

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Fisica e Astronomia

Corso di Laurea Triennale in Ottica e Optometria

Tesi di Laurea

Tamarindus indica: proprietà e applicazioni nel
trattamento del discomfort all'uso delle lenti a contatto
e nell'occhio secco marginale

Tamarindus indica: properties and applications in
Contact Lens Discomfort (CLD) and marginal dry eye
syndrome

Relatore: prof. Pietro Gheller

Laureanda: Marina Passeri
Matricola 1045071

Anno Accademico 2015/2016

Indice

Introduzione	Pag.	1
Capitolo 1 – Generalità del Tamarindus indica	>>	3
1.1. Epidemiologia del Tamarindus indica	>>	3
1.2. Habitat del Tamarindus indica	>>	3
1.3. Descrizione botanica e costituenti chimici del Tamarindus indica	>>	4
Capitolo 2 – Le applicazioni del Tamarindus indica in farmacologia	>>	9
2.1. La fitoterapia	>>	9
2.2. Proprietà farmacologiche e impiego terapeutico del Tamarindus indica	>>	11
Capitolo 3 – Il TSP, Tamarind Seed Polysaccharide	>>	15
3.1. Composizione del TSP	>>	15
3.2. Isolamento e valutazione della purezza del TSP	>>	19
3.3. Analisi tossicologica del TSP	>>	19
Capitolo 4 – Applicazioni del TSP nella formulazione di nuove lenti a contatto	>>	21
4.1. Inserimento del TSP nella matrice polimerica della lente	>>	21

Capitolo 5 – Applicazioni del TSP in oftalmologia	>>	25
5.1. Potenzialità del TSP nelle formulazioni ad uso oftalmico	>>	25
5.2. Utilizzo del TSP nel trattamento delle lesioni oculari	>>	26
5.3. Applicazione del TSP nella protezione dai raggi UV-B	>>	27
5.4. Utilizzo del TSP come veicolo in sistemi di somministrazione topica di antibiotici a rilascio prolungato	>>	31
Capitolo 6 – Applicazione di sostituti lacrimali a base di TSP nel trattamento dell’occhio secco marginale	>>	35
6.1. La patologia dell’occhio secco marginale	>>	35
6.2. L’importanza della mucoadesione nei sostituti lacrimali	>>	37
6.3. Performance e tollerabilità dei sostituti lacrimali a base di TSP	>>	38
6.4. Sinergia tra TSP e HA, formazione di un innovativo copolimero	>>	43
6.5. Efficacia del TSP nel trattamento del discomfort all’uso delle lenti a contatto	>>	45
Valutazioni conclusive	>>	49
Bibliografia	>>	51
Sitografia	>>	57

Introduzione

Ho sempre ritenuto il campo della contattologia di notevole interesse e ho guardato con curiosità al mondo dei sostituti lacrimali.

Le statistiche mostrano che i soggetti che soffrono di discomfort a causa dell'occhio secco marginale, che può essere aggravato ulteriormente dal porto di lenti a contatto, sono in aumento; i dati derivanti dai più importanti studi americani, il WHS e il PHS, mostrano che 3.2 milioni di donne e 1.6 milioni di uomini di età maggiore ai 50 anni, soffre di occhio secco di media o grave entità (Dry Eye Workshop 2007). Per affrontare questo problema sono stati in passato usati molti metodi, che comportavano però l'utilizzo di sostanze farmacologiche. Ritenendo opportuno, quando possibile, utilizzare prodotti naturali fitoterapici, ho deciso di approfondire in questo elaborato il trattamento delle problematiche sopraesposte, legandolo ai prodotti naturali che sono oggi a disposizione sul mercato. Tra essi ho scelto di trattare i prodotti ad uso oftalmico che contengono estratti e principi attivi (TSP) provenienti dal *Tamarindus indica*, perché nuovi ed innovativi.

La possibilità di risolvere il discomfort derivante da una condizione di occhio secco, per i portatori di lenti a contatto, ma anche per i non portatori, è un obiettivo attuale che sempre più aziende e professionisti si prefiggono, convinti che il suo raggiungimento possa permettere una qualità della vita migliore e una riduzione dei drop outs dei portatori di lenti a contatto.

Le terapie oftalmiche possono essere sia di tipo topico che sistemico, tuttavia la più comune via di somministrazione dei farmaci oftalmici è quella topica, perché

conveniente, non invasiva e accessibile a tutti i pazienti. Saper scegliere in modo accurato il giusto sostituto lacrimale è dunque fondamentale.

Il presente lavoro si articola in sei capitoli.

Nel primo capitolo vengono fornite le indicazioni generali riguardanti l'habitat e le nozioni prettamente botaniche del *Tamarindus indica*.

Il secondo capitolo fornisce un'indicazione delle proprietà terapeutiche possedute dalle diverse parti del *Tamarindus indica*, che sono quindi sfruttate nell'industria farmaceutica.

Il terzo capitolo è interamente dedicato al TSP (Tamarind Seed Polysaccharide), un polisaccaride ramificato mucomimetico, mucoadesivo e bioadesivo, estratto dai semi del *Tamarandus indica*, che rappresenta l'eccipiente comune di tutte le formulazioni oftalmiche prese in esame nei capitoli successivi.

Il quarto capitolo è infatti completamente dedicato alla trattazione di una innovativa tipologia di lenti a contatto contenenti TSP e HA nella matrice polimerica, il cui scopo è fornire un approccio tecnico scientifico ai problemi oramai evidenti di occhio secco che insorgono con il porto delle lenti stesse.

Il capitolo successivo prende in esame gli studi che nel corso degli anni sono stati effettuati per quanto concerne l'uso del TSP in formulazioni ad uso oftalmico, ed in particolare riguardanti il suo impiego come eccipiente in sistemi di somministrazione topica a rilascio prolungato, come polisaccaride capace di fornire protezione dai raggi UV-B ed incrementare il tasso di guarigione delle ferite oculari.

Infine il sesto capitolo, dopo un breve excursus riguardante la sindrome dell'occhio secco marginale, è dedicato all'analisi delle proprietà che rendono l'applicazione di sostituti lacrimali a base di TSP una valida proposta per il trattamento di tale sindrome.

Capitolo 1

Generalità del *Tamarindus indica*

1.1. Epidemiologia del *Tamarindus indica*

Tamarindus, dall'arabo *tamar* = dattero ed *endi* = indiano, cioè dattero indiano. Questo perché le silique hanno aspetto simile ad un dattero o ad un dito (*dactylus*) e perché Mesuè ed altri medici arabi, fino al 1600, hanno erroneamente creduto che fosse il frutto di una palma (Benigni, Capra e Cattorini).

È invece un albero tropicale, appartiene alla sottofamiglia delle *Caesalpinioideae*, famiglia delle *Leguminosae* (*Fabaceae*) (Santosh Singh Bhadoriya et al., 2011).

1.2. Habitat del *Tamarindus indica*

Pianta originaria dell'Africa e dell'Asia tropicale, sebbene secondo alcuni questa pianta non sarebbe spontanea in Asia ma acclimata, coltivata da tempi remoti (Benigni, Capra e Cattorini). È proprio nelle zone aride del centro e sud dell'Asia che il Tamarindo cresce abbondantemente ed il suo frutto, quando maturo, viene esportato fresco, essiccato ed anche in forma di pasta, in più di sessanta paesi.

Oltre che in Africa e in Asia il Tamarindo si può trovare in Pakistan, Bangladesh, Nigeria e in molti paesi tropicali, dove viene impiegato in medicina tradizionale, oltre che come elemento importante nell'industria alimentare.

Questa pianta preferisce aree semi aride e praterie erbose, tuttavia cresce in un'ampia varietà di terreni e condizioni climatiche, trovandosi in zone boschive a

bassa altitudine ma anche nella savana e nelle foreste, spesso associata a termitai, e lungo torrenti o rive di fiumi (Orwa et al., 2009).

L'elevata estensione delle sue radici permette al Tamarindo di resistere alla siccità e una lunga stagione secca è necessaria affinché la pianta dia frutti.

Limiti biofisici: Altitudine: 0-1500 metri; temperatura annuale media: 20-33°C; precipitazioni annuali medie: 350-2700 mm.

1.3. Descrizione botanica e costituenti chimici del *Tamarindus indica*

Il *Tamarindus Indica* è una pianta sempreverde a crescita lenta, ha uno sviluppo di circa 60 centimetri l'anno e può raggiungere i 25 metri di altezza (Benigni, Capra e Cattorini) (Figura 1.1). Il tronco, con una corteccia ruvida marrone-grigiastra, può superare i 7 metri di circonferenza. Le foglie pennato-composte, lunghe fino a 15 centimetri, sono composte da 10-18 paia di foglioline lunghe tra i 12 e i 32 millimetri ed aventi un'appena accennata forma oblunga, l'apice leggermente dentellato, una nervatura centrale e una venatura più o meno marcata da entrambi i lati.



Figura 1.1 – *Tamarindus indica* L.,

(tratto dalla pagina web: www.ntbg.org/plants/imageonly.php?rid=838&plantid=10971).

I fiori sono riuniti in infiorescenze di circa 20 centimetri di lunghezza. I boccioli sono di un color rosato, completamente racchiusi da due bratteole che cadono molto presto quando il fiore si apre (Singh Bhadoriya et al., 2011). I fiori sono costituiti da quattro sepali e cinque petali; tre petali superiori sono ben sviluppati, di un color giallo tenue con venature rossastre, mentre i due situati inferiormente rimangono più minuti, filiformi e solo appena visibili (Figura 1.2).

La fioritura generalmente si verifica nello stesso periodo in cui avviene la crescita di nuove foglie, che nella maggior parte delle aree avviene durante primavera ed estate. I fiori ermafroditi sono probabilmente impollinati dalle api che raccolgono nettare e polline, benché non si abbiano informazioni specifiche riguardo ciò.



Figura 1.2 – Fiore del *Tamarindus indica*,

(tratto dalla pagina web:

www.kew.org/science-conservation/plants-fungi/tamarindus-indica-tamarind).

Il *Tamarindus indica* comincia a produrre frutti all'età di 7-10 anni e la rendita dei baccelli si stabilizza intorno ai 15 anni; rimane poi produttivo fino ad età avanzata, rendendo fino a 150 kg per albero all'anno.

I frutti a baccello, indeiscenti e di color marrone-rossastro, hanno una forma pressoché cilindrica, sono lunghi 5-10 centimetri e presentano estremità arrotondate. I baccelli, molto nutrienti, maturano circa 10 mesi dopo la fioritura (Sahoo Soumendra et al; 2010) e possono rimanere attaccati all'albero fino a fioritura successiva, se non raccolti. Il guscio del baccello è fragile ed i semi sono immersi in una polpa appiccicosa e commestibile. La superficie esterna della

polpa è percorsa, dalla base fino all'apice del baccello, da tre tenaci fibre (Figura 1.3). Al fine di mantenere inalterate le sue proprietà nutritive è bene che la polpa sia conservata in luoghi freschi e in recipienti in legno, non di ferro o rame (Campanini, 2003). Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) il frutto del Tamarindo è una fonte ideale per tutti gli amminoacidi, eccetto il triptofano; la polpa del frutto è ricca di acido tartarico 5.3-8.8%, acido citrico 4-6%, bitartrato di potassio 4.7-6% e tracce di acido malico. Contiene inoltre zuccheri, in media 20-35%, destrosio, levulosio, pectine e proteine.



Figura 1.3 – Baccello e semi del Tamarindo indica,

(tratto dalla pagina web:

www.tramil.net/fototeca/imageDisplay.php?id_elem=344&famil=FABACEAE&lang=en).

Ogni frutto contiene da 3 a 10 semi, lunghi approssimativamente 1.6 centimetri, di forma irregolare, aspetto lucido e liscio (Singh Bhadoriya et al., 2011). Sono inoltre duri, di colore rosso tendente al marrone violaceo, non sono arillati ed il lato appiattito di ogni seme è caratterizzato da una piccola depressione centrale.

Il singolo seme comprende un rivestimento, o testa, che costituisce il 20-30% del seme stesso, e un nocciolo, o endosperma, che rappresenta il restante 70-80%. Il seme del *Tamarindus indica* è la materia prima fondamentale per la produzione di TSP, un polisaccaride estratto dal seme stesso, e di tannino. Oggigiorno sta inoltre guadagnando importanza anche come fonte alternativa di proteine e aminoacidi essenziali, soprattutto nei paesi dove vi sono evidenti problemi di malnutrizione.

È stato infatti riportato che l'intero seme di Tamarindo contiene 131.3 g/kg di

proteine grezze (principalmente albumine e globuline), 67.1g/kg di fibre grezze, 48.2 g/kg di grassi, 56.2 g/kg tannino e che la maggior parte dei carboidrati si trova sotto forma di zuccheri.

Dal nocciolo dei semi del tamarindo viene estratto un olio di colore giallo-oro; questo si trova in commercio come olio semi-essiccato e per certi aspetti ricorda l'olio di arachidi. I maggior acidi grassi che lo compongono sono l'acido palmitico, oleico, linoleico ed eicosenoico. Il nocciolo è inoltre ricco di fosforo (68.4-165 mg/100g), potassio (273610 mg/100 g) e magnesio (17-118 mg/100 g) (Sahoo Soumendra at al; 2010).

Tabella I – Valori nutrizionali per 100 g di Tamarindus indica,

fonte: USDA National Nutrient data base,

(tratto dalla pagina web: <http://www.nutrition-and-you.com/tamarind.html>).

