALORIMETRIA A SCANSIONE DIFFERENZIALE..... 114

5.1. Introduzione.....	114
5.2. Il polimorfismo farmaceutico.....	115
5.3. Analisi quantitativa di polimorfi	117
5.4. Parte sperimentale.....	121
5.4.1. Materiali.....	121
5.4.2. Preparazione della Budesonide amorfa.....	121
5.4.3. Calorimetria a scansione differenziale (DSC)	121
5.4.4. Diffrazione di raggi X su polveri (XRPD)	122
5.4.5. Spettroscopia infrarossa (FT-IR).....	122
5.4.6. Analisi termogravimetrica (TGA).....	122

5.4.7. Preparazione delle miscele standard	123
5.4.8. Linearità	123
5.4.9. Precisione	123
5.4.10. Accuratezza	124
5.4.11. LOD e LOQ	124
5.5. Risultati e discussione	125
5.5.1. DSC	125
5.5.2. XRPD	127
5.5.3. TGA	128
5.5.4. Preparazione delle miscele standard	129
5.5.5. Curva di calibrazione	131
5.5.6. Precisione	132
5.5.7. Accuratezza	134
5.5.8. LOD e LOQ	134
5.6. Conclusioni	135
6. BIBLIOGRAFIA	136

Lista dei lavori trattati

1. B. Saladini, F. Bigucci, T. Cerchiara, M. C. Gallucci, B. Luppi, Microparticles based on chitosan/pectin polyelectrolyte complexes for nasal delivery of tacrine hydrochloride, Drug delivery and translational research 3 (2013) 33 – 41.

*Reproduced with permission. License Number:
3345970070104 (2014) Springer ©*

2. Nanoparticelle di Chitosano reticolate con Sodio Cromoglicato per il trattamento della rinite allergica (articolo in preparazione).
3. Analisi quantitativa di Budesonide amorfa tramite calorimetria a scansione differenziale (articolo in preparazione).

Il mio contributo

Ho contribuito a tutte le parti dei lavori descritti precedentemente, ad eccezione delle analisi SEM (lavoro 1) che sono state effettuate dalla Dott.ssa M.C. Gallucci (Dipartimento di Chimica, Università della Calabria, Arcavacata di Rende, Cosenza).

Ho inoltre contribuito alle analisi termiche (TGA e DSC) del seguente articolo:

Abruzzo A., Bigucci F., Cerchiara T., Saladini B., Cruciani F., Vitali B., Luppi B., Chitosan/alginate complexes for vaginal delivery of chlorhexidine digluconate. Original Research Article. 2013, 91(2), 651-658.

1

INTRODUZIONE

Il presente lavoro di tesi include diversi approcci sperimentali allo studio di formulazioni innovative per la somministrazione nasale di farmaci. Nel corso dei tre anni di dottorato sono state affrontati diversi aspetti riguardanti le formulazioni nasali: dalle strategie formulative all'utilizzo di diversi approcci sintetici (spray drying, liofilizzazione, coacervazione ionica); dalla caratterizzazione chimico-fisica allo studio del polimorfismo farmaceutico; dagli studi *in-vitro* a quelli *ex-vivo*.

Gli studi sono stati svolti presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Bologna, oggi Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, e presso PolyCrystalLine S.r.l., azienda in cui occupo la posizione di Responsabile del Laboratorio Analitico. Di seguito sono riassunti gli argomenti oggetto di questa relazione di tesi.

Microparticelle a base di complessi polielettroliti di Chitosano/Pectina per il rilascio nasale di Tacrina cloridrato¹

Lo scopo di questo studio è stata la ricerca di nuove formulazioni solide per la somministrazione nasale di Tacrina cloridrato allo scopo di ridurre l'eccessivo effetto di primo passaggio epatico ed aumentarne la biodisponibilità a livello del Sistema Nervoso Centrale. Il farmaco anti-Alzheimer è stato incapsulato in microparticelle mucoadesive a base di complessi elettrolitici di chitosano e pectina. Le microparticelle sono state preparate mediante due diversi approcci tecnologici (spray-drying diretto e spray-drying seguito da liofilizzazione) e analizzate in termini di caratteristiche dimensionali, morfologiche e chimico-fisiche. Inoltre, dopo averne analizzato le capacità igroscopiche e le proprietà mucoadesive, sono stati effettuati studi di rilascio del farmaco e di permeazione. I risultati suggeriscono che la liofilizzazione favorisce la formazione di piccoli aggregati con dimensioni di 10 μm , mentre con la tecnica di spray-drying diretto si ottenevano singole particelle con dimensioni inferiori ai 5 micron. Le microparticelle ottenute con i due diversi metodi di caricamento presentavano differenti proprietà funzionali dovute al diverso stato chimico-fisico del farmaco caricato e alla sua possibile interazione con il complesso chitosano/pectina. Inoltre, è stato osservato che la presenza di differenti rapporti molari di chitosano e pectina nella struttura microparticellare influenzava la loro capacità di idratarsi, di interagire con la mucina e di favorire la permeazione del farmaco.

Nanoparticelle di Chitosano reticolate con Sodio Cromoglicato per il trattamento della rinite allergica

Il Sodio Cromoglicato (SC), attualmente disponibile in commercio come spray nasale in soluzione acquosa, è uno dei farmaci utilizzati per il trattamento della rinite allergica, un processo infiammatorio acuto dovuto alla deposizione di allergeni sulla mucosa. Come noto, la *clearance* mucociliare provoca una rapida rimozione dei farmaci in soluzione dalla cavità nasale, aumentando così il numero di somministrazioni giornaliere e, di conseguenza, riducendo la compliance del paziente. Per ovviare a tale problema, si è pensato di includere il sodio cromoglicato in nanoparticelle (NPs) di chitosano (CH), un polimero capace di aderire alla mucosa nasale, prolungare il contatto della formulazione con il sito di applicazione e ridurre il numero di somministrazioni giornaliere. In questo studio sono state sfruttate le cariche negative del sodio cromoglicato per indurre la reticolazione del CH, polimero policationico, con conseguente formazione di nanoparticelle mucodesive. Le NPs ottenute sono state caratterizzate in termini di dimensioni, resa, efficienza di incapsulazione e caricamento del farmaco, potenziale zeta e caratteristiche mucoadesive. Due formulazioni (CH₁₈/SC₉ e CH₃₆/SC₉) sono state selezionate per le loro interessanti caratteristiche in termini di resa e sono state testate al fine di valutarne le proprietà chimico-fisiche e funzionali. Entrambe le formulazioni hanno mostrato buone proprietà in termini di caricamento, efficienza di incapsulazione, mucoadesione e

stabilità nelle 24 ore. Infine, dagli studi in-vitro di permeazione/penetrazione è stato possibile osservare che le NPs ottenute favoriscono la permanenza di un maggiore contenuto di SC nella mucosa rispetto alle soluzioni acquose. La possibilità di mantenere, all'interno della mucosa nasale, un alto contenuto di sodio cromoglicato, disponibile all'interazione con i mastociti, suggerisce una potenziale applicazione di queste formulazioni nel trattamento locale della rinite allergica.

Analisi quantitativa di Budesonide amorfa tramite calorimetria a scansione differenziale

La Budesonide è un glucocorticoide sintetico, usato in prevalenza per via inalatoria nella prevenzione e nel trattamento delle crisi asmatiche, nel trattamento della rinite allergica e delle poliposi nasali. La Budesonide per somministrazione inalatoria è commercializzata come sospensione acquosa oppure come polvere secca. Ad oggi, la Budesonide è conosciuta allo stato solido in una forma cristallina e nella forma amorfa. Lo studio del polimorfismo farmaceutico è di estrema importanza e attualità sia a causa della brevettabilità delle nuove forme cristalline sia per l'influenza che la struttura solida ha sulle caratteristiche chimico-fisiche della sostanza (solubilità, punto di fusione e stabilità) e, di conseguenza, sulla sua biodisponibilità all'interno dell'organismo. Risulta perciò sempre più importante sviluppare metodiche quali-quantitative che permettano di analizzare i principi attivi nella

loro forma solida. A tale scopo, è stato sviluppato un nuovo metodo quantitativo allo stato solido basato sulla Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC) in grado di quantificare in modo selettivo e accurato la quantità di Budesonide amorfa presente in una miscela solida. Durante lo sviluppo del metodo sono stati affrontati problemi relativi alla convalida di metodi analitici su campioni solidi. Il più importante e impattante sulla precisione del metodo è la miscelazione di polveri solide per la preparazione di miscele standard. Infatti, per quanto possa essere efficiente un processo di miscelazione a livello macroscopico, esso è tuttavia influenzato da molteplici fattori (quali la dimensione delle particelle, la densità, la forma e le caratteristiche superficiali delle due polveri) che possono favorire o sfavorire il processo stesso di miscelazione. Tali fattori, non essendo direttamente e facilmente controllabili, fanno sì che ogni miscela fisica di polveri “macroscopicamente omogenea” debba essere considerata “microscopicamente disomogenea”, soprattutto nel caso della DSC che misura quantità di campioni inferiori ai 5 mg. Sono state quindi proposte metodiche alternative che prevedono la misurazione delle miscele nella loro interezza. Inoltre, essendo la DSC una tecnica distruttiva, non è possibile ripetere più analisi sul medesimo campione. Pertanto, la precisione intra-day e la ripetibilità inter-day sono state calcolate costruendo tre rette di calibrazione ed entrambe sono state espresse come valori di deviazione standard relativa percentuale (RSD%) delle slope delle tre rette e non dei singoli punti.

2

LA VIA DI SOMMINISTRAZIONE NASALE

Ogni giorno vengono sintetizzate numerose nuove molecole potenzialmente attive, le quali vengono scartate per la loro tossicità o per la loro scarsa biodisponibilità. Il problema principale dei farmaci attivi sul sistema nervoso centrale (SNC) è proprio la loro difficoltà di attraversare la barriera ematoencefalica (BEE), che protegge il cervello separando il liquido interstiziale dal sangue circolante. Morfologicamente la BEE è composta da due membrane plasmatiche in serie separate da circa 300 nm di citoplasma endoteliale². Questa barriera assicura una superficie di interfaccia di circa 12 m² tra capillari cerebrali e tessuto cerebrale³.

Le cellule dell'endotelio capillare sono strettamente collegate tra loro tramite connessioni intercellulari (*tight junctions*), che agiscono come cerniere chiudendo i pori inter-endoteliali normalmente esistenti nelle membrane endoteliali. Le *tight junctions* determinano una maggiore resistenza elettrica transendoteliale (1500-2000 Ω cm²) rispetto ad altri tessuti come la pelle, la vescica, il colon e i polmoni (3-33 Ω cm²)⁴. Questo rende la barriera ematoencefalica resistente alla libera diffusione di

molecole attraverso la membrana e impedisce alla maggior parte delle molecole attive di raggiungere il SNC dal flusso sanguigno. Meno del 2% dei farmaci a basso peso molecolare e praticamente nessun farmaco di grandi dimensioni può attraversare la BEE. Questo ostacolo ha stimolato l'interesse della ricerca farmaceutica nella progettazione di nuove vie di somministrazione capaci di veicolare efficacemente i farmaci diretti al SNC.

Negli ultimi anni la via di somministrazione nasale ha suscitato sempre più interesse e sono numerose le *review* pubblicate che approfondiscono alcune interessanti applicazioni di questa via di somministrazione di farmaci^{5,6,7,8}. Infatti, la via intranasale 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 fornisce una serie di attributi unici che possono aumentare la sicurezza, la *compliance* del paziente, la velocità di assorbimento del farmaco e, di conseguenza, la velocità di insorgenza dell'effetto terapeutico. Inoltre, la mucosa nasale, rispetto ad altre membrane, è facilmente accessibile e rappresenta una pratica via d'ingresso sia per piccole che grandi molecole. L'assorbimento di quest'ultime può essere migliorata mediante *enhancer* d'assorbimento o altri approcci. La biodisponibilità nasale di piccole molecole è buona e farmaci che non vengono assorbiti per via orale possono essere veicolati alla circolazione sistemica per via nasale. Gli studi finora condotti indicano, inoltre, che la via nasale è una valida alternativa alla via parenterale soprattutto per proteine e peptidi e, per pazienti

soggetti a terapia parenterale a lungo termine, queste via di somministrazione risulta essere più comoda e meno invasiva.

Rispetto alla via orale la somministrazione nasale ha lo svantaggio di offrire una minore superficie di assorbimento e di rendere possibili fenomeni di irritazione locali dovuti al farmaco stesso o all'utilizzo degli *enhancer* d'assorbimento. Vi è inoltre il rischio di effetti collaterali locali e danni irreversibili alle ciglia della mucosa nasale, sia da parte del farmaco che da altri componenti della formulazione. Alcuni tensioattivi utilizzati come *enhancer* chimici, ad esempio, possono distruggere e anche dissolvere membrane se somministrate in alte concentrazioni.

La somministrazione intranasale ha il vantaggio di garantire una rapida insorgenza degli effetti terapeutici, di non produrre nessun effetto di primo passaggio epatico e nessuna degradazione gastrointestinale o tossicità polmonare. La somministrazione non è invasiva e l'applicazione è sostanzialmente indolore e di facile utilizzo da parte del paziente. Inoltre, nella regione olfattiva della mucosa nasale, i farmaci possono essere trasportati direttamente al cervello. Ci si rese conto che la regione olfattiva è il sito di entrata di alcuni virus nel cervello. Per confermare questa ipotesi Shoshkes Reiss C. et al.⁹ hanno inoculato il virus della stomatite vescicolare nell'epitelio nasale di topi e hanno verificato come il virus si è trasmesso, lungo il nervo olfattivo, nel SNC. La veicolazione di farmaci nel SNC attraverso la via intranasale è stata verificata^{10,11,12,13} sia in esseri umani sia in modelli animali

nella cura della malattia di Alzheimer^{14,15}, di tumori cerebrali^{16,17}, dell'epilessia¹⁸, del dolore¹⁹ e dei disturbi del sonno²⁰. È stato appurato che l'assorbimento di farmaco nel cervello dalla mucosa nasale si verifica principalmente attraverso tre vie differenti: per via sistemica (il farmaco viene assorbito nella circolazione sistemica e raggiunge successivamente il cervello attraversando la BEE), per via olfattiva e attraverso il nervo trigemino. I farmaci assorbiti attraverso la via olfattiva e trigeminale viaggiano dalla cavità nasale al liquido cerebrospinale (CSF)²¹. Il farmaco può attraversare il percorso olfattivo tramite uno o più meccanismi tra cui il passaggio transcellulare, la diffusione semplice attraverso la membrana, il trasporto paracellulare tramite movimento tra le cellule e la transitosi di vescicole vettore.

2.1. Anatomia e fisiologia del naso

Le funzioni principali della cavità nasale nell'uomo e negli animali sono la respirazione e l'olfatto. La struttura e la funzione di tale cavità sono correlate alla risonanza di suoni prodotti, alla filtrazione di particelle, alla *clearance* mucociliare, all'attività immunologiche e al riscaldamento e all'umidificazione dell'aria inspirata prima che raggiunga il polmoni²². Per la somministrazione di farmaci per via nasale, i farmaci devono poter permeare efficacemente attraverso la mucosa nasale. A tale scopo, la comprensione dell'anatomia e della fisiologia della mucosa nasale diventa un requisito indispensabile per la progettazione di sistemi farmaceutici capaci di veicolare

efficacemente principi attivi farmaceutici dalla cavità nasale al circolo sanguigno e, in particolar modo, al SNC²³.

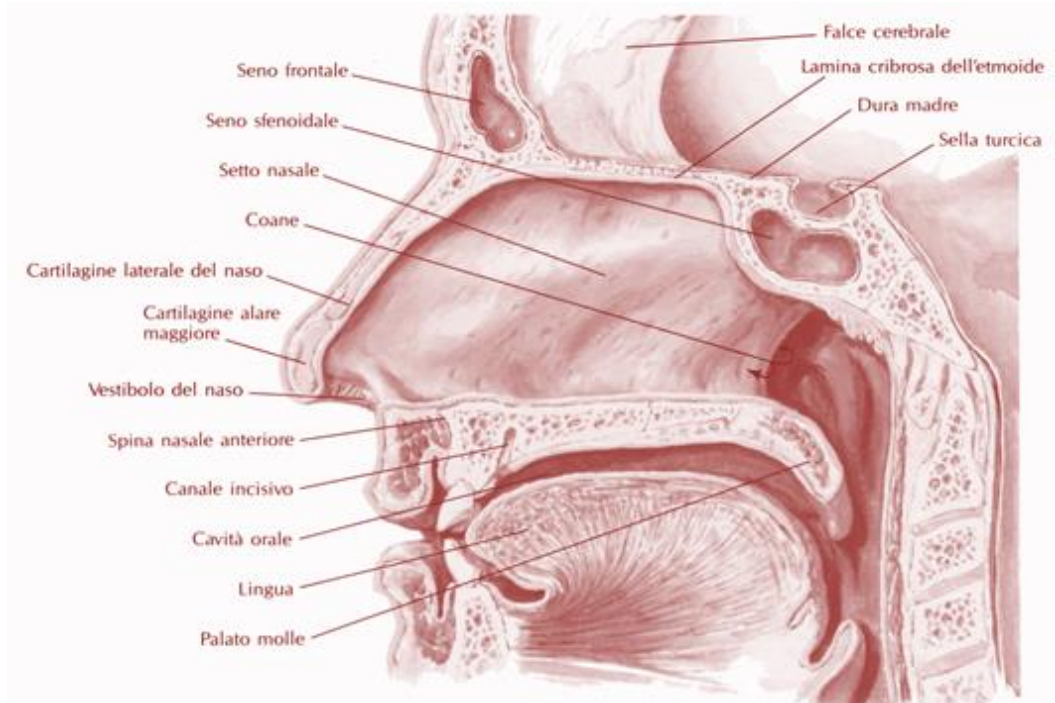


Figura 1

La cavità nasale è suddivisa lungo il centro in due metà dal setto nasale. Le due cavità si aprono dal lato del viso attraverso le aperture nasali anteriori e verso la rinofaringe attraverso le aperture nasali posteriori e ciascuna delle due cavità nasali può essere suddivisa in diverse regioni: il vestibolo nasale, i turbinati inferiori, medi e superiori, la regione olfattiva, il seno frontale, il seno sfenoidale e la lamina cribrosa dell'osso etmoide. La superficie totale della cavità nasale in un adulto umano è di circa 150 cm² e il volume totale è di circa 15 mL. La regione respiratoria contiene tre turbinati nasali (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 membrana epiteliale nasale rappresenta una barriera alla libera diffusione di sostanze^{24,25,26}. La presenza di *tight junction* tra cellule epiteliali vicine impedisce che molecole idrofile diffondano liberamente attraverso l'epitelio tramite percorsi paracellulari. Le *tight junction* si trovano al confine tra i domini apicali e basolaterali all'estremità delle cellule epiteliali.

2.1.1. La regione respiratoria

All'interno della cavità nasale, la regione respiratoria è il sito avente il più alto grado di vascolarizzazione e, di conseguenza, risulta essere il target d'eccellenza per la veicolazione di farmaci nella circolazione sistemica. Si compone di un epitelio che poggia su una membrana basale e su una lamina propria²⁷. La parte anteriore della regione respiratoria è rivestita di epitelio squamoso, che si trasforma in epitelio colonnare pseudostratificato nella parte posteriore della cavità nasale. L'epitelio pseudostratificato, detto anche epitelio respiratorio, è composto da quattro tipi di cellule: cellule ciliate colonnari, cellule colonnari non ciliate, cellule caliciformi e cellule basali. Le cellule basali si trovano sulla membrana basale e, a differenza degli altri tre tipi di cellule, non si estendono fino alla superficie epiteliale apicale. Esse sono ricche di cellule dendritiche, molto importanti per la risposta immunitaria locale (IgA). Tutte le cellule

respiratorie sono coperte da circa 300 microvilli per cellula mentre il 15-20% sono rivestite da uno strato di lunghe ciglia di dimensioni comprese tra 2-4 micron.

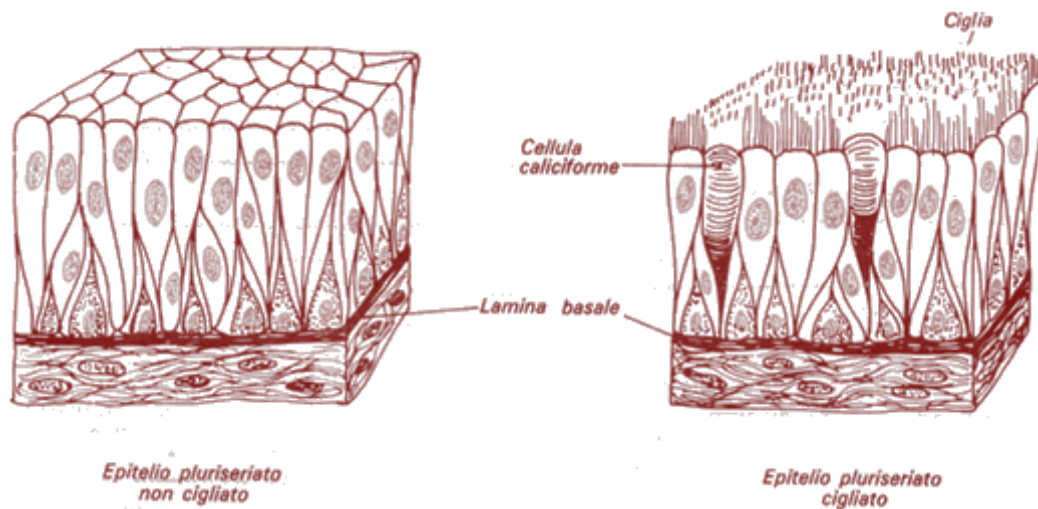


Figura 2

Il movimento coordinato delle ciglia spinge il muco dalla superficie epiteliale verso la faringe²⁵. Il muco è composto da uno strato a bassa viscosità (sol), che ricopre la punta delle ciglia, e da uno strato di gel più viscoso sulla parte superiore dello strato di sol. Le cellule epiteliali sono strettamente ancorate alla superficie apicale, circondate da giunzioni intercellulare noti come *junction complex*^{7,21}. La regione respiratoria è innervata dal nervo trigemino che entra nel cervello sia attraverso il ponte e, separatamente, attraverso la piastra cribrosa sotto i bulbi olfattivi²⁸.

2.1.2. La regione olfattiva

La regione olfattiva è situata tra il setto nasale e le pareti laterali di ciascuna delle due cavità nasali e appena sotto la lamina cribrosa dell'osso etmoide che separa la cavità cranica dalla cavità nasale. Negli uomini la regione olfattiva è limitata a un'area di circa 10 cm² situata nel tetto della cavità nasale. L'epitelio olfattivo è innervato dai nervi olfattivi (Fig. 3) che sono responsabili del trasporto di farmaci dalla cavità nasale al SNC attraverso la regione di passaggio intra/extraneuronale.

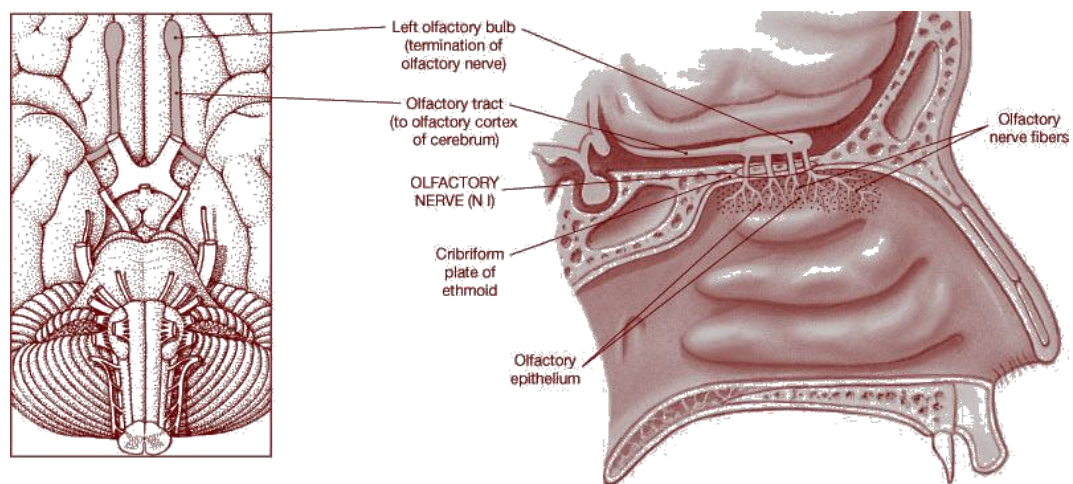


Figura 3

La somministrazione di farmaci dal naso al SNC può quindi essere ottenuta tramite il neuroepitelio olfattivo e può coinvolgere meccanismi paracellulari (spazi intercellulari e *tight junction*), transcellulari (diffusione passiva, trasporto attivo e transcitosi) e il trasporto neuronale. Vari studi in modelli animali hanno confermato che, immediatamente dopo la somministrazione nasale, la concentrazione di cocaina 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 cervello²⁹. Dopo una singola somministrazione nasale di 40 UI di insulina, Fehm et al. hanno registrato un significativo accumulo nel liquido cerebrospinale mentre non veniva osservato nessuno aumento nei livelli plasmatici³⁰.

L'afflusso di sangue alla mucosa nasale è importante per quanto riguarda la somministrazione di farmaci a livello sistemico. La fornitura di sangue arterioso alla cavità nasale arriva dalle arterie carotidi esterne e interne. Il ramo terminale dell'arteria mascellare fornisce l'arteria sfenopalatina, che a sua volta alimenta le pareti laterale e mediale della cavità nasale. I rami etmoidali anteriore e posteriore provengono dalla arteria oftalmica e vascolarizzano la porzione anteriore del naso³¹.

2.1.3. La secrezione nasale

L'epitelio di un naso pulito, non infetto, non allergico e non irritato, è coperto da uno strato di muco secreto dalle cellule caliciformi e dalle ghiandole sierose della mucosa e della submucosa nasale²². Circa il 90-95% dello strato mucoso è costituito da acqua contenente elettroliti, proteine del siero, immunoglobuline e lipidi, mentre il 3% è costituito da mucina³². Il muco si sposta attraverso il naso ad una velocità di circa 5-6 mm/min, rinnovandosi quindi ogni 10-15 minuti. Il muco nasale svolge una serie di funzioni fisiologiche: protegge fisicamente ed enzimaticamente dagli agenti esterni, trattiene l'acqua, agisce

come adesivo e trasporta le particelle verso la nasofaringe³³. Il pH medio anteriore del naso è 6.40, mentre il pH nella regione posteriore della cavità nasale è di 6.27³⁴. Più in generale, il pH normale delle secrezioni nasali in adulti varia da 5.5 a 6.5, mentre nei neonati e nei bambini va da 5.0 a 6.7²². Una variazione di pH nel muco può influenzare la sua ionizzazione e può quindi aumentare o diminuire la permeazione di un farmaco a seconda della sua natura. L'effetto del pH nasale sull'alterazione dell'assorbimento di alcuni farmaci è stato studiato negli animali ed in modelli animali. Morimoto et al. hanno dimostrato che una riduzione del pH nasale nei ratti è associato ad un maggiore assorbimento di vasopressina. Va inoltre segnalato che una riduzione del pH provoca un effetto negativo sul battito ciliare³⁵.

2.2. Assorbimento dei farmaci attraverso la mucosa nasale

L'assorbimento di un farmaco attraverso la mucosa nasale può essere considerato come un processo costituito da diverse fasi. Ciascuna fase, in relazione alle caratteristiche del farmaco, alla forma farmaceutica e al dispositivo utilizzato per la somministrazione, può risultare limitante per l'assorbimento. Tali fasi sono:

- Deposizione della formulazione sulla mucosa nasale;
- Liberazione del principio attivo dalla formulazione;
- Passaggio del principio attivo attraverso lo strato di muco;

- Trasporto del principio attivo attraverso le cellule epiteliali respiratorie e l'endotelio capillare.

La quantità e la velocità con cui il principio attivo viene assorbito attraverso la mucosa nasale determinano l'efficacia terapeutica della somministrazione nasale. Di conseguenza, durante lo sviluppo di un prodotto farmaceutico destinato alla via nasale, è necessario scegliere opportunamente ogni componente (eccipienti) ed il dispositivo più adatto per la somministrazione.

2.2.1. Deposito e sito di deposizione

È importante comprendere il principale meccanismo secondo cui le particelle di un aerosol si depositano sulle vie aeree. In generale, le particelle inalate possono depositarsi nelle vie aeree superiori e inferiori mediante vari meccanismi: intercettazione, impatto inerziale, sedimentazione e diffusione. In caso di somministrazione nasale, data la velocità del flusso di aria inspirata e le grandi dimensioni delle particelle, il meccanismo che governa la deposizione di un aerosol è l'impatto inerziale. L'impatto inerziale si verifica quando il flusso d'aria inspirato, in cui sono sospese delle particelle, cambia la sua direzione durante il suo tragitto e le particelle, non potendo seguire il flusso d'aria inspirato, impattano contro la superficie che incontrano. La deposizione nasale delle particelle di un aerosol, quindi, dipende dall'inerzia delle particelle, dalla loro dimensione, dalla velocità del flusso d'aria e dalla geometria delle vie aeree.

