



*Università degli Studi di Firenze*

*Facoltà di Farmacia*

*Dipartimento di Scienze Farmaceutiche*

Tesi di Dottorato in “Chimica e Tecnologia del Farmaco”

XXII ciclo

*Settore Disciplinare: CHIM 09*

**Sistemi Micro e Nanoparticellari per l’Ottimizzazione  
dei Farmaci**

Candidata

Dott.ssa Natascia Mennini

Docente Supervisore

Prof.ssa Paola Angela Mura

Coordinatore del Corso

Prof.ssa Elisabetta Teodori

# INDICE

---

## CAPITOLO 1 - MICROSFERE DI CALCIO - PECTINATO

1.1	Introduzione .....	1
1.2	Materiali e Metodi.....	6
1.2.1	Materiali .....	6
1.2.2	Metodi .....	6
1.2.2.1	Preparazione di microsfere.....	6
1.2.2.2	Determinazione del diametro delle ms.....	7
1.2.2.3	Determinazione del peso e del decremento % di peso delle ms.....	7
1.2.2.4	Determinazione dell'efficacia di incapsulazione .....	7
1.2.2.5	Rivestimento delle ms con Eudragit® S100 .....	7
1.2.2.6	Caratterizzazione morfologica delle ms .....	8
1.2.2.7	Studi allo stato solido .....	8
1.2.2.8	Studi di rilascio in vitro.....	8
1.2.2.9	Preparazione dei tamponi .....	9
1.3	Risultati e Discussione .....	10
1.3.1	Influenza della concentrazione di ioni calcio sulla igroscopicità ed efficacia di incapsulazione di microsfere di calcio-pectinato .....	10
1.3.2	Influenza della concentrazione di ioni calcio sull'aspetto morfologico delle microsfere .....	12
1.3.3	Influenza del tempo di cross linking (TCL) sull'efficacia di incapsulazione di teofillina .....	12
1.3.4	Studi morfologici delle microsfere con analisi SEM .....	13
1.3.5	Studi di stabilità delle microsfere.....	14
1.3.6	Studio delle possibili interazioni allo stato solido tra farmaco ed eccipienti .....	15
1.3.6.1	Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC) .....	16
1.3.6.2	Diffrazione dei raggi X su polvere.....	18
1.3.7	Studi di dissoluzione in ambiente gastrico.....	19
1.3.8	Rivestimento con Eudragit® .....	20
1.3.9	Studi di rilascio in presenza ed assenza di enzimi pectinolitici di ms rivestite con Eudragit® .....	21
1.4	Conclusioni .....	24
1.5	Bibliografia .....	25

## INDICE

---

### CAPITOLO 2 - MICROSFERE DI CHITOSANO - CALCIO - PECTINATO

2.1 Introduzione .....	28
2.2 Materiali e Metodi.....	30
2.2.1 Materiali.....	30
2.2.2 Metodi.....	30
2.2.2.1 Valutazione della mucoadesione.....	30
2.2.2.2 Valutazione della proprietà enhancer del chitosano.....	31
2.2.2.3 Disegno sperimentale.....	32
2.2.2.4 Metodo di preparazione delle ms.....	32
2.2.2.5 Calcolo della resa e delle dimensioni delle microsfere.....	32
2.2.2.6 Determinazione dell'efficacia di incapsulazione.....	32
2.2.2.7 Rivestimento delle ms con Eudragit® S100.....	33
2.2.2.8 Studi rilascio in vitro.....	33
2.2.2.9 Preparazione dei sistemi binari prednisone-HPβCD.....	33
2.2.2.10 Caratterizzazione dei sistemi binari prednisone-ciclodestrina.....	34
2.3 Risultati e Discussione.....	35
2.3.1 Valutazione di mucoadesione di microsfere di chitosano-calcio-pectinato.....	35
2.3.2 Valutazione delle proprietà enhance del chitosano.....	35
2.3.3 Disegno sperimentale.....	37
2.3.4 Caratteristiche morfologiche e dimensionali delle ms caricate con prednisone o teofillina.....	43
2.3.5 Studi di rilascio di teofillina in ambiente gastrico da ms di chitosano-calcio-pectinato.....	43
2.3.6 Studi di rilascio in ambiente gastro-intestinale di ms caricate con teofillina e rivestite con Eudragit S100.....	44
2.3.7 Studi di rilascio di prednisone da ms di chitosano-calcio-pectinato in ambiente gastro-intestinale.....	45
2.3.8 Caratterizzazione dei sistemi binari prednisone-ciclodestrina.....	46
2.3.8.1 Studi di solubilità di fase.....	46
2.3.8.2 Caratterizzazione allo stato solido di sistemi binari prednisone-HPβCD.....	48
2.3.9 Realizzazione di ms di chitosano-calcio-pectinato contenenti il complesso prednisone-HPβCD ottenuto con la tecnica della liofilizzazione.....	52
2.3.10 Studi di rilascio di prednisone in ambiente gastro-intestinale da ms di chitosano-calcio-pectinato caricate con liofilizzato prednisone-HPβCD.....	53
2.3.11 Effetto delle dimensioni delle ms sulla velocità di rilascio di prednisone in ambiente colonico.....	55
2.4 Conclusioni.....	56
2.5 Bibliografia.....	58

## INDICE

---

CAPITOLO 3 - MICROSFERE DI CHITOSANO - CALCIO - ALGINATO	
3.1 Introduzione .....	60
3.2 Materiali e Metodi.....	66
3.2.1 Materiali .....	66
3.2.2 Metodi .....	67
3.2.2.1 Estrazione del celecoxib.....	67
3.2.2.2 Studi di solubilità di fase.....	67
3.2.2.3 Dosaggio HPLC del celecoxib .....	67
3.2.2.4 Preparazione dei sistemi binari celecoxib-HP $\beta$ CD e ternari celecoxib-HP $\beta$ CD- polimero idrofilo allo stato solido .....	68
3.2.2.5 Metodi di analisi allo stato solido dei sistemi binari celecoxib-HP $\beta$ CD e ternari celecoxib-HP $\beta$ CD-polimero idrofilo.....	69
3.2.2.6 Studi di velocità di dissoluzione.....	69
3.2.2.7 Preparazione dei tamponi .....	70
3.2.2.8 Spettroscopia NMR.....	70
3.2.2.9 Disegno sperimentale .....	70
3.2.2.10 Metodo di preparazione delle microsfere.....	71
3.2.2.11 Determinazione dell'efficacia di incapsulazione .....	71
3.2.2.12 Test di rilascio del celecoxib da microsfere di chitosano-calcio-alginato.....	71
3.2.2.13 Calcolo della resa e delle dimensioni delle microsfere .....	72
3.2.2.14 Analisi morfologica delle microsfere.....	72
3.3 Risultati e discussione .....	73
3.3.1 Estrazione di celecoxib da Celebrex® .....	73
3.3.2 Caratterizzazione dei sistemi binari celecoxib-carrier idrofilo .....	74
3.3.2.1 Studi di solubilità di fase.....	74
3.3.2.2 Caratterizzazione allo stato solido dei sistemi binari - HP $\beta$ CD .....	76
3.3.3 Caratterizzazione allo stato solido dei sistemi ternari celecoxib- HP $\beta$ CD-polimero idrofilo.....	81
3.3.4 Studi di velocità di dissoluzione .....	82
3.3.5 Caratterizzazione in soluzione dei sistemi binario celecoxib- HP $\beta$ CD e ternario celecoxib- HP $\beta$ CD-PVP: Spettroscopia NMR.....	84
3.3.6 Disegno sperimentale .....	85
3.3.7 Studi morfologici delle microsfere.....	97
3.4 Conclusioni .....	100
3.5 Bibliografia .....	102



## INDICE

---

CAPITOLO 4 - MICELLE A BASE DI GCPQ	
4.1 Introduzione .....	107
4.2 Materiali e Metodi.....	113
4.2.1 Materiali .....	113
4.2.2 Metodi .....	114
4.2.2.1 Sintesi del GCPQ .....	114
4.2.2.2 Caratterizzazione del GCPQ .....	115
4.2.2.3 Preparazione delle micelle .....	116
4.2.2.4 Determinazione dell'efficacia di incapsulazione delle micelle.....	117
4.2.2.5 Analisi HPLC della doxorubicina .....	117
4.2.2.6 Determinazione del dimensioni e del potenziale Z delle micelle.....	117
4.2.2.7 Analisi morfologica delle micelle .....	118
4.3 Risultati e Discussione .....	119
4.3.1 Caratterizzazione del GCPQ .....	119
4.3.1.1 Cromatografia di esclusione e MALLS (multi-angle laser light scattering).....	119
4.3.1.2 Spettroscopia <sup>1</sup> H NMR.....	120
4.3.1.3 Spettroscopia Infrarossa in Trasformata di Fourier (FTIR) .....	122
4.3.1.4 Analisi DSC e diffrazione dei raggi X del GCPQ.....	123
4.3.2 Caratterizzazione delle micelle a base di GCPQ caricate con doxorubicina: Determinazione dell'EE%, delle diametro medio e del potenziale Z. ....	124
4.3.3 Caratterizzazione morfologica delle micelle di GCPQ caricate con teofillina.....	125
4.4 Conclusioni .....	127
4.5 Bibliografia .....	129
ALLEGATI - ARTICOLI PUBBLICATI	

## ABBREVIAZIONI

---

ANOVA	Analisi della Varianza
$\beta$ CD	betaciclodestrina
BEE	Barriera Emato-Encefalica
CMC	Concentrazione Micellare Critica
coev	coevaporato
coliof	coliofilizzato
com	comacinato
CSL	chitosano a basso peso molecolare
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSC	Calorimetria Differenziale a Scansione
EE %	Efficacia di incapsulazione
FTIR	Spettroscopia Infrarossa in Trasformata di Fourier
GCPQ	Palmitoil Glicol Chitosano Quaternarizzato
GPC	Gel Permeation Chromatography
HP $\beta$ CD	idrossipropilciclodestrina
HPMC	idrossipropilmetilcellulosa
knd	kneaded
MF	miscela fisica
ms	microsfere
PGC	Palmitoil Glicol Chitosano
PEG	polietilenglicole
PVP	polivinilpirrolidone
SDS	sodio dodecil solfato
SEM	Scanning Electron Microscopy
TCL	Tempo di Cross Linking
TEER	Resistenza Elettrica Transepiteliale
TEM	Transmission Electron Microscopy
TGA	Analisi Termogravimetrica

## ***Capitolo 1***

---

### ***Microsfere di Calcio-Pectinato***

## 1.1 Introduzione

Negli ultimi anni l'uso delle forme farmaceutiche a rilascio modificato, si è significativamente esteso per i numerosi vantaggi offerti rispetto alle forme farmaceutiche tradizionali. Quest'ultime infatti presentano molti inconvenienti quali: scarsa selettività d'azione del farmaco, comparsa di numerosi effetti collaterali tra cui irritazione di organi e mucose, necessità di somministrazioni frequenti, quindi scarsa compliance del paziente ed inevitabili fluttuazioni della concentrazione plasmatica del farmaco. Con le forme farmaceutiche tradizionali non è inoltre possibile somministrare tutti quei farmaci instabili a pH gastrico, suscettibili alla digestione enzimatica o soggetti ad un elevato metabolismo di first pass.