Principle	Nutrient Value	Percentage of RDA
Energy	239 Kcal	12%
Carbohydrates	62.50 g	40%
Protein	2.80 g	5%
Total Fat	0.60 g	3%
Cholesterol	0 mg	0%
Dietary Fiber	5.1 g	13%
Vitamins		
Folates	14 µg	3.5%
Niacin	1.938 mg	12%
Pantothenic acid	0.143 mg	3%
Pyridoxine	0.066 mg	5%
Thiamin	0.428 mg	36%
Vitamin A	30 IU	1%
Vitamin C	3.5 mg	6%
Vitamin E	0.10 mg	<1%
Vitamin K	2.8 µg	2%
Electrolytes		
Sodium	28 mg	2%
Potassium	628 mg	13%
Minerals		
Calcium	74 mg	7%
Copper	0.86 mg	9.5%
Iron	2.80 mg	35%
Magnesium	92 mg	23%
Phosphorus	113 mg	16%
Selenium	1.3 µg	2%
Zinc	0.10 mg	1%
Phyto-nutrients		
Carotene-β	18 µg	--
Crypto-xanthin-β	0 µg	--
Lutein-zeaxanthin	0 µg	--

Capitolo 2

Le applicazioni del Tamarindi indica L. in farmacologia

2.1. La fitoterapia

“La fitoterapia, o terapia delle piante, è la scienza che si occupa dell’impiego di medicinali vegetali per la cura delle malattie umane” (Weiss, 1996) e si distingue per l’utilizzo di estratti e prodotti derivanti da piante medicinali che contengono più principi attivi.

Solamente quando sono stati introdotti i primi principi attivi vegetali isolati allo stato puro, ed è stata possibile la loro sintesi chimica e modificazione per migliorarne le caratteristiche farmacologiche, farmacocinetiche o tossicologiche, si sono ottenuti farmaci molto potenti in sostituzione delle primitive medicine vegetali. A tutt’oggi, comunque, circa il 40% dei farmaci monomolecolari moderni deriva direttamente o indirettamente ancora dalle piante (Giachetti, Monti, 2005).

Anche la fitoterapia si è però evoluta con il tempo, e numerose indagini sono state condotte allo scopo di individuare prodotti erboristici utili a fornire un approccio terapeutico complementare ed alternativo alle medicine tradizionali (Oteri, 2007); questa costituisce infatti la più popolare pratica medica fra tutte le terapie complementari ed in molti paesi si assiste ad un continuo aumento di tale pratica. Per tale motivo proprio l’industria farmaceutica fitoterapica ha fatto negli ultimi anni grandi progressi soprattutto in materia di standardizzazione e

stabilizzazione. Alcuni preparati vegetali sono registrati secondo le norme vigenti del settore farmaceutico; nella maggioranza dei casi tuttavia, in assenza di prove cliniche, l'esperienza empirica maturata nel lungo periodo può essere considerata come testimonianza accettabile della loro utilità in medicina. I prodotti vegetali di questa seconda fascia, che sono destinati alla cura di indicazioni minori, sono regolamentati in base a norme stabilite dalle Direttiva 2004/24/EC del 31 marzo 2004, pubblicata sulla Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee (Giachetti, Monti, 2005).

Data la composizione delle preparazioni vegetali, costituita da una pluralità di composti strutturalmente anche molto differenti, la loro azione è polivalente ed il loro profilo farmacologico e terapeutico è caratterizzato da una molteplicità di effetti distinti fra loro, che possono comparire a dosi diverse. Va però tenuto presente che anche i fitoterapici leggeri, se assunti per lunghi periodi, possono palesare effetti collaterali (Weiss, 1996) e la loro regolamentazione diviene quindi fondamentale.

Ciò che rende difficoltoso lo studio di un fitocomplesso è la variabilità della sua composizione chimica. Esemplari di diversa origine, pur essendo della stessa specie vegetale, possono avere composizione chimica quantitativamente e qualitativamente differente, perché varianti nelle caratteristiche ambientali locali possono influire sul loro metabolismo secondario. Anche i processi di lavorazione che le piante medicinali subiscono dopo la raccolta o la mietitura, ed i tempi che intercorrono tra le diverse operazioni (essiccamento, fumigazione, interventi contro parassiti, ecc.), possono influire sulla composizione chimica delle stesse. In aggiunta questa non è uniforme in tutte le parti che compongono la pianta e varia durante la crescita della stessa. Quindi, l'esatto momento di raccolta/mietitura, chiamato tempo balsamico, riveste un'importanza fondamentale nel determinare la costanza di composizione fra i componenti di una stessa specie vegetale (Giachetti, Monti, 2005). Bisogna infine considerare i processi adottati per ottenere le varie preparazioni. Questi sono sostanzialmente di frazionamento, cioè mirano a concentrare nella preparazione i composti ritenuti utili e ad escludere quelli invece ritenuti inutili. È quindi evidente che la natura di questi processi

costituisca una fonte primaria di diversificazione nella composizione chimica dei preparati fitoterapici.

Le piante medicinali utilizzate per il trattamento delle malattie oculari sono piuttosto numerose, comprendono Camomilla, Eufrasia, Ginkgo, Mirtillo, Amamelide, Tamarindo, Berberis, Malva e molte altre. Tuttavia, per le problematiche sopra esposte, soltanto alcune di esse sono state studiate con rigore scientifico da un punto di vista sperimentale e clinico (Oteri, 2007). Proprio la variabilità della composizione chimica e, conseguentemente, dell'attività biologica delle sostanze vegetali, ne costituiscono il maggiore ostacolo per lo studio e l'applicazione terapeutica. Poiché quindi i risultati delle singole sperimentazioni sono riferibili solo alla specifica preparazione sottoposta ad indagine (Giachetti, Monti, 2005), l'interpretazione delle proprietà farmacologiche, tossicologiche e cliniche di una pianta è quasi sempre incerta.

2.2. Proprietà farmacologiche e impiego terapeutico

Il Tamarindo era noto nei paesi quali l'India sin dai tempi più remoti e di esso si trova menzione nei Veda indiani sotto varie denominazioni. Furono poi gli Arabi a diffonderlo in Europa e gli dettero il nome di Tamara hindi. Notizie più sicure provengono dal medico persiano Alhervi (IX secolo), il quale paragonò l'azione lassativa del Tamarindo a quello della Prugna siriana, dai medici della scuola salernitana, da Paracelso ed da Mattioli, anch'essi ne conoscevano le proprietà lassative.

Già in passato la polpa dei suoi frutti era usata in medicina tradizionale. Questa veniva purificata immergendola in acqua distillata bollente e quindi passata con un setaccio di crine. Il liquido veniva poi concentrato fino a trarne un estratto molle; si otteneva così una massa nerastra di sapore decisamente acido, che determinava un effetto lassativo se somministrata alla dose di 20-40 grammi, o purgativo se somministrata invece alla dose di 60-100 grammi (Benigni, Capra e Cantorini). In India il Tamarindo è usato ancora oggi come colorante e per la concia del tabacco ed alle sue foglie vengono attribuite anche proprietà

antielmintiche. Come edulcorante acidulo, viene impiegato nella tecnica galenica per la correzione del sapore di alcuni preparati.

Oggigiorno sono diverse le proprietà che si conoscono del *Tamarindus indica* relative ai suoi effetti sulla salute, e quindi diversi i trattamenti per cui è utilizzato:

- Effetto lassativo: *T. indica* è usato come lassativo nella medicina tradizionale per il suo contenuto di acido malico, acido tartarico e di potassio;
- Trattamento diarrea, costipazione e dolori addominali: per la diarrea vengono usate le foglie del *T. indica*, mentre per la costipazione vengono usati i suoi frutti e per i dolori addominali le radici e le parti più morbide della corteccia;
- Trattamento di ulcere gastriche: gli estratti del seme del *T. indica* si è visto possedere un effetto protettivo, dose dipendente, nei confronti delle ulcere provocate da ibuprofene o alcool. Questo si ritiene essere dovuto all'effetto antiossidante ed al ruolo protettivo contro i radicali liberi che possiedono i componenti polifenolici contenuti nei semi (Pinar Kuri, 2014);
- Effetti spasmolitici: il frutto del *T. indica* provoca il rilassamento della muscolatura liscia bloccando i canali per il calcio;
- Proprietà antibatteriche e antiparassitarie: grazie al suo contenuto di lupeolo il *T. indica* ha proprietà antibatteriche verso *Burkholderia pseudomallei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella paratyphi*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Pinar Kuri, 2014). È utilizzato comunemente per numerose infezioni, incluso il trattamento della malaria (foglie del Tamarindo), stimola inoltre il sistema immunitario e riduce la presenza di parassiti nel sangue. Le sue proprietà antiparassitarie derivano dalla presenza di tannino nei semi, questo infatti lega le glicoproteine presenti sulla superficie esterna del parassita e ne causa la morte. I frutti hanno invece effetti antipiretici;
- Effetti antinfiammatori ed analgesici: la presenza di polifenoli e flavonoidi nelle foglie, nei semi e in altre parti della pianta, è associata ad effetti antinfiammatori e nocicettivi, se pure non molto elevati. Test fitochimici

hanno mostrato la presenza di steroli e triterpeni nell'estratto di Tamarindo, composti che possano essere responsabili dell'attività analgesica mostrata da tale pianta (Santosh Singh Bhadoriya et al., 2011). Effetti analgesici sono stati studiati su modelli di dolore meccanico, chimico e scottature;

- Effetti anti-diabetici: il diabete mellito di tipo I e II è causato da un rilascio anomalo di insulina dovuto ai danni derivanti dall'infiammazione cronica delle cellule β degli isolotti pancreatici. L'estratto dei semi di T. indica, grazie alle sue proprietà antinfiammatorie, di regolazione del glucosio nel sangue e di difesa del tessuto pancreatico, mostra un'attività protettiva su queste cellule. Questi effetti sono causati da un aumento dei livelli di Ca^{2+} intracellulare nel pancreas e da una riduzione di assorbimento di glucosio. Uno studio, effettuato su ratti con diabete indotto da streptozotocina, ha mostrato che l'utilizzo di un estratto acquoso di T. indica riduce in modo significativo l'iperglicemia, misurata come livello di glucosio nel sangue a digiuno (Santosh Singh Bhadoriya et al., 2011);
- Proprietà antiossidanti: i semi e la polpa del T. indica mostrano effetti antiossidanti grazie al loro contenuto di flavonoidi, tannino, polifenoli, antocianine e proantocianidine oligomeriche. Il tegumento dei semi del Tamarindo Thai è risultato essere il più attivo in termini di numero di perossidi (Santosh Singh Bhadoriya et al., 2011);
- Trattamento delle ferite: T. indica è spesso citato nella letteratura relativa al trattamento di tagli, ferite e ascessi. La corteccia e le foglie sono le parti più comunemente utilizzate. È applicato topicamente, sia come decotto che come polvere o impasto, da solo o in combinazione con altre specie (Santosh Singh Bhadoriya et al., 2011). Un decotto di foglie di T. indica è uno degli agenti più importanti per pulire le ferite causate da infezioni da vermi della Guinea;
- Effetti sul sistema cardiovascolare: studi epidemiologici hanno mostrato che i flavonoidi presenti nei frutti del T. indica hanno effetti benefici sul sistema cardiovascolare. È stato mostrato come l'estratto del frutto del T. indica riduca il colesterolo, l'LDL ed i trigliceridi, ed aumenti i livelli di

HDL. Per questo motivo semi e frutti del Tamarindo sono consiglianti come supporti nutrizionali nei pazienti con alti livelli di colesterolo nel sangue;

- Effetto protettivo del fegato: le foglie del T. indica mostrano effetti anti-apoptotici e di protezione del fegato, determinando la stabilizzazione delle membrane e riducendo il consumo di glutatione (Pinar Kuri, 2014);
- Trattamento oftalmico: la corteccia del T. indica essiccata, pestata e poi aggiunta ad acqua, era usata in passato per il trattamento di infiammazioni oculari (Santosh Singh Bhadoriya et al., 2011). Oggi, grazie alle nuove tecnologie, l'utilizzo del Tamarindo in oftalmologia si sta notevolmente ampliando. Ne viene qui tralasciata la descrizione che verrà trattata in modo dettagliato successivamente.

Per quanto riguarda gli effetti tossici e collaterali, uno studio di due anni effettuato da Lida et al. ha riportato che non ci sono effetti collaterali in animali nutriti con estratti di seme di T. indica. Allo stesso modo Heimbach et al. hanno dimostrato che, dopo l'assunzione per 28 giorni di semi di T. indica da parte di animali, non vi sono stati cambiamenti nella biochimica del sangue, nelle analisi delle urine, nei test sulla funzionalità del fegato e nel peso dell'animale. Il T. indica contiene però tannino e altri componenti che ne possono rendere difficile la digestione, quindi si consiglia di assumerlo con acqua calda. Per quanto riguarda l'interazione con i farmaci, è stato osservato che ibuprofene e acido acetilsalicilico, quando assunti con T. indica, aumentano la loro biodisponibilità ed il loro livello nel sangue (Pinar Kuri, 2014).

Capitolo 3

Il TSP, Tamarind Seed Polysaccharide

3.1. Composizione del TSP

Formulazioni di un ingrediente farmaceutico attivo nelle forme di dosaggio desiderate sono raramente possibili senza l'aggiunta di eccipienti, che diventano parte essenziale del medicinale e che possono contribuire all'azione del farmaco stesso. Gli eccipienti sono molecole inerti che giocano un ruolo importante nella progettazione della forma farmaceutica. Oltre alla comune funzione di veicolo inerte, necessario per la somministrazione dell'adatto volume di principi attivi, gli eccipienti possono avere anche ruoli multifunzionali ed essere ritardanti di rilascio del farmaco, modificatori di viscosità, ecc.

Oggigiorno si tende sempre più ad utilizzare come eccipienti prodotti naturali per la loro facile reperibilità, atossicità, possibilità di modificazione chimica, potenziale biodegradabilità e buona biocompatibilità rispetto ai più costosi polimeri sintetici. Tra questi prodotti naturali il TSP, ottenuto dai semi del Tamarindo, ha acquisito un'importanza rilevante nei settori di dolciumi, prodotti da forno, prodotti tessili e industria alimentare; recenti ricerche hanno inoltre dimostrato le sue potenzialità di utilizzo nelle industrie farmaceutiche.