2.2.2. Assorbimento transmucoale

La membrana epiteliale nasale possiede la funzione fisiologica di barriera. Gli studi del trasporto di una sostanza attraverso la membrana epiteliale hanno evidenziato la presenza di due vie preferenziali di trasporto: via transcellulare o lipofila e la via paracellulare, grazie alla quale una sostanza passa negli spazi tra le cellule o i pori acquosi. Vi sono numerosi sistemi di difesa che possono ostacolare o limitare il trasporto del farmaco come il passaggio attraverso lo strato di muco, la possibile inattivazione enzimatica di peptidi e proteine e la permeabilità della membrana. Per ovviare a tali inconvenienti, possono essere incluse nella formulazione sostanze che facilitano il trasporto del farmaco, definite *promotori d'assorbimento chimici*. Queste sostanze organiche agiscono incrementando il trasporto del farmaco attraverso la membrana. Possono agire attraverso vari meccanismi: aumentando la solubilità del farmaco, inibendo gli enzimi come le proteasi, aumentando la fluidità dello strato lipidico interagendo con i componenti lipidici o proteici, alterando le *tight junctions*, aumentando il tempo di contatto tra farmaco e mucosa, aumentando il flusso ematico.

2.2.3. Rilascio locale

La via nasale è la scelta primaria per trattamenti di disordini locali, come rinosinusite o congestione nasale trattati con antistaminici e corticosteroidi. In questi casi la via nasale è la

prima opzione per il rilascio di farmaci perché induce una rapida riduzione dei sintomi e degli effetti collaterali rispetto alla via orale o parenterale. Recentemente si sta considerando la terapia antibiotica locale in caso di rinosinusite per cercare di eliminare il biofilm batterico spesso resistente a trattamenti sistemici e per evitare la tossicità associata a questa cura.

2.2.4. Rilascio sistemico

Numerosi studi sono stati effettuati per confrontare la via nasale alla via orale e parenterale. Il risultato è che la via nasale permette un assorbimento sistemico molto veloce e, immettendo il farmaco direttamente nel sistema portale, ne aumenta notevolmente la biodisponibilità, soprattutto nel caso di farmaci con un elevato metabolismo epatico. Di conseguenza, farmaci come analgesici, cardiovascolari, ormoni e farmaci antivirali sono attualmente studiati per formulazioni nasali.

2.2.5. Vaccini nasali

La mucosa nasale è il primo sito di contatto con antigeni inalati e per questo è sfruttata nel caso di vaccini, soprattutto contro le infezioni di tipo respiratorio. Il vaccino nasale è una buona alternativa alla via parenterale poiché permette di aumentare i livelli sistemici di IgG ed IgA nasali. La risposta immunologica locale è in parte mediata dal tessuto linfoide nasale, al di sotto dell'epitelio. Questo tessuto linfoide è composto da cellule

dendritiche, linfociti B e T, coinvolti nell'iniziazione ed esecuzione della risposta immune. La vaccinazione nasale comunque non è rivolta solo ad infezioni di tipo aereo, ma anche contro virus trasmessi attraverso altri siti mucosali, come l'HIV o virus dell'epatite B.

2.2.6. SNC: veicolazione dei farmaci attraverso la via nasale

Il cervello è un organo delicato, con molte funzioni vitali, isolato e protetto dall'ambiente esterno da parecchi meccanismi intrigati. Questi stessi meccanismi, spesso, impediscono il passaggio di farmaci nel SNC. Tra questi troviamo la barriera emato-encefalica che circonda il cervello, caratterizzata da giunzioni serrate. Qualora farmaci o altri xenobiotici riescano ad attraversarla, vi è una seconda linea di difesa che limita maggiormente la penetrazione a livello del SNC.

Negli ultimi anni, però, la via nasale è emersa come promettente approccio per la veicolazione di farmaci al SNC. Infatti, l'assorbimento può verificarsi attraverso il neuroepitelio olfattorio e può coinvolgere il trasporto paracellulare e transcellulare. Studi di questo tipo sono stati effettuati per patologie come la malattia di Alzheimer, epilessia e disordini del sonno.

2.3. Fattori che influenzano l'assorbimento nasale

2.3.1. Fattori anatomici e fisiologici

Una delle funzioni del tratto respiratorio superiore è quello di evitare che le sostanze nocive (allergeni, batteri, virus e tossine) raggiungano i polmoni. Generalmente, quando tali materiali aderiscono o si sciolgono nel muco della cavità nasale, essi vengono trasportati verso la rinofaringe per poi essere scaricate nel tratto gastrointestinale. Questo meccanismo di difesa è noto come *clearance* mucociliare (MCC)³³.

Il sistema di *clearance* mucociliare nasale trasporta lo strato di muco che ricopre l'epitelio nasale verso la rinofaringe mediante il battito ciliare. La sua funzione è quella di proteggere il sistema respiratorio da danni dovuti a inalazione di particolato e altre sostanze. Una perdita di funzionalità della *clearance* mucociliare nasale può portare a malattie delle vie aeree superiori. La *clearance* mucociliare nasale procede con una velocità media di circa 5-6 mm/min²²; formulazioni somministrate nell'epitelio respiratorio umano vengono eliminate dalla cavità nasale in circa 20 minuti. La *clearance* mucociliare ha anche influenza sull'assorbimento del farmaco: poiché i farmaci vengono eliminati rapidamente dalla cavità nasale dopo la somministrazione, è importante che l'assorbimento sistemico del farmaco sia adeguatamente rapido. A tale scopo, sono state discusse diverse strategie formulative atte ad aumentare il tempo di permanenza di formulazioni nella cavità nasale in modo da migliorarne

l'assorbimento³⁶. Ad esempio, inibendo la *clearance* mucociliare, è possibile aumentare il tempo di contatto tra farmaco e mucosa e, di conseguenza, la sua permeazione attraverso essa; viceversa, la stimolazione della *clearance* mucociliare diminuisce la permeazione del farmaco³⁷.

Zaki N.M. et al. hanno sviluppato un gel mucoadesivo capace di ridurre *in situ* la *clearance* mucociliare e migliorare la biodisponibilità di un farmaco antiemetico (metoclopramide cloridrato). Risulta quindi possibile prolungare il tempo di contatto farmaco-mucosa variando le proprietà reologiche della formulazione. Queste riducono o ritardano la *clearance* della mucosa tramite interazioni specifiche tra un gel polimerico e componenti del muco³⁸. Esistono un gran numero di metodi utilizzati per valutare la funzione mucociliare: alcuni studiano l'intero sistema mucociliare in-vivo, mentre altri (*in-vitro* o *ex-vivo*) prendono separatamente in considerazione singoli componenti, come ad esempio l'attività ciliare e lo strato di muco³⁷.

Un'altra importante barriera per l'assorbimento nasale di farmaci è rappresentato dal metabolismo enzimatico. Infatti, sebbene i farmaci somministrati per via nasale riescano ad evitare il metabolismo epatico, vi è una vasta gamma di enzimi metabolici ubicata nella mucosa nasale che possono limitare la biodisponibilità di alcuni farmaci, specialmente quelli contenenti peptidi o proteine³⁹. È stata riportata la presenza di un gran numero di enzimi nella cavità nasale⁴⁰, che comprendono:

- *Citocromo P-450*: catalizza l'ossidazione di alcuni substrati.
- *Aldeide deidrogenasi*: è un enzima responsabile dell'ossidazione di aldeidi ad acidi carbossilici. Le formaldeide deidrogenasi sono più abbondanti nella mucosa olfattiva, mentre l'attività di acetaldeide deidrogenasi è più abbondante nel tessuto respiratorio nasale.
- *15-lipossigenasi*: è un enzima che catalizza l'ossidazione di acido arachidonico per produrre 15-hydroperoxyarachidonate (15-HPETE) che viene rapidamente convertito a 15-idrossi-5-,8,11,13 eicosatetraenoate (15-HETE).
- *Alcol deidrogenasi*: sono un gruppo di enzimi deidrogenasi che facilitano l'interconversione tra alcoli e aldeidi o chetoni con la riduzione di nicotinammide adenina dinucleotide.
- *Carbossilesterasi*: è un enzima che catalizza la reazione chimica tra un acido carbossilico e l'acqua in un alcol e un carbossilato. Le attività carbossilesterasiche nella cavità nasale sono fra le più alte di tutte le attività che vi si trovano.
- *Epossido idrolasi*: ha funzioni di disintossicazione nel metabolismo dei farmaci.
- *UDP-glucuronil trasferasi*: è un glicosiltrasferasi che catalizza la glucuronidazione di piccole molecole idrofobe.

- *Glutathione S-transferasi (GTS)*: sono una famiglia di enzimi che catalizzano la coniugazione del glutathione ridotto a centri elettrofili di una vasta gamma di substrati.
- *Rodanese*: è un enzima mitocondriale che disintossica dal cianuro (CN^-) convertendolo in tiocianato (SCN^-) relativamente innocuo.

Il sistema monoossigenasi nasale P450-dipendente è implicato nel metabolismo nasale di decongestionanti nasali, alcol, nicotina e cocaina⁴¹. A differenza di quelli epatici, i citocromi P-450 nasali sono relativamente resistenti all'induzione ma possono essere facilmente inibiti. Da questo punto di vista, la via nasale è preferibile alla via orale. I principali approcci utilizzati per evitare le degradazioni enzimatiche si basano sull'utilizzo di proteasi e inibitori di peptidasi come bacitracina, amastatina, boroleucina e puromicina, attualmente utilizzati per migliorare l'assorbimento di molti farmaci⁴².

2.3.2. Caratteristiche chimico-fisiche del farmaco

Le caratteristiche chimico-fisiche del farmaco somministrato che possono influenzare l'assorbimento nasale sono: il peso molecolare, la solubilità, la velocità di dissoluzione, la sua carica, il coefficiente di ripartizione, il pKa, le dimensioni delle particelle e la forma cristallina⁴³. Il peso molecolare (MW), le dimensioni e la

lipofilia/idrofilia svolgono un ruolo chiave nella permeazione nasale. Generalmente, la permeazione di farmaci inferiori a 300 Da non è significativamente influenzata dalle proprietà chimico-fisiche del farmaco; esse, infatti, possono permeare attraverso canali della membrana (meccanismo paracellulare). Al contrario, un gran numero di molecole terapeutiche come peptidi e proteine, che hanno un peso molecolare superiore a 1 kDa, hanno una bassa biodisponibilità. In generale, la biodisponibilità di molecole ad alto peso molecolare varia da 0.5% a 5%⁴⁴, ma può essere aumentata formulando queste molecole in combinazione con sostanze *enhancer* che, aprendo le *tight junctions*, consentono il loro passaggio attraverso la membrana nasale. Altri fattori che possono influenzare il trasporto di queste molecole sono il pH e l'osmolarità della formulazione. Alcuni autori hanno riportato che, modificando questi due parametri nella formulazione, è possibile aumentarne la biodisponibilità⁴⁵. La lipofilia del farmaco è una delle più importanti caratteristiche chimico-fisiche che un farmaco deve possedere per migliorare la permeabilità nasale. Infatti, anche se la mucosa nasale ha dimostrato di avere alcune caratteristiche idrofiliche, sembra che in questa mucosa i domini lipidici giochino un ruolo importante nella sua funzione di "barriera"⁴⁶. Generalmente, la permeazione di un composto attraverso la mucosa nasale aumenta all'aumentare della sua lipofilia. Occorre notare tuttavia che la lipofilia è in contrasto con la solubilità del farmaco nel mezzo acquoso. Considerando che l'acqua rappresenta il 95% delle secrezioni nasali, la solubilità del farmaco è probabilmente il fattore più importante nel

determinare il suo assorbimento attraverso la mucosa nasale. Farmaci poco solubili in acqua possono richiedere dosi di somministrazione elevate, rendendo questa via di somministrazione impraticabile. Questo problema può essere superato aumentando la solubilità del farmaco mediante diverse tecniche. Infine, strettamente legata alla solubilità e altrettanto importante, c'è la cinetica di dissoluzione del farmaco. Questa variabile diventa particolarmente importante per quei farmaci somministrati sotto forma di polvere per inalazione o di sospensioni. In questi casi la velocità di dissoluzione diventa fondamentale poiché le particelle che si depositano nelle narici devono sciogliersi e il farmaco essere assorbito prima che la formulazione venga allontanata dalla *clearance* mucociliare.

2.3.3. Gli *enhancer* d'assorbimento

La scarsa biodisponibilità nasale di molte sostanze (in particolare peptidi e proteine) può essere notevolmente migliorata tramite l'uso di *enhancer* di assorbimento. L'utilizzo di questi *enhancer* non dipende solo dal loro effetto, ma anche dalla loro sicurezza riguardo effetti avversi sistemici e locali. Le formulazioni di farmaci nasali non devono in alcun modo alterare l'istologia e la fisiologia del naso, nel senso che la mucosa deve mantenere la sua funzionalità come barriera verso sostanze estranee e microrganismi. Per tossicità istologica, invece, si intende l'alterazione della mucosa dovuta a rimozione delle proteine di membrana, perdita di cellule, muco eccessivo scarico o alterazioni

del normale equilibrio enzimatico. In letteratura esistono numerosi studi che hanno evidenziato l'effetto *enhancer* di diverse sostanze^{47,48,49,50,51}. Generalmente queste sostanze agiscono come inibitori enzimatici per superare la barriera enzimatica e come *enhancer* di permeazione per superare fisicamente la barriera aprendo le *tight junctions*, alterando le proprietà dello strato di muco, chelando il Ca^{++} presente nelle membrane cellulari e/o aumentando la fluidità di membrana. È possibile anche combinare effetti diversi: Sayani e Chien elencarono diversi inibitori enzimatici che stabilizzavano i peptidi e allo stesso tempo miglioravano la permeazione⁵². Una classificazione delle principali molecole *enhancer* è stato redatto da Ramesh⁵³:

- **Tensioattivi:** Sajadi Tabassi SA ha riportato una forte riduzione dei livelli ematici di glucosio dopo l'instillazione nasale di soluzioni contenenti insulina e *Acanthophyllum*⁵⁴. Il miglioramento dell'effetto sembra essere legato ad una riduzione della tensione superficiale dell'acqua. Va notato, tuttavia, che questo effetto è anche tossico poiché causa completa emolisi dei globuli rossi umani ad una concentrazione di 250 $\mu\text{g/mL}$.
- **Sali biliari:** il sodio desossicolato, un tipico sale biliare, è stato utilizzato in concentrazione di 1% per migliorare la biodisponibilità di dopamina in cani beagle per via

nasale. È stato ottenuto un aumento del 20% della biodisponibilità della dopamina⁵⁵. I derivati fusidati mostrano proprietà fisiche e chimiche simili ai sali biliari, e per questo sono stati suggeriti come *enhancer* d'assorbimento. Deurloo ha descritto un eccellente assorbimento nasale di insulina per effetto del sodio taurodiidrofusidato (STDHF); in particolare, il derivato fusidato all'1% (p/v) aumentava la biodisponibilità insulinica nasale dal 0.9% al 5.2% nei conigli e dal 0.3% al 18.0% nei ratti. Emerse così che l'STDHF è un potente *enhancer* di assorbimento di insulina nasale, probabilmente sia facilitando il trasporto di insulina attraverso la mucosa nasale sia inibendo la degradazione enzimatica⁵⁶. Per verificare la tossicità di queste sostanze, Zezhi Shao et al. studiarono nei ratti il rilascio di proteine e enzimi dopo la somministrazione di quattro sali biliari e un derivato fusidato⁵⁷. Il desossicolato (NADC) possiede la massima attività solubilizzante nei confronti delle proteine, seguita dal STDHF, dal colato, dal glicocolato (NaGC) e dal taurocolato (NATC).

- **Chelanti:** è stato osservato come il meccanismo di azione di acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) preveda l'apertura delle *tight junctions* tramite l'eliminazione del Ca^{++} . Infatti, l'integrità delle *tight*

junctions, che possono essere viste come un ostacolo alla diffusione paracellulare di molecole, dipende dalla concentrazione di Ca^{++} extracellulare.

- **Sali di acidi grassi e fosfolipidi:** acidi grassi saturi (acido laurico, miristico e acido caprico) e acidi grassi insaturi (acido oleico, acido linoleico e linolenico) sono studiati da lungo tempo per la loro capacità di migliorare la permeazione. Gli esteri di acidi grassi, come l'etil o il metil estere dell'acido laurico, sono stati impiegati anche come fase oleosa di una emulsione. Tugrul T. Kararli ha valutato l'effetto migliorativo dell'emulsione acido oleico/monoleina sull'assorbimento nasale di un inibitore della renina confrontato con una soluzione controllo di PEG 400. I risultati evidenziano che la biodisponibilità assoluta del composto è migliorata dal 3-6% (soluzione di PEG 400) al 15-27% (dell'emulsione acido oleico/monoleina)⁵⁸. La didecanoilfosfatidilcolina (DDPC) ha dimostrato proprietà di *enhancer* d'assorbimento nasale di insulina e dell'ormone della crescita.
- **Ciclodestrine:** le ciclodestrine (CD) sono oligosaccaridi ciclici costituiti da una superficie esterna polare e una cavità interna apolare in grado di includere molecole lipofile. Le CD possono migliorare l'assorbimento di farmaci lipofili migliorando la loro solubilizzazione e

proteggendole dalla degradazione enzimatica⁵⁹. Le CD sono anche in grado di migliorare l'assorbimento di farmaci idrofili tramite l'estrazione di lipidi dalla superficie delle membrane biologiche ed il conseguente aumento della fluidità e della permeabilità di membrana⁶⁰. Il grado di protezione e miglioramento d'assorbimento sembra dipendere fortemente sia dalla natura del farmaco utilizzato che dalla CD utilizzata. Ad esempio, studi in-vivo sul ratto hanno dimostrato che l'aggiunta del 5% di α -CD ad una preparazione nasale di insulina determini una biodisponibilità assoluta di circa il 30%, mentre, utilizzando β - e γ -CD, non si ottiene nessun effetto sull'assorbimento di insulina. La dimetil-beta-ciclodestrina (DM β -CD) ha dato luogo ad un grande aumento dell'assorbimento di insulina, con una biodisponibilità del 100%⁶¹. Sulla base di studi tossicologici, la DM β -CD è considerata un *enhancer* d'assorbimento nasale sicuro.

2.4. Forme farmaceutiche nasali

Le preparazioni nasali possono essere liquide, solide o semisolide e contenere uno o più principi attivi. Le preparazioni nasali devono essere, per quanto possibile, non irritanti e non devono esercitare alcun effetto indesiderato sulle funzioni della mucosa e delle ciglia. Le forme farmaceutiche necessitano di un dispositivo adatto che ne permetta la corretta liberazione nella cavità nasale. La scelta del dispositivo e della modalità di somministrazione viene effettuata in base al tipo di forma farmaceutica preparata, alla facilità d'uso, al grado di distribuzione sulla mucosa nasale e alla capacità di produrre dosi precise e ripetibili. Dispositivo e formulazione costituiscono un insieme inscindibile tale che la sostituzione di un dispositivo con un altro ritenuto simile può provocare notevoli variazioni di biodisponibilità.

2.4.1. Aerosol nasale

Con il termine aerosol si intende una sospensione di particelle (liquide o solide) veicolate da un gas (generalmente aria), che deve essere respirata per subire un impatto con le vie aeree. Un aerosol può essere considerato un sistema a due fasi: una fase discontinua di particelle ed una fase continua gassosa. Gli aerosol inalatori comprendono preparazioni liquide, solide e semisolide destinate alla somministrazione di uno o più principi attivi nelle vie aeree superiori (cavità nasale) o nelle vie aeree inferiori (polmoni) al fine di ottenere un effetto locale o sistemico.

2.4.2. Formulazioni liquide

Le preparazioni nasali liquide comprendono gocce e spray nasali, e possono presentarsi sotto forma di soluzioni, emulsioni o sospensioni da nebulizzare nelle cavità nasali. Al momento, le forme farmaceutiche liquide sono tra le più utilizzate poiché consentono la somministrazione di una corretta dose di principio attivo. Le emulsioni e le sospensioni presentano spesso segni di separazione di fase e devono essere ricostituite tramite agitazione. Le gocce nasali sono confezionate sia in recipienti multidose che in contenitori a dose unica. Le preparazioni nasali liquide possono essere preparate semplicemente sciogliendo o disperdendo uno o più principi attivi in un opportuno veicolo che deve possedere un pH adatto, potere tamponante, essere isotonico, non modificare la viscosità del muco che ricopre la cavità nasale, non essere irritante per la mucosa, essere compatibile con le secrezioni nasali ed essere stabile per tutto il periodo di validità della preparazione. La preparazione nasale liquida è dunque costituita da uno o più principi attivi, da un solvente e da eccipienti con diverse funzioni. Nella maggior parte dei casi il solvente è l'acqua ed il suo scopo è quello di solubilizzare il o i principi attivi allo scopo di favorirne l'assorbimento. Pur essendo prevalentemente su base acquosa le preparazioni nasali liquide possono contenere dei cosolventi in piccole quantità. Questi vengono impiegati, quando necessario, per aumentare o favorire la solubilizzazione del principio attivo qualora non fosse abbastanza solubile in acqua. I cosolventi

possono essere alcoli, polietilenglicole, propilenglicole o altri solventi organici. Le preparazioni liquide acquose svolgono un effetto reidratante della mucosa nasale e umettante; quest'ultimo si ottiene per aggiunta di agenti umettanti, come glicerina e sorbitolo, e si dimostra particolarmente importante nelle patologie di tipo allergico.

Per le preparazioni nasali si considera ottimale un pH compreso nell'intervallo tra 5.5 e 7.5. Il valore di pH deve favorire la solubilizzazione, assicurare la stabilità dei principi attivi presenti, permettere un efficiente assorbimento di farmaco e prevenire la crescita di batteri nella cavità nasale. Per prevenire la degradazione del principio attivo tali preparazioni possono contenere agenti antiossidanti. Altri componenti fondamentali di una preparazione di questo tipo sono i conservanti, introdotti per evitare la contaminazione microbica durante la produzione, la conservazione e l'impiego. Vi sono inoltre agenti viscosizzanti e gelificanti, tensioattivi, promotori di assorbimento ed aromi.

2.4.3. Formulazioni semisolide

Le forme farmaceutiche semisolide sono unguenti, creme e geli. Un unguento è costituito da una base monofasica in cui possono essere disperse sostanze solide o liquide; una crema è una preparazione multifase costituita da una fase lipofila ed una fase acquosa; un gel è costituito da un liquido gelificato per mezzo di opportuni gelificanti. I geli sono ottenuti gelificando sospensioni e soluzioni e possono contenere agenti emollienti per mascherare o

diminuire il loro potenziale effetto irritante. Le preparazioni semisolide permettono, a confronto con le liquide, di prolungare il tempo di contatto tra il principio attivo e la mucosa nasale, sito di assorbimento, grazie alla loro maggiore viscosità.

2.4.4. Formulazioni solide

Le **polveri nasali** sono polveri da insufflare nelle cavità nasali per mezzo di un opportuno dispositivo. Le dimensioni delle particelle che costituiscono le polveri devono essere tali da permettere la loro deposizione nella cavità nasale. Presentano numerosi vantaggi rispetto alle preparazioni liquide dal punto di vista tecnologico e di biodisponibilità. Esse infatti rispondono ad una formula più semplice, possiedono maggiori stabilità chimico-fisica e microbiologica e consentono di utilizzare polimeri bioadesivi, che possono essere inclusi nelle polveri nasali allo stato secco. Quando le polveri vengono liberate nella cavità nasale, i polimeri, a contatto con il muco, si idratano e aderiscono alla mucosa consentendo un prolungamento del tempo di contatto tra principio attivo e sito di assorbimento. Le migliori caratteristiche di biodisponibilità sono dovute alla concentrazione di principio attivo disponibile sul sito d'assorbimento e alla minore velocità di rimozione da parte della clearance mucociliare.

Gli **inserti nasali** sono formulazioni solide che possono essere somministrate nella cavità posteriore del naso^{62,63}, dove sono trasformate rapidamente in gel, evitando così la sensazione di un

corpo estraneo. Rispetto alle polveri nasali, questi nuovi sistemi sono in grado di erogare dosi più precise di farmaco nella cavità nasale. Grazie alle proprietà mucoadesive della loro matrice (ad es. chitosano), gli inserti nasali basati su polimeri possono aderire facilmente alla mucosa e prevenire la rapida *clearance* del farmaco, aumentando così il suo tempo di residenza nel sito d'assorbimento. Inoltre, è possibile raggiungere un buon controllo del rilascio del farmaco attraverso la capacità dei polimeri (chitosano) di reticolare per formare una rete gelificata in cui il farmaco può liberamente diffondere. Non è necessario rimuovere gli inserti meccanicamente dalla cavità nasale perché, dopo la gelificazione, essi vengono eliminati verso la rinofaringe dalla *clearance* mucociliare. Gli inserti nasali ottenuti mediante liofilizzazione sono caratterizzati da una struttura spugnosa che garantisce una rapida reidratazione e gelificazione nel sito di somministrazione. Il rilascio del farmaco da sistemi gelificanti *in situ* è regolato da un complesso di fenomeni tra cui l'assorbimento di acqua, il rilassamento delle catene, il rigonfiamento, le interazioni farmaco-polimero, la solubilità del farmaco e la diffusione dell'inserto reidratato. Diversi studi hanno descritto l'uso di inserti nasali basati su un noto polimero mucoadesivo gelificante: l'idrossipropilmetilcellulosa^{64,65,66}. Bertram e Bodmeier formulato inserti nasali⁶⁷ utilizzando diversi polimeri, tra cui il chitosano glutammato. Essi hanno scoperto che il tipo di polimero scelto per la preparazione influenza le proprietà meccaniche degli inserti, il loro assorbimento d'acqua, le caratteristiche mucoadesive e la loro capacità di controllare il

rilascio del farmaco. Studi *in-vitro* hanno rivelato che il chitosano è in grado di formare un film sottile su substrati mucosali grazie alla sua carica opposta alla mucina, ma che essa è meno efficace, rispetto ad altri polimeri con carica negativa, nel prolungare il tempo di contatto con la mucosa. In un recente lavoro, Luppi et al. hanno studiato l'uso di inserti nasali basati su complessi di chitosano e ialuronato per la somministrazione di peptidi e proteine⁶⁸. I complessi polielettrolitici sono stati ottenuti con diverse tecniche di preparazione ed utilizzati per ottenere inserti liofilizzati caricati con vancomicina o insulina.

In un altro lavoro, Luppi⁶⁹ ha descritto l'uso di complessi polielettrolitici a base di chitosano e pectina per la formulazione di inserti nasali contenenti clorpromazina. I risultati mostravano che una maggiore quantità di pectina nei complessi produceva una struttura maggiormente porosa negli inserti nasali migliorando le capacità di assorbimento di acqua e le capacità mucoadesive.

2.5. Dispositivi nasali

2.5.1. Preparazioni liquide

L'obiettivo, sia per farmaci ad effetto locale che per quelli ad effetto sistemico, è quello di distribuire la preparazione sulla più ampia superficie disponibile. Di recente l'interesse è rivolto maggiormente verso gli spray nasali, per la loro semplicità di somministrazione e per l'igiene. I più comuni sistemi per la

somministrazione degli spray sono contenitori costituiti da un bulbo di gomma comprimibile (*squeeze bottle*), oppure pompe spray predosate montate su un contenitore di vetro. I primi presentano maggior rischio di contaminazione microbiologica e vengono utilizzati principalmente per la somministrazione di decongestionanti, quando la dose di principio attivo non è critica. Uno degli svantaggi di tali contenitori, infatti, sta nella variabilità della dose erogata, poiché la quantità di preparazione liberata all'esterno dipende dalla pressione che viene esercitata sul bulbo di gomma. Le pompe spray predosate, invece, permettono l'erogazione di una dose nota e controllata. Generalmente i volumi di liquido che possono essere erogati da queste pompe spray sono compresi tra 25 e 200 μl .

2.5.2. Preparazioni solide

Le polveri nasali vengono somministrate mediante opportuni dispositivi denominati *insufflatori nasali*. Questi dispositivi possono essere di tipo passivo come i *Dry Powder Inhaler* (DPI), in cui l'erogazione è determinata dall'atto inspiratorio del paziente, o di tipo attivo come i pressurizzati o gli insufflatori a pompa. I pressurizzati sono preparati nei quali le particelle di polvere micronizzata sono sospese in propellenti liquidi mediante l'impiego di un tensioattivo. Questi sistemi di deposito sono maneggevoli, garantiscono accuratezza e ripetibilità della dose e assicurano la protezione della preparazione contenuta. Lo svantaggio è l'impiego di propellenti che nella maggior parte dei

casi sono risultati irritanti per la mucosa e ritenuti responsabili della riduzione dello strato di ozono dell'atmosfera. Gli insufflatori attualmente in uso sono costituiti da un adattatore nasale, un bulbo di gomma e un *reservoir* di polvere predosata, rappresentato da una capsula di gelatina rigida.