Tra le forme farmaceutiche a rilascio modificato, vengono distinti due gruppi principali: forme a rilascio prolungato e forme a rilascio direzionato. Le prime vengono progettate principalmente per mantenere il tasso ematico di farmaco ad un livello costante e per un tempo prestabilito, superiore a quello di una forma farmaceutica convenzionale; le seconde invece, vengono realizzate principalmente per direzionare il principio attivo verso un determinato sito d'azione, ed evitare che si distribuisca in altri compartimenti dell'organismo dove la sua presenza non è desiderata o addirittura tossica.

Il targeting colonic è estremamente importante in patologie che richiedono un trattamento topico locale come morbo di Crohn, colite ulcerativa, carcinomi ed infezioni in genere, ma può essere adottato anche per l'assorbimento sistemico di farmaci proteici [1-2], oppure per la somministrazione cronica di principi attivi altamente irritanti come i FANS [3]. Il targeting colonic assume grande importanza anche nella somministrazione sistemica di farmaci destinati alla cura di malattie soggette a ritmo circadiano come l'asma notturna e l'artrite reumatoide [4-5-6-7-8], poiché migliora la compliance del paziente, permettendogli di assumere la dose preventiva la sera prima di coricarsi, evitando quindi il risveglio notturno.

I principali vantaggi offerti dal targeting colonic possono essere così riassunti:

- Aumento della biodisponibilità dovuto alla maggiore quantità di farmaco che raggiunge il sito bersaglio e al maggiore tempo di permanenza nel sito deputato all'assorbimento.
- Riduzione della dose somministrata e prevenzione di effetti collaterali indesiderati poiché il farmaco, essendo indirizzato al sito bersaglio, non ha la possibilità di disperdersi e di alterare tessuti, organi e mucose che non devono essere trattate.
- Protezione di farmaci facilmente degradabili, in quanto il colon è caratterizzato da condizioni di pH più blande ed assenza di enzimi digestivi.
- Protezione della mucosa del tratto gastrointestinale superiore da farmaci altamente irritanti.
- Prolungati livelli e minori fluttuazioni di concentrazione plasmatica di farmaco nel tempo [9-10-11-12]; infatti, poiché il tempo di residenza nel colon è circa

dieci volte più grande rispetto all'intestino tenue, esso si comporta come un reservoir, da cui una quantità costante di farmaco entra nel torrente circolatorio.

Nella prima parte della mia ricerca di dottorato ho rivolto l'attenzione allo sviluppo di sistemi a rilascio colon specifico, ad unità multipla, per la somministrazione orale di teofillina, prednisone e celecoxib.

La teofillina è un farmaco antiasmatico particolarmente indicato per la realizzazione di forme farmaceutiche a rilascio modificato, a causa della sua breve emivita e ristretto range terapeutico (7,5-20 µg/ml). Il targeting colonico, funzionando da reservoir, potrebbe assicurarne un rilascio prolungato nel tempo, riducendo al minimo la fluttuazione dei livelli plasmatici, che ne compromette l'efficacia terapeutica e ne provoca tossicità.

Il prednisone è un glucocorticoide sintetico utilizzato in affezioni reumatologiche ed ematologiche, malattie del collagene, condizioni allergiche gravi o debilitanti, sarcoidosi e come coadiuvante nel trattamento della colite ulcerosa. Gli effetti collaterali di questo farmaco, specie per trattamenti intensi e prolungati, sono quelli tipici di una terapia cortisonica quali: alterazioni del bilancio idroelettrolitico, alterazioni muscolo scheletriche, cutanee e neurologiche, complicazioni di natura oculistica e a carico dell'apparato gastro-intestinale, che possono arrivare fino alla comparsa di ulcera peptica. Un rilascio colonico per il prednisone sarebbe quindi auspicabile al fine di migliorarne la biodisponibilità e conseguentemente ridurre il dosaggio e gli effetti collaterali.

Il celecoxib è un farmaco antinfiammatorio non steroideo inibitore selettivo della cicloossigenasi-2 (COX-2) Esso è utilizzato principalmente nel trattamento dell'artrite reumatoide e dell'osteoartrite ma trova anche impiego nel trattamento di tumori al colon. Il rilascio colonico di questo farmaco è stato finalizzato da una parte al miglioramento della sua efficacia nella terapia dell'artrite reumatoide e dall'altra, a massimizzare il targeting colonico, per una applicazione locale del celecoxib come antitumorale.

Il colon può essere raggiunto tramite via orale o rettale. Abbiamo scelto di realizzare sistemi a rilascio colonico orale, in quanto questa è la via di assunzione preferita dei farmaci, specialmente per terapie croniche, e che richiedono ripetute somministrazioni.

Molte sono le strategie che possono essere adottate per un rilascio colonico:

- Sistemi attivati dalla microflora batterica, che comprendono profarmaci e matrici e rivestimenti polimerici; come meccanismo di rilascio sfruttano la degradazione di polisaccaridi o azopolimeri, effettuata da enzimi prodotti da batterici presenti esclusivamente nel colon.
- Sistemi pH dipendenti che sfruttano per il rilascio l'aumento del valore di pH che si ha passando dall'intestino tenue al colon.

- Sistemi controllati dalla pressione, in cui è il temporaneo aumento della pressione luminale, causata da forti onde peristaltiche, a promuovere la liberazione del farmaco dalla forma farmaceutica.
- Sistemi tempo dipendenti, il cui meccanismo di rilascio sfrutta il tempo di transito gastro-intestinale medio.

Il principale limite dei sistemi puramente pH dipendenti è la non perfetta riproducibilità dei profili di rilascio del farmaco. Questo è correlato alla variabilità inter ed intra-individuale del pH del tratto gastrointestinale, in funzione dell'assunzione di cibo e di condizioni fisiopatologiche. I sistemi attivati dalla microflora batterica, liberando il farmaco quando vengono degradati da reazioni chimiche catalizzate in modo specifico da enzimi colonici, sono l'approccio più sicuro, efficace e riproducibile [5]; infatti la flora intestinale non presenta grosse variazioni intra-individuali, almeno che non intervengano situazioni patologiche particolari come diarrea acuta [13]. Per questo motivo e per l'assoluta atossicità dei polimeri biodegradabili impiegati in questo tipo di approccio, abbiamo deciso di adottare un sistema di rilascio colonico che sfruttasse contemporaneamente la strategia di controllo pH dipendente e microflora dipendente [14]. In particolare sono state realizzate:

- Microsfere di calcio-pectinato caricate con teofillina (capitolo 1).
- Microsfere di chitosano-calcio-pectinato caricate con teofillina o prednisone (capitolo 2).
- Microsfere di chitosano chitosano-calcio-alginato caricate con celecoxib (capitolo 3).

I carrier particellari possono essere classificati in funzione delle dimensioni in microparticelle ( $> 1 \mu\text{m}$ ) e nanoparticelle ( $< \mu\text{m}$ ). Le microparticelle e le nanoparticelle possono a loro volta essere classificate in funzione della struttura del corpo particellare in micro e nanosfere e micro e nanocapsule. Le micro e nanosfere sono costituite da una matrice polimerica in cui il farmaco è omogeneamente disperso, le micro e nanocapsule invece sono sistemi costituiti da particelle di forma sferica in cui un "core" o fase interna (liquida, solida o semisolida) è circondata da un rivestimento solido di natura polimerica, la membrana. Molti sono i campi di applicazione dei sistemi particellari, in particolare, in campo farmaceutico, è di notevole interesse la possibilità di ottenere con questi sistemi un rilascio graduale di farmaci.

Numerosi sono stati i polimeri fino ad ora utilizzati nella preparazione dei sistemi particellari. Un criterio tramite il quale possono essere classificati è in funzione delle loro caratteristiche di interazione con l'acqua. Si distinguono pertanto in:

- Polimeri idrofobi: si idratano molto poco e non rigonfiano in acqua.
- Polimeri idrofili: si idratano molto, rigonfiano ma non si sciolgono.
- Polimeri idrosolubili.
- Hydrogels: sono polimeri originariamente idrosolubili, ma resi insolubili per cross linking; rigonfiano in acqua in funzione del loro grado di reticolazione.

Un importante requisito che devono avere i polimeri utilizzati nella formulazione di microsistemi è la non tossicità e la biodegradabilità. I polimeri da noi utilizzati per la preparazione delle microsfere sono polisaccaridi naturali (chitosano, pectina e alginato), appartenenti alla categoria degli hydrogels che rispondono perfettamente a questi requisiti.

Le caratteristiche degli altri polimeri verranno trattate nei capitoli successivi; in questo primo capitolo invece verranno descritte le caratteristiche delle pectine.

La pectina è un carboidrato presente nella parete cellulare di tutte le piante superiori, ma quella disponibile in commercio viene estratta principalmente da agrumi e mele. E' costituita prevalentemente da polimeri lineari di acido D-galatturonico legati con legame  $\alpha$ -1,4-glicosidico, interrotti da residui di L-ramnosio 1,2 – legati, che sono inseriti regolarmente sulla catena principale circa ogni 25 residui. Dal processo estrattivo, che prevede l'idrolisi acida del polimero, si ottengono dei blocchi di poligalatturonato con simile peso molecolare contenenti circa 25 residui ciascuno. Nella catena sono presenti alcuni acidi liberi residui ed altri esterificati con gruppi metilici; il grado di esterificazione (DE) dipende dalla fonte di estrazione, dall'attività enzimatica delle pectin-esterasi nel processo di maturazione del frutto e dalle condizioni con cui avviene l'estrazione stessa. Dai blocchi di poligalatturonato si ottengono derivati de-esterificati tramite idrolisi alcalina che sono ampiamente studiati per la messa a punto di formulazioni a rilascio colonico. Quando il processo di de-esterificazione alcalina viene effettuato con ammoniaca, alcuni gruppi carbossilici vengono convertiti in gruppi amidici, producendo così la pectina amidata. La quantità di gruppi amidici presenti viene indicata con il grado di amidazione (DA). Questo parametro insieme al grado di esterificazione (DE) determina indirettamente il numero di gruppi carbossilici liberi nella catena di pectina.