Il TSP è una frazione polisaccaridica purificata, neutra e idrosolubile, ottenuta, come verrà descritto successivamente, dall'endosperma dei semi del *Tamarindus indica*.

Ha un peso molecolare di 52.350 Dalton.

Per quanto riguarda il contenuto proteico il 38.7% è costituito da proteine insolubili ed il restante 61.3% da proteine solubili, di cui alcune solubili in acqua, altre in soluzione salina, soluzioni alcoliche o di alcali. Include inoltre 3.9-7.4% di olio, 0.7-8.2% di fibre grezze e 2.45-3.3% di cenere (Joseph et al., 2012).

In tale recensione se ne prendono in esame il suo utilizzo e le sue potenzialità in ambito contattologico ed oftalmico.

Si tratta di una molecola polimerica di galactoxiglucano molto idrofila e dotata di struttura ramificata: alla catena principale lineare, formata da unità ripetitive di glucosio, si coniugano piccole unità monosaccaridiche di xilosio e disaccaridiche di xilosio-galattosio, in quest'ultimo caso il galattosio è terminale alla catena laterale (Favilla, 2010) (Figura 3.1). I tre monomeri sono presenti in un rapporto molare 3:1:2 e costituiscono circa il 65% dei componenti del seme (Joseph et al., 2012). Non possedendo quindi una struttura lineare, a differenza di altri sostituti lacrimali derivati dalla cellulosa e dall'acido ialuronico, il TSP è stato recentemente preso in considerazione come sostituto lacrimale di nuova generazione.

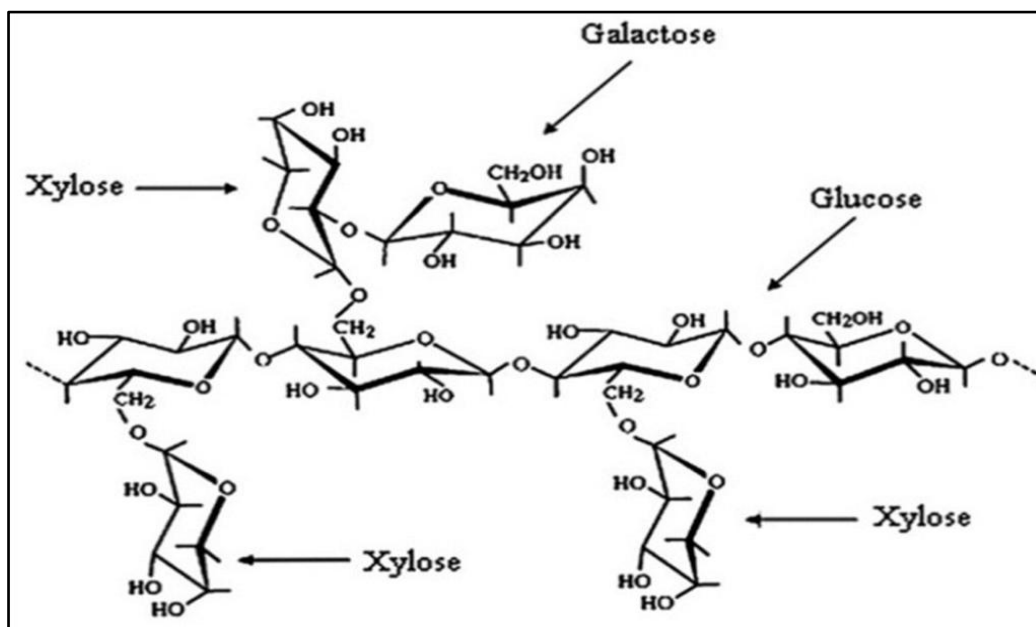


Figura 3.1 – Configurazione chimica del TSP,

(tratto dalla pagina web:

www.greenpharmacy.info/viewimage.asp?img=IntJGreenPharm_2012_6_4_270_108205_f4.jpg).

Tale ipotesi è fondata sulla particolare configurazione ramificata del TSP, detta “branched-chain”, che gli conferisce una struttura molecolare di tipo “mucin-like” (Sahoo Soumendra et al. 2010). L’elevata somiglianza alle mucine presenti negli epiteli corneali e congiuntivali, ed in particolare alla MUC-1 nella sua proiezione extracellulare nel glicocalice (Figura 3.2), determinando le ottime proprietà mucoadesive del polisaccaride, derivanti dalla formazione di legami di varia natura con le mucine stesse (Bux et al., 2000).

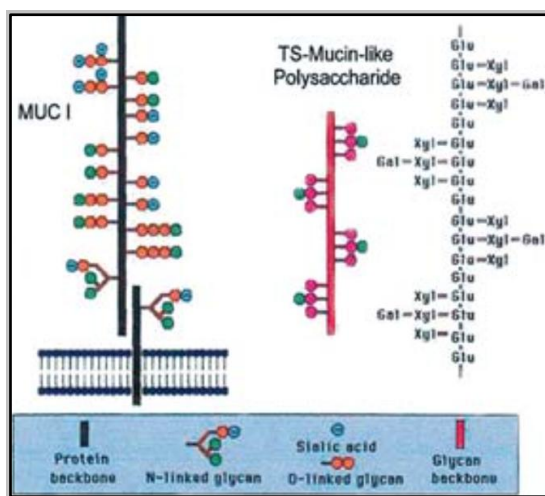


Figura 3.2 – Confronto della struttura chimica ramificata di TS-Polisaccaride e MUC-1, (Favilla, 2010).

Oltre a ciò, l’assenza di carica elettrica e la struttura ramificata, hanno il duplice effetto di favorire sia la formazione di legami con le mucine del glicocalice e del film lacrimale, sia l’adesione alla membrana delle cellule epiteliali apicali corneo-congiuntivali.

Grazie alle sue proprietà bioadesive, mucoadesive e viscoelastiche, soluzioni contenenti TSP mostrano un maggiore tempo di contatto con la superficie oculare rispetto ad altri sostituti lacrimali. Il TSP possiede inoltre un comportamento reologico pseudoplastico, non Newtoniano, quindi le sue soluzioni sono ad alta viscosità quando sottoposte a forze di taglio poco intense (occhio aperto), mentre sono a bassa viscosità quando sottoposte a forze di taglio più intense (ammiccamento). Tale comportamento permette un’adeguata distribuzione delle

soluzioni, un'ottimale lubrificazione della superficie oculare ed una riduzione delle forze di attrito che si generano durante l'ammiccamento.

Le soluzioni di TSP generalmente hanno un'osmolarità di circa 300 mOsm/Kg, che si avvicina molto a quella del film lacrimale (293-318 mOsm/Kg). In aggiunta ad una buona biocompatibilità, questo polimero possiede un'ampia tolleranza a variazioni di pH; il suo pH è di circa 6-7 (Bux et al., 2000) e la cornea, in vitro, può tollerare un range di pH da 6.5 a 8.5. È stata dimostrata la sua insolubilità in solventi organici quali etanolo, metanolo, acetone, etere ed in acqua fredda, ma si dissolve completamente in acqua calda a temperature superiori a 85° C, producendo soluzioni colloidali altamente viscosi o gel mucilluginosi che mostrano comportamento reologico non newtoniano e proprietà pseudoplastiche (Joseph et al., 2012). Si è anche notato che è un potenziale emulsionante, non tossico e non irritante, con attività emostatica (Joseph et al., 2012).

Infine, la possibilità di sterilizzazione mediante semplice autolavaggio rende il TSP vantaggioso anche dal punto di vista della manifattura.

Tabella II – Proprietà fisiche del polisaccaride estratto dal seme di Tamarindo (TSP), (tratto dalla pagina web: www.greenpharmacy.info/viewimage.asp?img=IntJGreenPharm_2012_6_4_270_108205_t2.jpg).

Property (units)	Results
True density (g/ml)	1.015–1.9
Tapped density (g/ml)	0.363–0.781
Bulk density (g/ml)	0.24–0.651
Angle of repose (°)	13°–29.5°
Compressibility index (%)	15.33–16.64
Hausner ratio	0.14–1.23
pH (1% w/v TSP)	6–6.81
Swelling index (%) (in water)	12–17
Surface tension (dynes/cm)	61.3–83.26
Moisture content (%)	8.10±1.23
Water retention (%)	20.00±1.34
Melting point (°C)	240–260
Particle size in range (µm)	60–90
Average molecular weight (× 10 ⁶ g/mol)	0.9–2.1

3.2. Isolamento e valutazione della purezza del TSP

Il TSP può essere isolato tramite metodi chimici e metodi enzimatici, usando proteasi o una combinazione di proteasi e ultrasuoni ad elevata intensità. Nel metodo chimico, 20g di polvere di semi di Tamarindo sono aggiunti a 200 ml di acqua fredda distillata per preparare una sospensione che è poi versata in 800 ml di acqua bollente distillata. La soluzione così formata viene fatta bollire per 20 minuti e continuamente mescolata; dopo aver riposato una notte, è sottoposta a centrifugazione a 5000 rpm per 20 minuti. Il liquido soprannatante viene separato e versato all'interno di un volume di alcool puro pari al doppio del liquido stesso. Si ottiene quindi un precipitato che è poi lavato con etanolo puro ed essiccato all'aria. Infine il polimero essiccato viene macinato, passato attraverso un setaccio e immagazzinato in un essiccatore fino all'uso (Sahoo Soumendra et al. 2010).

Nel metodo enzimatico la polvere ottenuta dai semi è mischiata con etanolo e poi trattata con proteasi; successivamente viene centrifugata ed al surnatante è aggiunto l'etanolo per la precipitazione. Il polimero è infine separato ed essiccato (Joshny Joseph et al., 2012).

La purezza del TSP può essere confermata dall'assenza di proteine, queste potrebbero infatti degenerare formando precipitati insolubili che renderebbero la separazione del TSP stesso più difficoltosa. Per questo motivo l'eliminazione delle proteine è l'obiettivo principale di tutti i sistemi di isolamento. La purezza del TSP è valutata tramite diversi test fitochimici che devono mostrare risultati negativi per proteine, steroli, saponine, alcaloidi, flavonoidi, tannini e fenoli; risultati positivi devono essere invece riscontrati per quanto riguarda la presenza di carboidrati (Molisch's test, Barfoed's test e Benedict's test) e mucillaggini (Kumar et al., 2001).

3.3. Analisi tossicologica del TSP

Gli studi di tossicità acuta e di tossicità cronica, condotti per determinare la sicurezza del TSP, hanno rivelato che questo, anche a dosi elevate, non è tossico. Con lo scopo di simulare un trattamento in vivo con preparazioni oftalmiche rese

più viscosi dall'aggiunta del polisaccaride di interesse, sono state studiate possibili modifiche della vitalità cellulare dopo somministrazione di TSP e di TSP in presenza di mertiolato, timololo e chinoloni, in diversi momenti di esposizione delle cellule (Raimondi et al., 2000). I risultati mostrano come il TSP non causi alcun segno di tossicità nelle cellule congiuntivali umane.

Inoltre, la quantità di TSP che può essere assorbita dall'uomo, dopo applicazione topica oculare, può essere considerata di trascurabile. Quindi, il suo uso come eccipiente in prodotti farmaceutici è dimostrato essere accettabile.

Per stabilire le proprietà cancerogene del TSP, sono stati fatti studi su entrambi i sessi di topi B6C3F1. I topi sono stati nutriti per 13 settimane con dieta contenente diverse percentuali di TSP (0, 0.625, 1.25, 25 e 5%) e ne è stata indagata la tossicità subcronica (Sano et al., 1996). Anche alla massima percentuale del 5%, la dieta non ha mostrato effetti tossici. Per lo studio di carcinogenesi, i campioni di sangue e tessuti di vari organi sono stati sottoposti ad esame dopo 98 settimane. Gli studi hanno dimostrato che non vi erano segni di cancerogenicità o di effetti negativi su entrambi i sessi di topo.

Capitolo 4

Applicazioni del TSP nella formulazione di nuove lenti a contatto

4.1. Inserimento del TSP nella matrice polimerica della lente

Il numero di coloro che interrompono l'uso delle lenti a contatto, a causa delle difficoltà che riconoscono durante l'uso delle lenti stesse, equivale circa al numero delle nuove applicazioni. L'aumento di evaporazione, l'instabilità del film lacrimale e la diminuzione dello spessore dello stesso, causano o incrementano ulteriormente i problemi di discomfort ed anticipano talvolta i sintomi da occhio secco.

In questi anni, varie aziende hanno introdotto sul mercato lenti a contatto contenenti TSP e HA nella loro matrice polimerica. Tali lenti, sfruttando le ormai note proprietà dei due polimeri, hanno l'obiettivo di migliorare il comfort durante le ore di porto, in modo da ridurre così il numero di drop outs. Tra le aziende, anche una italiana, la Safilens, progettando le lenti della linea Safegel Fusion, ha cercato di offrire un approccio tecnico scientifico ai problemi oramai evidenti delle varie sindromi da occhio secco. Queste lenti, disponibili in un ampio range di poteri (-0.50 D / -10.00 D), sono state ideate con lo scopo di fornire una valida proposta di prevenzione grazie alla rimozione delle cause più conosciute di drop

out quali depositi, contaminazioni batteriche, sfregamenti meccanici ed ipossia (Safilens, 2011).

Proprio per gli obiettivi prefissati, la scelta dei polimeri è ricaduta su HA e TSP. L'acido ialuronico ha ottime proprietà idro-assorbenti che migliorano l'idratazione delle interfacce, è infatti una delle molecole più igroscopiche presenti in natura e, idratato, può contenere una quantità d'acqua mille volte superiore al proprio peso (Fagnola et al., 2010).