La polvere introdotta nel *reservoir* non può occuparne interamente il volume. I diversi insufflatori nasali differiscono principalmente per la dimensione del bulbo di gomma, che influenza la quantità di polvere emessa nella singola erogazione. La necessità di depositare il farmaco in entrambe le narici ha portato allo sviluppo di insufflatori con bulbo di piccole dimensioni e che richiedono quindi più erogazioni per esaurire l'intero contenuto della capsula, alternando la deposizione in entrambe le narici. Secondo le varie esigenze terapeutiche sono stati progettati diversi insufflatori nasali in grado di liberare in modo diverso tutta la polvere contenuta nel *resevoir* e di direzionare la formulazione in una zona specifica della cavità nasale. Recentemente, al posto di questi insufflatori, sono state proposte pompe spray monodose anche per la somministrazione di polveri. Tali pompe consentono di liberare una quantità nota di polvere che non dipende dalla pressione esercitata dal paziente sul bulbo di gomma.

2.6. *Microcarriers e nanocarriers nasali*

L'uso di *micro/nanocarriers* farmaceutici (micro/nanoparticelle, micro/nanoemulsioni, micelle e liposomi) per migliorare l'efficienza in-vivo di molti farmaci e si è affermata negli ultimi dieci anni sia nella ricerca che nella clinica farmaceutica. Al fine di migliorare la stabilità e la penetrazione transmembrana e di aumentare il tempo di permanenza nella cavità nasale, questi sistemi possono includere, oltre al farmaco, inibitori enzimatici, *enhancer* d'assorbimento nasale e polimeri mucoadesivi.

2.6.1. Microsfere

Le microsfere stanno diventando estremamente popolari per la progettazione di formulazioni nasali grazie alla loro capacità di prolungare il contatto con la mucosa nasale e, conseguentemente, di aumentare l'assorbimento e la biodisponibilità del farmaco in esse contenuto⁷⁰. Normalmente le microsfere, assorbendo molta umidità, tendono a disidratare la mucosa nasale. Questo porta ad un restringimento reversibile delle cellule epiteliali e una separazione fisica temporanea delle *tight junctions* che consentono l'assorbimento di farmaci ad alto peso molecolare come l'insulina.

Come già accennato, una delle più importanti regioni anatomiche del naso deputate all'assorbimento di farmaci è la regione respiratoria, riccamente vascolarizzata. La deposizione delle particelle in questa regione, contenente i tre turbinati nasali,

dipende dalle dimensioni dei microsistemi utilizzati. Classicamente, dopo l'inalazione, le particelle più grandi (>10 micron) si depositano nella cavità nasale. Più grandi sono le particelle, più la deposizione avviene in una regione anteriore del naso. Per le particelle più piccole (<10 micron) il sito di deposizione dipende dalla velocità con cui le particelle vengono inalate e dalla turbolenza nel flusso d'aria. Le particelle di dimensioni inferiori a 1 micron non sono normalmente intercettate dalla cavità nasale ma viaggiano verso la trachea per raggiungere i polmoni. La granulometria ideale per la somministrazione nasale di microsfele dovrebbe quindi variare da 10 a 50 micron. La capacità di rimozione delle particelle dal tratto respiratorio superiore è del 100% per particelle di dimensioni maggiori di 10 micron, contro l'80% per particelle di 5 micron. La capacità di *clearance* diminuisce progressivamente con la riduzione delle dimensioni particellari e si avvicina a zero per le particelle di 1-2 micron.

Il fondamento alla base dell'uso di un sistema a microsfele è la mucoadesione. Infatti, la somministrazione di microsistemi in polvere con proprietà mucoadesive permette alle microsfele di gonfiarsi a contatto con il liquido presente sulla mucosa nasale per formare un gel. Questo gel consente alle molecole attive di restare più a lungo a contatto con la superficie di assorbimento. È stato dimostrato che le microsfele costituite da materiali bioadesivi vengono eliminate dalla cavità nasale in più di 3 ore, rispetto ai 15-20 minuti delle normali formulazioni⁷¹. Sono numerosi gli esempi di sistemi microparticellari realizzati utilizzando materiali

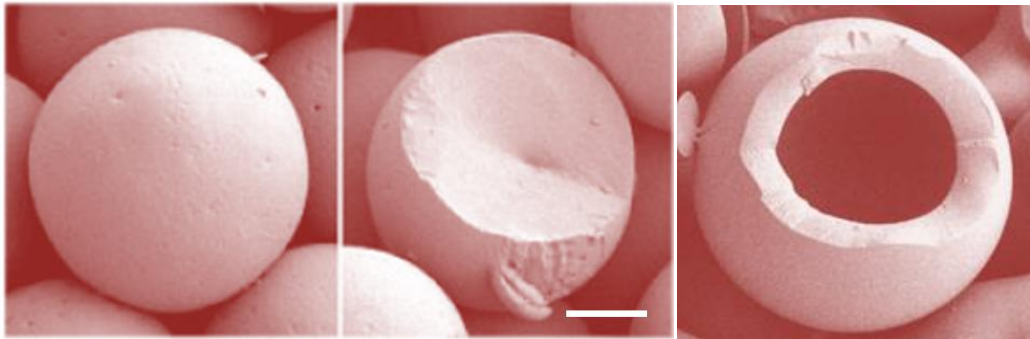
bioadesivi che sono stati ottimizzati e valutati in-vivo per la somministrazione nasale di farmaci.

Microsfere mucoadesive costituite da alginato e contenenti carvedilolo hanno mostrato una disponibilità del 68%⁷². Illum et al. hanno utilizzato microsfere di amido degradabili ed hanno osservato che tali microparticelle aumentavano l'assorbimento di ormone della crescita umano e di desmopressina^{73,74}. Una particolare attenzione dovrebbe essere riservata ai chitosani, polisaccaridi cationici biodegradabili ad alto peso molecolare, che negli ultimi dieci anni, grazie alle loro proprietà mucoadesive, sono stati studiati intensamente come eccipienti per la preparazione di formulazioni nasali. Infatti, la loro capacità di incrementare l'assorbimento nasale è dovuta alla combinazione di due effetti: la mucoadesione e la capacità di aprire le *tight junctions* di membrane .

La capacità dei chitosani di legarsi alle cellule è dovuta alle interazioni elettrostatiche che si creano tra le superfici cellulari cariche negativamente e le cariche positive della loro struttura policationica. Inoltre, i chitosani non arrestano la *clearance* mucociliare e non causano cambiamenti significativi nell'istologia della mucosa nasale⁷⁵. In relazione a queste considerazioni, la combinazione di polimeri bioadesivi con *enhancer* d'assorbimento non tossici è una strategia potenzialmente promettente per lo sviluppo di un'eccellente formulazione nasale.

2.6.2. Nanoparticelle

Le nanoparticelle possono offrire miglioramenti per quanto riguarda la somministrazione di farmaci naso-cervello grazie alla loro capacità di proteggere la molecola attiva dalla degradazione chimica e biologica. Le nanoparticelle sono particelle solide colloidali di dimensioni comprese tra 10nm e 1µm. Sono realizzate con materiali macromolecolari che possono essere di origine sintetica o naturale. A seconda della tecnica di preparazione, le nanoparticelle possono essere distinte in: nanosfere, in cui il farmaco è omogeneamente disperso nella struttura della matrice, e nanocapsule, che presentano una membrana che racchiude un nucleo oleoso contenente il farmaco.



I sistemi di rilascio nanoparticellari possono migliorare significativamente l'assorbimento di farmaci attraverso la mucosa nasale rispetto alle soluzioni di farmaco. Le tecniche di applicazione dei farmaci incapsulati in nanoparticelle sull'epitelio olfattivo possono potenzialmente favorire il passaggio diretto del farmaco al sistema nervoso centrale. Se, grazie a questo tipo di

nanosistemi, i farmaci riuscissero raggiungere il SNC in concentrazioni sufficienti ad espletare la loro funzione farmacologica, si potrebbero rivalutare molecole farmacologicamente attive che in passato sono state abbandonate a causa della loro scarsa biodisponibilità orale (ad esempio la Tacrina)⁷⁶. Ci sono, però, esempi in letteratura in cui è stato dimostrato che le formulazioni nanoparticellari non sono sempre una valida alternativa alle soluzioni⁷⁷.

Seju U et al. hanno valutato l'assorbimento al SNC di olanzapina a seguito di una somministrazione intranasale di olanzapina caricata in nanoparticelle di PLGA. Essi hanno scoperto che i livelli di olanzapina, a seguito di una somministrazione intranasale di nanoparticelle, erano rispettivamente 6.35 e 10.86 volte superiori rispetto ad una soluzione di olanzapina somministrata per via endovenosa e intranasale. È stato quindi evidenziato un probabile trasporto diretto di farmaco al cervello dopo somministrazione intranasale di nanoparticelle⁷⁸. Non è ancora chiaro se il miglioramento dell'assorbimento di farmaco dovuto alla somministrazione nasale di nanoparticelle sia dovuto alla loro capacità di attraversare la membrana, al maggiore tempo di permanenza 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 endocitosi⁷⁶.

2.6.3. Liposomi

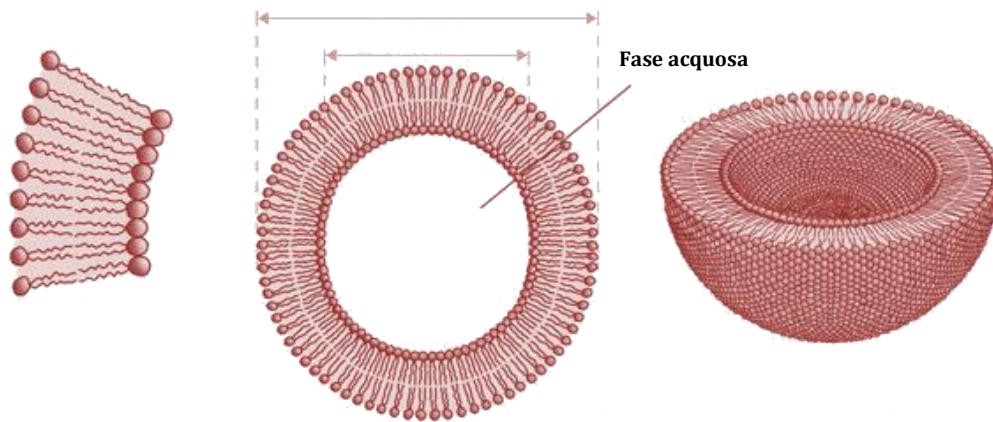


Figura 4. Liposoma

I liposomi sono costituiti da uno o più doppi strati lipidici concentrici che racchiudono uno o più volumi acquosi all'interno. La presenza di due ambienti diversi nel vettore, quello acquoso e la membrana lipidica, rende i liposomi un *nanocarrier* versatile per una vasta gamma di piccole e grandi molecole idrofile, anfipatiche e idrofobe. Inoltre, i liposomi hanno il vantaggio di avere bassa tossicità, di non stimolare l'attivazione del sistema immunitario e di consentire la somministrazione mirata di composti bioattivi direttamente al sito d'azione. I liposomi sono classificati in base ai loro parametri strutturali⁷⁹ o in base al loro metodo di preparazione⁸⁰. La tabella 1 mostra una classificazione accurata sulla base dei parametri strutturali e dei metodi di preparazione. L'utilizzo di tecniche diverse per la preparazione dei liposomi permette di ottenere strutture fisiche molto diverse; ad esempio, è possibile variare la composizione lipidica di membrana e/o le proprietà superficiali del liposoma in modo da

veicolare al meglio il loro contenuto. Inoltre, è possibile aggiungere all'interno del doppio strato lipidico o nella fase acquosa sostanze in grado di migliorare l'assorbimento del farmaco e/o di avere un effetto antiossidante (molto utili nel trattamento di malattie neurodegenerative).

Liposome Classification			
Based on Structural Parameters	Abbreviation	Based on Method of Preparation	Abbreviation
Multilamellar Large Vesicles >0.5µm	MLV	Single or Oligolamellar Vesicles made by Reverse-phase Evaporation	REV
Oligolamellar Vesicles 0.1-1µm	OLV	Multilamellar Vesicles made by Reverse-phase Evaporation	MLV-REV
Unilamellar Vesicles (all size range)	UV	Stable Plurilamellar Vesicles	SPLV
Small Unilamellar Vesicles 20-100nm	SUV	Frozen and Thawed MLV	FAT-MLV
Medium sized Unilammelar Vesicles	MUV	Vesicles prepared by Extrusion methods	VET
Large Unilamellar Vesicles >100nm	LUV	Vesicles prepared by French press	FPV
Giant Unilamellar Vesicles >1µm	GUV	Vesicles prepared by fusion	FUV
Multivesicular Vesicles >1µm	MVV	Dehydration-Rehydration Vesicles	DRV

Tabella 1. Classificazione dei liposomi

I principali vantaggi dell'uso dei liposomi come sistema di rilascio di farmaci sono:

- **Protezione:** i materiali attivi contenuti all'interno del sistema sono protetti dalla membrana lipidica in cui, oltretutto, è possibile aggiungere agenti protettivi come molecole antiossidanti;

- **Rilascio prolungato:** il controllo del rilascio può essere ottenuto variando le caratteristiche di permeabilità della membrana o tramite strutture lamellari;
- **Rilascio controllato:** il rilascio del farmaco può essere attivato sfruttando transizioni di fase dei lipidi di membrana in relazione a stimoli esterni come cambiamenti di temperatura o pH;
- **Somministrazione mirata:** può essere ottenuta variando attributi come la dimensione dei liposomi e la loro carica superficiale per effettuare rilasci passivi agli organi del corpo oppure incorporando anticorpi o altri ligandi per mirare il rilascio in specifici tipi cellulari. Allo stesso tempo, è possibile evitare che i farmaci raggiungano target non voluti;
- **Internalizzazione:** si sfrutta l'assorbimento cellulare dei liposomi tramite endocitosi o meccanismi di fusione.

Tutte queste caratteristiche rendono i liposomi candidati eccellenti per la somministrazione nasale di farmaci. È stato osservato che i liposomi sono in grado di ridurre la *clearance* mucociliare grazie alla loro viscosità, di scambiare fosfolipidi con le membrane cellulari e di aprire le *tight junctions* paracellulari con conseguente aumento della permeabilità.

In letteratura sono riportati numerosi esempi che mostrano la convenienza dell'uso di liposomi rispetto ad una semplice soluzione di farmaco. Maitani et al. hanno riportato che l'insulina ha mostrato una migliore permeabilità nasale nei conigli quando incapsulata nei liposomi⁸¹. Law et al. hanno studiato l'effetto dei liposomi sull'assorbimento nasale della calcitonina; essi hanno riferito che i liposomi caricati positivamente avevano una biodisponibilità migliore rispetto a quelli caricati negativamente e, ancor di più, rispetto alla soluzione di calcitonina. Il significativo miglioramento della biodisponibilità nei liposomi caricati positivamente può essere spiegato con l'interazione tra le cariche positive dei liposomi e le cariche negative presenti sulla superficie mucosale. Questa ha consentito un aumento del tempo di permanenza dei liposomi nella cavità nasale ed un conseguente aumento della biodisponibilità della calcitonina⁸².

3

MICROPARTICELLE DI CHITOSANO/PECTINA PER IL RILASCIO NASALE DI TACRINA CLORIDRATO

Lo scopo di questo lavoro è stato la messa a punto di una formulazione innovativa finalizzata al miglioramento delle proprietà terapeutiche della Tacrina nel trattamento di malattie neurodegenerative, quali il morbo di Alzheimer. Il morbo di Alzheimer, come noto, è una malattia neurodegenerativa ad esordio prevalentemente senile, caratterizzata da un declino progressivo delle facoltà cognitive e intellettive. Le cause della sua insorgenza e della progressione non sono ancora del tutto chiare, ma è stato osservato che la malattia è sempre accompagnata da una ridotta sintesi del neurotrasmettitore Acetilcolina con conseguente riduzione dell'attività dei neuroni colinergici. Per questo motivo la terapia farmacologica si è finora basata su sostanze ad azione anticolinesterasica (tacrina, rivastigmina, donepezil, galantamina) che, impedendo il catabolismo del neurotrasmettitore, migliorano sensibilmente le capacità cognitive dei pazienti e rallentano il progredire della malattia. La Tacrina (1,2,3,4-tetraidro-9-amminoacridina) è il capostipite di questa classe di farmaci, nonché il primo farmaco utilizzato nel

trattamento della malattia di Alzheimer. Commercializzato negli Stati Uniti con il nome di Cognex®, la Tacrina ha mostrato però marcati effetti collaterali a livello gastrointestinale e, soprattutto, epatico. L'elevato metabolismo ad opera del fegato, infatti, diminuisce notevolmente la sua biodisponibilità orale (circa 17%) e richiede l'aumento della dose da somministrare. Per questo motivo, si è pensato di utilizzare nuove strategie formulative che, evitando l'effetto di primo passaggio epatico, aumentino la biodisponibilità del farmaco e permettano così di diminuire la dose da somministrare e di limitare gli effetti collaterali tipici della somministrazione orale. L'obiettivo della ricerca è stato dunque quello di mettere a punto nuove strutture di trasporto (carriers) capaci di veicolare il farmaco in modo tale da massimizzarne l'effetto terapeutico limitando gli effetti collaterali. La somministrazione nasale di sistemi farmaceutici solidi si presenta come approccio estremamente interessante e innovativo per migliorare la risposta di questo farmaco. L'elevata area superficiale della cavità nasale, l'endotelio poroso e l'elevato afflusso di sangue alla mucosa nasale assicurano infatti un rapido assorbimento dei farmaci ed evitano il metabolismo di primo passaggio epatico. Recenti studi suggeriscono inoltre che la somministrazione nasale possa bypassare la barriera emato-encefalica consentendo quindi al farmaco di raggiungere direttamente il sistema nervoso centrale. A tale scopo sono stati presi in considerazione supporti polimerici con caratteristiche mucoadesive che garantiscano il prolungamento del tempo di contatto fra farmaco e mucosa nasale e il raggiungimento di un

elevato gradiente di concentrazione al sito di assorbimento; fra i materiali polimerici utilizzabili per formulare forme farmaceutiche nasali è stato scelto il chitosano, derivato deacetilato della chitina, il quale sta assumendo sempre più importanza in campo medico e farmaceutico grazie alle sue note proprietà mucoadesive e di *enhancer*. In particolare, se reticolato o complessato con molecole di carica opposta, il chitosano è in grado di originare un network tridimensionale in grado di rigonfiare e modulare il rilascio del principio attivo. La pectina, polisaccaride anionico ricco di residui carbossilici, è stata scelta come agente reticolante per la formazione di complessi chitosano/pectina da utilizzare nella formulazione di sistemi farmaceutici solidi, quali inserti e microparticelle.

3.1. La malattia di Alzheimer

La crescente incidenza del morbo d'Alzheimer (AD) nella popolazione generale in tutto il mondo è accompagnata da una crescita equivalente del suo enorme costo economico e sociale: il costo dei pazienti affetti da questa patologia è di circa 600 miliardi di dollari l'anno, con una previsione di crescita dell'85% che la rende la patologia più onerosa per i sistemi sanitari.⁸³ La malattia di Alzheimer è la più frequente causa di demenza nell'anziano e solitamente diventa clinicamente evidente con un'alterazione delle funzioni intellettuali superiori, associate a disturbi dell'umore e del comportamento. In seguito il disorientamento progressivo, la perdita della memoria e l'afasia

diventano manifesti, indicando una severa disfunzione corticale. Infine, nell'arco di 5-10 anni, il paziente diventa disabile, muto e immobile. Ad oggi non esistono farmaci in grado di fermare o far regredire la malattia e i trattamenti disponibili mirano a contenerne i sintomi e la degenerazione. Gli inibitori dell'acetilcolinesterasi sono in grado, in soggetti affetti da una forma di malattia lieve o moderata, di ridurre l'aggravarsi della malattia per alcuni mesi.

L'anomalia fondamentale in questa malattia neuro-degenerativa consiste nella deposizione di peptidi A β (β amiloide) che derivano dal processamento dell'APP (Proteina Progenitrice dell'Amiloide). Ulteriori studi mettono in evidenza che nei malati di Alzheimer interviene un ulteriore meccanismo patologico: all'interno dei neuroni una Proteina Tau, fosforilata in maniera anomala, si accumula nei cosiddetti "aggregati neurofibrillari". Particolarmente colpiti da questo processo patologico sono i neuroni colinergici, specialmente quelli delle aree corticali e delle aree ippocampali sottocorticali. L'ippocampo è una struttura encefalica che svolge un ruolo fondamentale nell'apprendimento e nei processi di memorizzazione, perciò, la distruzione dei neuroni di queste zone è ritenuta essere la causa principale della perdita di memoria dei malati. La progressione della malattia è lenta ma inarrestabile, con un decorso sintomatico che spesso supera i dieci anni. I sintomi iniziali sono disturbi della memoria a breve termine, con il progredire della malattia emergono altri sintomi tra cui disturbi del linguaggio, perdita delle abilità matematiche e delle abilità motorie acquisite. Le forme familiari di Alzheimer

hanno dato seguito alla teoria secondo cui mutazioni puntiformi nel gene codificante l'APP costituiscano una delle cause dell'AD familiare.

3.1.1. Trattamento della malattia

La diminuzione di recettori colinergici, specialmente nicotinici, che è stata osservata a livello della corteccia cerebrale nel morbo di Alzheimer, ha stimolato un'intensa ricerca rivolta al potenziamento dell'attività colinergica. Questa può essere ottenuto attivando direttamente i recettori nicotinici e muscarinici post-sinaptici, aumentando il rilascio di ACh o inibendone il suo catabolismo. Nonostante i notevoli sforzi fatti, il trattamento di Alzheimer con agonisti muscarinici non ha dato i risultati attesi, probabilmente a causa della loro scarsa selettività per i sottotipi recettoriali implicati nella malattia. Un secondo metodo, più vantaggioso, è l'aumento del rilascio di Acetilcolina indotto mediante antagonisti muscarinici M2, in quanto l'attivazione di questi recettori comporta un'inibizione del rilascio del neurotrasmettitore o con l'attivazione dei recettori nicotinici. Un ulteriore approccio terapeutico, che ha ottenuto i migliori risultati, prevede invece la riduzione del catabolismo dell'ACh ottenuto mediante l'inibizione dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE), responsabile del suo metabolismo e preposto alla terminazione della trasmissione colinergica. I farmaci che inibiscono l'AChE, chiamati anticolinesterasici, determinano l'accumulo del neurotrasmettitore nella fessura sinaptica e sono

così in grado di evocare risposte biologiche equivalenti alla stimolazione colinergica. Per questo motivo, gli anticolinesterasici trovano impiego nelle stesse malattie in cui vengono impiegati gli agonisti colinergici, soprattutto nell'atonia della muscolatura liscia del tratto intestinale e della vescica, nel trattamento del glaucoma e della *myasthenia gravis*.

3.2. La Tacrina

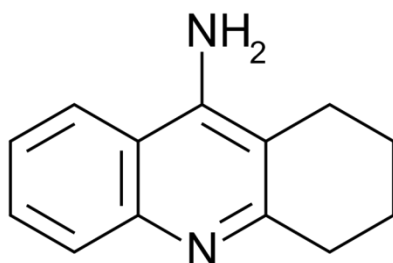


Figura 5. Tacrina

La Tacrina (1,2,3,4-tetraidro-9-ammino-acridina) è stata il primo inibitore dell'acetilcolinesterasi approvato nel 1993 dalla FDA (Food and Drugs Administration) per il trattamento del morbo di Alzheimer e fu commercializzato negli USA sotto forma di sale cloridrato (Cognex®). La Tacrina cloridrato era indicata per il trattamento delle forme lievi o moderate della malattia ed era in grado di rallentarne il decorso per diversi mesi. Il farmaco, prima di essere rimosso dal commercio, prevedeva la somministrazione per via orale, sotto forma di capsule di gelatina rigida. Il principio attivo viene assorbito velocemente dopo somministrazione orale e le massime concentrazioni plasmatiche si hanno dopo 1-2 ore. Il principio attivo risente particolarmente dell'effetto di primo

passaggio a livello epatico⁸⁴, causa della sua bassa biodisponibilità (circa il 17%). La Tacrina è metabolizzata dall'isoforma IA2 del citocromo P450. Questi dati sono stati confermati dall'osservazione che l'assunzione di Tacrina inibisce il metabolismo della teofillina, molecola metabolizzata da questo isoenzima. I principali metaboliti che derivano dal catabolismo della Tacrina sono residui idrossilati. In particolare il metabolita 1-OH Tacrina, (velinacrina)⁸⁵ risulta avere ancora attività anticolinergica. I metaboliti vengono successivamente eliminati in seguito a glucuronazione. Diversi studi di farmacocinetica hanno dimostrato che il sesso influenza le concentrazioni plasmatiche del farmaco che risultano essere del 50% maggiori nelle femmine rispetto ai maschi; questa particolarità sembra essere dovuta alla differente attività che si riscontra tra uomo e donna nel citocromo P450IA2, minore nelle donne. La Tacrina induce un aumento dei livelli di Acetilcolina sia a livello dei recettori colinergici centrali che a livello dei recettori periferici. Di conseguenza gli effetti collaterali sono associati all'azione colinergica sistemica del farmaco con aumento delle secrezioni gastriche e bronchiali, ed effetti vagotonici sul cuore che provocano bradicardia. Gli effetti collaterali più significativi e frequenti riguardano il sistema gastrointestinale, come nausea, vomito, anoressia e diarrea. La somministrazione del farmaco con il cibo riduce i fastidi gastrointestinali ma richiede somministrazioni di dosi maggiori. Il paziente in cura con Tacrina deve eseguire analisi frequenti dei livelli di transaminasi per prevenire eventuali danni epatici. Il danno epatico è dovuto a stress ossidativo che porta all'aumento

della fluidità della membrana lipidica degli epatociti. La gravità e la frequenza di questi effetti collaterali, soprattutto l'epatotossicità, hanno portato al ritiro del farmaco dal commercio.

3.3. Gli idrogeli polielettrolitici

Quando si progettano nuove formulazioni bisogna far particolare attenzione ai reagenti utilizzati per evitare di andare incontro a reazioni sconosciute e indesiderate. Anche se si lavora con polimeri naturali e biocompatibili, bisogna comunque prestare attenzione ai solventi organici e agli eventuali agenti reticolanti che si utilizzano durante la preparazione. In questo studio sono stati utilizzati il chitosano e la pectina, polimeri naturali che hanno il grosso vantaggio di non aver bisogno di agenti reticolanti. In quanto il complesso si forma per interazioni ioniche. Inoltre, le microparticelle sono state ottenute senza ricorrere a solventi organici: chitosano e pectina sono stati solubilizzati in soluzioni rispettivamente di acido cloridrico e idrossido di sodio, in modo tale che, una volta unite le due soluzioni, si avesse come prodotto residuo il sodio cloruro già presente a livello fisiologico.

3.3.1. Chitosano

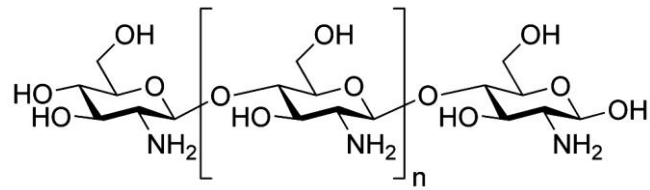


Figura 6. Chitosano

Il chitosano è un polisaccaride naturale non tossico e biodegradabile che si ottiene per deacetilazione della chitina. Fu scoperto nel 1859 da Rouget mentre cercava di produrre un sapone naturale bollendo la chitina in alcani. Con il termine “chitosano” ci si riferisce ad un insieme di polimeri poliamminici che differiscono per il peso molecolare, la viscosità e il grado di acetilazione. Il chitosano in commercio presenta un grado di deacetilazione del 70-80% e si presenta come una poliammina lineare con i gruppi amminici liberi di interagire con sostanze anioniche per la formazione di sali. Il chitosano è solubile in ambiente acido ed insolubile in ambiente neutro e alcalino oltre che in molti solventi organici. La sua solubilità aumenta drasticamente in soluzioni acquose con pH inferiore a 4.5 per effetto della protonazione delle funzioni amminiche (pKa 6.3). La solubilità del chitosano dipende anche dal suo grado di deacetilazione che influenza sia le sue proprietà acido-base sia la viscosità della soluzione. La presenza dei gruppi amminici protonati fa del chitosano un policatione che può interagire con

ioni organici e inorganici carichi negativamente o con basi di Lewis.

Il chitosano è molto versatile e viene utilizzato sia in campo farmaceutico che medico e cosmetico. Il chitosano agisce come regolatore dell'assorbimento del colesterolo: se assunto con la dieta fa calare i livelli plasmatici di colesterolo, così da ridurre il rischio di arteriosclerosi e di malattie cardiovascolari in generale. Non viene digerito ma passa intatto attraverso l'intestino dove lega gli acidi biliari formando un gel in cui si emulsionano i grassi, così da limitarne l'assorbimento e favorirne l'escrezione fecale. Per via della sua biocompatibilità e delle sue proprietà mucoadesive, il chitosano viene utilizzato in ambito farmaceutico nella preparazione di formulazioni a rilascio modificato per uso oftalmico, nasale e orale. Le caratteristiche bioadesive del chitosano vengono quindi sfruttate per aumentare il tempo di permanenza nel sito di somministrazione ed aumentare la quantità di farmaco assorbita.