Usate inizialmente solo dall'industria alimentare, poi proposte come eccipienti per preparati farmaceutici, le pectine hanno destato un grande interesse per la loro attività gelificante. I fattori che determinano la gelificazione e che influenzano le caratteristiche dei gel sono molteplici: tipo di pectina, concentrazione, grado di esterificazione e di amidazione, pH della soluzione, temperatura e presenza di cationi.

Molte pectine sono state usate come carrier per il rilascio colon specifico [15]. La pectina da sola però non è in grado di garantire la non cessione del principio attivo a livello gastrico e del primo tratto intestinale, a causa della sua solubilità in mezzo acquoso. Al fine di superare questo inconveniente sono stati studiati numerosi derivati pectinici. Tra questi il migliore è risultato il calcio pectinato, che, in confronto alla pectina tal quale, è meno solubile a livello dei fluidi gastroenterici, ugualmente biodegradabile dagli enzimi pectinolitici della microflora intestinale e non tossico [16-17]. L'interazione degli ioni calcio con i galatturonati induce un cambiamento nella conformazione delle catene, nonché un diverso impacchettamento del polimero, definito come struttura "egg box" [18]. Questo aggregato macromolecolare è stabile in soluzione a bassi valori di pH e resistente in vivo nel tratto gastrointestinale.

Molti sono i fattori che influenzano le caratteristiche di questi sistemi microparticellari costituiti da una matrice di calcio-pectinato [19]: grado di amidazione ed esterificazione della pectina, quantità di ioni calcio e tempo di cross linking.

Sulla base di queste premesse, nella prima parte di questo lavoro di tesi, sono state preparate microsfere di chitosano-calcio-alginato per il rilascio colon specifico di teofillina somministrata per via orale. La scelta di somministrare il farmaco con un sistema ad unità multipla invece che in un'unica dose, oltre ad essere un approccio più sicuro [20], è stata dettata dal fatto che, in questo modo, la superficie esposta al mezzo di dissoluzione e agli enzimi intestinali aumenta, a parità di volume, e quindi viene facilitato il completo rilascio del farmaco una volta raggiunto il colon [21]. Per permettere una facile somministrazione, le microsfere potrebbero essere inserite dentro una capsula di gelatina, che si solubilizza rapidamente a livello gastrico.

E' stata quindi analizzata l'influenza del tipo di pectina, della concentrazione degli ioni calcio e del tempo di cross linking sull'efficacia di incapsulazione della teofillina e sul suo profilo di rilascio. Poiché si è reso necessario un rivestimento gastro-resistente delle microsfere, per evitare una perdita prematura del farmaco prima del raggiungimento del colon, è stata valutata a tal fine l'efficacia protettiva del polimero enterico Eudragit® S100. Test di rilascio del farmaco sono stati condotti in vari tamponi, in modo da simulare la variazione del pH gastro-intestinale, e in presenza o assenza di enzimi pectinolitici, al fine di indagare sul ruolo di questi enzimi nel rilascio del farmaco. Le microsfere sono state caratterizzate allo stato solido tramite SEM (Scanning Electron Microscopy), DSC (Differential Scanning Calorimetry), termogravimetria, diffrazione dei raggi X e analisi FTIR, in modo da poter mettere in evidenza possibili interazioni e /o incompatibilità tra i componenti.



## 1.2 Materiali e Metodi

### 1.2.1 Materiali

Prodotto	Ditta produttrice
Acido cloridrico 37%	Riedel deHaën
Calcio cloruro	Fluka
Enzimi pectinolitici Pectinex Ultra SP-L Attività= 26000 PG/ml a pH 3,5	Novo Nordisk Ferment
Eudragit® S100	Röhm Pharma GmbH
Glicina ≥99%	Aldrich
Pectina AU701 DE = 36-44%	Herbstreith &Fox
Pectina CF020 DA = 19-23%; DE = 25-31%	Herbstreith &Fox
Potassio fosfato monobasico	Fluka
Sodio cloruro	Fluka
Sodio fosfato bibasico	Fluka
Teofillina	Aldrich

### 1.2.2 Metodi

#### 1.2.2.1 Preparazione di microsfere

Le ms sono prodotte per gelificazione ionotropica; la pectina è stata solubilizzata in 10 ml di H<sub>2</sub>O deionizzata aggiungendo la polvere nel solvente a piccole porzioni e agitando dopo ogni aggiunta fino a completa formazione di una gelatina omogenea. La teofillina (250 mg) è stata poi sospesa nella gelatina sempre sotto agitazione. La sospensione è stata quindi sgocciolata con una siringa con diametro di 0,7 mm, applicando al pistone una lieve pressione positiva, in modo da permettere un gocciolamento rapido ed uniforme. Le microgocce estruse sono state fatte cadere da un'altezza di circa 15 cm in un beaker contenente 250 ml di una soluzione di CaCl<sub>2</sub> (2,5-30% p/v) sotto agitazione magnetica (100 riv/min) e a T ambiente. Il sistema eterogeneo così ottenuto è stato lasciato sotto agitazione nella soluzione di CaCl<sub>2</sub> per un determinato periodo di tempo, definito tempo di cross linking (TCL), durante il quale si è avuta la formazione del reticolo rigido di calcio pectinato, contenente il farmaco intrappolato al suo interno. Le microsfere (ms) sono state quindi recuperate tramite filtrazione sottovuoto, lavate con

acqua e poste ad essiccare in stufa a 50 °C. I vari lotti di ms sono stati conservati in essiccatore e/o in ambiente ad umidità controllata (umidità relativa = 70-80%) per valutare il possibile effetto di varie condizioni di stoccaggio sulla stabilità.

### **1.2.2.2 Determinazione del diametro delle ms**

Il diametro delle microsfere é stato misurato con un calibro, prima e dopo il rivestimento con Eudragit® S100, in modo da poter valutare anche lo spessore di quest'ultimo. Le dimensioni ottenute sono il risultato di una media di 10 misurazioni effettuate su 10 microsfere scelte casualmente da ciascun lotto.

### **1.2.2.3 Determinazione del peso e del decremento % di peso delle ms**

Le microsfere sono state pesate singolarmente con bilancia analitica Mettler M 3, prima e dopo il rivestimento con Eudragit® S100.

Anche in questo caso i valori ottenuti sono il risultato di una media di misure effettuate su 10 ms scelte casualmente dallo stesso lotto.

Per calcolare il decremento % di peso, ciascun lotto di ms è stato pesato prima e dopo essiccamento (50 °C per 24 ore) e la % media di acqua persa è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$\text{Decremento \% di peso} = \frac{p_i - p_f}{p_i} * 100$$

dove  $p_i$  è il peso iniziale subito dopo filtrazione e  $p_f$  il peso finale dopo essiccamento.

### **1.2.2.4 Determinazione dell'efficacia di incapsulazione**

Questo parametro è stato determinato indirettamente determinando in triplicato, tramite analisi spettrometrica a 266 nm (UV/Vis1601 Shimadzu), la concentrazione di teofillina nella soluzione acquosa filtrata e applicando la seguente formula:

$$\frac{Q_t - Q_r}{Q_t} * 100$$

Dove  $Q_t$  rappresenta la quantità di farmaco totale, aggiunta inizialmente durante la preparazione delle ms, e  $Q_r$  la quantità di farmaco rimasta nel filtrato.

### **1.2.2.5 Rivestimento delle ms con Eudragit® S100**

Per evitare un prematuro rilascio del farmaco prima del raggiungimento del colon, le ms sono state rivestite con Eudragit® S100, copolimero anionico costituito da monomeri di acido metacrilico e metilmetacrilico. Questo polimero è insolubile in acqua e in ambiente acido, ma diventa solubile nelle soluzioni a pH=7, quindi nei fluidi intestinali.

Per effettuare il rivestimento delle ms, inizialmente è stata preparata una soluzione di

Eudragit<sup>®</sup> S100 in acetone al 12% (p/v). Questo solvente è stato scelto sulla base di esperimenti preliminari, dove era stato visto che l'acetone permetteva una completa dissoluzione del polimero, mantenendo integre le ms. Il rivestimento è stato ottenuto immergendo le ms nella soluzione di Eudragit<sup>®</sup> e allontanando successivamente il solvente con rotavapor. L'operazione è stata ripetuta fino ad ottenimento del peso percentuale di rivestimento voluto (da 5 a 100% p/p), che è stato calcolato tramite la seguente formula:

$$\text{Peso medio \% di rivestimento} = \frac{\text{peso medio delle ms dopo rivestimento}}{\text{peso medio iniziale delle ms}} * 100$$

Lo spessore medio di rivestimento è stato determinato per differenza tra il diametro medio delle ms dopo e prima del trattamento con Eudragit<sup>®</sup>.

### **1.2.2.6 Caratterizzazione morfologica delle ms**

La caratterizzazione morfologica delle ms, preparate di fresco o a intervalli di tempo durante lo stoccaggio, è stata effettuata tramite analisi SEM, utilizzando uno strumento Philips XL-30. Prima di poter essere osservati, i campioni sono stati rivestiti con oro-palladio per renderli elettricamente conduttori.

### **1.2.2.7 Studi allo stato solido**

Al fine di caratterizzare da un punto di vista chimico-fisico le ms ed individuare eventuali interazioni presenti tra i costituenti, sono state effettuate analisi DSC e TGA e di diffrazione dei raggi X. Questi studi sono stati condotti sui componenti puri, sulle loro miscele fisiche (negli stessi rapporti p/p in cui sono presenti nelle ms) e sulle ms stesse.

L'analisi DSC è stata eseguita con uno strumento Mettler TA4000 dotato di una cella DSC 25. I campioni (5-10mg), posti in crogioli di alluminio e sigillati, sono stati sottoposti ad un aumento programmato della temperatura tra 30 e 300 °C a 10 °C/min, sotto atmosfera inerte.