Il TSP invece, grazie alla sua struttura molecolare simile a quella delle mucine endogene, garantisce ottime proprietà mucoadesive che gli permettono di formare un rivestimento duraturo, fornire una stabile protezione per la superficie corneale e migliorare la stabilità del film precorneale, senza aumentare eccessivamente la viscosità della soluzione.

La tecnologia Fusion utilizzata dalla Safilens permette dunque di sfruttare l'interazione sinergica di HA e TSP, creando un bio-copolimero naturale che viene inserito all'interno del materiale plastico della lente a contatto grazie al processo di idratazione termoreversibile brevettato dall'azienda Safilens stessa (materiale Filcon TSP®-Hyaluropolymer; acqua 58%). Tale sinergia è in grado di amplificare le proprietà dei singoli polimeri nell'idratare, lubrificare e proteggere la superficie oculare dallo stress meccanico indotto dalla lente, e quindi favorire il ristabilirsi delle fisiologiche condizioni oculari che possono essere perturbate dalla presenza della lente stessa sulla cornea. Questa tecnologia ha dunque lo scopo di migliorare il comfort dell'utilizzatore attraverso la normalizzazione del film lacrimale e la realizzazione di un effetto stabilizzante nei confronti delle interfacce lac/film lacrimale/epitelio.

Safilens ha ritenuto che il rilascio di sostanze bio-attive durante il porto di una lente a contatto fosse il metodo più adatto per ripristinare un equilibrato rapporto lente a contatto/film lacrimale. Per queste ragioni la tecnologia Fusion lavora in armonia con l'occhio per rilasciare, in maniera controllata e costante, sostituti lacrimali naturali, dalla lente al film lacrimale. La consegna del copolimero Fusion avviene grazie ad una serie di cause congiunte: pressione della palpebra, ammiccamento e temperatura corporea (Safilens, 2011). Il progressivo rilascio dei

principi attivi e l'ottimale viscosità della formulazione garantiscono infine una lubrificazione costante durante il porto.

A livello funzionale, dal momento in cui il rilascio del principio attivo si esaurisce dopo sette giorni, il ricambio della lente Safegel Fusion 7days è settimanale, ed è sconsigliato protrarne l'uso dopo il periodo di sostituzione clinicamente testato.

Capitolo 5

Applicazioni del TSP in oftalmologia

5.1. Potenzialità del TSP nelle preparazioni ad uso oftalmico

I polisaccaridi, dal momento che sono atossici ed accettati dalle autorità di regolazione, sono i materiali più usati tra i polimeri idrofili. Sono carboidrati relativamente complessi, dotati di buone proprietà meccaniche che ne permettono l'utilizzo come adesivi, modificatori reologici, emulsionanti e possibili sistemi di rilascio di farmaci. Inoltre, la formazione di complessi ionici macromolecolari di polisaccaridi e farmaci aumenta la biodisponibilità di questi ultimi, incrementandone l'effetto terapeutico rispetto a soluzioni contenenti i soli farmaci (Sahoo Soumendra et al., 2010).

Il TSP è un polisaccaride multifunzionale che svolge il ruolo di stabilizzante, addensante, legante, rilascio ritardante, agente di sospensione, incrementante della viscosità, emulsionante, ed è inoltre usato come eccipiente nei sistemi idrofili di somministrazione di farmaci per via orale, buccale, oculare e nano fabbricazione. Proprio in virtù della sua mucoadesività, viscosità e bioadesione, proprietà che ne rallentano il deflusso attraverso il sistema di drenaggio naso-lacrimale, ci si aspetta che tale polisaccaride risieda nell'area precorneale per un periodo relativamente prolungato, ed è per questo che è stato recentemente introdotto sul mercato come sostituto del film lacrimale (TSP Farmigea S.p.a., Pisa, Italy).

Molte caratteristiche fanno del TSP un ottimo candidato come veicolo per la somministrazione topica oculare a rilascio controllato di medicinali oftalmici. Possiede infatti buona attività nella prevenzione delle alterazioni della superficie oculare in caso di cheratocongiuntivite sicca (Burgalassi et al., 1999), aumenta il tasso di guarigione di ferite corneali (Burgalassi et al., 2000), riduce la tossicità esercitata da timololo, mertiolato e fluorochinoloni sulle cellule congiuntivali in vitro (Raimondi et al., 2000) ed aumenta in modo significativo la penetrazione intraoculare di gentamicina ed ofloxacina quando somministrati topicamente in occhi di conigli in salute (Ghelardi et al., 2000). La sua applicazione potrebbe inoltre ridurre l'uso di soluzioni fortificate di antibiotici e la necessità di ripetute applicazioni ad intervalli frequenti, in modo da abbassare la tossicità per la cornea ed aumentare la compliance del paziente.

Dai test finora effettuati risulta infatti privo di tossicità oculare, anallergico, non irritante e possiede una completa trasparenza; mantiene le sue proprietà quando posto in autoclave e, a differenza di altri polimeri mucoadesivi, non modifica le sue caratteristiche a pH neutro.

I paragrafi che seguono si concentrano quindi sulle possibilità di utilizzo di questo polisaccaride nelle industrie farmaceutiche, con particolare riferimento alle sue proprietà chimiche e fisiche per la formazione di preparati ad uso oftalmico. A tale scopo, una revisione degli studi, che i ricercatori hanno condotto per valutare l'efficacia del TSP nelle preparazioni oculari, mostra le sue potenzialità e versatilità di utilizzo in diverse applicazioni, che lo rendono un elemento promettente per l'industria farmaceutica.

5.2 Utilizzo TSP nel trattamento delle lesioni oculari

Burgalassi et al. hanno effettuato uno studio per valutare il ruolo del TSP sulla riparazione delle lesioni corneali. A tal fine, applicando un disco di carta imbevuta con n-eptano, è stato lesionato l'epitelio corneale di conigli albini e successivamente trattato con tre differenti colliri. Questi contenevano rispettivamente TSP, una formulazione di riferimento di acido ialuronico e una soluzione salina normale. Misurando giornalmente il diametro delle ferite corneali

dopo colorazione con fluoresceina, si è osservato come, rispetto al sodio ialuronato, il TSP ha leggermente, ma significativamente, aumentato il tasso di guarigione delle ferite (Burgalassi et al., 2000). Il medesimo studio ha mostrato come la capacità del polisaccaride di promuovere la guarigione delle ferite corneali potrebbe dipendere dalla sua influenza sul riconoscimento dell'integrina, una proteina della superficie cellulare (Burgalassi et al., 2000).

Inoltre, essendo un polimero naturale dotato di proprietà mucoadesive, il TSP aiuta l'adesione delle cellule dell'epitelio danneggiato alla laminina, una glicoproteina adesiva molto voluminosa, che risulta essere la componente più abbondante di tutte le lamine basali (Joseph et al., 2012). In questo modo viene quindi favorita la guarigione delle lesioni oculari.

Gli effetti farmacologici del TSP nella terapia delle lesioni corneali e congiuntivali hanno anche fatto pensare ad una sua azione trofica sull'epitelio. A tal proposito, Bux et al hanno osservato un effetto stimolante da parte del TSP sulla proliferazione in vivo dei cheratociti e sull'adesione delle cellule congiuntivali alla matrice cellulare in presenza di laminina (Bux et al., 2000).

Infine, uno studio successivo, in cui è stato valutato il trattamento dei danni corneali tramite diversi tipi di polisaccaridi quali TSP, acido ialuronico e arabinogalattano, ha evidenziato che il decremento nel tempo di guarigione era strettamente dipendente dal prodotto applicato, suggerendo un'influenza da parte dei polimeri sul meccanismo di restauro (Burgalassi et al., 2007).

5.3 Applicazione del TSP nella protezione dai raggi UV-B

Tra le lunghezze d'onda nell'ultravioletto, il range degli UV-B è il più pericoloso, producendo danni specifici al DNA cellulare. Le lesioni nei confronti di cellule e tessuti, derivanti dagli UV, sono dovute ad un aumento nella produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che sono responsabili delle alterazioni del DNA e di quello che viene comunemente chiamato stress ossidativo. Questi eventi avversi stimolano poi vie di trasduzione del segnale che determinano la riparazione delle cellule, o la morte delle stesse quando i danni sono irreversibili. Le specie reattive

dell'ossigeno generano infatti una cascata infiammatoria intracellulare che causa l'attivazione genica, con conseguenti cambiamenti nel metabolismo cellulare, nelle proteine e l'ossidazione del DNA. I ROS sono inoltre ritenuti essere cofattori o promotori di patologie quali cancro, invecchiamento cellulare, malattie degenerative ed anche patologie oculari.

Differenti strategie sono state messe in atto per ridurre la concentrazione intracellulare di ROS a livello oculare, limitando così lo stress ossidativo generato dall'esposizione agli UV-B. Tra queste la somministrazione di composti antiossidanti risulta di particolare efficacia.

Per aumentarne le caratteristiche farmacocinetiche, i farmaci antiossidanti sono generalmente somministrati con l'uso di soluzioni ad alta viscosità, caratteristica che si ottiene aggiungendo alle soluzioni polimeri naturali, semisintetici o sintetici (Dick et al., 1999). Poiché la presenza di polisaccaridi naturali nelle soluzioni prolunga quindi il tempo di contatto del farmaco con la superficie cellulare, aumentando di conseguenza il suo assorbimento, molti di questi sono usati come eccipienti nei sistemi di somministrazione per preparazioni oftalmiche.

Tuttavia, i polisaccaridi non possono essere considerati solo come additivi nelle preparazioni oftalmiche, possedendo un proprio profilo farmacologico ed avendo quindi un ruolo a se stante nel trattamento delle malattie.

Per valutare il possibile impiego del TSP come agente protettivo contro i raggi UV, in particolare UV-B, Raimondi et al. hanno esaminato il suo effetto sulle cellule derivate dalla cornea di coniglio (cellule SIRC) esposte ad una fonte di UV-B. Lo studio ha verificato che le cellule SIRC presentano una duplicazione inferiore del DNA quando brevemente esposte (9 s) ai raggi UV-B e che tale danno è permanente. Hanno quindi valutato se il polisaccaride naturale preso in considerazione potesse essere un valido aiuto nel ridurre gli effetti negativi delle specie reattive all'ossigeno (Raimondi et al., 2003).

Era già noto che l'esposizione ad UV-B di cellule isolate attivasse gli enzimi che generano perossido di idrogeno (H_2O_2); in particolare, la formazione di l'8-idrossideossiguanosina (8-OHdG) era ritenuta essere un indicatore precoce ed accurato del danno ossidativo al DNA.

Lo studio ha di fatto dimostrato che nelle cellule SIRC esposte ai raggi UV-B si aveva un consistente aumento di H₂O₂ e di 8-OHdG. (Raimondi et al., 2003). È poi stato valutato se queste condizioni, pretrattando le cellule con TSP trenta minuti prima dell'esposizione, subivano modifiche.

Dai risultati si è desunto che in presenza di TSP la concentrazione di H₂O₂ è significativamente inferiore rispetto a quella riscontrata nelle cellule non trattate con il polisaccaride (P < 0.05 nella comparazione tra SIRC trattate con TSP e non trattate) (Tabella III).

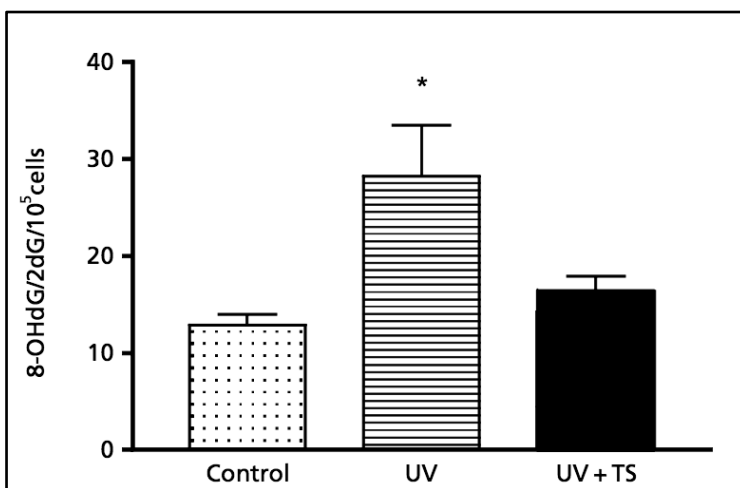
Tabella III – Effetto del TSP sul contenuto di H₂O₂ nelle cellule esposte a radiazione UV-B nello studio “*The polysaccharide from Tamarindus indica (TS-polysaccharide) protects cultured corneal-derived cells (SIRC cells) from ultraviolet rays*”, (Raimondi et al., 2003).

	H₂O₂ (nmol/10⁵ cells/45 min)
Control	Not measurable
UV	7.70 ± 0.08
UV + TS-polysaccharide	4.8 ± 0.1*

H₂O₂ concentration was measured as described in Methods. Results are the means ± s.e. of 4 different experiments run in duplicate.
*P < 0.05, compared with UV-exposed cells, Student's *t*-test.

Inoltre, come ci si aspettava, è stato riscontrato un significativo aumento nei livelli di 8-OHdG nelle cellule esposte ad UV-B rispetto alle cellule del gruppo controllo; in presenza di TSP i livelli di 8-OHdG sono invece risultati notevolmente inferiori rispetto a quelli osservati nelle cellule esposte non trattate (Grafico 5.1).

Grafico 5.1 – Livelli di 8-OHdG riscontrati nel DNA delle cellule SIRC non sottoposte a radiazione (control), sottoposte a radiazione UV-B in assenza di TSP (UV) e in presenza di TSP (UV+TSP); *P = 0.0081 se comparato con il gruppo controllo, (Raimondi et al., 2003).