3.3.2. Pectina

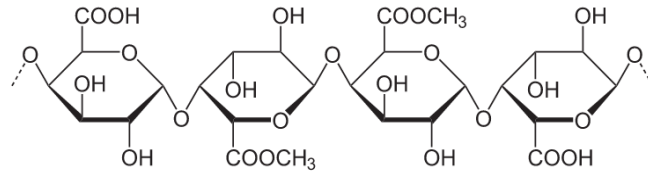


Figura 7. Pectina

La pectina è un colloide idrofilo costituito da acidi poligalatturonici, che ne costituiscono la catena principale, uniti da legami $\alpha(1-4)$ e aventi i gruppi metossilici parzialmente metossilati. Il grado di metossilazione è definito come la percentuale di gruppi carbonilici esterificati. Vengono definite ad alta metilazione (HM) le pectine con oltre il 50% dei gruppi esterificati; se invece la percentuale è inferiore al 50% vengono dette a bassa metilazione. La pectina ha la capacità di gelificare proporzionalmente al suo grado di metilazione. La presenza di gruppi acetilati riduce la propensione a gelificare ma ne aumenta la stabilità. Il peso molecolare delle pectine varia da 20000 a 400000 Da in relazione alla pianta da cui viene estratta e alle condizioni di estrazione. Oltre che per le loro proprietà gelificanti, le pectine sono utilizzate in numerosi ambiti commerciali e industriali. Vengono usate come stabilizzanti nell'industria alimentare e cosmetica e sembrano avere sbocchi anche in campo medico, in quanto abbassano i livelli di colesterolo e stimolano la risposta immunologica.

3.3.3. L'idrogelo chitosano-pectina

Gli idrogeli vengono sintetizzati reticolando monomeri o polimeri tramite opportuni agenti reticolanti in grado di formare ponti trasversali tra le catene di monomeri. Gli idrogeli sono in grado di modulare il rilascio di un farmaco in esso contenuto durante il rilassamento del reticolo tridimensionale ad opera dell'acqua. Il controllo del rilascio può essere influenzato da diversi fattori:

- tipo di polimero;
- tipo di reticolante (in grado di influenzare l'ampiezza delle maglie);
- concentrazione del polimero;
- concentrazione dell'agente reticolante;
- reazioni di derivatizzazione che possono inserire gruppi funzionali in grado di aumentare o diminuire la capacità del reticolo di legare l'acqua.

Il sistema messo a punto in questo studio prevedeva l'uso di due materiali polimerici naturali, il chitosano e la pectina, che consentono di ottenere un reticolo tridimensionale senza utilizzare un agente reticolante. La reticolazione di questo sistema si basa sulla formazione di legami ionici tra i gruppi ionizzati di carica opposta: i gruppi carbossilici della pectina e i gruppi amminici del chitosano. Affinché questo legame avvenga è necessario che vi sia un corretto grado di ionizzazione di entrambi

i polimeri, tale da portare ad un processo di salificazione. Essendo questi materiali acidi e basi deboli, il processo di ionizzazione è influenzato dal pH della soluzione. Molto importante è anche la forza ionica: l'aggiunta di eventuali sali può indebolire le interazioni elettrostatiche in seguito alla competizione tra gli ioni in soluzione e i gruppi carichi coinvolti nella complessazione. I gruppi carbossilici della pectina, ad esempio, risentono particolarmente della presenza di ioni calcio che, interagendo, possono provocarne la precipitazione. Un altro fattore da non trascurare è la concentrazione del polimero che influisce sulla viscosità della soluzione finale. Esiste, infatti, una concentrazione ideale in corrispondenza della quale la resa è massima: affinché i due polimeri interagiscano correttamente è necessario che le loro catene abbiano lo spazio adeguato per distendersi e offrire l'opportunità ai loro gruppi ionizzati di interagire. Supponendo di operare a un pH compreso nell'intervallo dei pKa dei gruppi ionizzabili e in cui, quindi, questi gruppi sono in gran parte ionizzati, appare chiaro che all'aumentare del quantitativo di chitosano si ha un idrogel in cui le probabilità di avere i gruppi carbossilici della pectina liberi si riducono progressivamente. Allo stesso modo è vero anche il contrario, la progressiva riduzione dei gruppi amminici liberi all'aumentare della concentrazione di pectina. Quindi, modulando il pH di reazione e il rapporto molare tra i due polimeri è possibile ottenere idrogeli con gruppi amminici o gruppi carbossilici liberi. Gli idrogel ionici così ottenuti mostrano improvvisi o graduali cambiamenti del loro comportamento come risultato della variazione del pH esterno⁸⁶.

In particolare, ad un pH inferiore rispetto al pKa della pectina (pKa = 4.0) o superiore al pKa del chitosano (pKa = 6.3) la ionizzazione cresce poiché i gruppi liberi (amminici e carbossilici) presentano delle cariche fisse. Queste causano l'aumento delle repulsioni elettrostatiche, una maggiore idrofilicità della rete ed un maggiore rigonfiamento del sistema.

In definitiva, il rapporto molare tra i due polimeri presenti nei complessi, il pH del mezzo di preparazione di questi ultimi e il pH del mezzo esterno influenzano la quantità di cariche libere presenti sul complesso e dunque l'ingresso dell'acqua necessaria al rigonfiamento dell'idrogel.

3.4. Parte Sperimentale

3.4.1. Materiali

Il Chitosano (Mw 110.000-150.000; pKa 6,3 DA 97%), la Pectina (Mw 30,000-100,000; pKa 4.0), la Tacrina cloridrato monoidrata (Mw 234.72) e la Mucina (tipo II da stomaco di maiale, 1% di acido sialico legato) sono stati acquistati presso Sigma Aldrich (Milano, Italia).

L'acetonitrile, il metanolo e la trietilammina per HPLC, l'acido cloridrico (0.1 M), il sodio idrossido (0.1 M), il sodio idrogeno fosfato dodecaidrato, il potassio didrogeno fosfato e il cloruro di sodio sono stati acquistati presso Carlo Erba (Milano, Italia).

L'acqua ultrapura è stata ottenuta utilizzando un apparato MilliQ della Millipore (Milford, USA).

3.4.2. Preparazione delle microparticelle liofilizzate

Il chitosano (1, 5, 9 mmol di monomero) e la pectina (9, 5, 1 mmol di monomero) sono stati solubilizzati rispettivamente in 1 litro di soluzione acquosa 5mM HCl e 1 litro di soluzione acquosa 5mM NaOH. I polimeri sono stati lasciati in agitazione fino a completa dissoluzione. La soluzione di pectina è stata aggiunta alla soluzione di chitosano e il complesso formatosi è stato lasciato in agitazione per 24 ore a temperatura ambiente. Le due soluzioni producono istantaneamente un complesso visibile come precipitato gelatinoso biancastro. La sospensione è stata

nebulizzata e essiccata tramite un Mini Spray Dryer B-290 (Buchi, CH). Le condizioni sperimentali erano: ugello di 1.4 mm, pressione del flusso d'aria compressa a 0.75 bar, volume d'aria 37.5 m³/h, velocità di flusso d'aria 7.5 mL/min e temperatura interna a 140°C.

Una volta ottenute le microparticelle scariche, il farmaco è stato caricato aggiungendo 10 mL di soluzione acquosa di Tacrina cloridrato (55.17 mg/mL) a 1 g delle particelle preparate. La soluzione è stata lasciata in agitazione per due ore e successivamente liofilizzata (-50°C). I campioni così ottenuti sono stati denominati: C/P/T_(1:9)Lyo, C/P/T_(1:1)Lyo e C/P/T_(9:1)Lyo.

3.4.3. Preparazione delle microparticelle Spray Dried

Il chitosano (1, 5, 9 mmol di monomero) e la pectina (9, 5, 1 mmol di monomero) sono stati solubilizzati rispettivamente in 1 litro di soluzione acquosa 5 mM HCl e 1 litro di soluzione acquosa 5 mM NaOH. I polimeri sono stati lasciati in agitazione fino a completa dissoluzione. La Tacrina è stata aggiunta alla soluzione di chitosano (1.48 mmol/g sul peso totale del complesso). Successivamente la soluzione di pectina è stata aggiunta alla soluzione di chitosano e il complesso è stato lasciato in agitazione per 24 ore a temperatura ambiente. Le due soluzioni producono istantaneamente un complesso visibile come precipitato gelatinoso biancastro. La sospensione è stata nebulizzata e essiccata tramite un Mini Spray Dryer B-290 (Buchi, CH). Le condizioni sperimentali erano: ugello di 1.4 mm, pressione del

flusso d'aria compressa a 0.75 bar, volume d'aria 37.5 m³/h, velocità di flusso d'aria 7.5 mL/min e temperatura interna a 140°C. I campioni così ottenuti sono stati denominati C/P/T_{(1:9)SD}, C/P/T_{(1:1)SD} e C/P/T_{(9:1)SD}.

3.4.4. Studi dell'efficienza di caricamento

L'efficienza del caricamento è stata valutata mediante tecnica spettrofotometrica UV. Una curva di calibrazione è stata costruita preparando 5 soluzioni standard di Tacrina cloridrato nel range di concentrazioni 6-10 µg/mL, e misurandone l'assorbanza a 324 nm con uno spettrofotometro Cary UV 50 (Agilent, CA, USA). Per la preparazione del campione, sono stati aggiunti 10 mg di microparticelle cariche a 100 mL di tampone fosfato 30 mM pH 5.5, in un dissolutore Vision Classic 6 (Hanson, USA). La sospensione è stata agitata per 24 ore a 37°C. Successivamente, la soluzione è stata filtrata con filtro a siringa di 0.45 µm di politetrafluoroetilene (Whatman, USA) e l'assorbanza è stata misurata tre volte. L'efficienza di caricamento è stata espressa come il rapporto percentuale tra la Tacrina cloridrato trovata nelle microparticelle e la Tacrina cloridrato teoricamente caricata.

3.4.5. Misura delle dimensioni delle microparticelle

Le dimensioni delle particelle sono state misurate usando un Particle Size Analyzer LS100Q (Beckman Coulter, USA). Circa 10 mg di microparticelle sono stati sospesi in 5 mL di 1-butanol,

sonicati per 1 minuto e misurati in tre volte per 60 secondi utilizzando come bianco l'1-butanolo puro.

3.4.6. Analisi al microscopio a scansione elettronica

Quest'analisi consente di valutare la struttura interna delle microparticelle, la loro porosità e l'influenza del farmaco sulla loro morfologia. Sono stati messi a confronto le polveri aventi rapporti chitosano-pectina differenti ottenute mediante spray drying e liofilizzazione. Le polveri sono state fissate su un supporto ricoperto di oro-palladio sotto un atmosfera di argon in un evaporatore sotto vuoto. I campioni sono stati osservati con LEO 420 (LEO Electron Microscopy Ltd, England) utilizzando un secondo microscopio elettronico a 15kV per analizzare la struttura interna e esterna.

3.4.7. Analisi termogravimetriche (TGA)

Le prove calorimetriche sono state eseguite utilizzando un termogravimetro STA 409 PC Luxx (Netzsch, Germania). I campioni sono stati collocati all'interno di crogioli di alluminio aperti e la misura è stata eseguita in flusso di azoto nel range di temperatura 25-500°C utilizzando una velocità di riscaldamento di 10°C/min.

3.4.8. Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

Le prove calorimetriche sono state eseguite utilizzando una DSC 200 F3 Maia® (Netzsch, Germania). I campioni sono stati collocati all'interno di crogioli di alluminio con coperchio forato e la misura è stata eseguita in flusso di azoto nel range di temperatura 25-500°C utilizzando una velocità di riscaldamento di 10°C/min.

3.4.9. Diffrazione di raggi X su polveri (XRPD)

La diffrazione di raggi X è stata ottenuta mediante un diffrattometro Panalytical X'Pert Pro equipaggiato con X'Celerator, CuK α , usando portacampioni in vetro. Il voltaggio e l'intensità della lampada sono stati impostati rispettivamente a 40 kV e 40 mA. Il programma usato per l'analisi ha raccolto i dati nel range angolare di 3-40°2 θ .

3.4.10. Capacità d'idratazione delle microparticelle

L'assorbimento dinamico di umidità è stato misurato tramite una DVS Intrinsic (SMS, UK) collocando circa 50 mg di campione all'interno della bilancia dello strumento. La temperatura di analisi è stata impostata a 37°C e i campioni sono stati seccati in un flusso di azoto anidro per un ora per determinarne la massa secca. Il campione è stato esposto a umidità relativa del 90% per 6 ore al fine di valutare la cinetica di rigonfiamento delle

microparticelle. I risultati sono stati espressi come la % di acqua assorbita dal campione che può essere espressa come segue:

$$\text{Water uptake \%} = \frac{(W_H - W_D)}{W_D} \cdot 100$$

dove:

- W_H è la massa di microparticelle idratata;
- W_D è la massa delle microparticelle asciutte.

3.4.11. Capacità mucoadesive delle microparticelle

Le proprietà mucoadesive delle microparticelle sono state valutate mediante un metodo colorimetrico che prevede l'utilizzo di un acido periodico con reagente di Schiff (PAS). La mucina libera viene determinata mediante assorbimento UV dopo aggiunta delle microparticelle ad una soluzione di mucina standard.

È stata preparata una retta di calibrazione usando cinque soluzioni di mucina a concentrazione nota (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL). Alle soluzioni standard è stato aggiunto 1 mL di reagente di acido periodico (30 µl di 50% di soluzione di acido periodico in 20 mL di una soluzione al 7% di acido acetico, preparati al momento). Le soluzioni sono state incubate per 2 h a 37°C. Successivamente è stato aggiunto 1 mL di reagente di Schiff (Sigma-Aldrich, Milan, Italy). Dopo 30 minuti è stata misurata

l'assorbanza della soluzione mediante uno spettrofotometro UV-1601 (Shimadzu, Italia) settato ad una lunghezza d'onda di 555 nm. Le microparticelle sono state analizzate aggiungendo 10 mg di campione a 40 mL di una soluzione di mucina a concentrazione nota (0.5 mg/mL). La soluzione è stata agitata per una ora e successivamente sono stati aggiunti i reagenti con la stessa metodica adottata per le soluzioni standard. I campioni sono stati centrifugati a 4000 rpm per 2 minuti e il surnatante è stato utilizzato per la lettura allo spettrofotometro. La concentrazione di mucina libera è stata calcolata interpolando il valore ottenuto nella retta di calibrazione. I valori di mucoadesione sono stati espressi in % di mucina legata alle microparticelle.

3.4.12. Studi di rilascio *in-vitro*

Gli studi di rilascio sono stati eseguiti mediante uno spettrofotometro Cary 50 UV-Vis (Agilent, CA, USA) accoppiato con una fibra ottica ad un dissolutore Vision Classic Dissolution (Hanson, USA). Circa 10 mg di microparticelle sono stati aggiunti a 100 mL di una soluzione di tampone fosfato 30 mM pH 5.5 agitata a 100 rpm e mantenuta a 37°C. L'assorbanza della soluzione è stata misurata a 324 nm dopo 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minuti mediante la fibra ottica immersa nella soluzione.

Per il calcolo del coefficiente di estinzione molare (ϵ) è stata costruita una curva di calibrazione. Sono state preparate 5 soluzioni a concentrazione nota di Tacrina cloridrato in soluzione

tampone fosfato a pH 5.5 nel range di concentrazione 6-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ed è stata misurata la loro assorbanza a 324 nm.

3.4.13. Studi di permeazione *ex-vivo*

Per le prove di permeazione *ex-vivo* è stata utilizzata la mucosa nasale di pecora. La testa di pecora è stata acquistata da venditori locali e la cavità nasale è stata tagliata longitudinalmente in modo da esporre i turbinati. È stata lavata all'interno di una vaschetta contenente soluzione fisiologica per circa un ora. Successivamente, la mucosa è stata rimossa dall'osso mediante delle pinze e immersa nuovamente in soluzione fisiologica per 30 minuti. Infine, la mucosa è stata tagliata delle dimensioni adatte per essere utilizzata in una cella di Franz (Fig. 8) con area diffusionale pari a 1.5 cm^2 e capacità pari a 12 mL.

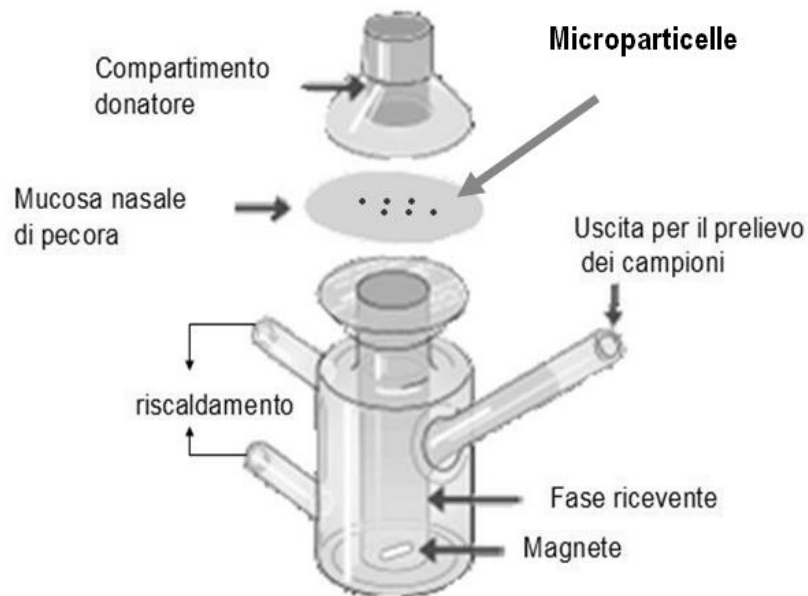


Figura 8. Cella di Franz

Al tempo zero le microparticelle sono state collocate sopra la mucosa nasale attraverso il compartimento donatore facendo attenzione che la distribuzione fosse omogenea. La fase ricevente era costituita da tampone fosfato pH 5.5 mantenuto alla temperatura di 37°C in agitazione a 100 rpm. Ogni 60 minuti è stato effettuato un prelievo di 100 µL immediatamente rimpiazzati da 100 µL di tampone fresco. La soluzione prelevata, contenente la Tacrina cloridrato permeata attraverso la mucosa, è stata analizzata mediante HPLC-UV.

Il metodo HPLC messo a punto prevedeva l'utilizzo di una colonna a fase inversa C8 (Thermo Scientific Hypersil Gold) e una fase mobile composta da tampone fosfato pH 3.5 30 mM/acetoneitrile/metanolo/trietilammina (698/100/200/2, v/v/v/v). Il sistema cromatografico era composto da una pompa LC-10ATVP (Shimadzu, Italia), un detector UV-Vis SPD-10AVP (Shimadzu, Italia) e un iniettore Rheodyne 7125 con un loop da 20 µL. È stato utilizzato un flusso di 1 mL/min e la rivelazione è stata eseguita a 240 nm. La Tacrina cloridrato era eluita dopo circa 4 minuti. Le aree dei picchi sono state integrate utilizzando il software CromatoPlus (Shimadzu, Italia). Per il calcolo della ϵ (coefficiente estinzione molare) è stata costruita una curva di calibrazione analizzando, mediante HPLC, soluzioni standard di Tacrina cloridrato nel range di concentrazioni 0.039-1.249 µg/mL.

La permeabilità della Tacrina cloridrato attraverso la mucosa è stata espressa come la frazione di Tacrina cloridrato permeata (M_t/M_∞) in funzione del tempo.

3.5. Risultati e discussioni

3.5.1. Preparazione e caricamento delle microparticelle

Da una prima valutazione visiva, le microparticelle ottenute mostravano differenze di aspetto in relazione alla tecnica di preparazione adottata: le polveri liofilizzate mostravano una struttura porosa e un volume apparente maggiore rispetto alle polveri spray dried, che risultavano essere molto fini e poco scorrevoli. Il campione C/P/T_(9:1)Ly_o, invece, non mostrava un aspetto polveroso, ma si presentava come un agglomerato. Per questo motivo, non essendo adatto allo scopo di questo studio, è stato escluso dalle successive caratterizzazioni.

	Resa di produzione (%)	Efficienza di caricamento (%)
C/P/T _(1:9) SD	48.08	79.9 ± 0.3
C/P/T _(1:1) SD	65.92	66.3 ± 2.4
C/P/T _(9:1) SD	45.64	74.3 ± 3.7
C/P/T _(1:1) LY _o	-	89.6 ± 0.7
C/P/T _(1:9) LY _o	-	92.3 ± 0.6

Tabella 2

La produzione delle microparticelle caricate con Tacrina cloridrato mediante spray drying ha dato delle buone rese nel

range 46-66% (Tabella 2). La perdita di campione è avvenuta soprattutto a livello della camera d'essiccazione, probabilmente a causa della temperatura non sufficientemente alta per essiccare immediatamente il solvente. Avendo comunque ottenuto dei buoni valori di resa, si è preferito continuare a lavorare alla temperatura di 140°C per evitare di esporre il farmaco a temperature troppo elevate.

Le prove di efficienza di caricamento del farmaco hanno dato buoni risultati, con valori compresi tra il 66.3% e il 79.9% per le microparticelle spray dried e di circa il 90% per le microparticelle liofilizzate.

3.5.2. Misura delle dimensioni delle microparticelle

Nella tabella sottostante sono riportati i risultati ottenuti dalle analisi di Particle Size Distribution. Le microparticelle spray dried mostravano dimensioni inferiori rispetto alle microparticelle liofilizzate.

	Mean (μm)	Median (μm)	S.D. (μm)	Mode (μm)	d10 (μm)	d50 (μm)	d90 (μm)
C/P/T(1:9)SD	5.19	3.56	5.62	5.35	0.856	3.56	10.7
C/P/T(1:1)SD	3.71	2.35	4.73	2.31	0.831	2.35	6.97
C/P/T(9:1)SD	1.64	131	140	269	2.28	131	354
C/P/T(1:1)LYO	9.03	5.57	9.47	5.88	1.31	5.57	22.8
C/P/T(1:9)LYO	19.0	17.1	15.5	26.1	1.75	17.1	38.7

Tabella 3. Risultati delle distribuzioni granulometriche

Analizzando i risultati, è possibile osservare come la percentuale di pectina all'interno dei complessi abbia influenzato le dimensioni finali delle microparticelle. Infatti, all'aumentare della percentuale di pectina nel complesso, sono state ottenute microparticelle aventi grandezza maggiore. Le dimensioni delle particelle liofilizzate, comprese tra 9-19 μm , erano più adatte alla somministrazione nasale. Infatti, particelle di queste dimensioni sono in grado di depositarsi all'interno della cavità nasale nel sito più adatto per l'assorbimento del farmaco, ovvero la membrana nasale. Le particelle spray dried, invece, risultano essere più piccole, con una distribuzione granulometrica compresa tra 1 e 5 μm . Particelle di dimensioni così ridotte hanno la tendenza a depositarsi a livello dei bronchioli.

3.5.3. Analisi al microscopio a scansione elettronica

La figura mostra la morfologia delle microparticelle caricate con il farmaco osservata tramite scansione elettronica. A conferma dei risultati ottenuti tramite le analisi granulometriche, si nota che tutti i campioni sono costituiti da microparticelle della grandezza di qualche micron e che le dimensioni delle particelle ottenute mediante spray drying erano più piccole rispetto a quelle ottenute con liofilizzazione. Anche qui è possibile notare come, al crescere della concentrazione di pectina, le microparticelle aumentano di dimensioni. I campioni ottenuti mediante spray drying mostravano forma sferica, superficie rugosa e dimensioni eterogenee. Al contrario, gli esemplari caricati tramite liofilizzazione le microparticelle erano visibili come aggregati e mostravano superfici irregolari.

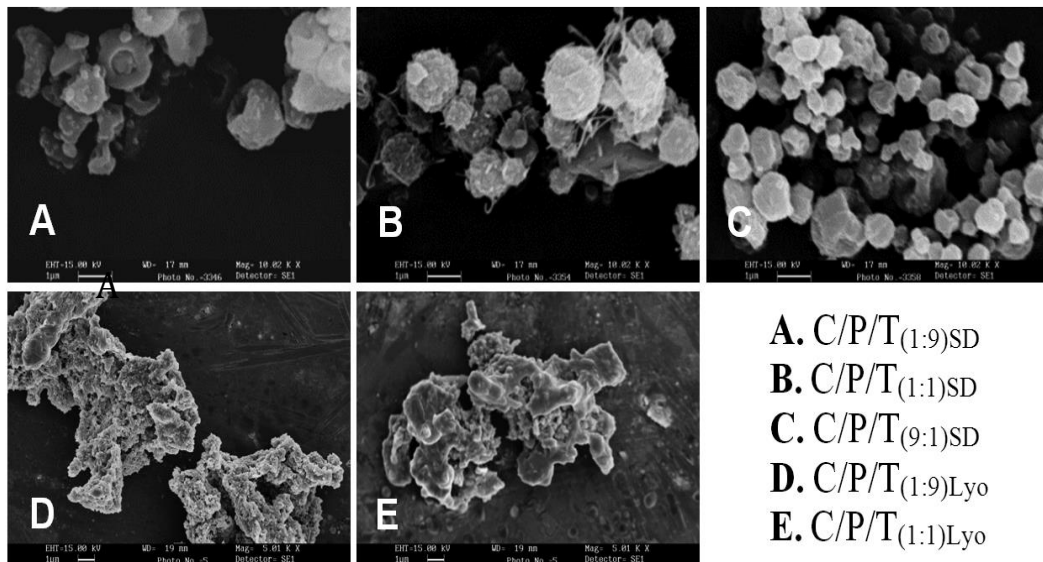


Figura 9. Immagini SEM delle microparticelle cariche

3.5.4. TGA

L'analisi termogravimetrica ha evidenziato che tutti i campioni analizzati contenevano percentuali di acqua residua compresi fra il 7% e il 13% (p/p). In particolare, nelle microparticelle preparate tramite spray drying è possibile notare una correlazione tra la percentuale di pectina nel complesso e la quantità di acqua ritenuta. Questo fenomeno di ritenzione potrebbe spiegare l'aumentare delle dimensioni di queste particelle all'aumentare della quantità di pectina nel complesso.

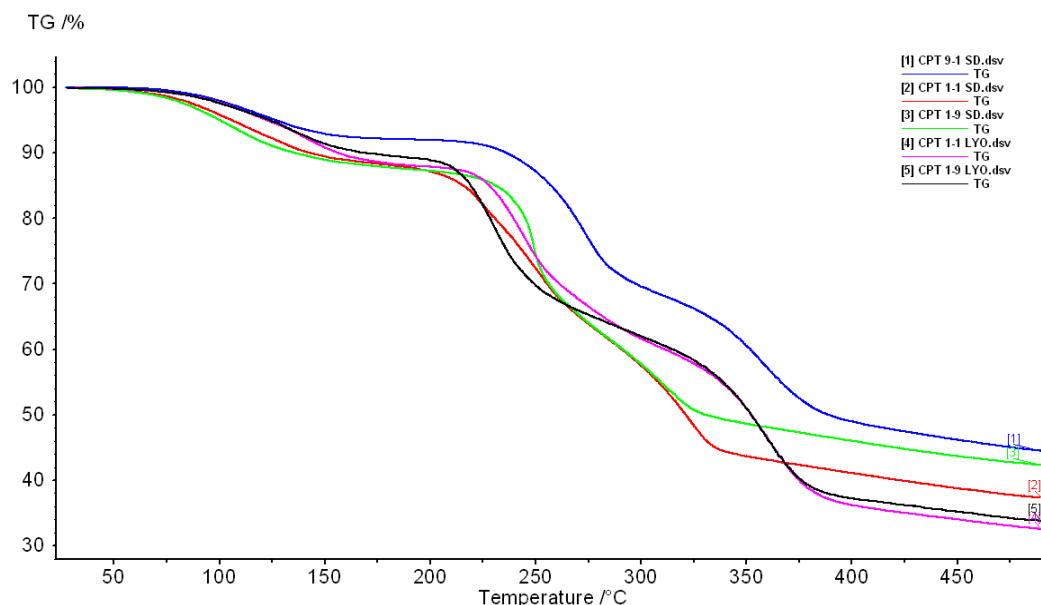


Figura 10. Analisi termogravimetrica (TGA) delle microparticelle.

Campione	Mass loss (25-180°C)
C/P/T _(1:9) SD	12.31%
C/P/T _(1:1) SD	11.95%
C/P/T _(9:1) SD	7.91%
C/P/T _(1:1) LYO	11.71%
C/P/T _(1:9) LYO	10.60%

Tabella 4

3.5.5. X-Ray Powder Diffraction

I diffrattogrammi ottenuti dall'analisi di diffrazione di raggi X dei campioni carichi sono stati inizialmente confrontati con quelli di chitosano, pectina e con le forme cristalline note di Tacrina cloridrato. I campioni C/P/T_(1:9)LYO e C/P/T_(1:1)LYO, caricati mediante liofilizzazione, hanno mostrato picchi di diffrazione riconducibili a quelli della Tacrina cloridrato anidra. Anche nel campione C/P/T_(9:1)SD, sebbene prevalentemente amorfo, la Tacrina cloridrato sembra mantenere la struttura cristallina della forma anidra (Fig. 11).