Per effettuare le analisi termogravimetriche è stato utilizzato uno strumento Perkin-Elmer Pyris 1 TGA con una velocità di riscaldamento di 20 °C/min in un range di temperatura tra 30 e 400 °C, sotto azoto (20 ml/min).

I diffrattogrammi dei campioni sono stati registrati mediante un diffrattometro Bruker D8-advance con  $2\theta$  compreso tra 2 e 25° e ad una velocità di scansione di 1°/min. Prima di effettuare l'analisi sulle ms, queste sono state preventivamente macinate.

### **1.2.2.8 Studi di rilascio in vitro**

Gli studi di rilascio in vitro delle ms sono stati condotti secondo il metodo "dispersed amount": le ms su cui effettuare il test sono state poste in un beaker (150 ml) in cui sono stati aggiunti 75 ml di solvente. All'interno del beaker è stato introdotto centralmente, a

circa 1 cm dal fondo, l'agitatore a pale, collegato ad un motore elettrico. Il tutto è stato inserito in un bagno termostattizzato a  $37 \pm 0,5$  °C e la velocità di rotazione dell'agitatore è stata fissata a 100 rpm. Sono stati effettuati studi di rilascio sia in ambiente gastrico, per verificare che non ci fosse una perdita di farmaco prima del raggiungimento del colon, sia variando il mezzo di dissoluzione, in modo da simulare le condizioni di pH del tratto gastro-intestinale. A tale scopo le ms sono state lasciate 2 ore in tampone gastrico a pH 1,1, 2 ore in tampone fosfato a pH=6,8 (simulante l'ambiente dell'intestino tenue), e 20 ore in tampone fosfato a pH=7,4 in assenza o presenza di enzimi pectinolitici (0,375ml), per riprodurre l'ambiente colonico. Le ms sono state aggiunte nel mezzo di dissoluzione in quantità tale da consentire il mantenimento delle "sink conditions" (la solubilità del farmaco determinata in tampone fosfato a pH 6,8 era risultata di 6,8 g/l). Ad intervalli di tempo sono stati fatti prelievi del mezzo di dissoluzione e, dopo filtrazione, è stata determinata la concentrazione di farmaco in soluzione mediante dosaggio UV utilizzando uno spettrometro UV-Vis 1601 Shimadzu. Alla lunghezza d'onda selezionata (266 nm), non si è osservata alcuna interferenza degli altri componenti. E' stato calcolato anche un termine correttivo per la diluizione cumulativa, generata dal rimpiazzamento dei campioni prelevati, con uguale volume del mezzo di dissoluzione originario. Ciascuna prova è stata ripetuta 4 volte (CV<1,5%).

### **1.2.2.9 Preparazione dei tamponi**

Tutti i tamponi sono stati preparati secondo le indicazioni riportate in FU.

#### Tampone gastrico pH 1,1

0,5 g di NaCl e 0,5 g di glicina sono stati solubilizzati in 80 ml di HCl 1N e portati ad 1 litro con acqua deionizzata.

#### Tampone fosfato pH 6,8

A 51 ml di una soluzione (27,2 g/l) di potassio fosfato monobasico sono stati aggiunti 49 ml di una soluzione (71,6 g/l) di sodio fosfato bibasico.

#### Tampone fosfato pH 7,4

19,2 g di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  e 1,8 g di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sono stati solubilizzati in acqua deionizzata e la soluzione portata ad 1 litro.

### 1.3 Risultati e Discussione

In una prima fase dello studio sono state selezionate le concentrazioni di pectina AU701 e CF020 da utilizzare nella preparazione delle microsfere (ms). Questo parametro è stato ottimizzato attraverso prove di siringabilità, che hanno permesso di individuare la corretta quantità di agente gelificante da utilizzare per ottenere microgocce regolari nella forma e nelle dimensioni, evitando l'ostruzione dell'ago della siringa e quindi la perdita di prodotto. Da questo studio le concentrazioni ottimali sono risultate le seguenti:

		viscosità
<b>Pectin classic AU701</b>	2% p/v	0,16 Cp a 25 °C
<b>Pectin amid CF020</b>	8% p/v	

Successivamente è stata valutata l'influenza della concentrazione degli ioni calcio, sull'efficacia di incapsulazione della teofillina e sulla igroscopicità e aspetto morfologico delle ms mantenendo costante il tempo di cross linking (TCL) a 20 minuti. Studi di efficacia di incapsulazione sono stati condotti anche fissando la % (p/v) di  $\text{CaCl}_2$  e variando il TCL al fine di valutare l'influenza di questa variabile sulla percentuale di farmaco incapsulato.

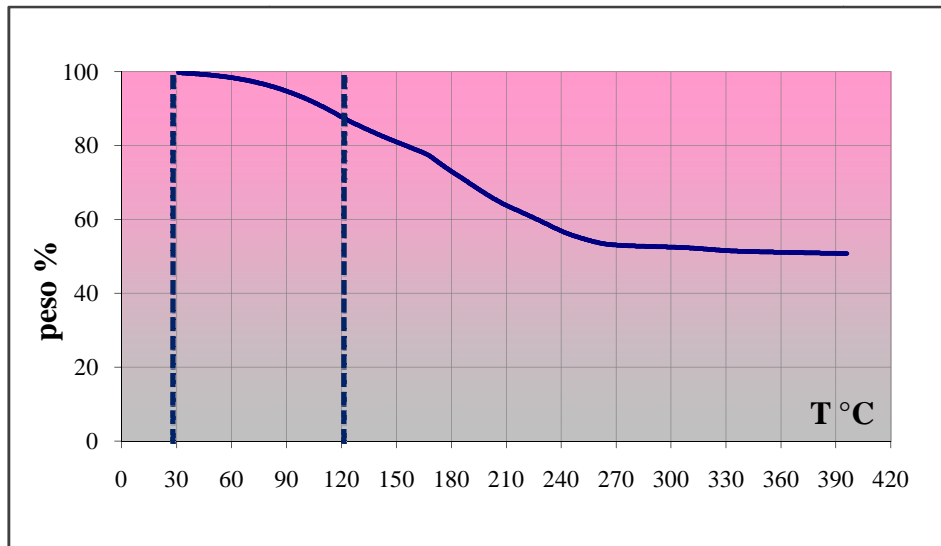
#### 1.3.1 Influenza della concentrazione di ioni calcio sulla igroscopicità ed efficacia di incapsulazione di microsfere di calcio-pectinato

[Ca <sup>2+</sup> ] % p/v	Decremento percentuale di peso		Efficacia di incapsulazione	
	AU701 2%	CF020 8%	AU701 2%	CF020 8%
2,5	97,1	90,7	46,2 ± 2,0	59,8 ± 3,0
5	95,7	87,6	47,7 ± 1,5	55,3 ± 1,6
10	91,6	81,6	48,8 ± 1,3	56,4 ± 1,8
20	82,7	68,5	59,1 ± 1,6	59,2 ± 1,3
30	80,3	67,3	68,8 ± 1,4	60,2 ± 1,1

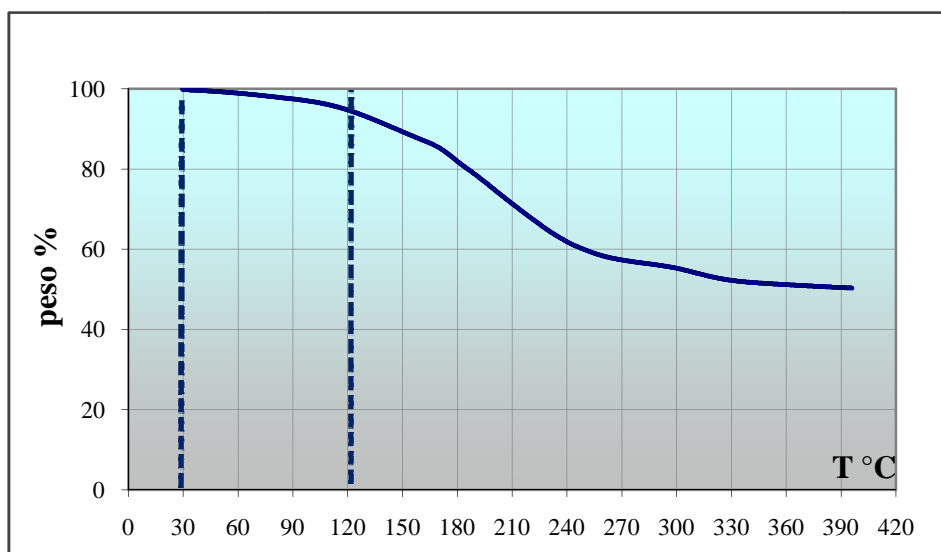
**Tabella 1:** Perdita percentuale di acqua ed efficacia di incapsulazione di ms preparate con concentrazioni crescenti di ioni calcio e TCL di 20 min

Come possiamo osservare in tab 1, per entrambe le pectine, al crescere della concentrazione di ioni calcio, diminuisce la percentuale di acqua persa dopo essiccamento in quanto l'aumentata consistenza della matrice di calcio pectinato, ostacola in origine l'incorporazione di acqua. Inoltre le ms realizzate con pectina AU701 sono risultate più igroscopiche rispetto a quelle realizzate con pectina CF020, infatti hanno mostrato un maggiore decremento in peso dopo essiccamento. Questo è imputabile al fatto che la presenza di legami amidici riduce l'idrofilicità della pectina CF020, come confermato dall'analisi termogravimetrica (TGA) (fig 1-2). Confrontando infatti i termogrammi 1 e 2 possiamo osservare che le ms realizzate con pectina non

amidata hanno presentato una perdita in peso del 15% nel range di temperatura tra 30-120 °C associata all'evaporazione di acqua, mentre le ms preparate con pectina amidata, a parità di concentrazione di  $\text{CaCl}_2$ , pectina e TCL, hanno perso solo un 2% in peso di acqua. Quindi, come precedentemente osservato anche da altri autori [22], la quantità di acqua incorporata dipende sia dal tipo di pectina che dalla concentrazione di ioni calcio.