Da quanto sopra riportato si è quindi supposto che tale polisaccaride ad alto peso molecolare, probabilmente offrendosi come uno scudo fisico ai raggi nocivi grazie alle sue caratteristiche bioadesive, protegge le cellule dall'effetto dannoso delle radiazioni UV-B di intensità simile a quella a cui è esposto l'uomo (Raimondi et al., 2003). L'uso di sostituti lacrimali viscosi contenenti TSP può, per le ragioni esposte, essere proposto come agente limitante i danni al DNA causati dalla radiazione ultravioletta.

5.4. Utilizzo del TSP come veicolo in sistemi di somministrazione topica di antibiotici a rilascio prolungato

Il trattamento di malattie oculari tramite somministrazione topica di colliri oftalmici pone il problema del raggiungimento della necessaria biodisponibilità del farmaco nel distretto di interesse. Innanzitutto va preso in considerazione il fatto che il dispenser eroga gocce il cui volume è maggiore di quello del sacco congiuntivale in cui la goccia stessa viene instillata, determinando l'immediata perdita di parte del farmaco somministrato. Inoltre, virtualmente, tutte le gocce causano all'instillazione un'importante lacrimazione riflessa, a cui segue un'ulteriore perdita di efficacia del farmaco (Hopkins, Pearson, 2000). È quindi nell'area precorneale, sito d'azione del farmaco o dove questo deve essere assorbito, che avviene rapidamente la diluizione e l'eliminazione del farmaco stesso. In aggiunta, altri meccanismi di protezione degli occhi quali l'ammiccamento, il sistema di drenaggio naso-lacrimale e l'integrità dell'epitelio corneale, che agisce come barriera contro la penetrazione del farmaco, possono impedire il raggiungimento dei livelli di farmaco terapeuticamente attivi nei distretti oculari desiderati. Ciò implica la necessità di instillazioni frequenti, e quindi, il rischio di effetti collaterali associati ai farmaci somministrati.

Questo è ciò che si verifica quando si interviene per trattare malattie oculari, soprattutto infettive, quali la cheratite batterica. *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* causano frequentemente cheratiti che, se la terapia appropriata non viene prontamente avviata, possono portare alla distruzione progressiva dell'epitelio corneale e dello stroma, con conseguente formazione di cicatrici corneali o perforazioni. Una terapia di successo deve quindi essere in grado di raggiungere rapidamente concentrazioni elevate di farmaco nel sito di infezione. Tale obiettivo non è così facilmente conseguibile. Se da un lato farmaci per via sistemica non vengono frequentemente utilizzati perché la cornea è un tessuto avascolare, dall'altro lato il trattamento topico mostra i problemi precedentemente esposti. Per queste motivazioni, il trattamento standard della cheratite batterica richiede la somministrazione ad intervalli frequenti di colliri

spesso contenenti soluzioni fortificate di fluorochinoloni. Tuttavia, questo regime non solo è dannoso per il paziente, e di solito richiede ospedalizzazione, ma è anche stato associato a tossicità in vitro per l'epitelio corneale (Ghelardi et al., 2004).

Per queste ragioni diversi sistemi sono stati sviluppati per prolungare il tempo di contatto tra farmaci antimicrobici e tessuti corneali; la capacità di un polimero di prolungare il tempo di contatto del farmaco con la superficie oculare, aderendo ad essa e contemporaneamente legando il farmaco, è stata ritenuta una strategia promettente. In particolare, data l'elevata viscosità e resistenza mucoadesiva, il TSP è stato identificato come un ottimo candidato per aumentare il tempo di permanenza degli antibiotici sulla cornea.

Vari studi, tra cui quelli di Ghelardi et al. (2000, 2004), Uccello-Barretta et al. (2008) e Burgalassi et al. (2000), sostengono tale ipotesi. Nel primo studio Ghelardi ha osservato che la somministrazione di TSP-gentamicina e TSP-ofloxacina ha prodotto livelli intraoculari di farmaco significativamente più elevati rispetto a quelli ottenuti con le corrispondenti formulazioni senza TSP. In particolare la concentrazione di ofloxacina, che è lipofila, è rimasta costantemente maggiore rispetto a quella della gentamicina, che è idrofila, sia quando somministrata con TSP che sola. Ciò può essere spiegato tenendo conto della diversa permeabilità dell'epitelio corneale alla gentamicina e all'ofloxacina, ed è stato quindi dedotto che il TSP migliora significativamente la penetrazione intraoculare sia di composti idrofobi che idrofili, senza però modificare la solubilità intrinseca dei farmaci stessi (Ghelardi et al., 2000).

Inoltre, le concentrazioni nella cornea di entrambi i farmaci, quando somministrati con TSP, hanno notevolmente superato le MIC (minime concentrazioni inibenti) riportate per la maggior parte dei ceppi di *Pseudomonas*, *Streptococcus* e *Staphylococcus* frequentemente isolati nei casi di cheratocongiuntivite (Ghelardi et al., 2000). I risultati suggeriscono quindi che questo polisaccaride naturale prolunga i tempi di permanenza precorneale degli antibiotici e migliora l'accumulo dei farmaci nella cornea, probabilmente riducendo la velocità di drenaggio dei farmaci stessi somministrati per via topica. Viene così avvalorata l'ipotesi che pone il TSP come un candidato promettente nella veicolazione di

farmaci per il trattamento topico delle cheratiti batteriche, poiché in sua assenza questi antibiotici difficilmente raggiungono le concentrazioni necessarie per eliminare l'infezione.

In uno studio successivo, il medesimo autore ha utilizzato il TSP per la somministrazione oculare di rifloxacina 0,3%, un fluorochinolone ad ampio spettro, nel trattamento sperimentale di cheratite da *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* indotta nei conigli. Il polisaccaride ha aumentato significativamente la penetrazione corneale di rifloxacina in entrambi gli occhi, infetti e non infetti, riducendo così la presenza di *P. aeruginosa* e *S. aureus* nella cornea ad una velocità superiore, se confrontata con quella ottenuta con la sola rifloxacina. In particolare, l'uso del polisaccaride ha consentito una riduzione sostanziale di *S. aureus*, anche quando l'intervallo di tempo tra le somministrazioni del farmaco è stato esteso (Ghelardi et al., 2004).

Di una certa rilevanza è che, una concentrazione significativamente più alta di rifloxacina, quando somministrata in associazione con TSP, è stata trovata nell'umore acqueo di occhi infetti, rispetto a quella presente invece in occhi sani, anche se l'integrità epiteliale appariva conservata. Questo risultato può essere spiegato dal fatto che le componenti batteriche, come il lipopolisaccaride e l'acido lipoteicoico, attivano la produzione di mucine da parte delle cellule epiteliali, determinando quindi una maggior disponibilità di substrati in grado di aderire al TSP. Una quantità più elevata di mucine può dunque aver determinato una permanenza ancora più sostenuta del composto TSP-rifloxacina sul tessuto corneale, consentendo una maggiore penetrazione del farmaco nell'umore acqueo (Ghelardi et al, 2004).

In conclusione, lo studio avvalorava l'ipotesi che il TSP possa essere considerato un veicolo promettente per la somministrazione topica oculare di antibiotici. In particolare, la sua applicazione potrebbe sostituire l'uso di soluzioni fortificate di antimicrobici e ridurre la frequenza di somministrazioni del farmaco, abbassando così potenzialmente la tossicità corneale ed aumentando la compliance del paziente.

A confermare che il TSP possa essere un coadiuvante realmente utile per i sistemi di somministrazione di farmaci vi sono anche i risultati di uno studio di Burgalassi

et al. Questi hanno confrontato la pressione intraoculare e le concentrazioni di timololo raggiunte nei diversi distretti oculari quando somministrato con tre differenti veicoli oftalmici, tra cui il TSP. Il polimero in esame ha prodotto le concentrazioni di timololo maggiori nei tessuti oculari, associate ad un basso assorbimento sistemico del farmaco (Burgalassi et al., 2000).

Anche i risultati di uno studio di Uccello-Barretta avvalorano le ipotesi sopra esposte. Sono stati studiati sistemi di diversi polisaccaridi con ketotifene fumarato (KT), farmaco antistaminico di seconda generazione usato per il trattamento di congiuntivite allergica o di occhi rossi pruriginosi causati dalle allergie. Il farmaco, utilizzato nelle forme di dosaggio oftalmiche, ha mostrato più affinità verso il TSP che verso l'idrossietilcellulosa (HEC) o l'acido ialuronico (HA) (Uccello-Barretta et al., 2008). Confrontando la capacità dei tre polimeri di legarsi al KT, si è quindi potuta effettuare una valutazione comparativa del potenziale dei suddetti polimeri come eccipienti per colliri contenenti KT.

La maggiore affinità del TSP rispetto ad HEC e HA, dimostrata con l'uso della spettroscopia NMR, può ragionevolmente essere attribuita ad una miglior capacità di questo polimero di creare estese interazioni con il KT. A conferma di ciò, la tecnica di dialisi dinamica ha mostrato come la frazione di KT legata al TSP è significativamente superiore a quella legata ad HEC o HA (Uccello-Barretta et al., 2008). È stato inoltre dimostrato che il TSP forma una miscela stabile con il KT, caratteristica di grande rilevanza per le proprietà di cui necessitano le formulazioni mediche. I risultati degli studi sopracitati suggeriscono quindi la grande rilevanza del TSP nello sviluppo di nuove formulazioni a rilascio controllato di farmaci, tenendo anche in considerazione le già dimostrate proprietà mucoadesive.

Capitolo 6

Applicazione di sostituti lacrimali a base di TSP nel trattamento dell'occhio secco marginale

6.1. La patologia dell'occhio secco

Il film lacrimale è composto da una struttura a tre strati. Uno strato lipidico esterno dello spessore di $0.1\mu\text{m}$, che ritarda l'evaporazione della componente acquosa sottostante; uno strato acquoso di $7-10\mu\text{m}$ contenente acqua, elettroliti e sostanze organiche a basso peso molecolare; uno strato mucoso interno, ricco di glicoproteine, con uno spessore di $0.02-0.05\mu\text{m}$ (Bucci, 1993). L'instabilità e il deterioramento delle caratteristiche del film lacrimale precorneale determinano alterazioni nella composizione dello stesso con conseguente danno alle cellule epiteliali, spesso associato ad infiltrazione di cellule infiammatorie nei tessuti congiuntivali. Queste alterazioni patologiche della superficie oculare sono indicate col termine di Dry Eye o occhio secco. La Definizione di Dry Eye attualmente riconosciuta a livello internazionale è stata formulata durante il Dry Eye Workshop 2007 (DEWS), in cui tale condizione viene così caratterizzata: *“l'occhio secco è una patologia multifattoriale delle lacrime e della superficie oculare che si manifesta con sintomi di discomfort, disturbo visivo e di instabilità del film lacrimale e che reca potenziale danno alla superficie oculare. È accompagnata da un aumento di osmolarità del film lacrimale e da*

infiammazione della superficie oculare". I dati epidemiologici italiani indicano che il 25% della popolazione soffre di almeno qualche sintomo di occhio secco marginale (Gheller, 2014); è quindi un problema sociale ed in aumento negli ultimi anni.

In particolare tale sindrome può essere suddivisa in due categorie principali:

- Occhio secco da iperevaporazione lacrimale (qualitativo), nel quale le alterazioni qualitative delle tre differenti componenti del film lacrimale inducono fenomeni di instabilità dello stesso, causando di conseguenza un aumento del tasso di evaporazione dell'acqua.
- Occhio secco da iposecrezione lacrimale (quantitativo), nel quale è presente una ridotta produzione delle lacrime da parte delle ghiandole o un'ostruzione al deflusso dei loro prodotti sulla superficie oculare e nel sacco lacrimale (G. Scudieri, 1998).

L'occhio secco marginale è una malattia sintomatica, ed uno dei principali ostacoli per diagnosticare questa patologia sembra essere proprio la mancanza di correlazione tra i sintomi irritativi oculari dei pazienti ed i risultati dei test clinici selezionati per l'occhio secco (Dry Eye Workshop, 2007). La sintomatologia soggettiva è determinata da sensazione di corpo estraneo, gradi variabili di bruciore, sensazione di sabbia, lieve prurito, fotofobia, aumento della frequenza di ammiccamenti e dolore; a questa si associano alcuni segni clinici quali iperemia congiuntivale e sofferenza epiteliale, che può protrarsi sino a vere e proprie lesioni corneali valutabili in lampada a fessura. Nei portatori di lenti a contatto si riscontra inoltre una minor tolleranza all'uso delle lenti, che può associarsi a cheratite puntata.

Per la diagnosi ed il monitoraggio sono quindi indispensabili questionari, quali il McMonnies, che indagano gli aspetti della malattia dell'occhio secco in stadi differenti: dall'esclusiva diagnosi, all'identificazione di fattori che concorrono all'insorgenza ed al peggioramento della malattia stessa. I questionari dovrebbero essere utilizzati in combinazione con misure cliniche oggettive atte a valutare: la colorazione della superficie oculare con coloranti vitali (Rosa Bengala, Verde di lissamina); la stabilità del film lacrimale tramite il tempo di rottura del film

lacrimale (BUT); il flusso lacrimale basale e riflesso grazie all'uso del test di Schirmer; la qualità delle lacrime tramite il ferning test; l'osmolarità lacrimale.

I mezzi terapeutici ritenuti appropriati per la gestione della malattia dell'occhio secco sono diversi: dall'utilizzo di sostituti lacrimali lubrificanti, a sistemi di ritenzione del deflusso lacrimale tramite l'occlusione dei puntini lacrimali; ma anche terapie antinfiammatorie tramite l'utilizzo di tetracicline, ciclosporina o corticosteroidi e stimolazione lacrimale utilizzando secretagoghi, sostanze che stimolano o innescano la secrezione acquosa, mucosa od entrambe (Dry Eye Workshop 2007). Obiettivo di tutti questi trattamenti è il ristabilire una corretta osmolarità lacrimale. È infatti la presenza di un fluido ipertonico a contatto con la superficie oculare che causa sofferenza epiteliale, a cui seguono fenomeni di desquamazione con perdita di microvilli e micropliche epiteliali, degenerazione vacuolare idropica, distrofia ed atrofia cellulare (Scudieri, 1998).