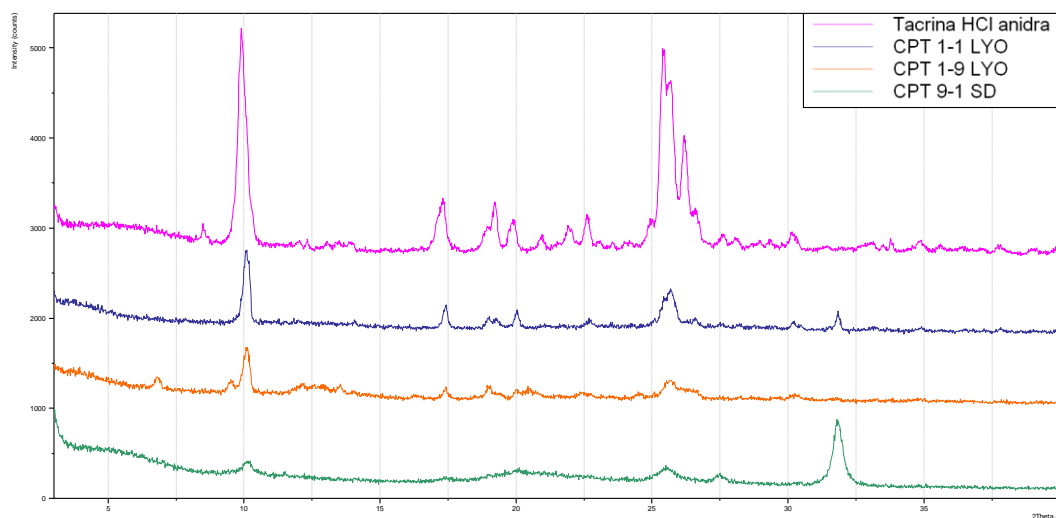


Figura 11. Confronto tra Tacrina cloridrato anidra e campioni C/P/T_(1:9)LYO, C/P/T_(1:1)LYO e C/P/T_(9:1)SD

I diffrattogrammi dei campioni C/P/T_(1:1)SD e C/P/T_(1:9)SD hanno mostrato, invece, picchi cristallini non riconducibili a forme

crystalline forms of Tacrine hydrochloride and Tacrine base; this suggests the formation of a new crystalline phase due to a probable interaction between the amino group of the active principle and the carboxylic groups present in the structure of pectin (Fig. 12).

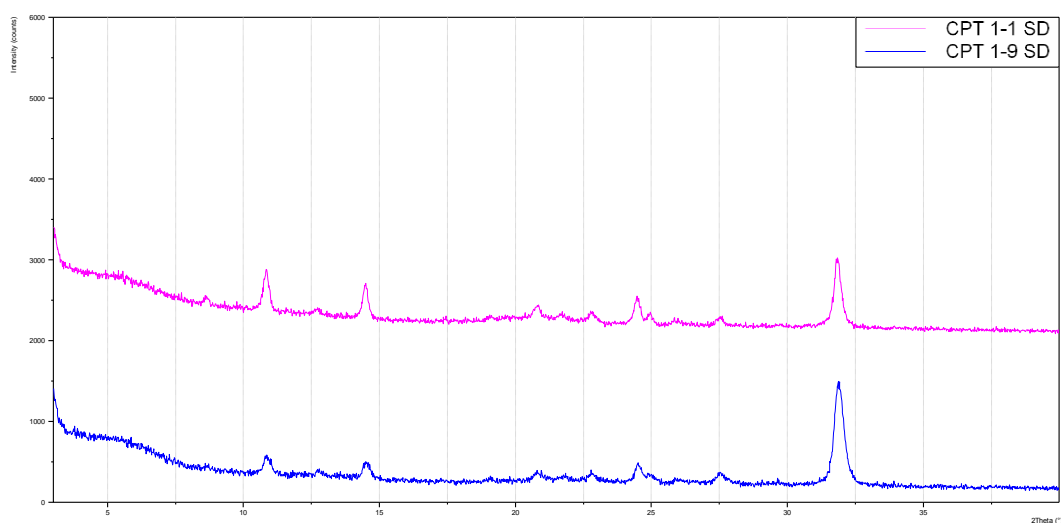
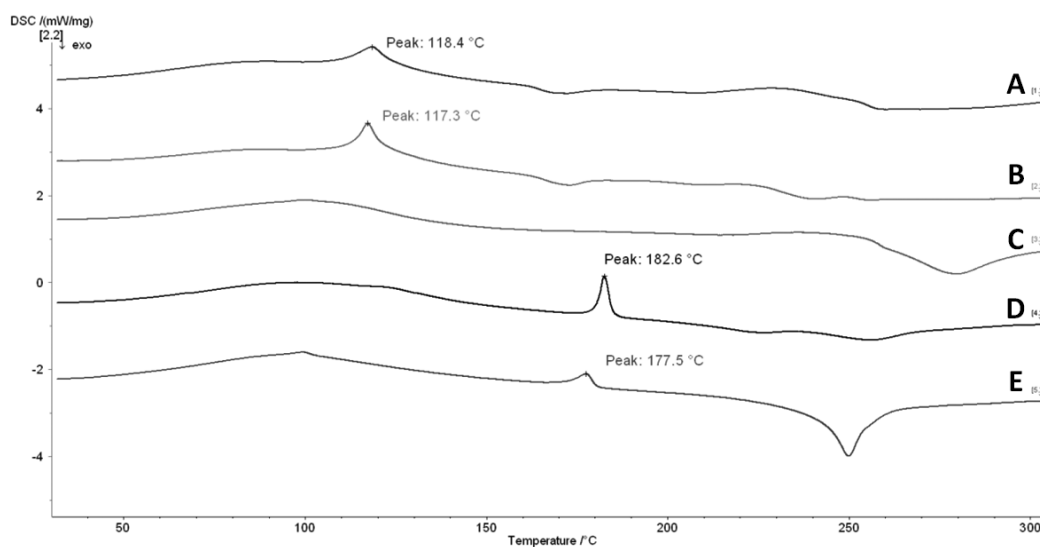


Figura 12. XRPD dei campioni C/P/T_{(1:1)SD} e C/P/T_{(1:9)SD}

3.5.6. DSC

Nella figura seguente sono stati riportati i termogrammi ottenuti tramite analisi DSC dei campioni. I campioni C/P/T_(1:9)Ly₀ e C/P/T_(1:1)Ly₀ hanno mostrato picchi endotermici rispettivamente a 118.4°C e 117.3°C. L'analisi del campione C/P/T_(9:1)SD non mostrava picchi, compatibilmente con la natura prevalentemente amorfa mostrata dall'analisi XRPD del campione. I campioni C/P/T_(1:9)SD, C/P/T_(1:1)SD, in cui è stata evidenziata una interazione tra il principio attivo ed il complesso, hanno mostrato dei picchi rispettivamente a 182,6 e 177,5°C.



(A) C/P/T_(1:1)Ly₀ (B) C/P/T_(1:9)Ly₀ (C) C/P/T_(9:1)SD (D) C/P/T_(1:1)SD (E) C/P/T_(1:9)SD

Figura 13. Analisi DSC dei campioni.

3.5.7. Capacità d'idratazione delle microparticelle

In figura 14 sono riportate le curve di idratazione dei campioni. Dopo 6 ore al 90% di umidità relativa, la capacità d'idratazione è risultata più bassa per le microparticelle liofilizzate rispetto ai campioni ottenuti tramite spray drying. Anche in questo caso, come nelle analisi termogravimetriche e dimensionali, è stata evidenziata una diretta correlazione tra la percentuale di pectina nel complesso e la capacità della microparticelle di ritenere molecole d'acqua.

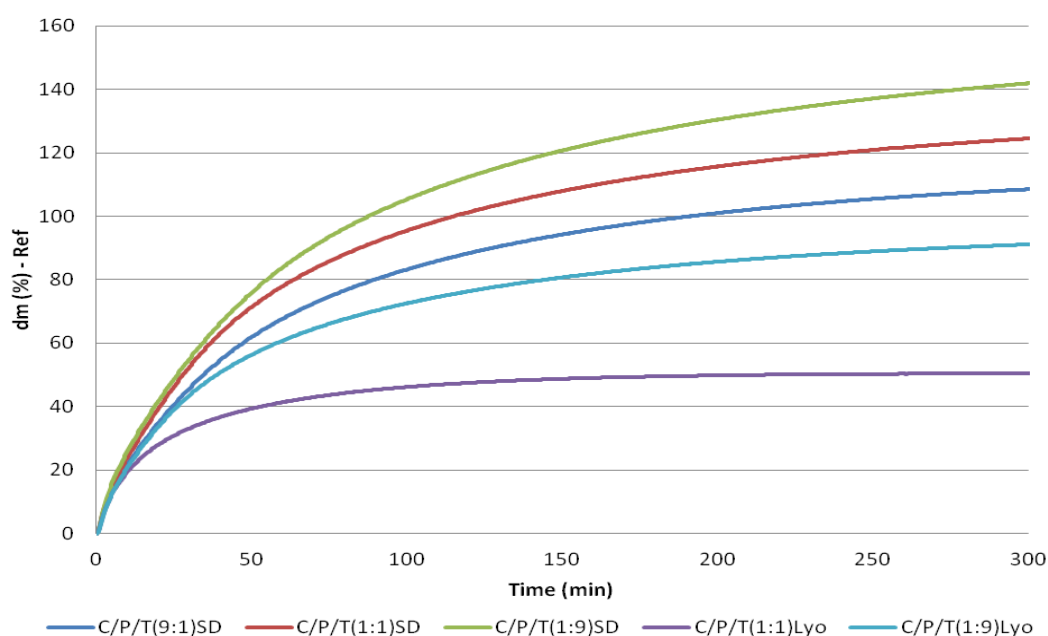


Figura 14. Rigonfiamenti delle polveri esposte ad un umidità del 90%.

Campione	Assorbimento d'acqua
C/P/T _(1:9) SD	143.2%
C/P/T _(1:1) SD	125.1%
C/P/T _(9:1) SD	109.8%
C/P/T _(1:1) LYO	50.4%
C/P/T _(1:9) LYO	91.2%

Tabella 5. Risultati delle analisi DVS.

3.5.8. Capacità mucoadesive delle microparticelle

Un sistema farmaceutico che deve essere somministrato attraverso la via nasale deve possedere capacità mucoadesive tali da limitare l'effetto della *clearance* mucociliare. Le microparticelle ottenute hanno mostrato buone capacità mucoadesive, grazie all'interazione del polimero con le glicoproteine del muco. Nella figura 15 è riportato il confronto tra le proprietà mucoadesive delle microparticelle, misurate mediante metodo colorimetrico PAS.

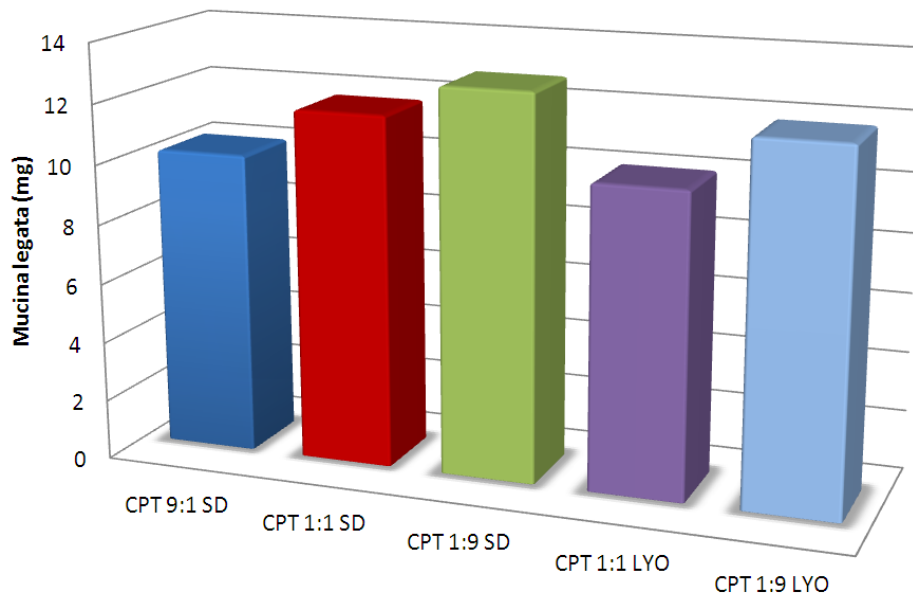


Figura 15. Mg di mucina legati alle microparticelle.

Come si può evincere dal grafico, la capacità mucoadesiva dei campioni è condizionata sia dal metodo di preparazione delle

microparticelle, sia dalla loro composizione. Infatti, a parità di composizione, le microparticelle spray dried mostrano capacità mucoadesive maggiori rispetto alle microparticelle liofilizzate probabilmente a causa delle minori dimensioni particellari che consentono di creare un'interazione più intima con il muco. Alle condizioni sperimentali (pH 5.5) sia la pectina che l'acido sialico del muco (pKa 2.2) presentano catene cariche negativamente, mentre il chitosano è carico positivamente; di conseguenza, ci si potrebbe aspettare che i complessi aventi percentuali maggiori di chitosano abbiano capacità mucoadesive maggiori. Invece, i complessi aventi quantità maggiori di pectina si sono dimostrati più mucoadesivi rispetto agli altri. Il motivo di questo risultato inatteso è da attribuire alle diverse capacità d'idratazione dei due polimeri chitosano e pectina. L'assorbimento d'acqua da parte delle microparticelle influenza la mobilità delle catene e l'interazione fisica con lo strato superficiale di muco: di conseguenza, microparticelle aventi una percentuale di pectina maggiore (quindi una maggior capacità di idratazione) hanno una fluidità tale da aumentare l'interazione con il muco.

3.5.9. Studi di rilascio in-vitro

In figura 16 sono mostrati i risultati degli studi di rilascio condotti a pH 5.5. Questi studi ci permettono di valutare l'influenza della composizione polimerica e della metodica di preparazione sul rilascio del farmaco dal sistema.

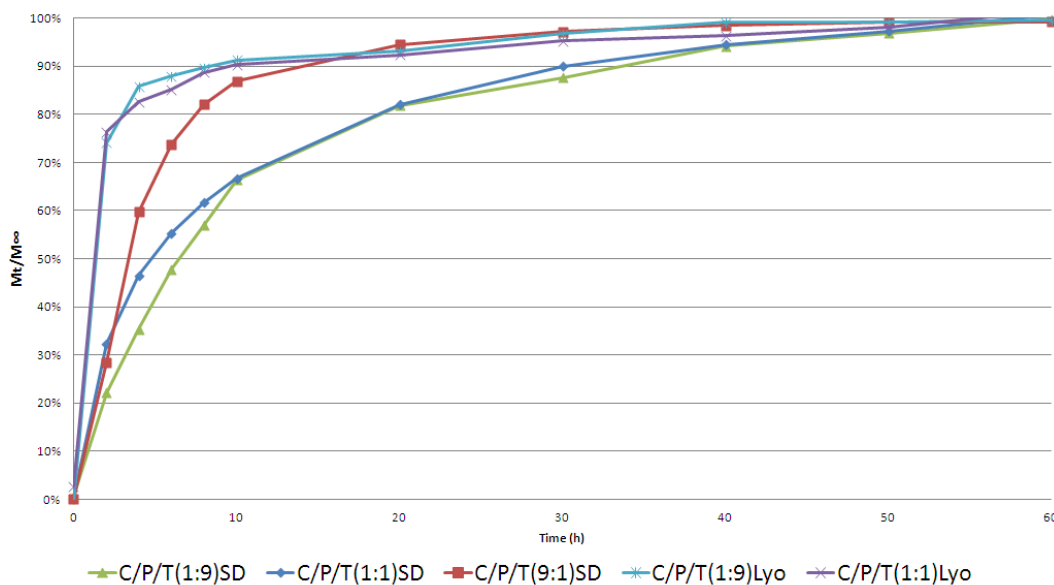


Figura 16. Cinetica di rilascio di Tacrina cloridrato dalle microparticelle

Le microparticelle spray dried hanno mostrato un rilascio più lento rispetto alle microparticelle liofilizzate. La spiegazione di questo fenomeno è da ricercare nelle interazioni tra il complesso e la Tacrina cloridrato; infatti, nei campioni C/P/T (1:1)_{Lyo}, C/P/T (1:9)_{Lyo}, che contengono Tacrina cloridrato nella forma cristallina anidra, il rilascio era più veloce rispetto ai campioni C/P/T (1:1)_{SD}, C/P/T (1:1)_{SD}, in cui si era ipotizzata una interazione del farmaco con il complesso.

3.5.10. Studi di permeazione *ex-vivo*

La figura mostra i risultati dello studio di permeazione. Come si può notare, la permeazione sembra essere correlata con la composizione del complesso. In particolare, le microparticelle contenenti meno chitosano hanno mostrato profili di permeazione più bassi rispetto agli altri campioni. Il motivo di questo calo è probabilmente dovuto alla proprietà del chitosano di agire come *enhancer* permettendo così una maggior permeazione del farmaco attraverso la mucosa nasale.

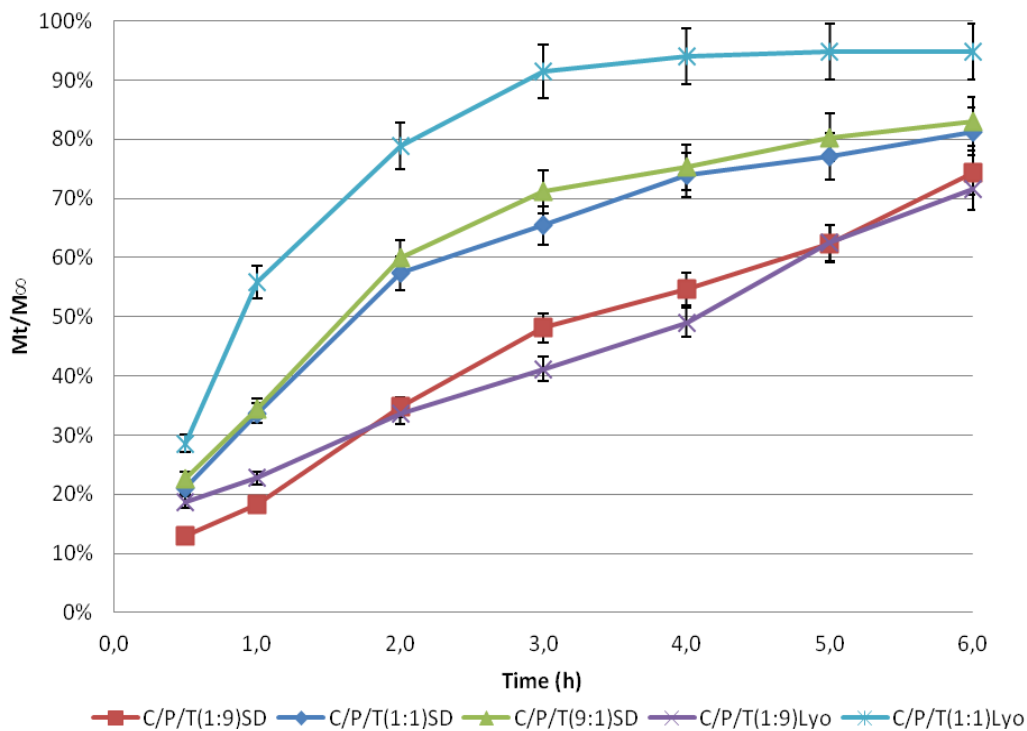


Figura 17. Profilo di permeazione della Tacrina cloridrato attraverso la mucosa nasale di pecora.

3.6. Conclusioni

I risultati ottenuti suggeriscono che i complessi chitosano-pectina possano trovare applicazione come *carriers* per la veicolazione nasale di Tacrina cloridrato. Il rilascio e l'assorbimento a livello delle cavità nasali permetterebbe una maggior efficacia terapeutica del farmaco poiché, evitando l'effetto di primo passaggio epatico, potrebbe aumentare la biodisponibilità del farmaco e diminuire la dose da somministrare limitando gli effetti collaterali tipici della somministrazione orale. Le proprietà mucoadesive dei complessi polielettrolitici permettono una residenza maggiore nel sito di somministrazione della formulazione. In particolare, l'eccesso di pectina nei complessi polielettrolitici conferisce al network una struttura largamente porosa che favorisce l'ingresso dell'acqua e, di conseguenza, la mobilità delle catene e l'interazione col muco nasale, tale da aumentare le proprietà mucoadesive delle microparticelle. La percentuale di chitosano, invece, influenza la capacità del farmaco di permeare attraverso la mucosa nasale, agendo da *enhancer*. Le particelle ottenute mediante liofilizzazione hanno riportato le dimensioni migliori per depositarsi all'interno della cavità nasale, nella porzione dove l'assorbimento è migliore grazie alla fitta rete di vascolarizzazione. Inoltre queste particelle si sono mostrate in grado di rilasciare completamente il farmaco al sito di somministrazione garantendone un'adeguata permeazione.

4

NANOPARTICELLE DI CHITOSANO RETICOLATE CON SODIO CROMOGLICATO PER IL TRATTAMENTO DELLA RINITE ALLERGICA

Nell'ambiente sono presenti numerosi allergeni, come polveri, pollini e allergeni animali. Questi possono depositarsi sulla mucosa nasale e la successiva sensibilizzazione verso uno di questi allergeni può causare la rinite allergica. La rinite allergica può essere trattata attraverso l'utilizzo di vari farmaci, come corticosteroidi, antistaminici, decongestionanti orali e nasali. Tra gli antistaminici, il Sodio Cromoglicato è uno dei farmaci attualmente utilizzato nella profilassi di tale patologia. Esso ha una blanda attività antinfiammatoria e possiede un effetto antistaminico indiretto, inibendo la degranolazione dei mastociti. In seguito a somministrazione nasale, meno del 7% della dose somministrata viene assorbita a livello sistemico. Una delle possibili cause è la *clearance* mucociliare che, come noto, provoca una rapida rimozione dei farmaci in soluzione dalla mucosa nasale. Come conseguenza, viene ridotta la compliance del paziente che deve somministrare il farmaco almeno quattro volte

al giorno. Per ovviare a tale problema, si è pensato di includere il Sodio Cromoglicato in nanoparticelle di Chitosano, un polimero capace di aderire alla mucosa, prolungando il contatto della formulazione al sito di applicazione. Le proprietà del Chitosano permettono, inoltre, di prolungare il rilascio del farmaco con conseguente riduzione del numero di somministrazioni giornaliere. In presenza di molecole cariche negativamente, infatti, il Chitosano, polimero policationico, ha la capacità di generare un network tridimensionale capace di modulare la liberazione del farmaco. In questo studio, sono state sfruttate le cariche negative del Sodio Cromoglicato per indurre la coacervazione del Chitosano senza l'aggiunta di altri reticolanti e la conseguente produzione di nanoparticelle mucoadesive e a rilascio modulato.

4.1. La rinite allergica

La rinite allergica è una infiammazione delle vie nasali. Essa si verifica quando un allergene (polline, polvere, peli di animali) viene inalato da un individuo con un sistema immunitario sensibilizzato. In questi individui, l'allergene innesca la produzione dell'immunoglobulina E (IgE), che si lega ai mastociti e basofili contenenti istamina. Il legame delle IgE ai mastociti causa il rilascio di mediatori infiammatori, come l'istamina⁸⁷. I sintomi caratteristici della rinite allergica sono: rinorrea (eccessiva secrezione nasale), prurito e congestione nasale⁸⁸, gonfiore congiuntivale ed eritema, edema palpebrale, stasi venosa palpebra inferiore (occhiaie) e turbinati nasali gonfi⁸⁹.

4.1.1. Trattamento della malattia

L'obiettivo del trattamento della rinite allergica è quello di prevenire o ridurre i sintomi causati dalla infiammazione dei tessuti interessati. I farmaci corticosteroidi intranasali sono usati per controllare i sintomi associati alla malattia (starnuti, rinorrea, prurito e congestione nasale). Questi farmaci richiedono diversi giorni per agire e devono essere presi per diverse settimane. Altri steroidi sistemici (prednisone e triamcinolone acetone) sono efficaci nel ridurre l'infiammazione nasale, ma il loro impiego è limitato a causa della breve durata del loro effetto e degli effetti collaterali della terapia steroidea prolungata. Gli antistaminici sono considerati i farmaci di prima scelta in caso di forma leggera di rinite allergica. Possono essere somministrati soli o in combinazione con corticosteroidi. I farmaci antistaminici possono essere assunti sia per via orale che nasale per controllare i sintomi della rinite allergica. Per prevenire la rinite allergica stagionale, è preferibile prendere il farmaco antistaminico orale prima dell'esposizione. Nel caso di antistaminici nasali il sollievo dai sintomi sopraggiunge già dopo 15 minuti. I farmaci antistaminici possono avere effetti collaterali indesiderati; il più importante è la sonnolenza causata dagli antistaminici orali. Altre terapie che possono essere utilizzate comprendono l'uso di antistaminici, decongestionanti, antagonisti del recettore dei leucotrieni ed il Sodio Cromoglicato⁸⁸.

4.2. Sodio Cromoglicato

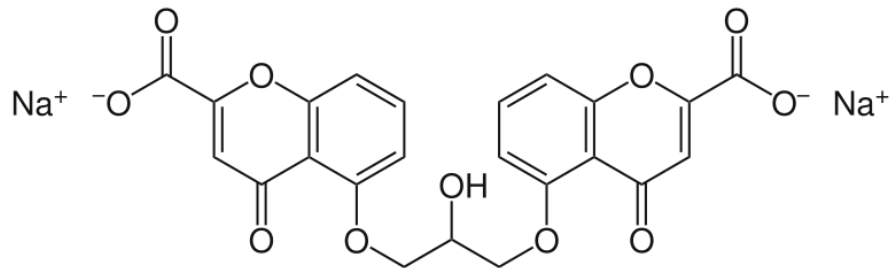


Figura 18. Sodio Cromoglicato

Il Sodio Cromoglicato (acido 5-[3-(2-carbossi-4-oxochromen-6-yl)ossi-2-idrossipropossi]-4-oxochromene-2-carbossilico), anche noto come *Cromonyl*, è il sale bisodico dell'acido cromoglicico. Ha una blanda attività antinfiammatoria e non ha un effetto antistaminico diretto. Starnuti, bruciore nasale e rinorrea rispondono bene al trattamento con questo farmaco, ma non è efficace contro la congestione nasale⁹⁰. Diversi studi dimostrano che è in grado di stabilizzare la membrana dei mastociti inibendo il rilascio di istamina e di altri mediatori che innescano la risposta allergica. L'inibizione è dovuta al blocco dei canali voltaggio dipendenti del cloro, inducendo iperpolarizzazione. Diversi studi effettuati *in-vitro*, su mastociti peritoneali intestinali, ed *in-vivo*, su ratti e topi, hanno dato numerose informazioni sull'attività del farmaco. Il primo risultato evidente è che esistono differenze specie-specifiche, in quanto il farmaco è capace di inibire il rilascio di istamina nel ratto e nell'uomo, ma non nel topo, dove si evidenzia una riduzione di proteasi-1 plasmatica, rilasciata dai mastociti, ma non una riduzione di istamina. Un altro importante

dato da considerare è che il Sodio Cromoglicato presenta l'effetto terapeutico in seguito a somministrazione a lungo termine precedente all'attacco allergico, ma non risulta efficace se somministrato al momento dell'attacco patogeno o per terapie a breve termine⁹¹. Il massimo beneficio si ottiene 2 o 4 settimane dopo l'inizio della terapia. Se somministrato 4 volte al giorno da un effetto paragonabile a quello degli antistaminici diretti, ma risulta meno efficace dei corticosteroidi nasali; deve essere somministrato almeno 6 volte al giorno⁹⁰. Nell'essere umano è richiesta un'elevata concentrazione di farmaco (1 mM) per avere una modesta inibizione del rilascio di mediatori, questo è stato evidenziato da studi *in-vitro*, condotti su mastociti isolati da polmone, tonsille, intestino e da colture di mastociti che derivano da cellule del cordone ombelicale. Risulta, inoltre, avere un effetto stabilizzante solo su mastociti del tessuto connettivo e non su mastociti mucosali o su basofili⁹¹. Non sono stati rilevati effetti inibitori su: aumento della permeabilità vascolare, *swelling* tissutale, infiltrazione dei leucociti, aumento della temperatura corporea).

Il Sodio Cromoglicato è assorbito per via orale solo per lo 0.5-2.0%, per tale motivo viene somministrato principalmente per via transmucosale. Il grado di assorbimento dipende dal metodo di somministrazione. La via polmonare e la via nasale prevedono l'utilizzo di aerosol, con l'impiego di inalatori o nebulizzatori. Meno del 7% della dose somministrata per via nasale è assorbita a livello sistemico. La frazione assorbita viene rapidamente eliminata poiché il Sodio Cromoglicato possiede un elevato indice

di depurazione plasmatica che impedisce l'accumulo del farmaco; la quantità di farmaco che raggiunge il polmone dipende dalla capacità del paziente di utilizzare gli inalatori, dal grado di broncocostrizione, dalle dimensioni delle particelle e dalla presenza di muco nelle vie aeree. L'emivita di assorbimento polmonare è di un'ora. Livelli plasmatici di 9 ng/mL si possono raggiungere in 15 minuti, in seguito alla somministrazione di 20 mg di farmaco. La via oftalmica prevede l'instillazione del farmaco nell'occhio e porta ad un assorbimento dello 0,03%. Il Sodio Cromoglicato, essendo un sale, e dunque eccessivamente polare, non attraversa le membrane biologiche a pH fisiologico, poiché insolubile nel doppio strato lipidico. Esso forma un legame reversibile con le proteine plasmatiche, alle quali si lega per circa il 65%. Il Sodio Cromoglicato non viene metabolizzato e viene eliminato al 50% per via biliare e al 50% per via urinaria. In parte può essere eliminato attraverso le feci o per esalazione.