**Figura 1** : Analisi TGA di ms di pectina AU701 2% (p/v),  $\text{CaCl}_2$  20% (p/v), TCL = 20 min

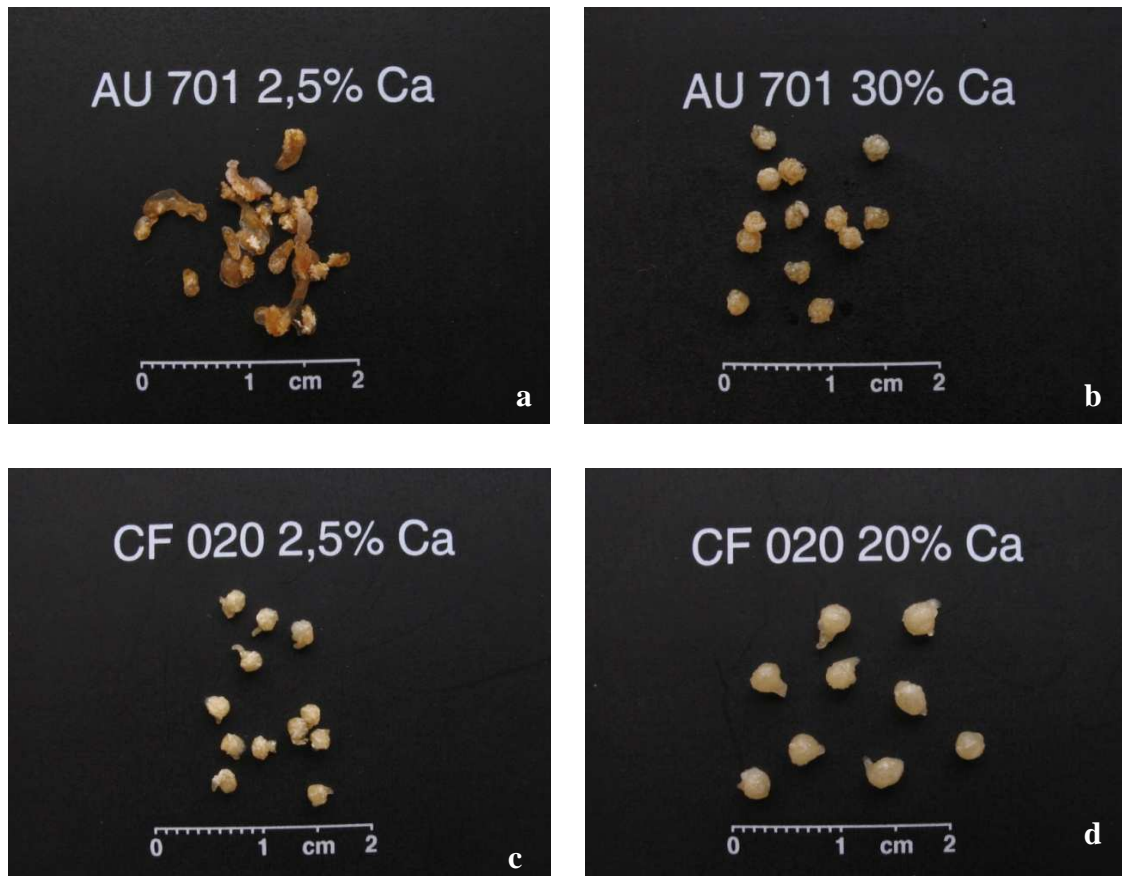


**Figura 2** : Analisi TGA di ms di pectina CF020 8% (p/v),  $\text{CaCl}_2$  20% (p/v), TCL = 20 min

Per quanto riguarda l'efficacia di incapsulazione di teofillina (tab 1) solo la pectina AU701 è sensibile alla variazione della percentuale di ioni calcio. Infatti, a parità di concentrazione di pectina e di TCL, l'incremento della concentrazione di  $\text{CaCl}_2$  porta ad un aumento dell'efficacia di incapsulazione solo nel caso delle ms realizzate con pectina non amidata. Questo può essere spiegato dal fatto che la pectina AU701, non avendo gruppi amidici, presenta conseguentemente un maggior numero di gruppi carbossilici che possono instaurare interazioni ioniche con gli ioni calcio, dando origine ad una

struttura più rigida capace di trattenere meglio il farmaco. E' possibile osservare inoltre che per concentrazioni di  $\text{CaCl}_2$  pari al 20 % (p/v) e  $\text{TCL} = 20$  minuti, il tipo di pectina non influenza l'efficacia di incapsulazione.

### 1.3.2 Influenza della concentrazione di ioni calcio sull'aspetto morfologico delle microsfere



**Figura 3:** Foto digitali di ms realizzate con pectina AU701 2% p/v (a-b) e pectina CF020 8% (c-d) a varie % (p/v) di  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{TCL} = 5$  min

Le foto digitali sopra riportate mostrano come l'aumento della concentrazione di ioni calcio comporti un aumento delle dimensioni finali delle ms e della loro sfericità. Quest'ultimo effetto è particolarmente marcato per le ms realizzate con pectina non amidata che, a basse concentrazioni di  $\text{CaCl}_2$ , si presentano di aspetto irregolare e di forma non ben definita, mentre ad altre concentrazioni di ioni calcio risultano sferoidali e ben separate le une dalle altre.

### 1.3.3 Influenza del tempo di cross linking (TCL) sull'efficacia di incapsulazione di teofillina

Come si può osservare in tab 2 esiste una relazione inversa tra  $\text{TCL}$  ed efficacia di incapsulazione; in particolare all'aumentare del  $\text{TCL}$  si ha una diminuzione



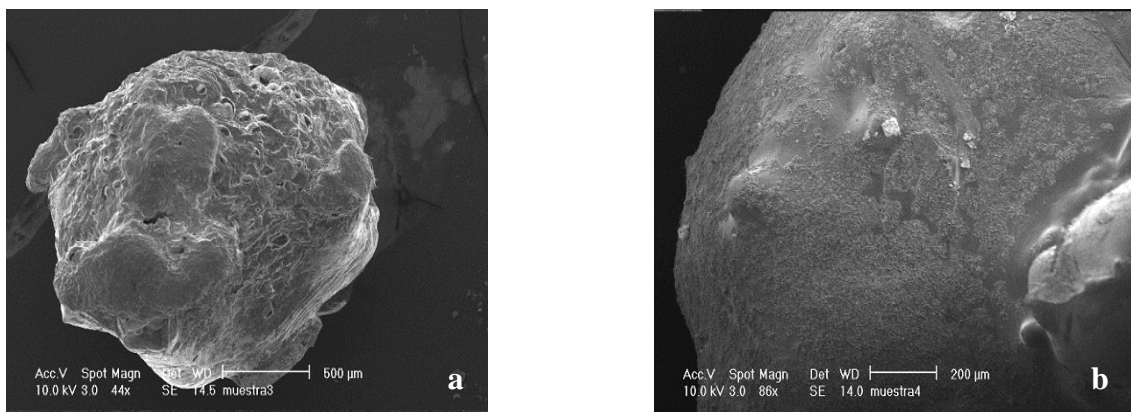
dell'efficacia di incapsulazione perché, essendo la teofillina un farmaco di natura idrofila, maggiore è il tempo di permanenza delle ms in soluzione acquosa e maggiore è la quantità di principio attivo che diffonde nel mezzo e quindi minore l'efficacia di incapsulazione. Tuttavia un TCL di 5 minuti è il minimo tempo necessario per ottenere la formazione di microsfere di opportuna rigidità. Nel caso di ms di pectina AU701 non sono state considerate concentrazioni di calcio inferiori al 20 % (p/v) in quanto davano origine a ms di forma irregolare, appiccicose e poco scorrevoli (fig 3a), che avrebbero creato problemi di riempimento in vista di una possibile formulazione in capsule o di rivestimento con film gastro-resistente.

Tipo di Pectina	[Ca <sup>2+</sup> ] (% p/v)	TCL (min)	Peso (mg) (media ± DS)	Diametro (mm) (media ± DS)	EE % (media ± DS)
AU701	20	20	4,04 ± 1,03	1,74 ± 0,32	59,1 ± 1,6
AU701	30	20	6,59 ± 1,08	2,17 ± 0,41	68,8 ± 1,4
AU701	30	5	5,98 ± 1,36	1,90 ± 0,37	80,9 ± 1,1
CF020	2,5	20	3,69 ± 0,29	1,75 ± 0,17	59,8 ± 3,0
CF020	5	20	5,96 ± 0,53	2,19 ± 0,22	55,3 ± 1,6
CF020	10	20	9,2 ± 1,07	2,35 ± 0,32	56,4 ± 1,8
CF020	20	20	13,35 ± 2,1	2,61 ± 0,35	59,2 ± 1,3
CF020	20	5	9,8 ± 3,37	2,37 ± 0,52	82,0 ± 1,1

**Tabella 2:** Peso medio ed efficacia di incapsulazione di ms preparate a differenti concentrazioni di ioni calcio e a differenti TCL

### 1.3.4 Studi morfologici delle microsfere con analisi SEM

L'analisi SEM è stata eseguita su ms realizzate con pectina AU701 o CF020, CaCl<sub>2</sub> 20% (p/v) e TCL = 5 minuti, che dagli studi precedentemente visti erano risultate più regolari nella forma e avevano dato i più alti valori di efficacia di incapsulazione. Come già osservato da altri autori [23-24] le ms costituite da pectina non amidata presentano forma irregolare e superficie rugosa, mentre le ms di pectina CF020 appaiono più omogenee e levigate. Poiché non si osservano cristalli di farmaco in superficie questo risulta completamente incorporato nella matrice polimerica.