6.2. L'importanza della mucoadesione nei sostituti lacrimali

In tale elaborato viene preso in considerazione il trattamento sintomatico dell'occhio secco marginale che si avvale dell'impiego di sostituti lacrimali mucomimetici e mucoadesivi contenenti, in particolare, TSP.

Già nel 1986 Mararquardt aveva stabilito i requisiti che dovevano possedere le lacrime artificiali (Hopkins, Pearson, 2000):

- Assenza di azione irritante;
- Buona azione lubrificante;
- Assenza di disturbi nella visione;
- Tempo di ritenzione sufficientemente lungo.

La stabilità del film lacrimale dipende dalle sue caratteristiche fisiche e chimiche e dalla sua interazione con epitelio corneale e congiuntivale attraverso le mucine. Cellule caliciformi della congiuntiva e cellule squamose stratificate dell'epitelio corneale e congiuntivale sintetizzano uno spettro di mucine coinvolto negli eventi fisiopatologici che si verificano sulla superficie oculare (Kaufman, 2003). La presenza di uno strato mucoso integro è indispensabile in quanto converte

l'epitelio corneale da superficie idrofobica ad idrofila, protegge gli epiteli dallo sfregamento palpebrale grazie alle sue proprietà viscoelastiche, impedisce l'adesione batterica e consente la distribuzione regolare ed uniforme dello strato lipidico del film lacrimale su quello acquoso, riducendo così la tensione superficiale (Gheller, 2014). Se la produzione di muco è ridotta, per esempio a causa di danni alle cellule caliciformi, la distribuzione dello stesso sulla superficie oculare è compromessa, con conseguente riduzione di contatto tra film lacrimale e superficie oculare, perdita di stabilità del film e formazione di dry spot (Sharma, Ruckenstein, 1985).

È stato osservato che molti pazienti affetti da occhio secco presentano un deficit mucinico (Hopkins, Pearson, 2000); ne consegue che l'efficacia sintomatologica di un sostituto lacrimale è strettamente correlata alla capacità di questo di permanere sulla superficie oculare, e quindi alle sue caratteristiche mucomimetiche e mucoadesive.

6.3. Performance e tollerabilità dei sostituti lacrimali a base di TSP

Al fine del raggiungimento dello scopo sopra esposto, le aziende farmaceutiche si sono mosse verso la realizzazione di un sostituto lacrimale il più possibile simile alle lacrime naturali, il cui obiettivo fosse migliorare la stabilità del film lacrimale, ristabilire il normale equilibrio omeostatico tra superficie oculare e film lacrimale e proteggere la superficie oculare mantenendola umida e lubrificandola, migliorando di conseguenza il comfort oculare del paziente.

Presso i laboratori di un'azienda pisana è stato formulato, studiato e brevettato un sostituto lacrimale di nuova generazione contenente un polisaccaride purificato ottenuto dai semi dell'albero *Tamarindus indica* L., denominato TSP. Questo si è dimostrato essere efficace, per tempi prolungati ed in assenza di effetti collaterali, nel trattamento dell'occhio secco (Favilla, 2010).

La soluzione di TS-Polisaccaride, realizzata sotto forma di collirio, è stata studiata nelle formulazioni oftalmiche 1%, 0,5% e 0,2% e si è dimostrata possedere un comportamento reologico pseudo-plastico, caratteristica posseduta anche dalle

lacrime naturali, che rende il polimero idoneo a essere impiegato come sostituto lacrimale mucomimetico (Favilla, 2010).

Altra proprietà necessaria affinché una lacrima artificiale possa essere definita mucomimetica è la capacità di cristallizzare a forma di felce; l'esame per valutare questa caratteristica è detto "ferning test", o test della felcizzazione, ed basato sulla proprietà del muco di cristallizzare in forma di felce. Nelle lacrime naturali questo tipo di test serve per la valutazione dello strato mucoso. Dopo prelievo, un campione di lacrime viene posto su vetrino, lasciato asciugare a temperatura ambiente e poi osservato all'esame microscopico; migliore è l'equilibrio tra le concentrazioni di elettroliti e mucine, tanto più fitta è l'arborizzazione del film lacrimale (Rossetti, Gheller, 2003).

Negli anni sono stati effettuati vari studi per indagare le proprietà di felcizzazione dei sostituti lacrimali e si è osservato che, basandosi sui risultati del ferning test, non tutti i prodotti in commercio possono esprimere proprietà mucomimetiche. La felcizzazione dei sostituti lacrimali infatti, quando presente, non è risultata essere così strutturata da essere sovrapponibile, come tipizzazione, a quella delle lacrime naturali.

Il primo sostituto lacrimale che si è avvicinato alla struttura a felce delle lacrime naturali è stato l'acido ialuronico alla concentrazione di 0,4%. Attualmente, come dimostrato da uno studio eseguito da Mannucci et al., il TSP è stato l'unico a evidenziare, alle diverse concentrazioni presenti nelle formulazioni oftalmiche studiate, la capacità di cristallizzare in una struttura organizzata molto simile a quella delle lacrime naturali (Mannucci et al, 2004) (Figura 6.1).

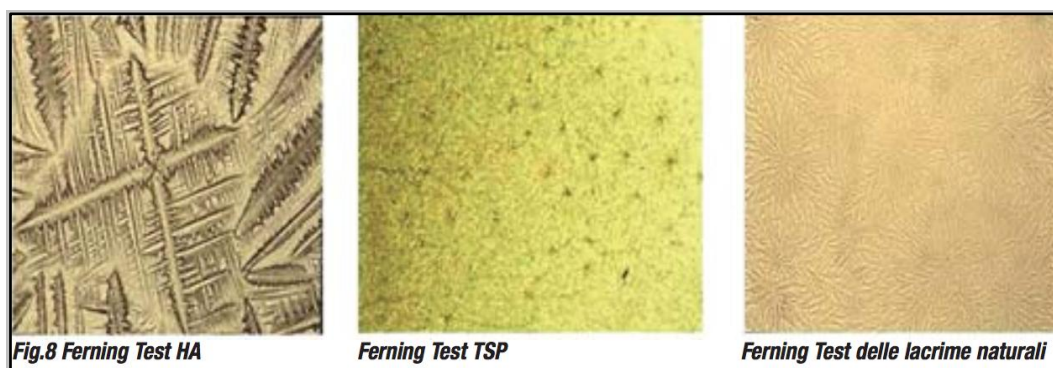


Figura 6.1 – Confronto di immagini al microscopio della felcizzazione di HA, TSP e lacrime naturali, (Favilla, 2010).

È stato quindi suggerito che le analogie della struttura del TSP alle mucine endogene possano permettergli di aderire alle cellule della superficie oculare per periodi più prolungati, anche in assenza di microvilli e micropliche epiteliali, favorendo così il ripristino della fisiologica protezione della superficie oculare stessa e garantendo un prolungato sollievo dai sintomi dell'occhio secco (Sahoo Soumendra et al., 2010).

A conferma di ciò, la letteratura riporta uno studio di Burgalassi et al., in cui diversi polimeri sono stati esaminati come possibili sostituti lacrimali per la sindrome dell'occhio secco marginale indotta in conigli albinici tramite solfato di atropina 1%. La valutazione clinica si è basata sul test di Schirmer I e sui segni di staining corneale dopo instillazione di fluorescina. Lo studio ha dimostrato che la gomma di tamarindo offre risultati migliori rispetto allo ialuronato di sodio, all'idrossipropilmetilcellulosa e al sodio poliacrilato (Burgalassi et al., 1999).

Le ricerche effettuate fino ad oggi suggeriscono che il TSP può avere alcuni vantaggi, in particolar modo rispetto all'acido ialuronico, per quanto concerne tempi di ritenzione oculare, proprietà di guarigione nei confronti di ferite oculari e sollievo dai sintomi dell'occhio secco marginale (Mannucci et al., 2000).

Ad avvalorare tale tesi vi è anche uno studio di Rolando e Valante in cui è stata posta a confronto l'attività del TSP 0,5% ed 1% rispetto all'attività dell'HA 0,2%, già presente sul mercato (Hyalistil™).

L'obiettivo primario di questo studio è stato quello di valutare la tollerabilità della somministrazione topica oculare del TSP in pazienti con occhio secco marginale. Questa è stata stimata utilizzando i dati relativi all'insorgenza di eventi avversi e tramite il questionario specifico VAS di tollerabilità, che ha valutato visione offuscata, arrossamento oculare, bruciore oculare e prurito oculare. Obiettivi secondari dello studio riguardavano la determinazione del miglioramento della stabilità del film lacrimale tramite break-up time e la stima di eventuali cambiamenti nei sintomi soggettivi, nella colorazione corneale e congiuntivale, nella pressione intraoculare e nel numero di instillazioni giornaliere necessarie.

In termini di tollerabilità, dal questionario VAS è emerso che, per tutta la durata dello studio, non sono insorti ulteriori sintomi, oltre a quelli già presenti a causa della sintomatologia da secchezza oculare. Inoltre, non è stata riportata

l'insorgenza di alcun evento avverso (Rolando, Valante, 2007); ciò conferma l'idoneità, sia del TSP che dell'HA, all'uso come sostituti lacrimali nel trattamento dell'occhio secco, anche per regimi di somministrazione elevati.

I sintomi soggettivi sono migliorati in tutti i gruppi di trattamento; tuttavia, sono emerse alcune differenze significative tra i due gruppi (Tabella IV).

Tabella IV – Variazioni dei sintomi soggettivi nei tre gruppi di trattamento (TSP 0,5%, TSP 1%, HA 0,2%) dello studio clinico “*Establishing the tolerability and performance of tamarind seed polysaccharide (TSP) in treating dry eye syndrome: results of a clinical study*”, (Rolando, Valante, 2007).

	Blinking trouble*	Ocular burning**	Sensation of foreign body***	Sensation of lachrymation°	Ocular fatigue/load sensation°	Wish to keep eyes shut°	Photophobia°
0.5% TSP (n = 11)							
Baseline Mean (SD)	81.55 (27.62)	86.09 (14.49)	89.64 (9.06)	8.64 (28.64)	25.45 (43.69)	31.45 (45.23)	8.82 (29.25)
Visit 5 (day 90) Mean (SD)	38.00 (22.46)	43.45 (13.92)	36.82 (15.42)	4.55 (15.08)	15.73 (27.38)	16.27 (24.69)	4.73 (15.68)
1% TSP (n = 10)							
Baseline Mean (SD)	81.20 (31.93)	93.00 (8.62)	90.50 (9.64)	9.50 (30.04)	9.70 (30.67)	40.60 (45.74)	14.70 (32.76)
Visit 5 (day 90) Mean (SD)	16.50 (16.21)	22.30 (13.70)	16.60 (16.79)	4.40 (13.91)	3.20 (10.12)	5.90 (10.35)	1.20 (3.79)
0.2% HA (n = 9)							
Baseline Mean (SD)	63.22 (40.39)	78.78 (30.76)	72.00 (31.08)	0.00 (0.00)	10.78 (32.33)	59.67 (45.17)	25.00 (38.98)
Visit 5 (day 90) Mean (SD)	40.67 (28.27)	50.44 (22.11)	42.78 (29.47)	0.00 (0.00)	9.33 (21.29)	28.67 (35.12)	12.44 (24.00)
* TSP 1% vs. HA 0.2%; p < 0.05							
** TSP 1% vs. HA 0.2%; p < 0.05, TSP 1% vs. TSP 0.5%; p < 0.05							
*** TSP 1% vs. HA 0.2%; p < 0.05							
° p = NS							

Il TSP 1% ha mostrato vantaggi rispetto all'HA per quanto riguarda il miglioramento dei sintomi legati ai problemi di ammiccamento, bruciore oculare, fotofobia e sensazione di corpo estraneo; risultati che suggeriscono i benefici d'uso di tale formulazione rispetto all'HA. Non sono invece emerse elevate differenze nelle misurazioni cliniche, fatta eccezione per quanto concerne il BUT, i cui valori medi sono aumentati in modo statisticamente significativo in tutti e tre i gruppi, ma maggiormente nei pazienti trattati con il TSP. Un miglioramento di tale parametro, non solo può produrre un beneficio in termini di risoluzione dei sintomi, ma può anche portare all'interruzione del ciclo di instabilità film lacrimale/danno epiteliale, che causa ed aggrava la sindrome dell'occhio secco marginale (Rolando, Valante, 2007).

Infine, sia per quanto concerne il danno corneale che congiuntivale, in tutti e tre i gruppi di trattamento, c'è stata una diminuzione statisticamente significativa nel punteggio totale della colorazione tra il valore al baseline e la visita finale. Ciò

sottintende un miglioramento generale della salute della superficie oculare ed una riorganizzazione del film lacrimale sulla superficie oculare nei soggetti con occhio secco, con il conseguente ripristino dell'effetto protettivo delle mucine (Dry Eye Workshop 2007).

A suggerire un effetto riorganizzante del film lacrimale da parte del TSP vi è anche uno studio di Linsay et al. in cui, tramite scintigrafia, sono stati valutati i tempi di permanenza precorneale di diverse concentrazioni di TSP (0,5%, 1,0% e 2,0%) e HA 0,4% su pazienti con lieve o moderato occhio secco. È emerso che, mentre il TSP 0,5% possiede un profilo comparabile con HA 0,4%, le formulazioni di TSP 1% e il 2% hanno una maggiore ritenzione rispetto all'HA 0,4% (Rolando, Valante, 2007).