Essendo un farmaco poco assorbito, gli effetti collaterali sono di lieve entità e limitati ai siti di contatto: irritazione della gola, tosse, xerostomia e più raramente senso di costrizione toracica e respiro sibillante. Gli effetti indesiderati gravi sono molto rari: dermatiti reversibili, miositi e gastroenteriti, nel 2% dei pazienti ed in pochi casi si possono verificare infiltrazione polmonare con anafilassi⁹².

4.3. Preparazione di nanoparticelle polimeriche

Le nanoparticelle sono particelle solide, di dimensioni comprese tra 10 e 1000 nm. L'utilizzo della nanoparticelle per il controllo del rilascio del farmaco porta numerosi vantaggi: le dimensioni e le caratteristiche superficiali possono essere manipolate per ottenere un trasporto attivo e passivo del farmaco in seguito a somministrazione parenterale; le nanoparticelle controllano ed impediscono il rilascio del principio attivo durante il trasporto al sito target, aumentando l'indice terapeutico e riducendo gli effetti collaterali; si può ottenere un rilascio controllato scegliendo opportunamente la matrice; si può ottenere una veicolazione del principio attivo al sito target grazie alla presenza di un ligando riconosciuto dal target o tramite l'utilizzo di una guida magnetica; si possono somministrare per via locale e sistemica. Le principali limitazioni nell'uso di tali formulazioni sono date dalle ridotte dimensioni delle particelle e dalla maggior area superficiale, che possono portare alla formazione di aggregati, rendendone la manipolazione più complicata⁹³. In letteratura sono riportati diversi metodi per la preparazione delle nanoparticelle, brevemente descritti di seguito.

4.3.1. Emulsione semplice con evaporazione del solvente

Il polimero ed il principio attivo vengono solubilizzati all'interno di un solvente organico, immiscibile con acqua e la soluzione ottenuta viene emulsionata in una fase acquosa fino al

raggiungimento di gocce con dimensioni definite. Le emulsioni risultanti sono emulsioni O/A. Successivamente si porta ad evaporazione del solvente e le particelle ottenute vengono essiccate tramite filtrazione o altri metodi idonei. Questa tecnica viene utilizzata in presenza di farmaci insolubili o poco solubili in acqua e porta alla formazione di nano o microsfele.

4.3.2. Doppia emulsione con evaporazione del solvente

Vengono preparate due soluzioni: una acquosa contenente il farmaco, una organica in cui è contenuto il polimero. Successivamente si uniscono le due fasi fino ad ottenere un'emulsione A/O. In seguito si aggiunge l'emulsione ottenuta ad un'altra fase acquosa, contenente un eventuale stabilizzante, così da avere una doppia emulsione A/O/A. Questa tecnica è utilizzata solo quando il farmaco è molto solubile in acqua ed ha un basso coefficiente di ripartizione.

4.3.3. Omogeneizzazione a caldo

Questa tecnica prevede la preparazione di due fasi, una acquosa ed una lipidica. Una fase lipidica calda viene dispersa in una fase acquosa, anch'essa calda e contenente surfactante, così da ottenere una pre-emulsione O/A. In questo caso il farmaco può essere disciolto sia nella fase acquosa che nella fase lipidica.

4.3.4. Omogeneizzazione a freddo

Il farmaco è disciolto in un lipide caldo e viene versato nella fase acquosa, tenuta sotto agitazione magnetica. In seguito al raffreddamento, il lipide tende a precipitare formando delle microparticelle che verranno immediatamente risospese in una seconda fase acquosa fredda contenente surfactante. Si ottiene così una sospensione che viene omogeneizzata a temperatura ambiente, o inferiore, per ottenere delle nanoparticelle. Questa tecnica è utilizzata in caso di principi attivi idrosolubili, allo scopo di limitarne la perdita nella fase acquosa.

4.3.5. Polimerizzazione di monomeri

In questo metodo si sfrutta la polimerizzazione di monomeri in soluzione acquosa. Il farmaco può essere incorporato nelle nanoparticelle sia per dissoluzione nel mezzo di polimerizzazione, che per adsorbimento su nanoparticelle, quando la polimerizzazione è completata. La sospensione nanoparticellare viene poi purificata attraverso ultra centrifugazione, allo scopo di eliminare stabilizzanti e surfactanti precedentemente utilizzati. Il precipitato così ottenuto viene risospeso in un mezzo isotonico privo di tensioattivi.

4.3.6. Coacervazione o gelazione ionica

Questa tecnica viene utilizzata per produrre delle nanoparticelle utilizzando dei polimeri idrofili come Chitosano, Gelatina, Acido Ialuronico e Sodio Alginato. Nel caso del Chitosano, il metodo prevede la preparazione di due fasi acquose, una contenente il polimero cationico ed un eventuale copolimero, come polietileno-ossido o etileno-ossido, l'altra contenente un polianione come Sodio Tripolifosfato. Le cariche positive reagiscono con le cariche negative attraverso un'interazione elettrostatica e portano alla formazione di coacervati.

4.4. Parte Sperimentale

4.4.1. Materiali

Il Chitosano (Mw 60.000-120.000 Da e grado di deacetilazione = 97%) ed il Sodio Cromoglicato (Mw 512.33 g/mol) sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Tutti gli altri prodotti e solventi sono stati acquistati da Carlo Erba (Milano, Italia). Il tampone acetato pH 5.0 era costituito da 13.6 g di sodio acetato e 6 mL di acido acetico glaciale, portati a pH con idrossido di sodio.

4.4.2. Preparazione delle nanoparticelle

Il Chitosano (fase policationica) e il Sodio Cromoglicato (fase polianionica) sono stati solubilizzati in tampone acetato pH 5.0. Le nanoparticelle si formavano spontaneamente a seguito dell'aggiunta di 1 mL di fase polianionica a 3 mL di fase policationica tenuta sotto agitazione. Sono state utilizzate diverse concentrazioni di chitosano (0.025-0.400% p/v) e Sodio Cromoglicato (0.11-0.92% p/v) in modo da ottenere differenti rapporti molari di polimero e farmaco nella miscela finale. 10 mL di sospensione sono stati centrifugati su un letto di glicerolo (13000 × *g*, 30 min, 25°C); il precipitato ottenuto è stato lavato con acqua ultrapura allo scopo di eliminare il sodio acetato. Le

nanoparticelle così ottenute sono state isolate per ultracentrifugazione e risospese in acqua ultrapura.

4.4.3. Determinazione della resa

Per determinare la resa di produzione, la sospensione di NPs è stata centrifugata (13000g, 30 min, 25°C) ed il surnatante è stato eliminato. Il precipitato è stato essiccato a 50°C fino a peso costante. La resa è stata calcolata attraverso la seguente formula:

$$Resa \% = \frac{\text{peso del precipitato essiccato}}{\text{peso dei componenti iniziali}} \cdot 100$$

4.4.4. Analisi dimensionale e morfologica

Le dimensioni e l'indice di polidispersione (PDI) sono stati misurati a 25°C tramite un Dynamic Light Scattering (Brookhaven 90-Plus) con raggio laser He-Ne impostato ad una lunghezza d'onda di 532 nm (angolo di diffusione di 90°). La sospensione di nanoparticelle è stata dispersa in acqua ultrapura (1/10, v/v). La misura del potenziale Z è stata effettuata a 25°C con un Malvern Zetasizer 3000 HS, effettuando la stessa diluizione. L'esame morfologico delle NPs è stato eseguito attraverso un microscopio a forza atomica (AFM). L'immagine AFM è stata ottenuta in aria attraverso un tapping-mode in un sistema Multimode - Nanoscope V (Bruker) usando sonde TESP. Un'aliquota della

sospensione di NPs è stata stratificata su un disco mica e disidratata per circa 10 min sotto un flusso di azoto. Le immagini sono state prese da diverse angolazioni sul film delle nanoparticelle essiccate. Le misure sono state ripetute tre volte e i risultati sono stati espressi come media delle tre analisi.

4.4.5. Caricamento del farmaco ed efficienza di incapsulazione

Per il calcolo del caricamento del farmaco (DL) e dell'efficienza di incapsulazione (EE), le nanoparticelle sono state isolate tramite centrifugazione ($13000 \times g$, 30 min, 25°C) e il surnatante ottenuto è stato analizzato mediante l'uso di uno spettrofotometro UV settato a 328 nm, quantificando così il contenuto di Sodio Cromoglicato non legato alle nanoparticelle. È stata costruita una retta di calibrazione misurando l'assorbimento UV di 5 soluzioni di Sodio Cromoglicato (5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). È stata ottenuta una buona linearità con un R^2 pari a 0.999. Il caricamento del farmaco e l'efficienza di incapsulazione sono state calcolate rispettivamente come segue:

$$\text{DL} = \frac{\text{farmaco totale} - \text{farmaco nel surnatante}}{\text{peso delle nanoparticelle}} \cdot 100$$

$$\text{EE} = \frac{\text{farmaco totale} - \text{farmaco nel surnatante}}{\text{farmaco totale}} \cdot 100$$

4.4.6. Stabilità delle NPs in soluzione fisiologica ed acqua

La stabilità delle nanoparticelle è stata testata in soluzione fisiologica (0.9% NaCl p/v) ed in acqua al fine di identificare il mezzo idoneo per la risospensione e, dunque, per la loro conservazione. Aliquote di sospensioni di NPs appena preparate sono state diluite ad una concentrazione di 1 mg/mL e la variazione delle dimensioni è stata valutata attraverso l'uso di un Dynamic Light Scattering a 25°C ($n=3$).

4.4.7. Studi di mucoadesione

La valutazione delle proprietà mucoadesive delle nanoparticelle è stata effettuata come descritto da Luppi et al.⁸⁶. Nello specifico, 1mL di sospensione di mucina (0,05% p/v in soluzione fisiologica) è stato miscelato con 1 mL di NPs per 24 ore a 37°C, sotto agitazione continua. L'incremento delle dimensioni delle nanoparticelle, dovuta all'interazione tra le catene di Chitosano e la mucina, rispettivamente carichi positivamente e negativamente, viene misurato attraverso il Dynamic Light Scattering a 37°C ($n=3$).

4.4.8. Studi di rilascio in-vitro

La sospensione di NPs (10 mL) è stata centrifugata come descritto precedentemente. Il precipitato ottenuto è stato lavato con acqua ultrapura, ricentrifugato e successivamente risospeso in 0.2 mL di acqua ultrapura. Gli studi di rilascio sono stati eseguiti incubando la sospensione di NPs in 10 mL di soluzione fisiologica a 37°C. Ad intervalli stabiliti (0, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 min) sono stati prelevati dei volumi di soluzione che sono stati successivamente filtrati ed analizzati attraverso lo spettrofotometro UV al fine di determinare la quantità di farmaco rilasciata nel tempo.

4.4.9. Studi di permeazione/penetrazione in-vitro

Gli studi di permeazione sono stati condotti utilizzando la mucosa nasale di pecora posta all'interno di celle di Franz con un'area diffusionale di 1.76 cm². Il naso di pecora è stato acquistato da rivenditori locali, tagliato in modo da esporre i turbinati e lavata con soluzione fisiologica. Dopo un'ora la mucosa è stata rimossa dai turbinati mediante l'utilizzo di pinze e posta nuovamente in soluzione fisiologica per mezz'ora. Infine, la mucosa è stata tagliata in dimensioni tali da permetterne l'utilizzo nelle celle di Franz. 10 mL della sospensione iniziale di NPs sono stati centrifugati; il precipitato ottenuto è stato lavato con acqua ultrapura, ricentrifugato e successivamente risospeso in 0.2 mL di

acqua ultrapura. Questa sospensione nanoparticellare è stata posta sul compartimento donatore. La fase ricevente (6.0 mL di soluzione fisiologica a 37°C) è stata costantemente mantenuta in agitazione e, ad intervalli stabiliti (0, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 min), sono state prelevate aliquote di 500 µl, immediatamente rimpiazzate da 500 µl di soluzione fisiologica fresca. La quantità di farmaco nella fase ricevente è stata analizzata attraverso spettrofotometria UV. Come confronto, è stata effettuata la stessa analisi su una soluzione acquosa di farmaco. Inoltre, è stato determinato il bilancio di massa del farmaco dopo 3 ore e 6 ore dall'applicazione della sospensione delle NPs al fine di ottenere informazioni sulla quantità effettiva di SC penetrato all'interno della mucosa.

4.5. Risultati e discussioni

4.5.1. Preparazione delle nanoparticelle e resa

Studi precedenti condotti da De Lima et al.⁹⁴ confermano che le interazioni tra il Sodio Cromoglicato ed il Chitosano sono sia di natura idrofobica, attraverso siti non polari (gruppo acetilato), che di natura elettrostatica attraverso interazioni ioniche. A pH 5.0, la reticolazione ionica è possibile grazie alla presenza di cariche positive sulle catene del Chitosano (pKa= 6.3) e negative del Sodio Cromoglicato (pKa= 1.9). Per le NPs con rapporto NH₂/COOH 4:1 e 1:2, un aumento delle concentrazioni di polimero e di farmaco in soluzione porta alla formazione di precipitati micrometrici.

Campione	Ratio NH ₂ :COOH	CH:SC (μmol)	Resa (%)
CH ₁₈ /SC ₂	4:1	18:2.25	5.8±0.7
CH ₃₆ /SC ₄		36:4.5	18.0±0.8
CH ₇₂ /SC ₉		72:9	Precipitazione
CH ₉ /SC ₂	2:1	9:2.25	6.2±0.7
CH ₁₈ /SC ₄		18:4.5	32.5±0.6
CH ₃₆ /SC ₉		36:9	60.0±0.7
CH ₄ /SC ₂	1:1	4.5:2.25	5.4±1.2
CH ₉ /SC ₄		9:4.5	29.0±0.9
CH ₁₈ /SC ₉		18:9	62.3±0.3
CH ₄ /SC ₄	1:2	4.5:4.5	7.0±0.5
CH ₉ /SC ₉		9:9	Precipitazione
CH ₁₈ /SC ₁₈		18:18	Precipitazione

Tabella 6

Come si può vedere dalla tabella 6, la resa del processo di preparazione delle nanoparticelle è correlato alla concentrazione di chitosano e farmaco in soluzione e dal loro rapporto molare. In particolare, la resa aumenta all'aumentare della concentrazione dei due componenti.

4.5.2. Analisi dimensionale e morfologica

In tabella sono riportati i valori relativi alle dimensioni e all'indice di polidispersione delle diverse preparazioni nanoparticellari preparate. Concentrazioni e rapporti molari differenti di Chitosano e Sodio Cromoglicato sono state preparate per studiare l'influenza dell'interazione ionica sulle dimensioni delle NPs. Le NPs ottenute mostrano un range di dimensioni compreso tra 180 e 402 nm con una buona polidispersione con un aumento di dimensioni all'aumentare delle concentrazioni di farmaco e polimero.

Sulla base dei risultati riguardanti le dimensioni delle nanoparticelle e la loro resa, sono stati selezionati due tipi di NPs ($\text{CH}_{18}/\text{SC}_9$ e $\text{CH}_{36}/\text{SC}_9$) che presentavano dimensioni nanometriche (387 ± 5 nm e 402 ± 10 nm rispettivamente), buoni valori di PDI e una buona resa finale ($> 60\%$). Queste due preparazioni nanoparticellari sono state utilizzate per gli studi successivi.

Campione	Ratio NH ₂ :COOH	CH:SC (μ mol)	Dimensioni (nm)	PDI	Resa (%)
CH₁₈/SC₂		18:2.25	180 \pm 9	0.29-0.34	5.8 \pm 0.7
CH₃₆/SC₄	4:1	36:4.5	205 \pm 4	0.29-0.37	18.0 \pm 0.8
CH₇₂/SC₉		72:9	Precipitazione		
CH₉/SC₂		9:2.25	235 \pm 10	0.48-0.53	6.2 \pm 0.7
CH₁₈/SC₄	2:1	18:4.5	267 \pm 8	0.28-0.31	32.5 \pm 0.6
CH₃₆/SC₉		36:9	402 \pm 7	0.26-0.44	60.0 \pm 0.7
CH₄/SC₂		4.5:2.25	256 \pm 11	0.26-0.39	5.4 \pm 1.2
CH₉/SC₄	1:1	9:4.5	289 \pm 6	0.24-0.31	29.0 \pm 0.9
CH₁₈/SC₉		18:9	387 \pm 7	0.24-0.42	62.3 \pm 0.3
CH₄/SC₄		4.5:4.5	365 \pm 4	0.23-0.35	7.0 \pm 0.5
CH₉/SC₉	1:2	9:9	Precipitazione		
CH₁₈/SC₁₈		18:18	Precipitazione		

Tabella 7

La figura 19 mostra come la superficie delle NPs sia liscia e rotonda. L'adesione tra le singole particelle era probabilmente dovuta al processo di essiccamento previsto dalla procedura di preparazione.

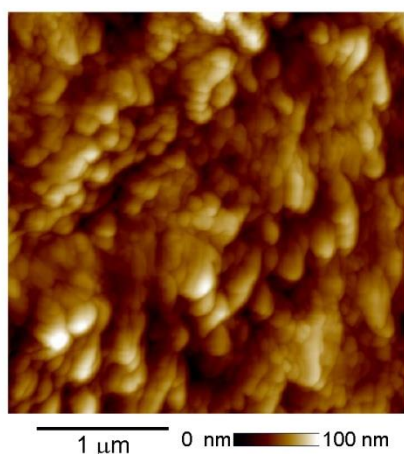


Figura 19. Immagine AFM delle NPs CH₁₈/SC₉

4.5.3. Caricamento, efficienza di incapsulazione e potenziale Z

Le nanoparticelle selezionate mostrano interessanti proprietà per quel che riguarda il caricamento del farmaco (DL%) e l'efficienza di incapsulazione (EE%). La gelificazione ionica, senza l'aggiunta di altri reticolanti, porta ad una buona efficienza di incapsulazione, non superiore comunque al 53% per entrambe le formulazioni. Le formulazioni CH₁₈/SC₉ e CH₃₆/SC₉ presentano rispettivamente una %DL del 63.7±0.2 % e del 39.5±0.6%, confermando che i due tipi di NPs, contengono diverse quantità di Chitosano e di conseguenza diversi rapporti molari tra farmaco e polimero.

In tabella 8 sono riportati i valori relativi ai potenziali Z delle nanoparticelle selezionate. Come previsto, il potenziale Z ottenuto risulta essere positivo per la presenza del Chitosano sulla superficie delle particelle.

Tipo di NPs	ζ (mV)	EE%	DL%
CH ₁₈ /SC ₉	+ 20.4 ± 1.8	51.2 ± 0.3	63.7 ± 0.2
CH ₃₆ /SC ₉	+23.9 ± 0.8	53.8 ± 0.5	39.5 ± 0.6

Tabella 8

4.5.4. Stabilità delle NPs in soluzione fisiologica ed acqua

Come si può vedere dalle figure 20 e 21, le dimensioni e il PDI delle NPs CH₁₈/SC₉ e CH₃₆/SC₉ si mantengono costanti sia in acqua che in soluzione fisiologica fino a 6 ore. Lo studio è stato effettuato anche fino a 24 ore ed i risultati ottenuti confermano la stabilità delle due preparazioni nanoparticellari nei due mezzi selezionati per la risospensione.

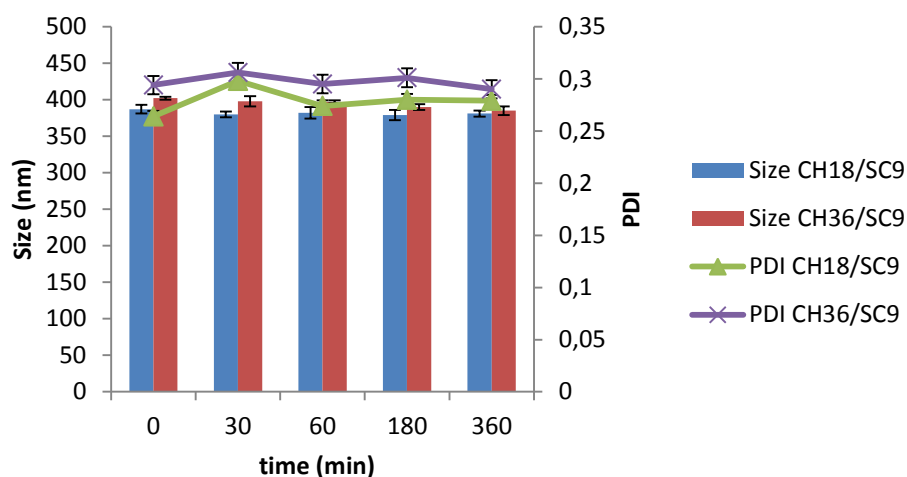


Figura 20. Stabilità in acqua delle NPs

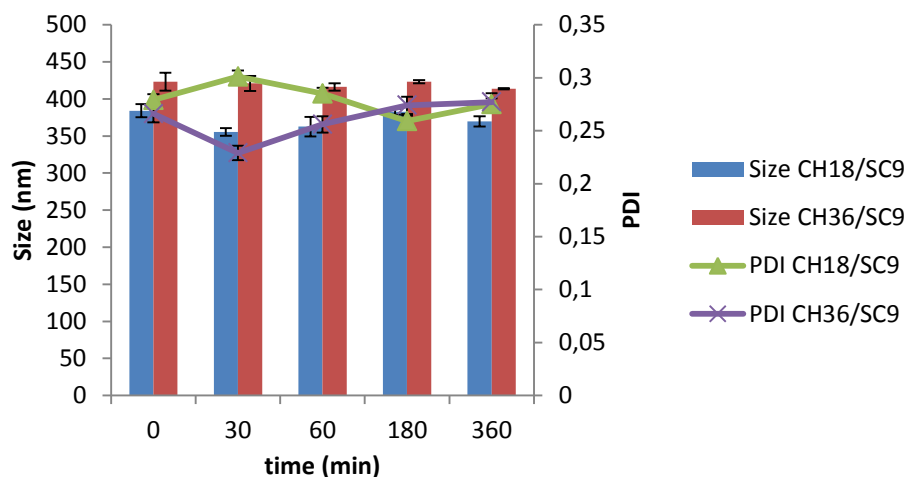


Figura 21. Stabilità in soluzione fisiologica delle NPs

4.5.5. Studi di mucoadesione

Lo studio delle proprietà mucoadesive è di estrema importanza per la ritenzione delle nanoparticelle al sito di applicazione. Dalle analisi effettuate tramite Dynamic Light Scattering, è stato possibile misurare le dimensioni delle NPs in seguito alla loro interazione con la mucina.

Tipo di NPs	Dimensioni iniziali (nm)	Dimensioni finali (nm)
CH ₁₈ /SC ₉	387 ± 5	491 ± 7
CH ₃₆ /SC ₉	402 ± 10	561 ± 10

Tabella 9

Come si può vedere in tabella 9, è stato osservato un aumento del diametro medio delle NPs di oltre 100 nm rispetto alle NPs iniziali. Tale fenomeno indica una avvenuta interazione con le molecole di mucina mediante legami di Van der Waals, interazioni idrofobiche e legami ad idrogeno. In particolare, in soluzione fisiologica, si stabilisce un'interazione ionica tra i gruppi carichi positivamente del Chitosano (pKa=6.3) e i gruppi carichi negativamente dell'acido sialico (pKa=2.6), presente nella mucina.

4.5.6. Studi di rilascio *in-vitro*

La figura 22 mostra il confronto tra la cinetica di rilascio delle NPs selezionate e una soluzione controllo di farmaco. La presenza di

un eccesso di Chitosano nelle NPs sembra favorire un maggior rilascio del farmaco nel tempo, probabilmente a causa della presenza di un maggiore contenuto di cariche positive libere in grado di richiamare/trattenere acqua all'interno della struttura nanoparticellare e di favorire il rilascio del farmaco.

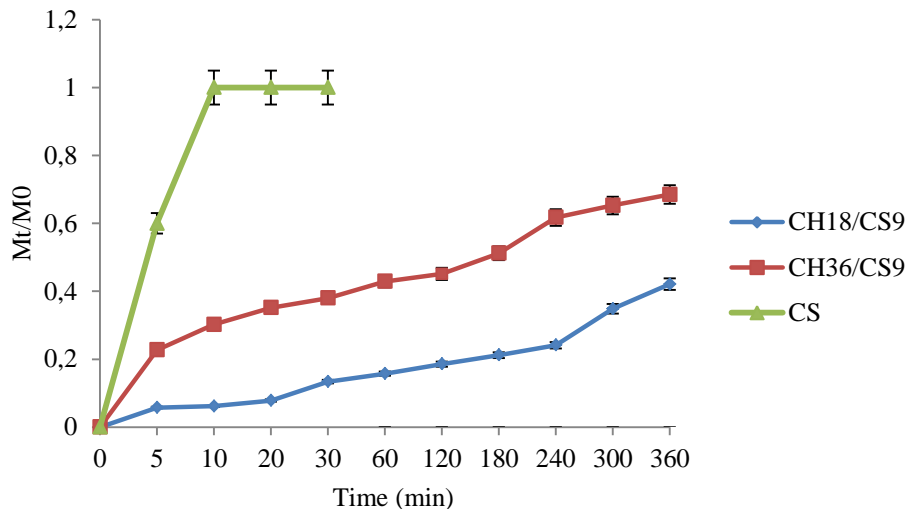


Figura 22. Cinetiche di rilascio

4.5.7. Studi di permeazione *in-vitro*

In figura 23 sono riportati i risultati relativi allo studio di permeazione, effettuato attraverso l'uso di celle di Franz termostatate a 37°C. È stata valutata la quantità di farmaco permeata nel tempo dopo applicazione delle due preparazioni nanoparticellari selezionate e di una soluzione acquosa di farmaco sulla mucosa nasale di pecora. Come si può vedere, dopo 4 ore la soluzione di farmaco mostra una permeazione quasi completa, mentre le NPs sembrano modulare la permeazione del farmaco. Questo comportamento è influenzato dal rilascio del farmaco dalle

NPs e, probabilmente, dalla capacità del Chitosano di interagire con la mucosa. Il Chitosano, infatti, interagendo con la mucina, è in grado di trattenere la formulazione per più tempo a livello della mucosa.

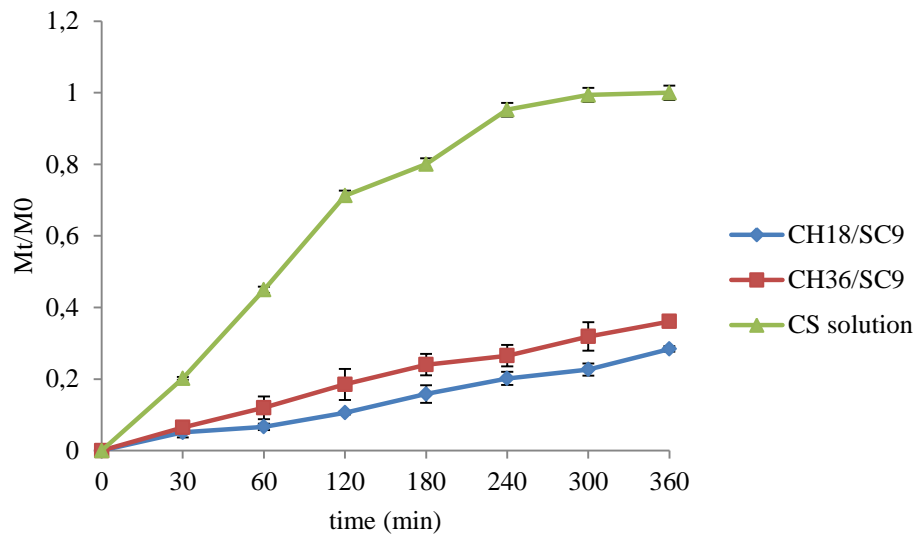


Figura 23. Cinetiche di permeazione

È stato effettuato uno studio per valutare la quantità di farmaco nei diversi compartimenti della cella di Franz (donatore e ricevente) e nella mucosa dopo 3 e 6 ore dalla deposizione. Come si può vedere dai risultati riportati in figura 24, sia dopo 3 ore che dopo 6 ore, le NPs favoriscono la presenza di un maggiore contenuto di Sodio Cromoglicato nella mucosa rispetto alla soluzione di farmaco. La presenza di un alto contenuto di farmaco all'interno della mucosa potrebbe garantire una migliore interazione del farmaco con i mastociti presenti all'interno della mucosa nasale.