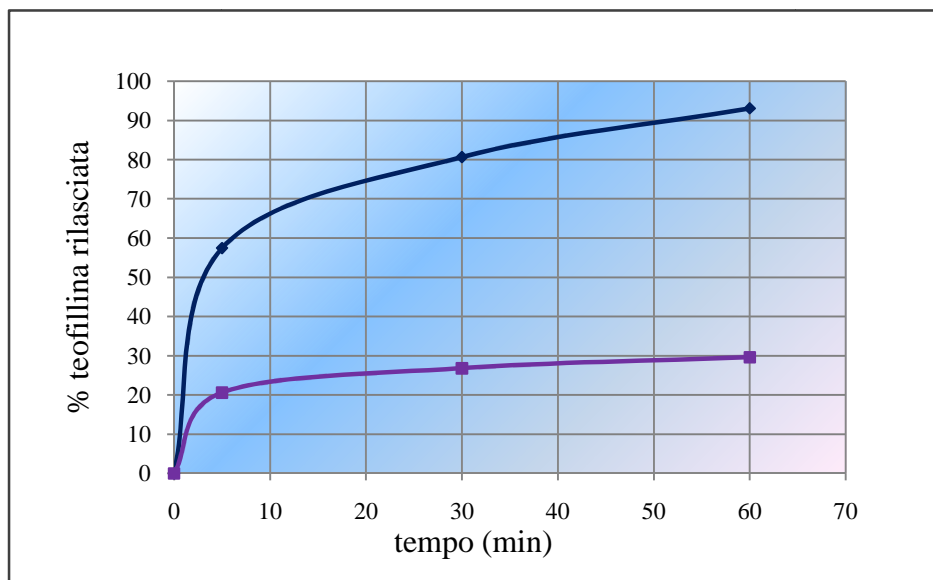


**Figura 4:** Foto Sem di ms di pectina Au701 (a) o CF020 (b) con 20% (p/v) di CaCl<sub>2</sub> e TCL = 5'

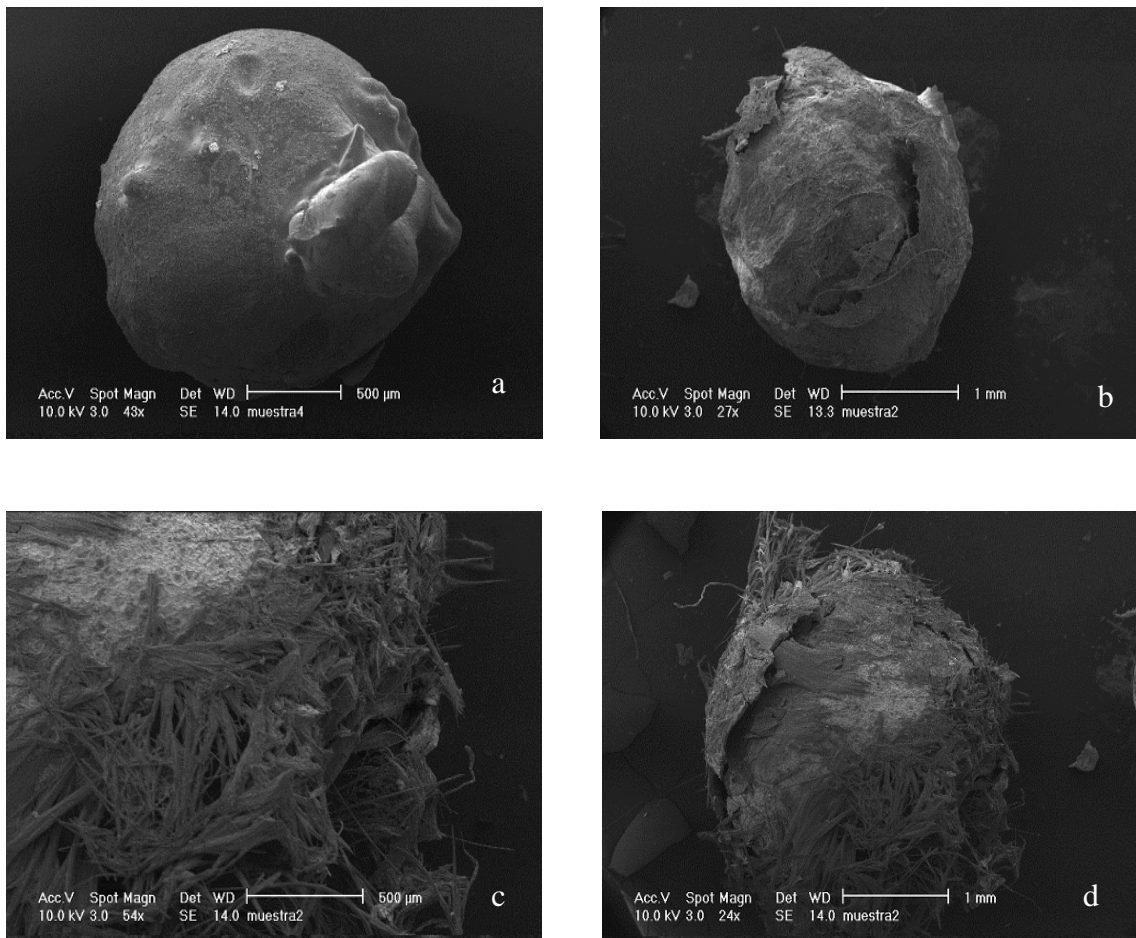


### 1.3.5 Studi di stabilità delle microsfere

Tutte le ms analizzate hanno mantenuto invariate le loro proprietà organolettiche e i loro profili di rilascio, se conservate in essiccatore a temperatura ambiente (25 °C), ma hanno presentato problemi di stabilità se stoccate in ambiente ad umidità controllata (70 % di umidità relativa). Tuttavia le ms di pectina AU701 già dopo pochi giorni dalla preparazione sono diventate deliquescenti e hanno perso la loro struttura morfologica, mentre le ms realizzate con pectina amidata, essendo meno igroscopiche, come già precedentemente osservato, hanno presentato un processo di alterazione più lento, che è stato quindi possibile monitorare con analisi SEM. Osservando le foto SEM (fig 6) si può notare come nel tempo si abbia un graduale cambiamento dell'aspetto morfologico delle ms con perdita della forma sferica originaria, che può essere attribuito a fenomeni di depolimerizzazione del calcio-pectinato [25]. Dopo 7 giorni di conservazione in presenza del 70% di umidità relativa, la superficie delle ms non è più perfettamente levigata ma inizia progressivamente a sfaldarsi, fino a completo distacco dello strato superficiale. Questi cambiamenti morfologici non si riflettono sulla stabilità chimica della teofillina. Infatti dopo completa dissoluzione delle ms, stoccate 15 giorni in presenza del 70% di umidità relativa, si ritrova il 100% del farmaco in tampone fosfato. Tuttavia l'andamento del rilascio del principio attivo è molto più rapido: il calcio-pectinato si dissolve più facilmente liberando completamente la teofillina solo dopo 60 minuti dall'inizio del test (fig 5).



**Figura 5:** Profilo di rilascio di teofillina da ms di pectina CF020, CaCl<sub>2</sub> 20% (p/v) e TCL = 5 min stoccate per 15 giorni in essiccatore (in viola) o in ambiente al 70% di umidità relativa (in blu)



**Figura 6:** Foto SEM di ms di pectina CF020,  $\text{CaCl}_2$  20% (p/v) e  $\text{TCL} = 5$  min (a), dopo 7 giorni (b) e dopo 15 giorni (c-d) di stoccaggio a T ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ) e 70% di umidità relativa

Considerando come parametri da ottimizzare l'efficacia di incapsulazione, la stabilità e l'aspetto morfologico, le microsfele che dagli studi finora effettuati sono risultate le migliori sono le seguenti :

Tipo di pectina	Pectina % (p/v)	$\text{CaCl}_2$ % (p/v)	TCL(min)
Pectin classic AU701	2%	30	5
Pectin amid CF020	8%	20	5

### 1.3.6 Studio delle possibili interazioni allo stato solido tra farmaco ed eccipienti

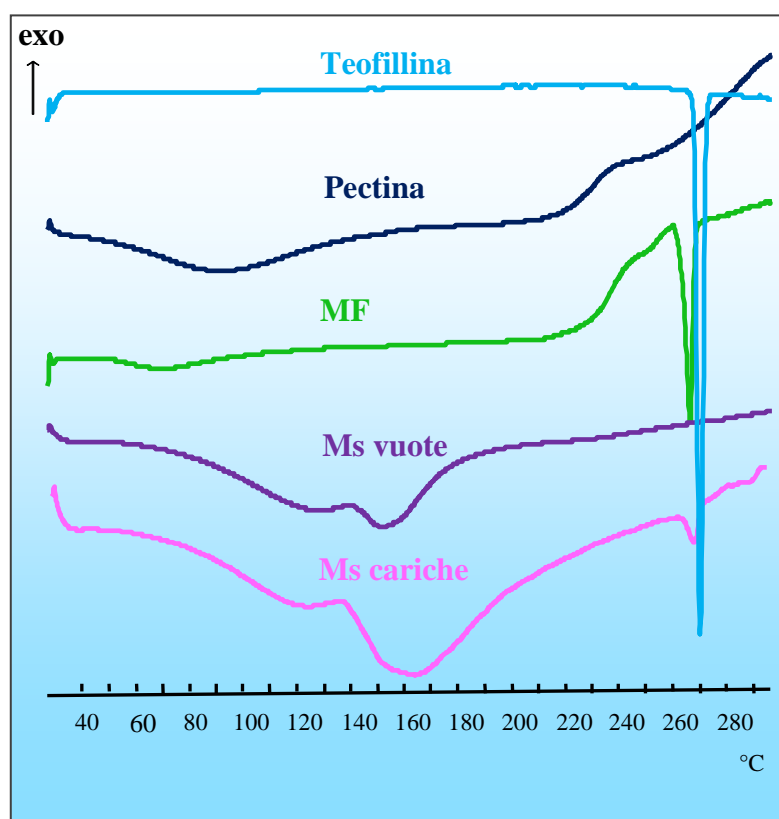
Al fine di verificare la possibile presenza di interazioni e quindi di eventuali incompatibilità tra farmaco e pectina, sono stati condotti studi di diffrazione di raggi X e di calorimetria differenziale a scansione su teofillina e pectina tal quali, sulla loro

miscela fisica negli stessi rapporti utilizzati nella preparazione delle ms, su ms vuote e caricate con il farmaco.