Un altro studio a sostegno della possibilità di utilizzare il TSP come sostituto lacrimale è stato eseguito da Jacobi et al. In esso è stata confrontata la sicurezza e l'efficacia nel trattamento di moderata cheratocongiuntivite secca di due colliri lubrificanti per la superficie oculare: gocce oculari di idrossipropil (HP)-Guar privo di conservanti (Systane UD (®)) e gocce oculari di TSP 1% (VISINE INTENSIV 1% EDO (®)). Dopo 3 mesi di trattamento, i pazienti di entrambi i gruppi hanno mostrato un beneficio soggettivo nel sollievo dai sintomi da occhio secco, valutato tramite i punteggi ottenuti dall'OSDI (Ocular Surface Disease Index). I soggetti trattati con HP-Guar e TSP hanno inoltre mostrato miglioramenti nella stabilità del film lacrimale, misurata tramite BUT (Jacobi et al., 2012). In questo caso però l'HP-Guar, presentando un miglioramento statisticamente significativo del BUT, è risultato essere leggermente più efficace nella protezione della superficie oculare rispetto al TSP, diminuendo l'evaporazione del film lacrimale.

Per concludere, prendendo in considerazione il trattamento della sindrome dell'occhio secco marginale, che richiede una terapia continua, bisogna tenere conto delle possibili reazioni avverse. Queste possono insorgere non solo nei riguardi dei conservanti, ma anche dei vari principi attivi contenuti nei colliri, a seguito di un uso cronico degli stessi. Se da un lato, da quanto trattato precedentemente, emerge che il TSP non causa l'insorgenza di eventi avversi, dall'altro lato gli studi effettuati finora non si sono protratti per periodi superiori

ai tre mesi e non ve ne sono di specifici che riguardano soluzioni di TSP con conservanti. Tale elaborato si limita quindi a citare lo studio di Iester et al. relativo all'uso di TSP 0,5% per proteggere la superficie oculare dall'azione tossica derivante dalla somministrazione, in pazienti glaucomatosi, di prostaglandine con benzalconio cloruro come conservante. Dopo tre mesi di trattamento con TSP 0,5% l'iperemia congiuntivale causata dal trattamento in corso si è ridotta, vi sono stati miglioramenti statisticamente significativi per quanto concerne BUT e Schirmer test, oltre che un cospicuo aumento delle cellule caliciformi congiuntivali (Iester et al., 2014).

A fronte di questi risultati, riportati dalla letteratura corrente, l'uso di sostituti lacrimali a base di TSP pare una delle scelte migliori oggi disponibili per il raggiungimento ed il mantenimento di una superficie oculare integra.

6.4. Sinergia tra TSP e HA, formazione di un innovativo copolimero

Vi sono stati studi che, invece di porre a confronto TSP e HA, hanno valutato l'azione sinergica che questi due polimeri potevano sviluppare all'interno di un sostituto lacrimale, sfruttabile anch'esso per il trattamento dell'occhio secco. La loro associazione è stato dimostrato generare una nuova entità supramolecolare, un copolimero dalle proprietà mucomimetiche potenziate rispetto alle molecole di partenza e caratterizzato da una grande affinità per le molecole d'acqua. Le peculiari caratteristiche di questo copolimero sono verosimilmente alla base della sua capacità di stabilizzare il film lacrimale (Versura, 2010).

L'acido ialuronico è un polisaccaride ionico il cui impiego per formulazioni di idrogel in campo biomedico è fortemente promosso ormai da tempo. I principali inconvenienti riguardanti le formulazioni di HA disponibili in commercio sono la bassa stabilità e la veloce degradabilità (Uccello-Barretta et al., 2013). Il TSP possiede invece proprietà mucoadesive e mucomimetiche ed è stata dimostrata la sua capacità di generare interazioni inter-catena con l'acido ialuronico che portano alla formazione di aggregati di TSP e HA, sfruttabili per sviluppare nuove formulazioni oftalmiche (Uccello-Barretta et al., 2010). I ricercatori sopracitati

hanno infatti svolto uno studio con lo scopo di determinare la possibilità di creare tale copolimero ed ottimizzare la composizione della formulazione al fine di incrementarne le proprietà mucoadesive. Per indagare l'interazione tra mucine e polisaccaridi si sono avvalsi della spettroscopia tramite risonanza magnetica nucleare (NMR), impiegando come sonda di interazione un farmaco avente elevata affinità con le mucine. L'interazione del polisaccaride con le mucine avrebbe perturbato l'affinità farmaco-mucina e, di conseguenza, modificato i parametri della NMR del farmaco. Sono state così dimostrate le superiori proprietà mucoadesive delle miscele TSP/HA rispetto al singolo impiego dei polisaccaridi. In particolare, il rapporto TSP/HA di circa 3/2 è risultato critico per la formazione di aggregati stabili supramolecolari (Uccello-Barretta, 2010).

La miscela di TSP/HA con rapporto 3/2, stabilizzata da interazioni non-covalenti, si è dimostrata soddisfare i requisiti richiesti ad un veicolo oftalmico liquido, quali una buona tollerabilità oculare e mucoadesività, accompagnata da relativamente bassa viscosità. La mucoadesività di questa miscela, in particolare, è maggiore di quella di ciascuno dei singoli polimeri e delle miscele TSP/HA di diversa composizione. Proprio in virtù di tale caratteristica, la formulazione TSP/HA (3/2) ha mostrato la capacità di stabilizzare il film lacrimale e di resistere più a lungo all'eliminazione da parte del sistema di drenaggio lacrimale. Viene così prolungata la residenza, sulla superficie oculare dei conigli in studio, anche dei farmaci utilizzati nell'indagine stessa (Uccello-Barretta, 2010). Uno studio successivo del medesimo autore ha confermato la capacità del TSP di generare interazioni non covalenti stabili con HA. Tuttavia, è emerso che è necessaria la concentrazione minima di 1,5 mg/mL di ciascun polisaccaride per garantire la formazione di un aggregato supramolecolare stabile, dotato di rilevabili proprietà mucoadesive ed all'interno del quale sia verificata una reciproca interazione sinergica, sfruttabile per lo sviluppo di nuove formulazioni oftalmiche (Uccello-Barretta et al., 2013). Ciò è probabilmente dovuto al fatto che l'acido ialuronico è un polimero ionico, le cui proprietà di aggregazione sono fortemente influenzate da fattori elettrostatici.

Ancor più recentemente, a sostegno dell'ipotesi di utilizzare una formulazione di TSP e HA per trattare la sintomatologia da occhio secco, vi sono i risultati dello

studio che Barabino et al. hanno effettuato su 49 soggetti con moderato occhio secco. Dopo tre mesi di trattamento con un sostituto lacrimale contenente una miscela di TSP e HA, si sono infatti osservati miglioramenti nei risultati dell'OSDI rispetto al baseline, una riduzione del BUT e delle lesioni oculari, oltre che un miglioramento statisticamente significativo dei sintomi soggettivi dovuti all'occhio secco marginale (Barabino S. et al., 2014).

6.5. Efficacia del TSP nel trattamento del discomfort all'uso delle lenti a contatto

Come riportato già nel precedente capitolo 4, il discomfort che colpisce molti portatori di lenti a contatto, e che è spesso causa dell'interruzione del porto delle lenti stesse, è multifattoriale. I fattori che lo determinano sono l'aumento di evaporazione del film lacrimale, l'ipoestesia, con conseguente riduzione di produzione di lacrime e concomitante aumento di osmolarità, e l'infiammazione. Ecco quindi nuovamente che la stabilità del film lacrimale diviene il fattore fondamentale per un buon comfort del portatore e l'instillazione di sostituti lacrimali un mezzo per ottenerlo. Una maggior compliance da parte dei pazienti può essere ottenuta cercando di stabilizzare le interfacce lente/film lacrimale/epitelio corneale tramite sostituti lacrimali mucoadesivi, che garantiscano un maggior tempo di ritenzione sulla superficie oculare. In particolare, è risultato valido per tale scopo un innovativo sostituto lacrimale ipo-osmolare, senza conservanti, già disponibile in commercio in Italia (Xiloial® colliri, Farmigea, Pisa, Italia), formulato per rafforzare le proprietà sinergiche di HA e TSP (Versura et al., 2010).

Nello studio effettuato, i pazienti affetti da lieve sofferenza della superficie oculare sono stati trattati per due mesi con instillazioni di Xiloial monodose. I benefici ottenuti sono mostrati in Tabella V.

Tabella V – Sommario dei risultati relativi allo studio “*Efficacy of two-month treatment with Xiloial® eyedrops for discomfort from disposable soft contact lenses*”, (Versura et al., 2010).

Parameter*	Screening visit	Baseline	30 days	60 days	Level of significance P < 0.05
OSDI	20.20 ± 1.66	20.20 ± 1.78	14.40 ± 2.97	8.5 ± 3.00	P < 0.05 (Friedman test)
TFBUT	7.07 ± 1.03	7.07 ± 0.80	8.20 ± 0.77	9.60 ± 1.12	P < 0.05 (Friedman test)
Oxford grading	3.67 ± 0.82	3.67 ± 0.82	2.07 ± 0.96	0.53 ± 0.64	P < 0.05 (Friedman test)
Ferning test	–	2.4 ± 0.47	–	2.03 ± 0.13	P < 0.05 (Wilcoxon test)
Schirmer test I	12 ± 2.10	13 ± 2.36	13.93 ± 1.91	14.60 ± 1.06	P < 0.05 (Friedman test)
Exudated serum albumin	–	0.354 ± 0.06	–	0.356 ± 0.03	NS (Wilcoxon test)

Note: *Mean ± standard deviation.
Abbreviations: OSDI, Ocular Surface Disease Index; TFBUT, tear film break-up time; NS, not significant.

Oltre ad un'evoluzione in positivo dei sintomi soggettivi, si è ottenuto un aumento statisticamente significativo del BUT, la cui riduzione è invece riconosciuta come un'importante effetto collaterale del porto delle lenti.

Degno di attenzione è anche il riscontro di un miglioramento nei confronti dei danni relativi alla superficie oculare, se si considera che l'integrità epiteliale è stata ripristinata nonostante il continuo porto di lenti a contatto. Queste osservazioni supportano l'azione mucomimetica dello Xiloial ed il ruolo protettivo del TSP come polimero che si interpone tra l'epitelio corneale e la lente a contatto (Versura et al., 2010). Ugualmente interessante è il fatto che il prodotto, somministrato con la lente indossata, non interagisce col materiale della lente stessa.

Anche Bux et al. hanno effettuato una ricerca per indagare le potenzialità del TSP in tale ambito. Nello studio sono stati comparati due diversi sostituti lacrimali, uno a base di HA 0,4% e l'altro a base di TSP 1%, su portatori di lenti a contatto che presentavano un film lacrimale alterato. Dopo sei mesi di monitoraggio, vista la riduzione della frequenza di ammiccamento ed il miglioramento dei sintomi soggettivi, si evince che entrambi i sostituti lacrimali hanno avuto una buona efficacia nel trattamento della secchezza oculare nei portatori di lenti a contatto in esame. Il TSP risulta però più incisivo nei cambiamenti ottenuti. Per tutti i pazienti che lo hanno utilizzato sono state sufficienti tre somministrazioni giornaliere, a differenza che per i pazienti trattati con HA (Bux et al., 2000).

Questo risultato si ritiene essere dovuto al maggior tempo di ritenzione del TSP sui tessuti oculari, evento reso possibile dalle sue proprietà bioadesive e mucoadesive. Sia il TSP che l'HA sono inoltre riusciti a portare miglioramenti nelle lesioni epiteliali corneo-congiuntivali. Queste evidenze sono riconducibili, da un lato all'HA che si comporta come induttore di fibronectina, dall'altro al TSP che ha mostrato la capacità di stimolare la proliferazione dei cheratociti e di favorire l'adesione cellulare in presenza di laminina (Bux et al., 2000). Tuttavia, l'incremento del tempo giornaliero di porto delle lenti è stato più cospicuo applicando il TSP, superando le 7 ore di porto, e ha fatto quindi supporre una maggior efficacia del TSP. I risultati ottenuti sono stati attribuiti dai ricercatori alla particolare conformazione "mucin like" del polisaccaride; questa consente il legame tra le glicoproteine dello strato mucoso ed il film lacrimale, favorendo una distribuzione uniforme del prodotto ed aumentandone la permanenza sulla superficie oculare rispetto agli altri sostituti lacrimali.

Per le motivazioni e gli studi sopraesposti, appaiono quindi evidenti i vantaggi derivanti dall'applicazione di questo sostituto lacrimale di ultima generazione anche nei portatori di lenti a contatto.

Valutazioni conclusive

La sindrome dell'occhio secco marginale è una problematica molto diffusa, e troppo spesso sottovalutata. Già nel 1995, il workshop NEI/Industry aveva ampiamente definito l'occhio secco come *“un disordine del film lacrimale dovuto al deficit lacrimale o all'eccessiva evaporazione lacrimale che causa un danno alla superficie oculare interpallebrale associato a sintomi di discomfort oculare”* (Dry Eye Workshop 2007).

Ad oggi vi è la consapevolezza che ci sono molteplici cause e co-fattori che concorrono all'insorgenza ed all'aggravarsi di tale condizione che, se non trattata adeguatamente, può avere conseguenze importanti a livello oculare. Un confronto dei dati specifici dell'età sulla prevalenza dell'occhio secco con ampi studi epidemiologici ha rivelato una variabilità che va dal 5% a più del 35% nelle varie fasce di età (Dry Eye Workshop 2007). Tali percentuali aumentano se si considera che tale condizione, spesso borderline, si manifesta a seguito del porto di lenti a contatto. La necessità di porre rimedio a questa problematica è quindi evidente.

In questo elaborato si è voluto mostrare come anche la fitoterapia, nello specifico attraverso l'impiego del *Tamarindus indica*, si sia evoluta allo scopo di individuare prodotti erboristici utili a fornire un approccio terapeutico complementare ed alternativo alla medicina tradizionale.