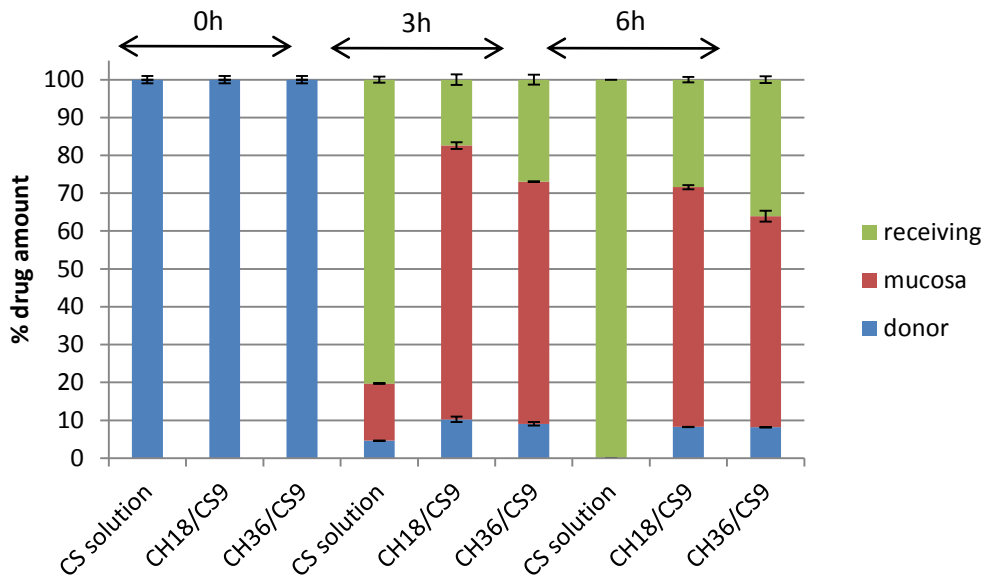


Figura 24

4.6. Conclusioni

In questo progetto il Chitosano e il Sodio Cromoglicato sono stati utilizzati al fine di ottenere formulazioni nanoparticellari per il trattamento della rinite allergica. Le nanoparticelle sono state preparate partendo da diversi rapporti molari e diverse quantità di Chitosano e farmaco. Tutte le nanoparticelle ottenute hanno mostrato delle dimensioni nanometriche e buoni valori di indice di polidispersione. Nello specifico, due formulazioni ($\text{CH}_{18}/\text{SC}_9$ e $\text{CH}_{36}/\text{SC}_9$) sono state selezionate per le loro interessanti caratteristiche in termini di resa e sono state testate al fine di valutare le loro proprietà chimico-fisiche e funzionali. Le nanoparticelle $\text{CH}_{18}/\text{SC}_9$ e $\text{CH}_{36}/\text{SC}_9$ sono risultate essere stabili sia in acqua che in soluzione fisiologica fino a 24h, hanno presentato un potenziale zeta positivo e buone proprietà in termini di caricamento, efficienza di incapsulazione e mucoadesione. Infine, le NPs favoriscono la presenza di un maggiore contenuto di Sodio Cromoglicato nella mucosa nasale di pecora, potenzialmente utile nel garantire una migliore interazione del farmaco con i mastociti presenti all'interno della mucosa nasale.

5

ANALISI QUANTITATIVA DI BUDESONIDE AMORFA TRAMITE CALORIMETRIA A SCANSIONE DIFFERENZIALE

5.1. Introduzione

La Budesonide ($16\alpha,17\alpha$ -butilenediossi- $11\beta,21$ -diidrossipregna- $1,4$ -diene- $3,20$ -dione) è un glucocorticoide sintetico, non alogenato, la cui struttura è correlata al 16α -idrossiprednisolone. È un farmaco usato in prevalenza per via inalatoria, nella prevenzione e nel trattamento delle crisi asmatiche. Viene anche utilizzato nel trattamento della rinite allergica e delle poliposi nasali. La Budesonide per somministrazione inalatoria è commercializzata come sospensione acquosa oppure come polvere secca. Ad oggi, la Budesonide è conosciuta allo stato solido in una forma cristallina e nella forma amorfa. Lo studio del polimorfismo farmaceutico è di estrema importanza e attualità sia a causa della brevettabilità delle nuove forme cristalline sia per l'influenza che la struttura solida ha sulle caratteristiche chimico-fisiche della sostanza e, di conseguenza, sulla sua biodisponibilità

all'interno dell'organismo. Risulta perciò sempre più importante sviluppare metodiche quali-quantitative che permettano di analizzare i principi attivi nella loro forma solida. A tale scopo, è stato sviluppato un nuovo metodo quantitativo allo stato solido basato sulla Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC) in grado di quantificare in modo selettivo e accurato la quantità di Budesonide amorfa presente in una miscela solida. La forma amorfa, infatti, alla temperatura di circa 117°C converte nella forma cristallina, rivelando in DSC un picco esotermico di cristallizzazione la cui entalpia è direttamente correlata alla percentuale (p/p) di Budesonide amorfa nella miscela. Inoltre, l'entalpia di fusione della forma cristallina (257°C) è stata utilizzata alla stregua di uno "standard interno" in quanto, essendo correlata sia alla percentuale di forma cristallina che di quella amorfa convertita, rappresenta la totalità della Budesonide della miscela solida.

5.2. Il polimorfismo farmaceutico

Il polimorfismo è la capacità di un materiale solido di esistere in più forme o strutture cristalline. Walter McCrone sosteneva che "ogni composto ha diverse forme polimorfiche, e che il numero di forme note per un dato composto è proporzionale al tempo e al denaro speso nella ricerca su quel composto"⁹⁵. Si definisce *cristallino* un solido in cui una determinata struttura primaria (cella elementare) si ripete a lungo raggio in modo ordinato e periodico. Se, invece, l'ordine molecolare è assente o limitato a un

numero molto piccolo di molecole, il solido risultante è definito *amorfo*. È inoltre possibile che alcuni composti formino cristalli con molecole di solvente (*solvati*), più comunemente con l'acqua (*idrati*)⁹⁶. L'importanza del fenomeno del polimorfismo sta nelle differenze tra le proprietà chimico-fisiche di forme cristalline e solvate di una stessa sostanza (tabella 10).

Proprietà	Differenze
Fisiche e termodinamiche	Densità, indice di rifrazione, conduttività termica ed elettrica, igroscopicità, punto di fusione, energia libera, capacità termica, pressione di vapore, stabilità termica
Spettroscopiche	Proprietà elettroniche, vibrazionali e rotazionali
Cinetiche	Solubilità cinetica e termodinamica
Di superficie	Energia libera di superficie, abito cristallino, area superficiale, bagnabilità
Meccaniche	Durezza, compressibilità, espansione termica, miscelabilità, scorrevolezza
Chimiche	Reattività chimica e fotochimica, reattività allo stato solido

Tabella 10

Lo studio del polimorfismo è estremamente importante nello sviluppo di ingredienti farmaceutici attivi (API). Molti farmaci, infatti, ricevono l'autorizzazione all'immissione in commercio soltanto per una determinata forma cristallina (o polimorfo). La maggior parte dei principi attivi farmaceutici è somministrata per via orale sotto forma solida e la loro velocità di dissoluzione è strettamente correlata alla loro forma cristallina. A causa delle

differenze di solubilità tra polimorfi, un polimorfo può essere terapeuticamente più attivo di un altro. Nel caso del farmaco antivirale Ritonavir, un polimorfo noto era praticamente inattivo rispetto alla forma cristallina commercializzata. Successivamente, è stato scoperto che il polimorfo attivo convertiva in quello inattivo per semplice contatto con esso, grazie alla sua maggiore stabilità e alla sua minore energia che rendevano la conversione energeticamente favorita e spontanea. Un granello di polimorfo a minore energia era in grado di convertire grandi lotti di Ritonavir nel polimorfo inattivo, causando gravi problemi in fase di produzione⁹⁷. La polvere di paracetamolo, aveva uno scarso grado di comprimibilità che portava a notevoli difficoltà durante la produzione di compresse. Per ovviare a tale problema, è stato trovato un nuovo polimorfo di paracetamolo più comprimibile. L'acetato di cortisone esiste in almeno cinque diversi polimorfi, quattro dei quali sono instabili in acqua e convertono nell'unica forma stabile. Tutti questi esempi mettono in evidenza l'importanza di studiare il polimorfismo farmaceutico e la necessità di mettere a punto metodi quantitativi in grado di determinare la presenza di più polimorfi all'interno di campioni polverosi.

5.3. Analisi quantitativa di polimorfi

L'analisi quantitativa di polimorfi riguarda principalmente il controllo delle impurezze polimorfiche che possono crearsi durante tutti i processi che portano dalla sintesi del principio

attivo puro al prodotto commerciale. Essa accompagna l'ottimizzazione e lo *scale-up* delle sintesi, gli studi di stabilità alla temperatura e all'umidità relativa, gli studi di compatibilità tra principio attivo ed eccipienti fino ai processi di confezionamento e stoccaggio.

Ad oggi, le principali tecniche utilizzate per le analisi quantitative di polveri farmaceutiche sono la diffrazione di raggi X su polveri, tramite la posizione e l'intensità dei picchi di diffrazione, la calorimetria a scansione differenziale, grazie alle differenze tra i punti di fusione dei polimorfi, la spettroscopia infrarossa e Raman, che riescono a distinguere i polimorfi tramite bande dovute ad interazioni intermolecolari, e la risonanza magnetica nucleare allo stato solido.

A differenza delle analisi liquide, in cui è possibile separare i singoli componenti di una soluzione tramite cromatografia, l'analisi solida non conosce tecniche separative e richiede, pertanto, la caratterizzazione preventiva di tutti i componenti che possono interferire con la quantificazione dell'analita. La principale difficoltà dell'analisi quantitativa allo stato solido è la preparazione di miscele standard per la costruzione della retta di calibrazione e la convalida del metodo analitico. Teoricamente, in una miscela standard ideale, ogni particella di ciascun componente si trova il più vicino possibile ad una particella degli altri componenti (B, Fig. 25). Il grado di miscelazione raggiunto dovrebbe essere tale che ogni campione prelevato contenga la corretta quantità di ogni componente (miscela perfetta). In termini statistici, però, le miscele "perfette" sono in realtà miscele

“random”. In pratica, la distribuzione C (Fig. 25) è la migliore che un processo di miscelazione è in grado di produrre. Se anche B fosse miscelato, si otterrebbe un risultato simile a C. Analiticamente parlando, il grado di miscelazione è meno impattante in tecniche che prevedono la misurazioni di grandi quantità di polvere (XRPD), mentre diventa via via più importante per quelle tecniche che richiedono quantità minime di campione (DSC). Pertanto, per quanto possa essere efficiente un processo di miscelazione a livello macroscopico, esso è tuttavia influenzato da molteplici fattori (quali la dimensione delle particelle, la densità, la forma e le caratteristiche superficiali delle due polveri) che possono favorire o sfavorire il processo stesso di miscelazione. Tali fattori, non essendo direttamente e facilmente controllabili, fanno sì che ogni miscela fisica di polveri debba essere considerata “microscopicamente disomogenea”.

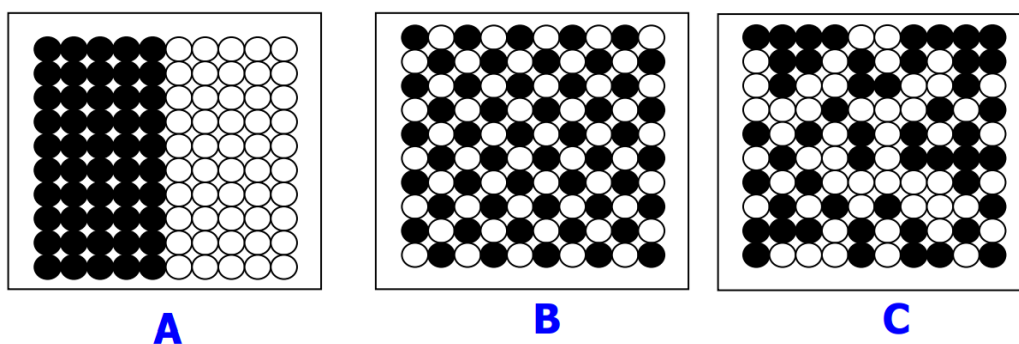


Figura 25

Un altro aspetto fondamentale da tenere in considerazione durante la messa a punto di un metodo analitico è la stabilità dei polimorfi alle condizioni di preparazione e misura. Infatti, molti

polimorfi possono convertire in forme cristalline più stabili quando vengono a contatto con altri componenti o solventi (fase di miscelazione) o in particolari condizioni di temperatura e umidità relativa (misura strumentale).

Anche la tecnica strumentale di misura può influire sulla convalida del metodo analitico. Analisi non distruttive (XRPD, FT-IR, FT-Raman) consentono di effettuare più misure su uno stesso campione, al contrario delle tecniche distruttive (DSC).

La caratterizzazione chimico-fisica dell'analita e di tutti i componenti del campione è quindi uno step fondamentale per la scelta della tecnica strumentale da utilizzare e per lo sviluppo e la convalida del metodo analitico.

5.4. Parte sperimentale

5.4.1. Materiali

La Budesonide ($C_{25}H_{34}O_6$, PM= 430.534 g/mol), l'etanolo 95% e l'acqua deionizzata sono stati acquistati presso la Sigma-Aldrich Co-LLC (Milano, Italy).

5.4.2. Preparazione della Budesonide amorfa

La Budesonide amorfa è stata preparata tramite spray drying utilizzando un Buchi Mini Spray Dryer B-290 a partire da una soluzione all'1%(p/v) di Budesonide cristallina contenente il 95% (v/v) di etanolo e 5% (v/v) di acqua deionizzata. Le condizioni strumentali applicate sono state le seguenti: temperatura di inlet 78°C, pompa peristaltica 15%, flusso d'aria 30, aspirazione 85%. La temperatura di outlet era 40°C⁹⁸.

5.4.3. Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

Le misure calorimetriche sono state condotte utilizzando il calorimetro a scansione differenziale DSC 200 F3 Maia (NETZSCH, Germania) dotato di intra-cooler. Le polveri sono state analizzate in atmosfera di N_2 nel range di temperatura compreso tra 80-300°C, utilizzando una velocità di riscaldamento di 10°C/min.

5.4.4. Diffrazione di raggi X su polveri (XRPD)

I diffrattogrammi sono stati ottenuti utilizzando un diffrattometro Panalytical X'Pert Pro dotato di X'Celerator, CuK α e portacampioni in vetro. I tubi di voltaggio e amperaggio sono stati impostati rispettivamente a 40 KV e 40 mA. Il programma utilizzato per la raccolta dati è stato impostato per registrare punti compresi nel range 3-40 °2 θ .

5.4.5. Spettroscopia infrarossa (FT-IR)

Il mapping delle polveri è stato effettuato tramite microscopia FT-IR in riflessione utilizzando un microscopio FT-IR Thermo Scientific Nicolet iN10MX con detector in mercurio, cadmio e tellurio (MCT). Ogni spettro è il risultato della media di 32 scansioni con una risoluzione di 8 cm⁻¹ in un range dello spettro compreso fra 4000 e 675 cm⁻¹ in riflettanza diffusa. L'area analizzata era di 1 mm² con uno step size di 25 μ m.

5.4.6. Analisi termogravimetrica (TGA)

Le analisi termogravimetriche sono state effettuate utilizzando il termogravimetro Mettler Toledo STARE System. Le polveri sono state analizzate in atmosfera di N₂ nel range di temperatura compreso tra 80-500°C, utilizzando una velocità di riscaldamento di 10°C/min.

5.4.7. Preparazione delle miscele standard

Le miscele standard sono state preparate all'interno di crogioli di alluminio (NETZSCH 100-DSC) e pesate con la bilancia analitica Mettler Toledo XP105DR. Al termine delle pesate ciascun pan è stato saldato ermeticamente con un coperchio di alluminio mediante una pressa e la parte superiore del pan è stata forata mediante un apposito ago.

5.4.8. Linearità

Miscela standard contenenti Budesonide amorfa e cristallina, sono state misurate tramite DSC. La retta di calibrazione è stata costruita considerando la percentuale di amorfo contro il rapporto tra l'area del picco di cristallizzazione dell'amorfo e l'area del picco di fusione.

5.4.9. Precisione

La ripetibilità intra-day è stata calcolata costruendo tre rette di calibrazione nello stesso giorno, mentre la precisione intermedia (o ripetibilità inter-day) è stata ottenuta costruendo 3 rette in tre giorni differenti. Entrambe sono state espresse come valori di deviazione standard relativa percentuale (RSD%) delle pendenze delle tre rette.

5.4.10. Accuratezza

L'accuratezza è stata valutata mediante saggi di recupero. Sono state analizzate tre miscele standard nello stesso giorno ed è stato calcolato il Recupero %.

5.4.11. LOD e LOQ

I valori del limite di quantificazione (LOQ) e del limite di rivelabilità (LOD) sono stati determinati utilizzando le seguenti formule:

$$LOD = 3.3 \delta / S \qquad LOQ = 10 \delta / S$$

dove δ corrisponde alla deviazione standard della risposta strumentale e S rappresenta la pendenza della retta di calibrazione.

5.5. Risultati e discussione

5.5.1. DSC

Il termogramma della Budesonide cristallina (Fig. 26) mostra un picco endotermico con onset a 256.5°C e area uguale a 96.03 J/g, relativo alla fusione del composto. Il termogramma della Budesonide amorfa (Fig. 26) presenta un picco esotermico di ricristallizzazione con onset a 116.5°C e con area di -31,47 J/g, seguito dal picco endotermico di fusione con onset a 256.3°C. Il picco esotermico di ricristallizzazione è preceduto da una transizione vetrosa con onset a 90.0°C.

In una miscela di Budesonide cristallina e amorfa, il picco esotermico di cristallizzazione è dovuto alla presenza della fase amorfa ed è direttamente proporzionale alla sua quantità nella miscela. L'entalpia di fusione endotermica, invece, rappresenta la totalità della Budesonide in quanto, dopo la cristallizzazione, la componente amorfa è convertita in cristallino. Di conseguenza, per lo sviluppo del metodo quantitativo di una miscela amorfo-cristallino, è stato scelto di utilizzare il rapporto tra l'entalpia di cristallizzazione e l'entalpia di fusione. L'impiego dell'area di fusione al dividendo permette di minimizzare gli errori relativi a pesate non accurate del campione (spesso inferiore ai 5 mg) e alla taratura dello strumento. Dal rapporto si ricava un numero puro che è funzione della percentuale di amorfo presente in miscela.

Sono state effettuate analisi di Budesonide amorfa utilizzando pan di alluminio ermeticamente chiusi. Queste analisi non mostravano il fenomeno esotermico di ricristallizzazione, probabilmente a causa della pressione che si veniva a creare all'interno del crogiolo. Le analisi in DSC sono state quindi condotte a pan forato. Sono state valutate diverse velocità di scansione (2, 5, 10, 25, 50°K/min) al fine di ottimizzare la risposta del segnale mantenendo tempi di analisi brevi. I migliori risultati sono stati ottenuti scaldando i campioni a 10 k/min.

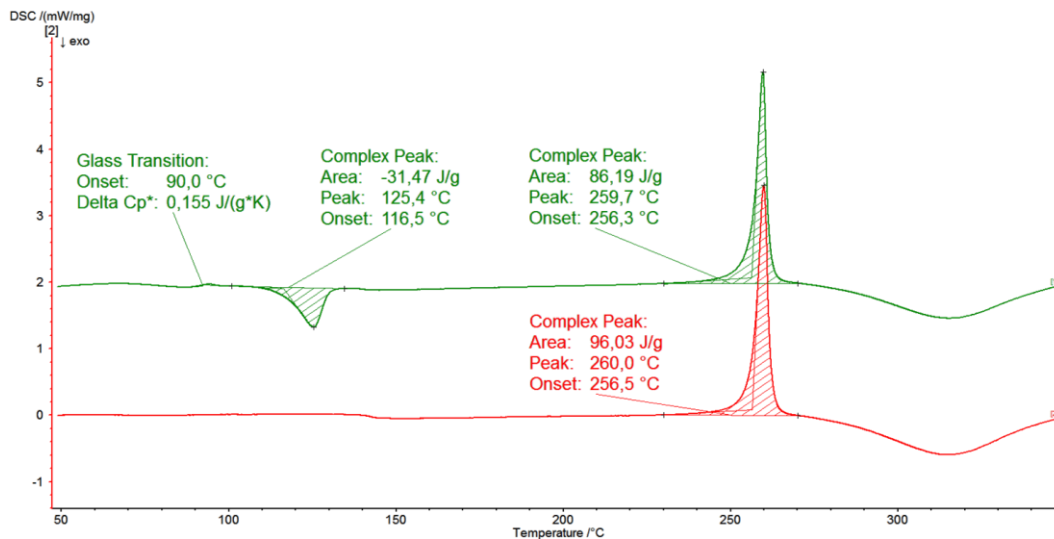


Figura 26

5.5.2. XRPD

Budesonide amorfa e cristallina sono state inizialmente caratterizzate mediante diffrazione di raggi X su polveri al fine di raccogliere i loro pattern di diffrazione. Un campione di Budesonide amorfa è stato scaldato alla temperatura di 118°C all'interno di una stufa per circa 10 minuti per verificare la sua forma cristallina dopo il picco esotermico individuato tramite analisi DSC. L'analisi XRPD ha confermato la completa conversione della forma amorfa in forma cristallina (Fig. 27).

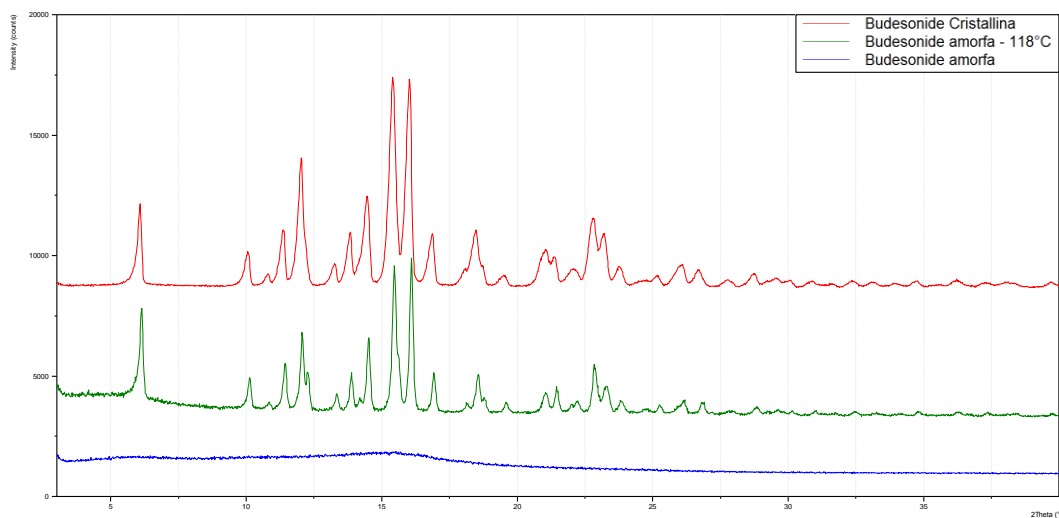


Figura 27

5.5.3. TGA

L'analisi termogravimetriche della Budesonide amorfa e cristallina non hanno evidenziato perdite di massa prima della degradazione. L'assenza di acqua e/o solventi di cristallizzazione o di imbibizione all'interno di un campione solido facilita l'analisi quantitativa in DSC per alcuni motivi fondamentali: l'evaporazione di questi solventi genera picchi endotermici molto intensi che potrebbero interferire con i picchi utili all'analisi quantitativa, sovrapponendosi ad essi e rendendoli difficilmente integrabili. In particolare, quelli di cristallizzazione possono indurre ad una trasformazione solido-solido generando in DSC picchi endotermici o esotermici a seconda del meccanismo di trasformazione. L'analisi termogravimetrica fornisce importanti informazioni riguardo la temperatura di degradazione del composto. Molto spesso la fusione di un composto cristallino è concomitante con la sua degradazione. Questo si traduce in segnali DSC sovrapposti, difficilmente integrabili e poco utili all'analisi quantitativa.

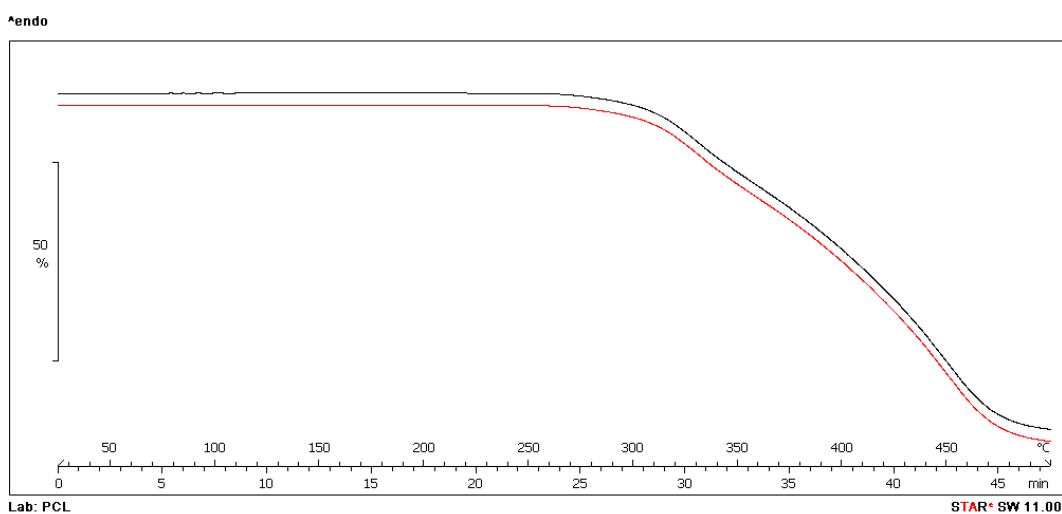


Figura 28. TGA di Budesonide amorfa (nero) e cristallina (rosso).

5.5.4. Preparazione delle miscele standard

Al fine di valutare l'omogeneità di una miscela di polveri a livello microscopico, è stata preparata una miscela (50/50, p/p) introducendo all'interno di un vial 1 g di Budesonide amorfa e 1 g di Budesonide cristallina e miscelandola energicamente tramite Grinder Retsch MM200 per 20 min a 30 Hz. La miscela è stata poi analizzata mediante mapping FT-IR in riflessione considerando un'area di 1 mm². Precedentemente, le due forme sono state misurate separatamente ed i loro spettri FT-IR sono stati utilizzati per la valutazione della loro distribuzione sulla superficie mappata. L'analisi ha dimostrato come, nell'area analizzata, le forme cristallina e amorfa avessero una distribuzione non uniforme e non conforme alla miscela voluta (Fig. 29). In particolare, la sezione mostrava una composizione pari a circa il 70% (w/w) di forma cristallina e il 30% di forma amorfa (Fig. 30).

Questa discrepanza tra la composizione teorica della miscela e la composizione reale di una piccola parte della stessa miscela diventa di estrema importanza nel caso di analisi quantitative effettuate tramite DSC, in cui vengono utilizzate quantità di campione inferiori ai 5 mg. E' evidente, quindi, che un prelievo da miscele solide così preparate non può essere considerato rappresentativo della miscela madre. Al fine di evitare questo tipo di problema nella costruzione di un metodo quantitativo, è stata scelta di preparare le miscele standard direttamente all'interno dei crogioli di alluminio e di analizzarle nella loro interezza. In tal

modo è stato possibile preparare miscele con proporzioni esatte di cristallino e amorfo, eliminando i problemi relativi alla disomogeneità delle miscele solide.

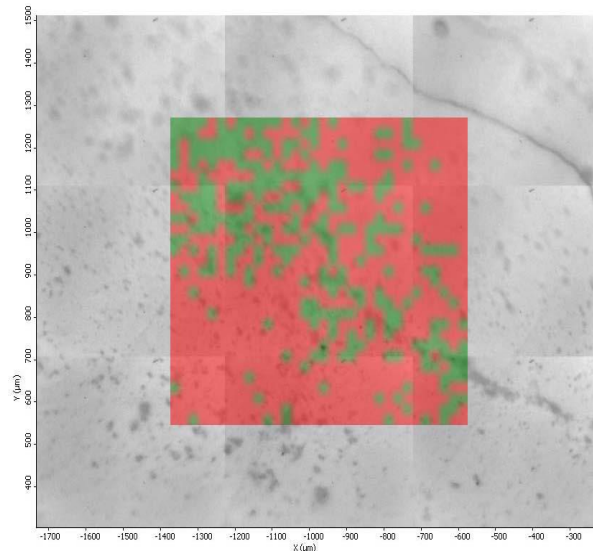


Figura 29. Mapping FT-IR

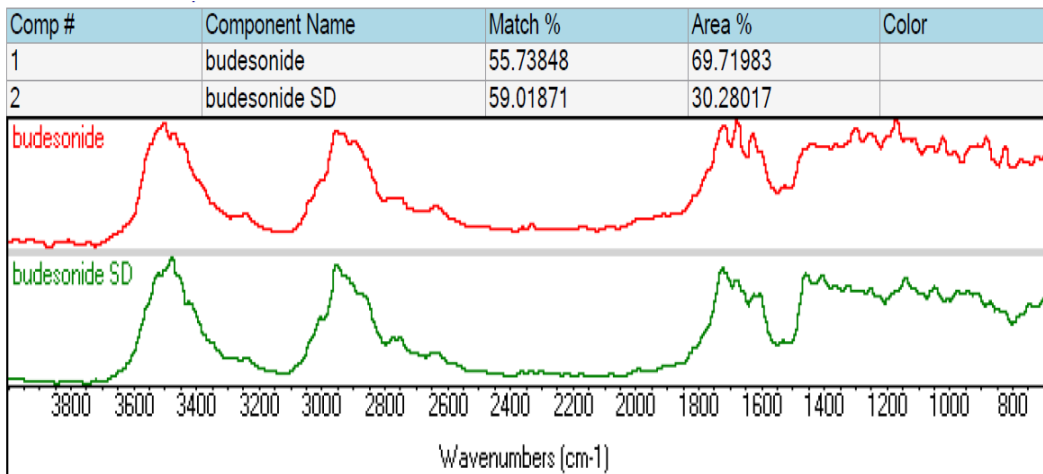


Figura 30

5.5.5. Curva di calibrazione

La curva di calibrazione, costruita misurando interamente 18 miscele standard, presenta una buona linearità ($R^2=0,9944$) nel range di composizione compreso fra 3.10% e 100% di amorfo.