### 1.3.6.1 Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC)

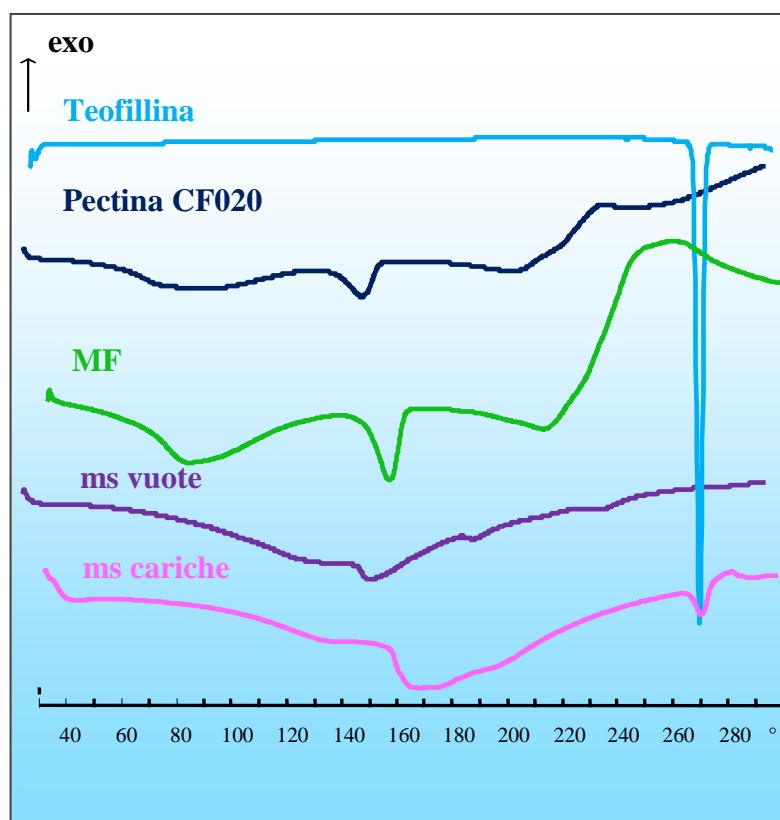
Campione	Picco di Fusione (°C)	Entalpia di Fusione (J/g)
Teofillina anidra	270,0	149,1
MF AU701-teo 1:1,25	269,2	72,4
MF CF020-teo 3.2:1	-	-
ms AU701-teo 1:1,25	267,75	34,3
ms CF020-teo 3.2:1	270,71	31,4

**Tabella 3:** Punto di fusione ed entalpia di fusione di teofillina anidra, teofillina in miscela fisica con pectina AU701 in rapporto 1:1.25 p/p (MF AU701-teo), teofillina caricata in microsfere di pectina AU701 (ms AU701-teo), teofillina in miscela fisica con pectina CF020 in rapporto 3.2:1 p/p (MF CF020-teo), teofillina caricata in microsfere di pectina CF020 (ms CF020-teo)



**Figura 7:** Termogrammi di teofillina anidra, microsfere vuote di pectina AU701 (ms vuote), teofillina in miscela fisica con pectina AU701 in rapporto 1:1.25 p/p (MF) e teofillina caricata in microsfere di pectina AU701 (ms cariche).

Come mostrato in fig 7, la teofillina presenta un profilo termico tipico di una sostanza cristallina anidra, con una endoterma di fusione a 270 °C a cui è associata una variazione di entalpia pari a 149 J/g (tab 3). Il termogramma della pectina AU701 rivela invece una struttura amorfa con una larga banda endotermica di disidratazione seguita, ad alte temperature, da una esoterma di degradazione. Nella miscela fisica (MF), in cui tra teofillina e pectina sono stati rispettati gli stessi rapporti in peso presenti anche nelle microsfere, è ancora ben visibile il picco di fusione del farmaco solo lievemente spostato a più basse temperature. Nella curva termica delle ms vuote è possibile osservare un flesso a 155 °C caratteristico del calcio pectinato ed attribuibile a fenomeni di rilassamento entalpico [25-26]. Questo stesso flesso lo si ritrova anche nelle ms caricate con teofillina ma più intenso e shiftato a temperature maggiori, seguito poi dal picco di fusione del farmaco, che risulta ridotto per parziale perdita di cristallinità.

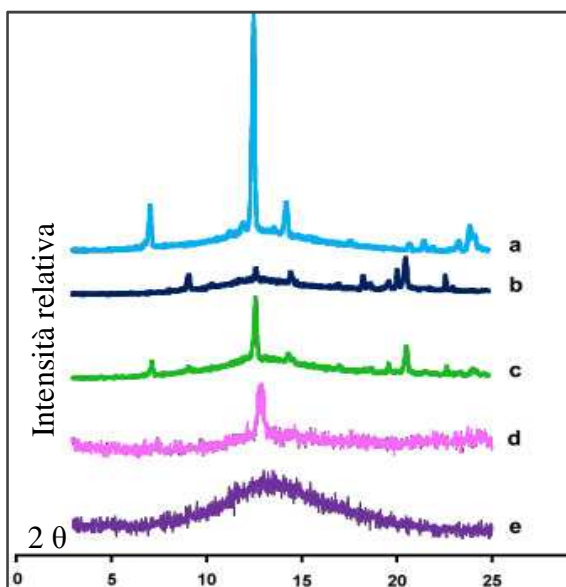


**Figura 8:** Termogrammi di teofillina anidra, microsfere vuote di pectina CF020 (ms vuote), teofillina in miscela fisica con pectina CF020 in rapporto 3.2:1 p/p (MF), teofillina caricata in microsfere di pectina CF020 (ms cariche)

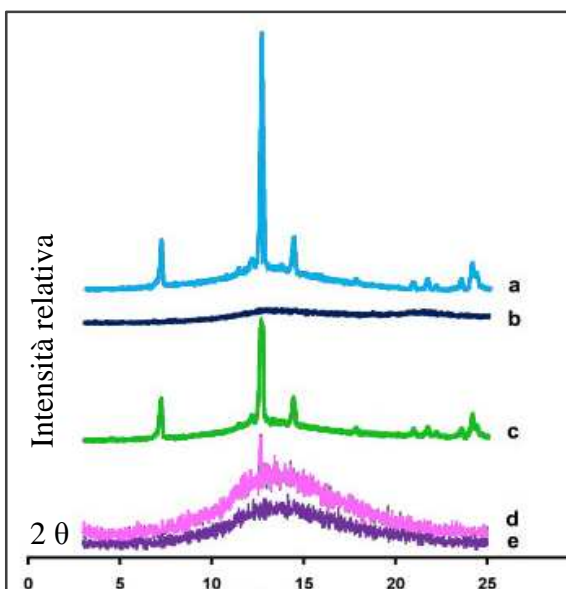
La curva termica della pectina CF020 (fig 8) presenta un picco di disidratazione tra 80 e 100 °C, un'endoterma di fusione a 152,7 °C, e un picco esotermico di decomposizione a temperature più alte [26]. Nella miscela fisica pectina CF020-teofillina, allo stesso rapporto farmaco-polimero presente anche nelle ms, non è più visibile il picco di fusione della teofillina perché coperto dall'esoterma di decomposizione del polimero. Il termogramma delle ms vuote di pectina CF020 è molto simile a quello visto per le ms vuote di pectina AU701. Anche in questo caso si ha un picco di rilassamento entalpico

ma a temperature inferiori (150,6 °C). Nel termogramma delle ms di pectina amidata cariche il picco di fusione del farmaco si riduce e, come precedentemente visto per le ms di pectina AU701, il flesso presente nelle ms vuote diventa, nella curva termica delle ms cariche, più intenso e spostato a temperature più alte.

### 1.3.6.2 Diffrazione dei raggi X su polvere



**Figura 9:** Diffrattogrammi di teofillina (a), pectina CF020 (b), MF teofillina-pectina CF020 1.25:1 (p/p) (c), ms caricate con teofillina (d) e ms vuote (e)



**Figura 10:** Diffrattogrammi di teofillina (a), pectina AU701 (b), MF teofillina-pectina AU701 1.25:1 (p/p) (c), ms caricate con teofillina (d) e ms vuote (e)

I diffrattogrammi delle miscele fisiche della teofillina sia con pectina AU701 (fig 9) che CF020 (fig 10) non presentano variazioni di posizione o di intensità relativa dei picchi di cristallinità del farmaco se confrontati con lo spettro della teofillina pura. Questo conferma che la scomparsa del picco di fusione del principio attivo, osservata precedentemente nel termogramma della miscela fisica con pectina CF020, era dovuta semplicemente a sovrapposizione con l'esoterma di decomposizione del polimero e non ad una interazione allo stato solido tra farmaco e pectina né ad amorfizzazione del

farmaco. Nei diffrattogrammi delle ms si ha una forte riduzione dell'intensità dei picchi della teofillina, legati ad una sua perdita di cristallinità come già osservato in DSC.

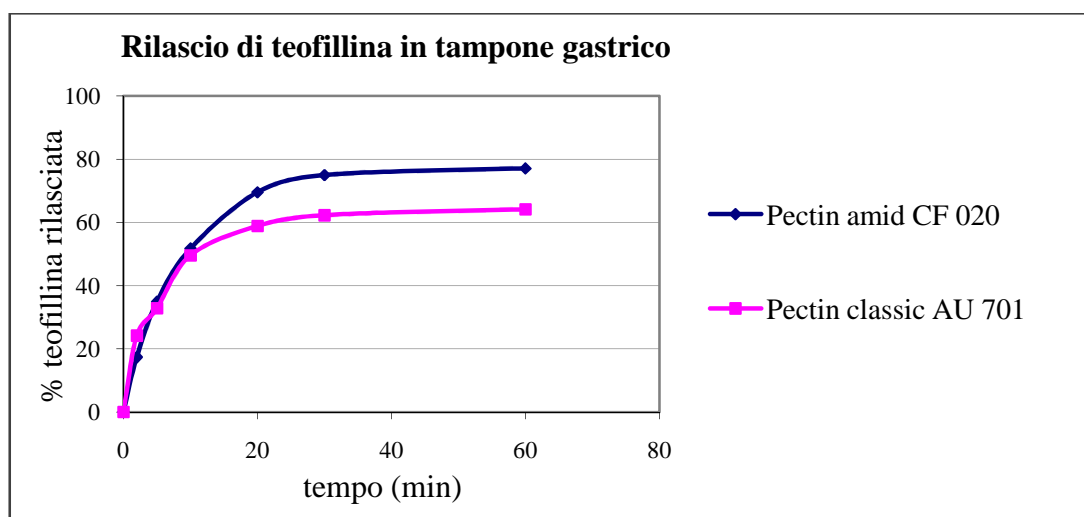
L'analisi calorimetria e la diffrazione dei raggi X hanno dimostrato l'assenza di interazioni allo stato solido e quindi di eventuali incompatibilità, durante la preparazione delle ms, tra teofillina e calcio-pectinato.

### 1.3.7 Studi di dissoluzione in ambiente gastrico

Studi di rilascio del principio attivo in ambiente gastrico sono stati condotti sulle ms che dal precedente screening erano risultate le migliori, al fine di valutare la necessità o meno di un rivestimento gastro-resistente.

Tipo di pectina	Pectina % (p/v)	CaCl <sub>2</sub> % (p/v)	TCL(min)
Pectin classic AU701	2%	30	5
Pectin amid CF020	8%	20	5

Da questo studio (fig 11) è emerso che le ms sopra riportate non sono in grado di consentire un rilascio colon specifico del farmaco perchè in meno di due ore la teofillina diffonde quasi completamente in ambiente gastrico. E' quindi richiesto un rivestimento con polimeri enterici in modo da garantire un targeting colonico della teofillina. Tale rivestimento non è necessario solo per ottenere un adeguato "lag time" prima dell'inizio del rilascio del farmaco, ma anche per aumentare la stabilità delle ms durante lo stoccaggio.