Il TSP, polisaccaride di origine naturale estratto dai semi del *Tamarindus indica*, ha mostrato caratteristiche analoghe al film lacrimale, cristallizzando con una struttura a felce che risulta sovrapponibile, come tipizzazione, a quella delle lacrime naturali. Le soluzioni oculari che lo contengono presentano inoltre un comportamento reologico pseudoplastico ed una buona viscosità e mucoadesività, proprietà che consentono al prodotto di rimanere per un tempo più prolungato

sulla superficie oculare, permettendo una minor frequenza di instillazioni giornaliere ed una maggior protezione dell'epitelio corneale.

Oltre che come sostituto lacrimale, il TSP ha dimostrato buone capacità di rigenerazione delle ferite oculari, mostrando un tasso di guarigione delle lesioni maggiore di quello misurato con l'uso di formulazioni contenenti altri polimeri.

Dagli articoli trovati in letteratura, e precedentemente discussi, si evince inoltre che il TSP può essere ritenuto un ottimo veicolo per la somministrazione di farmaci a rilascio prolungato, consentendo il raggiungimento di concentrazioni elevate di antibiotici nei diversi distretti oculari ed al contempo determinando un basso assorbimento sistemico del farmaco stesso.

Dagli studi finora effettuati non sono inoltre stati rilevati effetti tossici del TSP, né reazioni di sensibilizzazione a seguito del suo utilizzo; tuttavia gli studi riportati in letteratura non si sono protratti per più di tre mesi. Ritengo quindi doveroso effettuare ulteriori indagini per offrire una maggior sicurezza a coloro che intraprendono terapie che necessitano di regimi di somministrazione elevati e continui di colliri contenenti TSP, come ad esempio pazienti affetti da glaucoma, in cui il TSP può essere veicolo della formulazione, o da occhio secco marginale, in cui il TSP diviene invece principio attivo fondamentale per il trattamento.

Nell'elaborato è stato anche mostrato come il TSP, insieme all'HA, possa svolgere un ruolo importante come polimero inserito all'interno del materiale plastico di una lente a contatto. La sinergia tra TSP e HA si è dimostrata valida nel favorire il ristabilirsi delle fisiologiche condizioni oculari, che possono essere perturbate dalla presenza della lente stessa sulla cornea. Il progressivo rilascio di sostanze bio-attive e l'ottimale viscosità della formulazione garantiscono infatti una lubrificazione costante durante il porto ed il ripristino di un equilibrato rapporto lente a contatto/film lacrimale.

La prospettiva per l'avvenire quindi, ritenendo l'ambito della fitoterapia un campo di interesse ed a cui vorrò continuare ad dedicarmi, è di ampliare e migliorare le ricerche riguardo le vantaggiose proprietà che questo polisaccaride ha dimostrato possedere nei riguardi delle formulazioni di preparati ad uso oftalmico.

Grazie alla vista l'uomo ha costruito il sapere e le conoscenze, ne consegue che la cura dei nostri occhi non va trascurata, richiede bensì un'attenzione particolare.

Bibliografia

1. Barabino S, Rolando M, Nardi M, Bonini S, Aragona P, Traverso C E (2014), *The effect of an artificial tear combining hyaluronic acid and tamarind seeds polysaccharide in patients with moderate dry eye syndrome: a new treatment for dry eye*, European Journal of Ophthalmology, 24(2):173-8.
2. Benigni R, Capra C, Cantorini P E, *Piante medicinali chimica farmacologia e terapia*, II volume, INVERNI & DELLA BEFFA, Milano.
3. Bucci M G (1993), *Oftalmologia*, Società Editrice Universo, Roma, Cap 6, pp.86,87.
4. Burgalassi S, Panichi L, Chetoni P, Saettone M F, Boldrini E (1999) *Development of simple dry eye model in the albino rabbit and evaluation of some tear substitutes*, Ophthalmic Res. 31:229–235.
5. Burgalassi S, Raimondi L, Pirisino R, Banchelli G, Boldrini E, Saettone M F (2000), *Effect of xyloglucan (tamarind seed polysaccharide) on conjunctiva cell adhesion to laminin and on corneal epithelium wound healing*, Eur. J. Ophthalmol. 10:71–76.
6. Burgalassi S, Nicosia N, Monti D, Falcone G, Boldrini E, Chetoni P (2007), *Larch arabinogalactan for dry eye protection and treatment of corneal lesions: Investigation in rabbits*, Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, 23(6):541–549.
7. Campanini Enrica (2003), *Dizionario di fitoterapia e piante medicinali, Tecniche nuove*, pp.479,480.

8. Dick B, Schwenn O, Pfeiffer N (1999), *Classification of viscoelastic substances for ophthalmologic surgery*, Ophthalmologie 96: 193-211.
9. Fagnola M, Pagani M P, Maffioletti S, Tavazzi S, Papagni A (2010), *L'ACIDO IALURONICO E LE SUE APPLICAZIONI IN CONTATTOLOGIA*; Lenti a contatto, 12 (2): 45-52.
10. Favilla M G (2010), *Tamarindud indica L. TS-Polisaccaride nel trattamento del dry eye*, Fitoterapia, pp.28-34.
11. Ghelardi E, Tavanti A, Celandroni F, Lupetti A, Blandizzi C, Boldrini E, Campa M, Senesi S (2000), *Effect of a novel mucoadhesive polysaccharide obtained from tamarind seeds on the intraocular penetration of gentamicin and ofloxacin in rabbits*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 46:831–834.
12. Ghelardi E, Tavanti A, Davini P, Celandroni F, Salvetti S, Parisio E, Boldrini E, Senesi S, Campa M (2004), *A Mucoadhesive Polymer Extracted from Tamarind Seed Improves the Intraocular Penetration and Efficacy of Rufloxacin in Topical Treatment of Experimental Bacterial Keratitis*, ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Sept. 2004, pp. 3396–3401.
13. Gheller (2014), appunti di contattologia II.
14. Giacchetti D, Monti L (2005), *Piante medicinali in fitoterapia*, Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, 41(1):17-22.
15. Hopkins Graham, Pearson Richard (2000), *FARMACI OFTALMICI Usi Diagnostici e Terapeutici*, IV Ed. italiana a cura di Filippo Drago, PICCIN, Padova, pp. 63,64; 185.
16. Iester M, Oddone F, Fogagnolo P, Frezzotti P, Figus M (2014), *Changes in the morphological and functional patterns of the ocular surface in patients treated with prostaglandin analogues after the use of TSP 0.5%® preservative-free eyedrops: a prospective, multicenter study*, Ophthalmic Res, 51(3):146-52.
17. Jacobi C, Kruse F E, Cursiefen C (2012), *Prospective, randomized, controlled comparison of SYSTANE UD eye drops versus VISINE*

INTENSIV 1% EDO eye drops for the treatment of moderate dry eye, 28(6):598-603.

18. Joseph J, Kanchalochana SN, Rajalakshmi G, Hari V, Durai RD (2012), *Tamarind seed polysaccharide: A promising natural excipient for pharmaceuticals*, Int J Green Pharm, 6:270-8.
19. Kaufman Paul L, Alm Albert (2003), *Adler's physiology of the eye*, Elsevier, decima edizione, p. 32.
20. Kumar R, Patil SR, Patil MB, Paschapur MS, Mahalaxmi R. (2001), *Isolation and evaluation of the emulsifying properties of tamarind seed polysaccharide on castor oil emulsion*, Scholars Research Library, Der Pharmacia Lettre, 2:518-27.
21. Mannucci L L, Fregona I, Di Gennaro A (2000), *Use of a new lachrymal substitute (TS-Polysaccharide) in Contactology*, J Med Contactology and Low Vision, 1(1): 6–9.
22. Mannucci L L, Fregona I, Mannucci A (2004), *Aspetti della cristallizzazione di differenti sostituti lacrimali in uso in Contattologia*, EuVision Superficie Oculare, 1(04):6-11.
23. Pinar Kuri (2014), *Tamarind indica and its health related effects*, Asian Pac J Trop Biomed, 4(9): 676-681.
24. Raimondi L, Sgromo G, Banchelli R, Corti I, Pirisino R, Boldrini E (2000), *A new viscosity enhancer for ophthalmic preparations devoid of toxicity for human conjunctiva cells*, Cutaneous and Ocular Toxicology, 19(1): 31–42.
25. Raimondi L, Lodovici M, Guglielmi F, Banchelli G, Ciuffi M, Boldrini E, Pirisino R (2003), *The polysaccharide from Tamarindus indica (TS-polysaccharide) protects cultured corneal-derived cells (SIRC cells) from ultraviolet rays*, Journal of Pharmacy and pharmacology, 55: 333-338.
26. Rolando Maurizio, Valente Cristina (2007), *Establishing the tolerability and performance of tamarind seed polysaccharide (TSP) in treating dry eye syndrome: results of a clinical study* , BMC Ophthalmology 2007, 7:5.
27. Rossetti A, Gheller P (2003), *Manuale di optometria e contattologia*,

- Seconda edizione, Zanichelli, Bologna, p.385.
28. Safilens (2011), *Lente safegel fusion 7 days La rivoluzione 7 days*, Professional Optometry, pagina 82.
 29. Sano M, Miyata E, Tamano S, Hagiwara A, Ito N, Shirai T (1996), *Lack of carcinogenicity of tamarind seed, polysaccharide*, in B6C3F1 mice. Food Chem Toxicol, 34: 463-7.
 30. Santosh Singh Bhadoriya, Aditya Ganeshpurkar, Jitendra Narwaria, Gopal Rai, Alok Pal JainI (2011), *Tamarindus indica : Extent of explored potential*, Pharmacogn Rev., 5(9): 73–81.
 31. Scudieri Giuseppe (1998), *La cornea*, Masson s.p.a., Milano, pp. 170,171.
 32. Sharma A, Ruckenstein E (1985), *Mechanism of tear film rupture and its implications for contact lens tolerance*, American journal of optometry and physiological optics, 62:246-253.
 33. Soumendra Sahoo, Rashmirekha Sahoo, Padma Lochan. Nayak (2010), *Tamarind Seed Polysachharide: A Versatile Biopolymer For Mucoadhesive Applications*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences (JPBMS), Vol. 08, Issue 08.
 34. Uccello-Barretta G, Nazzi S, Balzano F, Di Colo G, Zambito Y, Zaino C, Sansò M, Salvadori E, Benvenuti M (2008), *Enhanced affinity of ketotifen towards tamarind-seed polysaccharide in comparison with hydroxyethylcellulose and hyaluronic acid: A nuclear magnetic resonance investigation*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 16(15): 7371–7376.
 35. Uccello-Barretta G, Nazzi S, Zambito Y, Di Colo G, Balzano F, Sansò F (2010), *Synergistic interaction between TS-polysaccharide and hyaluronic acid: Implications in the formulation of eye drops*, International Journal of Pharmaceutics 395, 122-131.
 36. Uccello-Barretta G, Balzano F, Vanni L, Sansò M (2013), *Mucoadhesive properties of tamarind-seed polysaccharide/hyaluronic acid mixtures: A nuclear magnetic resonance spectroscopy investigation*, Carbohydrate Polymers 91, 568–572.
 37. Versura P, Profazio V, Balducci N, Campos E (2010), *Efficacy of two-*

month treatment with Xiloial® eyedrops for discomfort from disposable soft contact lenses, *Clinical Ophthalmology*, 4: 1035–1041.

38. Weiss R F (1996), *Trattato di fitoterapia*, edizione APOIRE, Roma, pp. 21-48.
39. 2007 *Report of the International Dry Eye WorkShop (DEWS)*, April 2007, vol. 5 N° 2, *The Epidemiology of Dry Eye Disease* , 93-107.
40. 2007 *Report of the International Dry Eye WorkShop (DEWS)*, April 2007, vol. 5 N° 2, *Management and Therapy of Dry Eye Disease*, 163-178.

Sitografia

1. Bux A V, Scalinci S Z, Scorolli L, Morara M C, Meduri R (2000), *Comparison between two artificial tear substitutes in contact lenses wearing*, ARTICOLI SCIENTIFICI, ATO 4-8, alla pagina web: [http://www.farmigea.it/upload/media/2702\(1\).pdf](http://www.farmigea.it/upload/media/2702(1).pdf), (ultima consultazione il 28 ottobre 2015).
2. Orwa (2009), *Tamarindus indica*, in Agroforestry Database 4.0, 1-4, alla pagina web: http://www.worldagroforestry.org/treedb/AFTPDFS/Tamarindus_indica.PDF, (ultima consultazione il 17 ottobre 2015).
3. Oteri Alessandro (2007), *Fitoterapici utili nei disturbi oculari*, Unione Tecnica Italiana Farmacisti, aggiornamento farmacisti, alla pagina web: http://www.utifar.it/uploads/model_5/fitoterapici_utili_nei_disturbi_oculari.pdf (ultima consultazione il 4 novembre 2015).
4. http://www.greenpharmacy.info/viewimage.asp?img=IntJGreenPharm_2012_6_4_270_108205_f4.jpg (ultima consultazione 19 ottobre 2015).
5. http://www.greenpharmacy.info/viewimage.asp?img=IntJGreenPharm_2012_6_4_270_108205_t2.jpg (ultima consultazione 13 ottobre 2015).
6. <http://www.kew.org/science-conservation/plants-fungi/tamarindus-indica-tamarind> (ultima consultazione il 7 novembre 2015).
7. <http://www.ntbg.org/plants/imageonly.php?rid=838&plantid=10971> (ultima consultazione il 7 novembre 2015).

8. <http://www.nutrition-and-you.com/tamarind.html> (ultima consultazione il 6 novembre 2015).
9. http://www.tramil.net/fototeca/imageDisplay.php?id_elem=344&famil=FABACEAE&lang=en (ultima consultazione il 7 novembre 2015).