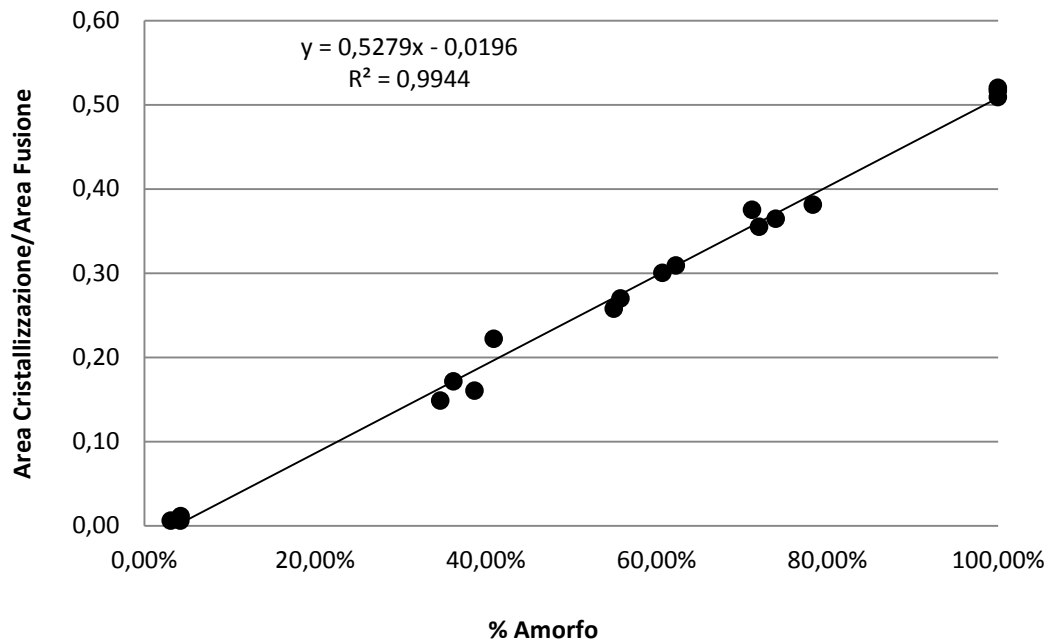


Figura 31. Curva di calibrazione

5.5.6. Precisione

La Conferenza internazionale sull'armonizzazione dei requisiti tecnici per la registrazione di prodotti farmaceutici ad uso umano ha stabilito, nelle linee guida⁹⁹ sulla convalida dei metodi analitici, che la precisione di un metodo venga calcolata come la deviazione standard relativa di almeno tre repliche per ogni concentrazione. Di conseguenza, la preparazione di miscele direttamente nei crogioli, associata ad un'analisi distruttiva, porta con sé l'impossibilità di replicare ogni misura. Per ovviare a tale problema, è stato scelto di calcolare la precisione del metodo costruendo tre diverse rette di calibrazione e calcolando la deviazione standard relativa delle loro pendenze (*slope*). I risultati sono stati soddisfacenti, con valori di R.S.D. di 0,75% per la ripetibilità intra-day e di 0,85% per la precisione intermedia.

	Slope	Intercept	R2	Average (Slope)	SD (Slope)	RSD (Slope)
Rep 1	0,5288	-0,0226	0,9926			
Rep 2	0,5325	-0,0232	0,9977	0,5286	0,0040	0,75%
Rep 3	0,5246	-0,0143	0,9938			

Tabella 11. Ripetibilità

	Slope	Intercept	R2	Average (Slope)	SD (Slope)	RSD (Slope)
Day 1	0,5242	-0,0202	0,9883			
Day 2	0,5323	-0,0250	0,9968	0,5271	0,0045	0,85%
Day 3	0,5248	-0,0263	0,9898			

Tabella 12. Precisione intermedia

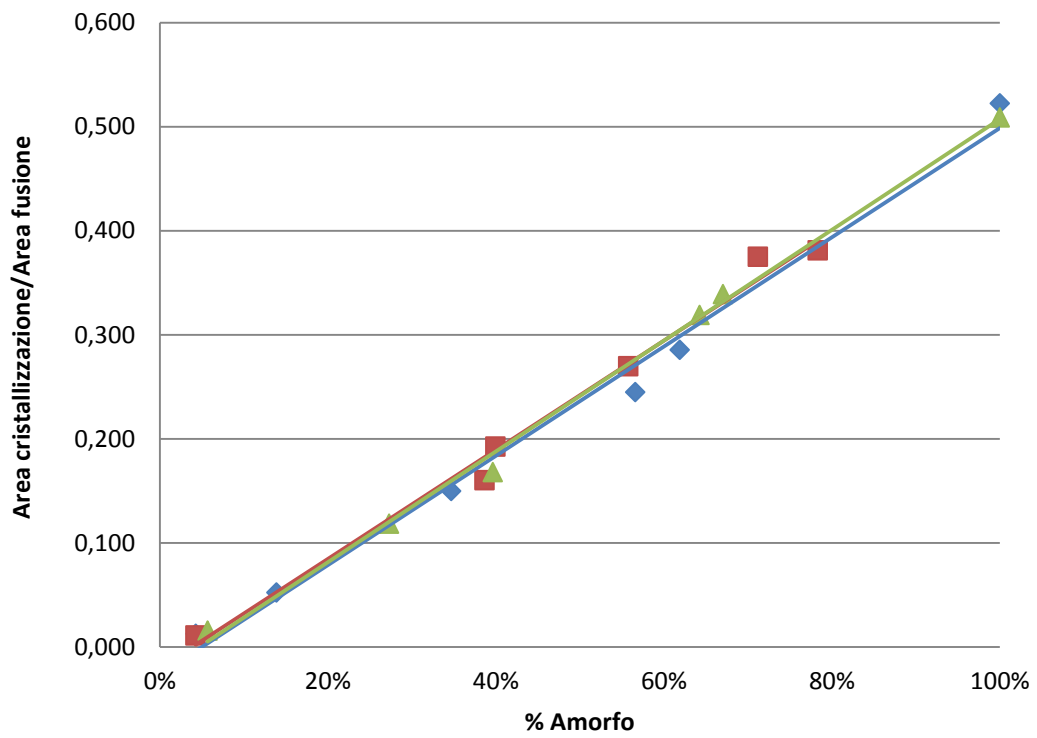


Figura 32

5.5.7. Accuratezza

L'accuratezza è stata misurata su 3 miscele standard di Budesonide amorfa e cristallino ottenendo buoni valori di recupero percentuale, sempre inferiori al 107%.

	Am (mg)	Cry (mg)	% Am	Cry Area	Melting Area	Ratio	% Am (Found)	Recovery %
MIX1	1,96	1,15	63,02%	25,02	78,34	0,32	64,21%	101,89
MIX2	2,13	2,16	49,65%	20,31	83,30	0,24	49,90%	100,50
MIX3	0,35	1,32	20,96%	8,04	81,51	0,10	22,39%	106,84

Tabella 13. Accuratezza

5.5.8. LOD e LOQ

Il LOD e il LOQ sono stati calcolati sulla base della deviazione standard della risposta strumentale, misurata su sei campioni di amorfo. I valori ottenuti di LOD e LOQ erano rispettivamente 1,03% e 3,13%.

5.6. Conclusioni

Lo studio condotto ha preso in considerazione ed ha approfondito problematiche peculiari dell'analisi quantitativa allo stato solido, quali l'omogeneità delle miscele solide di polveri e la convalida del metodo analitico. Nel corso della messa a punto del metodo è stato risolto il problema della "disomogeneità microscopica" delle miscele solide preparando le miscele direttamente all'interno dei crogioli di misura e analizzandole nella loro interezza. Conseguentemente, sono stati proposti metodi alternativi per la valutazione della ripetibilità e della precisione intermedia confrontando le pendenze di diverse rette di calibrazione costruite nello stesso giorno e in giorni diversi.

L'analisi quantitativa tramite DSC, che solitamente sfrutta le differenze tra i punti di fusione dei polimorfi, ha mostrato aspetti di grande originalità. Essa, infatti, prende in considerazione un fenomeno proprio della Budesonide amorfa, ovvero la sua conversione esotermica in forma cristallina. Sono stati ottenuti buoni risultati in termini di linearità, precisione ed accuratezza e la tecnica, che non richiede strumentazione particolarmente costosa, è risultata essere semplice e rapida.

BIBLIOGRAFIA

-
- 1 B. Saladini, F. Bigucci, T. Cerchiara, M. C. Gallucci, B. Luppi, Microparticles based on chitosan/pectin polyelectrolyte complexes for nasal delivery of tacrine hydrochloride, *Drug delivery and translational research* 3 (2013) 33 – 41. *Reproduced with permission. License Number: 3345970070104 (2014) Springer ©*
 - 2 M. E. Bodor Brewster, Problems of delivery of drug to the brain, *Pharmac. Ther.* 19 (1983) 337-386
 - 3 X. Lataste, The Blood-Brain Barrier in Hypoxia, *Int. J. Sports Med.* 13 (1992) 45-47
 - 4 C. L. Graff, R. Zhao, G. M. Pollack, Pharmacokinetics of substrate uptake and distribution in murine brain after nainstillation. *Pharm Res.* 22 (2005) 235-244
 - 5 V. D. Romeo, J. Meireles, A. P. Sileno, H. K. Pimplaskar, C. R. Behl, Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal delivery, *Adv Drug Deliv Rev* 29 (1998) 89-116
 - 6 A. K. Leonard, A. P. Sileno, G. C. Brandt, C. A. Foerder, S. C. Quay, H. R. Costantino, In vitro formulation optimization of intranasal galantamine leading to enhanced bioavailability and reduced emetic response in vivo. *Int J Pharm* 335 (2007) 138-146
 - 7 H. R. Costantino, L. Illum, G. Brandt, P. H. Johnson, S. C. Quay, Intranasal delivery: Physicochemical and therapeutic aspects, *Int. J. Pharm.* 337 (2007) 1-24
 - 8 H. R. Costantino, A. K. Leonard, G. Brandt, P. H. Johnson, S. C. Quay, Intranasal administration of acetylcholinesteraseinhibitors, *BMC Neurosci.* 9 (2008) S3-S6
 - 9 C. Shoshkes Reiss, I. V. Plakhov, T. Komatsu, Viral replication in olfactory receptor neurons and entry into the olfactory bulb and brain, *Ann NY Acad Sci.* 855 (1998) 751-761

-
- 10 H. H. Chow, N. Anavy, A. Villalobos, Direct Nose-Brain Transport of benzoylecgonine following intranasal administration in rats, *J Pharm Sci.* 90 (2001) 1729-1735
 - 11 C. Dufes, J. C. Olivier, F. Gaillard, A. Gaillard, W. Couet, J. M. Muller, Brain delivery of vasoactive intestinal peptide (VIP) following nasal administration to rats, *Int J Pharm* 255 (2003) 87-97
 - 12 Q. Z. Zhang, X. G. Jiang, C. H. Wu, Distribution of nimodipine in brain following intranasal administration in rats, *Acta Pharmacol Sin* 25 (2004) 522-527
 - 13 K. P. Doyle, T. Yang, N. S. Lessov, T. M. Ciesielski, S. L. Stevens, R. P. Simon, J. S. King, M. P. Stenzel-Poore, Nasal administration of osteopontin peptide mimetics confers neuroprotection in stroke, *J Cereb Blood Flow Metab* 28 (2008) 1235-1248
 - 14 V.V. Jogani, P. J. Shah, P. Mishra, A. K. Mishra, A. R. Misra, Nose -to-brain delivery of tacrine, *J Pharm Pharmacol* 59 (2007) 1199-1205
 - 15 V. V. Jogani, P. J. Shah, P. Mishra, A. K. Mishra, A. R. Misra, Intranasal mucoadhesive microemulsion of tacrine to improve brain targeting, *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 22 (2008) 116-124
 - 16 R. Hashizume, T. Ozawa, S. M. Gryaznov, A. W. Bollen, K. R. Lamborn, W. H. Frey 2nd, D. F. Deen, New therapeutic approach for brain tumors: Intranasal delivery of telomerase inhibitor GRN163, *Neuro Oncol.* 10 (2008) 112-120
 - 17 T. Sakane, S. Yamashita, N. Yata, H. Sezaki, Transnasal delivery of 5-fluorouracil to the brain in the rat, *J. Drug Target* 7 (1999) 233-240
 - 18 N. S. Barakat, S. A. Omar, A. A. Ahmed, Carbamazepine uptake into rat brain following intra-olfactory transport, *J. Pharm. Pharmacol.* 58 (2006) 63-72
 - 19 U. Westin, E. Piras, B. Jansson, U. Bergström, M. Dahlin, E. Brittebo, E. Björk, Transfer of morphine along the olfactory pathway to the central nervous system after nasal administration to rodents, *Eur. J. Pharm. Sci.* 24 (2005) 565-573
 - 20 K. Yamada, M. Hasegawa, S. Kametani, S. Ito, Nose-to-brain delivery of TS-002, prostaglandin D2 analogue, *J. Drug. Target* 15 (2007) 59-66

-
- 21 L. Illum, Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11 (2000) 1-18
 - 22 Y. W. Chien, K. S. E. Su, Chang, Anatomy and physiology of the nose, In: Swarbrick, J, (eds.), *Nasal systemic drug delivery; Drugs and pharmaceutical science*, v. 39, Marcel Dekker, New York, 1989, pp, 1-19
 - 23 V. Jogani, Recent patents review on intranasal administration for CNS drug delivery. *Recent Patents on Drug Delivery e Formulation* 2 (2008) 25-40
 - 24 L. Illum, Transport of drug from the nasal cavity to central nervous system, *Eur. J. Pharm. Sci.* 11 (2000) 1-18
 - 25 L. Illum, Nasal drug delivery – possibilities, problem and solutions, *J. Control. Rel.* 87 (2003) 187-198
 - 26 L. Illum, P. Watts, A. N. Fisher, M. Hinchcliffe, H. Norbury, I. Jabbal-Gill, R., Nankervis, S. S. Daviss, Intranasal delivery of morphine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301 (2002) 391-400
 - 27 A. Anwar Hussain, Intranasal drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews* 29 (1998) 39-49
 - 28 R. G. Thorne, Delivery of Neurotrophic Factors to the brain: Pharmacokinetic consideration, *Clinical Pharmacokinetics* 40(12) (2001) 907-946
 - 29 H. Chow, Z. Chen, G.T. Matsuura, Direct transport of cocaine from the nasal cavity to brain following intranasal cocaine administration in rats, *J. Pharm. Sci.* 88 (1999) 754-758
 - 30 H. L. Fehm, B. Perras, R. Smolink, W. Kern, J. Born, Manipulating neuropeptidergic pathways in humans: A novel approach in neuropharmacology? *Eur. J. Pharmacol.* 405 (2000) 43-54
 - 31 C. R. Behl, H. K. Pimplaskar, A. P. Sileno, J. Demeireles, V. D. Remo, Effect of physiochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 29 a (1998) 89-116
 - 32 M. I. Lethem, The role of trachealbronchial mucus in drug administration to the airway, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 11 (1993) 19-27

-
- 33 M. I. Ugwoke, R. U. Agu, N. Verbeke, R. Kinget, Nasal mucoadhesive drug delivery: Background, applications, trends and future perspectives, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1640-1665
 - 34 N. Washington, Determination of baseline human pH and the effect of intranasally administered buffers, *Int. J. Pharm.* 198 (2000) 139-146
 - 35 K. Morimoto, H. Tabata, K. Morisaka, Nasal absorption of nifedipine from gel preparations in rats, *Chem. Pharm. Bull.* 35 (1987) 3041-3044
 - 36 F. W. Merkus, Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery, *Adv Drug Deliv Rev.* 29(1-2) (1998) 13-38
 - 37 E. Marttin, G. M. Nicolass, J. Schipper, C. Verhoef, F.WH. M. Merkus, Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 29 (1998) 13-38
 - 38 M. N. Zaki, G. A. Awad, N. D. Mortada, S. S. Abd ElHady, Enhanced bioavailability of metoclopramide HCl by intranasal administration of a mucoadhesive in situ gel with modulated rheological and mucociliary transport properties, *Eur. J. Pharm. Sci.* 32 (2007) 296-307
 - 39 F. Y. Chung, M. D. Donovan, Nasal pre-systemic metabolism of peptide drugs: substance P metabolism in the sheep nasal cavity, *Int. J. Pharm.* 128 (1996) 229-237
 - 40 R. Alan, Nasal Cavity Enzymes Involved in Xenobiotic Metabolism: Effects on the Toxicity of Inhalants, *Critical Reviews in Toxicology* (1991) Volume 21, issue 5
 - 41 M.A. Sarkar, Drug metabolism in nasal mucosa, *Pharm. Res.* 9 (1992) 1-9
 - 42 A. Bernkop-schnurch, Use of inhibitory agents to overcome the enzymatic barrier to perorally administered therapeutic peptides and proteins, *J. Control. Rel.* 52 (1998) 1-16
 - 43 C. R. Behl, H. K. Pimplaskar, A. P. Sileno, J. Demeireles, V. D. Remo, Effect of physiochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 29 a (1998) 89-116
 - 44 F. Y. Chung, M. D. Donovan, Large molecule and particulate uptake in nasal cavity: the effect of size on nasal absorption, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 29 (1998) 147-155

-
- 45 T. Ohwaki, M. Ishii, S. Aoki, K. Tatsushi, M. Kayano, Effect of dose, pH and osmolarity on nasal absorption of secretin in rats III: in vivo membrane permeation test and determination of apparent partition coefficient of secretin, *Chem. Pharm. Bull.* 37 (1989) 3359-3362
 - 46 D. C. Corbo, J. C. Liu, Y. W. Chien, Characterization of the barrier properties of mucosal membrane, *J. Pharm. Sci.* 79 (1990) 202-206
 - 47 T. J. Aspden, L. Illum, Ø. Skaugrud, Chitosan as a nasal delivery system: evaluation of insulin absorption enhancement and effect on nasal membrane integrity using rat models, *Eur. J. Pharm. Sci.* 4 (1996) 23-31
 - 48 S. G. Chandler, N. W. Thomas, L. Illum, Nasal absorption in the rat. IV. Membrane activity of absorption enhancer, *Int. J. Pharm.* 117(1995) 139-146
 - 49 M.A. Deli, Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery, *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (2009) 892-910
 - 50 F. G. Gu, F. D. Cui, Y. D. Gao, Preparation of prostaglandin E1-hydroxypropyl-cyclodextrin complex and its nasal delivery in rats, *Int. J. Pharm.* 290 (2005) 101-108
 - 51 N. G. M. Schipper, J. C. Verhoef, S. G. Romeijn, F. W. H. M. Merkus, Methylated β -cyclodextrins are able to improve the nasal absorption of salmon calcitonin, *Calcif. Tissue Int.* 56 (1995) 280-282
 - 52 A. P. Sayani, Y. W. Chien, Systemic delivery of peptides and proteins across absorptive mucosae, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 13 (1996) 85-184
 - 53 R. P. Ramesh, C. Mahesh, O. Patil, Nasal Drug delivery in Pharmaceutical and biotechnology: present and future, *e-Journal of Science & Technology* 3 (2009) 1-21
 - 54 S. A. Sajadi Tabassi, H. Hosseinzadeh, M. Ramezani, E. Moghimipour, S. A. Mohajeri, Isolation, characterization and study of enhancing effects on nasal absorption of insulin in rat of the total saponin from *Acanthophyllum squarrosum*, *Indian J Pharmacol* 39 (2007) 226-30

-
- 55 K. Ikeda, K. Murata, M. Kobayashi, K. Noda, Enhancement of bioavailability of dopamine via nasal route in beagle dogs *Chem. Pharm. Bull.* 40 (1992) 2155-2158
- 56 M. J. Deurloo, W. A. Hermens, S. G. Romeyn, J. C. Verhoef, F. W. Merkus, Absorption enhancement of intranasally administered insulin by sodium taurodihydrofusidate (STDHF) in rabbits and rats, *Pharm Res.* 6(10) (1989) 853-6
- 57 Z. Shao, A. K. Mitra, Nasal Membrane and Intracellular Protein and Enzyme Release by Bile Salts and Bile Salt-Fatty Acid Mixed Micelles: Correlation with Facilitated Drug Transport, *Pharmaceutical Research* 9(9) (1992) 1184-1189
- 58 T. Tugrul, Kararli, E. Thomas, D, A. Baron, R. E. Schmidt, B. Katz and B. Belonio, Enhancement of Nasal Delivery of a Renin Inhibitor in the Rat Using Emulsion Formulations, *Pharmaceutical Research.* 9(8) (1992) 1024-1028
- 59 T. Loftsson, P. Jarho, M. Másson, T. Järvinen, Cyclodextrins in drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2(2) (2005) 335-351
- 60 D. Duchene, G. Ponchel, D. Wouessidjewe, Cyclodextrins in targeting. Application to nanoparticles, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36 (1999) 29-40
- 61 F. W. Merkus, J. C. Verhoef, S. G. Romeijn, N. G. Schipper, Absorption enhancing effect of cyclodextrins on intranasally administered insulin in rats, *Pharm Res.* 8(5) (1991) 588-92
- 62 F. J. McInnes, B. O'Mahony, B. Lindsay, Nasal residence of insulin containing lyophilised nasal insert formulations, using gamma scintigraphy, *Eur J Pharm Sci* 31 (2007) 25-31
- 63 F. J. McInnes, A. J. Baillie, H. N.E. Stevens, The use of simple dynamic mucosal models and confocal microscopy for the evaluation of lyophilised nasal formulations, *J Pharm Pharmacol* 59 (2007) 759-67
- 64 F. J. McInnes, P. Thapa, A. J. Baillie, In vivo evaluation of nicotine lyophilised nasal insert in sheep, *Int J Pharm* 304(1-2) (2005) 72-82
- 65 P. Thapa, H. N. E. Stevens, A. J. Baillie, In vitro drug release studies from a novel lyophilised nasal dosage form, *Kathmandu Univ J Sci Eng Technol* 5 (2009) 71-86

-
- 66 U. Bertram, M. C. Bernard, J. Haensler, In situ gelling nasal inserts for influenza vaccine delivery, *Drug Dev Ind Pharm*, (2009)
- 67 U. Bertram, R. Bodmeier, In situ gelling, bioadhesive nasal inserts for extended drug delivery: in-vitro characterization of a new nasal dosage form, *Eur J Pharm Sci* 27(1) (2006) 62-71
- 68 B. Luppi, F. Bigucci, L. Mercolini, Novel mucoadhesive nasal inserts based on chitosan/hyaluronate polyelectrolyte complexes for peptide and protein delivery, *J Pharm Pharmacol* 61(2) (2009) 151-7
- 69 B. Luppi, Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes for nasal delivery of antipsychotic drugs, 9th International Conference of the European Chitin Society; Venice; (2009)
- 70 E. Björk, U. Issksson, P. Edman, P. Artursson, Starch microspheres induce pulsatile delivery of drugs and peptides across the epithelial barrier by reversible separation of the tight junctions., *J. Drug Target.* 2 (1995) 501-507
- 71 M. Rathananand, D. S. Kumar, A. Shirwaikar, R. Kumar, D. Sampath Kumar, R. S. Prasad, Preparation of mucoadhesive microspheres for nasal delivery by spray drying, *Indian J Pharm Sci* 69 (2007) 651-7
- 72 S. B. Patil, A. Kaul, A. Babbar, R. Mathur, A. Mishra, K. K. Sawant, In vivo evaluation of alginate microspheres of carvedilol for nasal delivery, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 100B (2012) 249–255
- 73 L. Illum, N. F. Farraj, S. S. Davis, B. R. Johansen, D. T. O' Hagan, Investigation of the nasal absorption of biosynthetic human growth hormone in sheep-use of a bioadhesive microspheres delivery system, *Int. J. Pharm.* 63 (1990) 207-211
- 74 S.S.D. Critchley, D. Farraj, L. Illum, Nasal absorption of desmopressin in rats and in sheep. Effect of bioadhesive microspheres delivery system, *J. Pharm. Pharmacol.* 46 (1994) 651-656
- 75 *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, P. Colombo. *Mucosal Drug Delivery, Nasal*. Editor: Edith Mathiowitz. ISBN: 0-471-14828-8
- 76 A. Mistry, S. Stolnik, L. Illum, Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs, *Int. J. Pharm.* 379 (2009) 146–157

-
- 77 A. M. Dyer, M. Hinchcliffe, P. Watts, J. Castile, I. Jabbal-Gill, R. Nankervis, A. Smith, L. Illum, Nasal delivery of insulin using novel chitosan based formulations: A comparative study in two animal models between simple chitosan formulations and chitosan nanoparticles, *Pharm. Res.* 19 (2002) 998–1008
- 78 U. Seju, A. Kumar, K. K. Sawant, Development and evaluation of olanzapine-loaded PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: in-vitro and in vivo studies, *Acta Biomater.* 7(12) (2011) 4169-76
- 79 D. Lichtenberg, Y. Barenholz, In *Methods of Biological Analysis*, Vol. 33, D. Glick, ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, (1988) pp. 337-461
- 80 H. Talsma, M. J. van Steenberg, J. C. Borchert, D. J. Crommelin, A novel technique for the one-step preparation of liposomes and nonionic surfactant vesicles without the use of organic solvents. Liposome formation in a continuous gas stream: the 'bubble' method, *J Pharm Sci.* 83(3) (1994) 276-80
- 81 Y. Maitani, S. Asano, S. Takahashi, M. Nasayuki, T. Nagai, Permeability of insulin in liposomes through the nasal mucosa of rabbits, *Chem Pharm Bull* 40 (1992) 1569–1572
- 82 S. L. Law, K. J. Huang, H. Y. Chou, J. Y. Cherng, Enhancement of nasal absorption of calcitonin loaded in liposomes, *J Liposome Res* 11 (2001) 165–174
- 83 Editoriale, How much is dementia care worth?, *The Lancet Neurology*, (2010)
- 84 Cutler NR, Sedman AJ, Prior P, Underwood BA, Selen A, Balogh L, Kinkel AW, Gracon SI, Gamzu ER. Steady-state pharmacokinetics of tacrine in patients with Alzheimer's disease. *Psychopharmacol Bull.* (1990)
- 85 Hartvig P, Askmark H, Aquilonius SM, Wiklund L, Lindström B. Clinical pharmacokinetics of intravenous and oral 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine, tacrine. *Eur J Clin Pharmacol.* (1990)
- 86 Bigucci F, Luppi B, Cerchiara T, Sorrenti M, Bettinetti G, Rodriguez L, Zecchi V., Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin *Eur J Pharm Sci.* 2008; 35(5):435-41

-
- 87 May, J.R.; Smith, P.H.. "Allergic Rhinitis". In DiPiro, J.T.; Talbert, R.L.; Yee, G.C.; Matzke, G.; Wells, B.; Posey, L.M. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach* (7th ed.). New York: McGraw-Hill. pp. 1565–75
- 88 Sur DK, Scandale S. "Treatment of allergic rhinitis". *Am Fam Physician* 81 (2010), 1440–6
- 89 Valet RS, Fahrenholz JM, "Allergic rhinitis: update on diagnosis". *Consultant* (2009) 49: 610–3
- 90 Tiñana A.M., Bloebaum R.M., Grant J.A. "Managing Allergic Rhinitis: The Role of Pharmacotherapy". *Drug Benefit Trends*. (2009) 2: 312-318
- 91 Okuda M., MD; Ohnishi M, MD; Ohtsuka H., MD. "The effects of Cromolyn sodium on the nasal mast cells". *Annals of allergy*. (1985) 721-723
- 92 Katzung B.G. "Farmacologia generale e clinica". Piccin-nuova libreria, (2011)
- 93 Mohanraj V.J., Chen J. Nanoparticles: a Review. *J Pharmaceutical Research*, June (2006), 5 (1): 561-573
- 94 C.R.M. De Lima, M.R. Pereira, J.L.C. Fonseca. "Equilibrium and kinetic aspects of sodium cromoglycate adsorption on chitosan: Mass uptake and surface charging considerations". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 109 (2013) 52– 58.
- 95 W. C. McCrone, in *Physics and Chemistry of the Organic Solid State*, eds. D. Fox, M. M. Labes and A. Weissberger, Interscience Publishers, London, 1965, vol. 2, pp. 725-767
- 96 V.Cavrini, V. Andrisano, "Principi di analisi farmaceutica", Esculapio (2013)
- 97 Bauer J, et al.. "Ritonavir: An Extraordinary Example of Conformational Polymorphism". (2004) *Pharmaceutical Research* 18 (6) 859–866
- 98 L.Tajber, D.O. Corrigan, O.I. Corrigan, A.M. Healy. "Spray drying of Budesonide, formoterol fumarate and their composites-I. Physicochemical characterization", *International Journal of Pharmaceutics*, (2008)
- 99 International Conference on Harmonisation, Q2(R1), "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology", (2005)