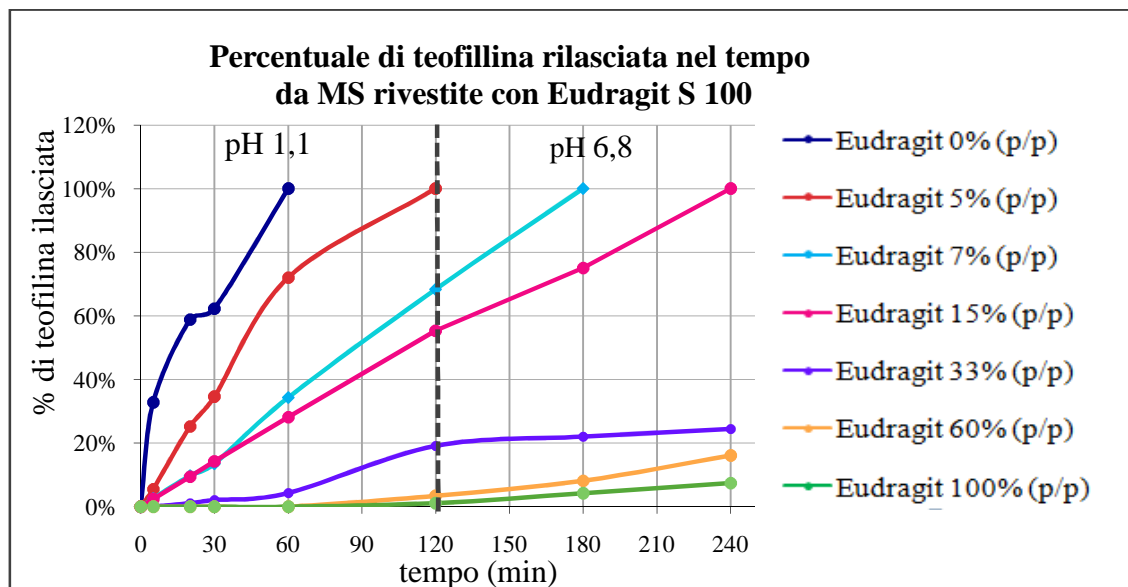


**Figura 11:** Profilo di rilascio di teofillina in ambiente gastrico da ms di pectina CF020 e AU701

Alla luce degli studi di rilascio del farmaco in ambiente gastrico, abbiamo pensato di rivestire le ms con Eudragit<sup>®</sup> S100, al fine di conferirgli gastro-resistenza. Le ms selezionate per questo rivestimento sono state quelle realizzate con pectina CF020, CaCl<sub>2</sub> 20% (p/v) e TCL = 5 min perché, come visto nei precedenti paragrafi, avevano

permesso di ottenere la più alta efficacia di incapsulazione e allo stesso tempo erano risultate le più stabili.

### 1.3.8 Rivestimento con Eudragit®



**Figura 12:** Profilo di rilascio di teofillina da ms di pectina CF020,  $\text{CaCl}_2$  20 % (p/v), TCL = 5 min rivestite con varie percentuali p/p di Eudragit®

Nel grafico (fig 12) sono riportate le percentuali di farmaco rilasciate nel tempo da ms con vari gradi di rivestimento di Eudragit®. Lo studio è stato condotto per 2 ore a pH 1.1 e altre 2 ore a pH 6.8 in modo da simulare le condizioni di transito gastrointestinale ed individuare la percentuale minima di film di rivestimento, che impedisse il rilascio di teofillina a livello gastrico. Possiamo osservare che maggiore è lo spessore di rivestimento e maggiore è il “lag time”. Il 100% p/p di rivestimento applicato è risultata essere la minima quantità di film che permetteva di ottenere un rilascio colonico, impedendo la dissoluzione del farmaco in ambiente gastrico e assicurando un rilascio di teofillina inferiore al 10% dopo due ore in mezzo enterico.

Tipo di pectina	$[\text{Ca}^{2+}]$ % p/v	TCL (min)	Peso ms non rivestite (mg ± DS)	Peso ms dopo rivestimento (mg ± DS)
AU701	20	20	4,04±1,03	9,48±2,60
CF020	2,5	20	3,69±0,29	8,72±2,50
CF020	5	20	5,96±0,53	13,01±0,68
CF020	20	20	13,35 ± 2,1	27,51±4,94
CF020	20	5	9,8±3,37	20,77±7,32

**Tabella 4a:** Peso medio di ms rivestite con Eudragit®



Tipo di pectina	[Ca <sup>2+</sup> ] % p/v	TCL (min)	Diametro ms non rivestite (mm ± DS)	Diametro dopo rivestimento (mm ± DS)	Spessore rivestimento (mm ± DS)
AU701	20	20	1,74±0,32	2,58±0,42	0,83±0,15
CF020	2,5	20	1,75±0,17	2,50±0,40	0,75±0,22
CF020	5	20	2,19±0,22	3,00±0,45	0,81±0,22
CF020	20	20	2,61±0,35	3,62±0,35	1,00±0,01
CF020	20	5	2,37±0,52	3,31±0,50	0,94±0,02

**Tabella 4b:** Diametro medio e spessore di rivestimento di ms rivestite con Eudragit®

Come mostrato in tab 4a il peso delle ms rivestite risulta raddoppiato rispetto alle ms prive di rivestimento, mentre l'incremento del diametro (tab 4b) è di circa un terzo. In tabella è riportato anche lo spessore del rivestimento, ottenuto per differenza tra il diametro delle ms prima e dopo applicazione del film di Eudragit®.

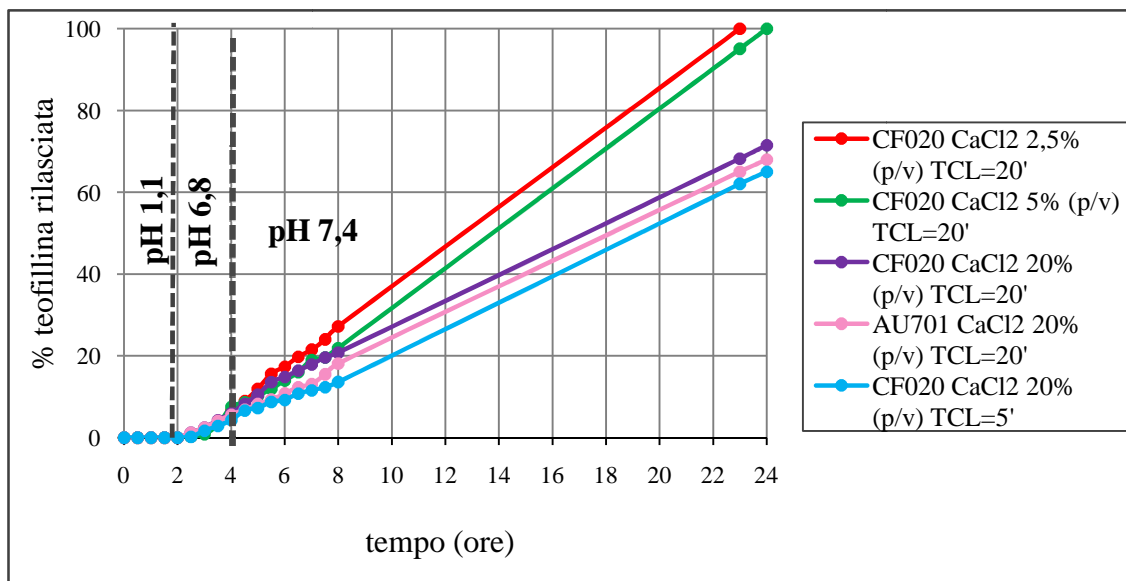
### 1.3.9 Studi di rilascio in presenza ed assenza di enzimi pectinolitici di ms rivestite con Eudragit®

Questi studi sono stati condotti in gradiente di pH sui seguenti lotti:

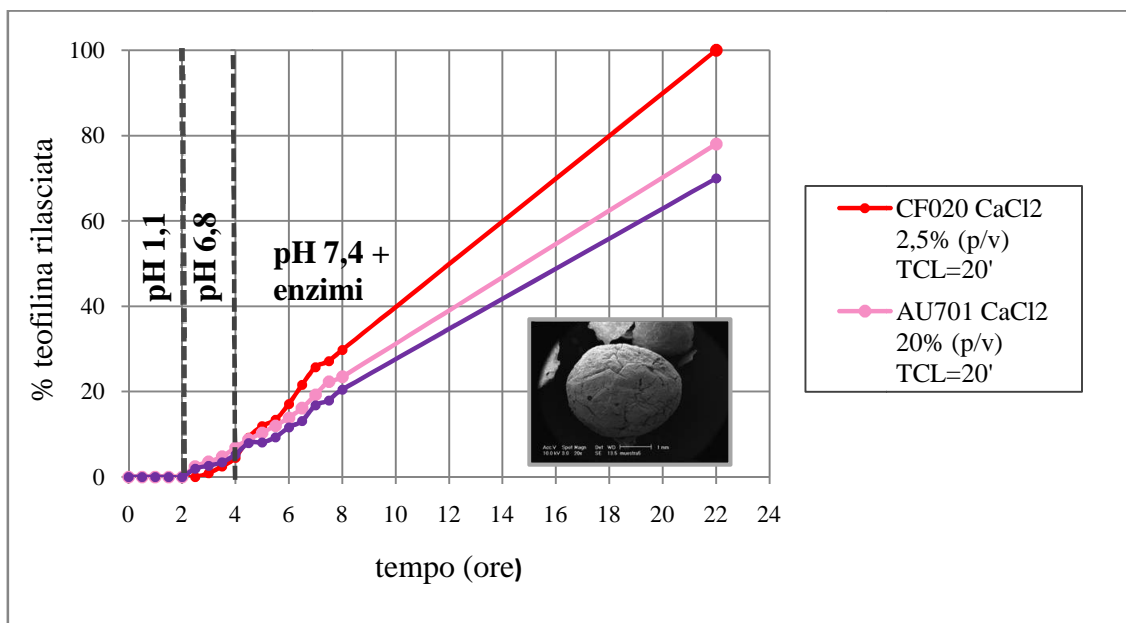
Tipo di pectina	Pectina % (p/v)	CaCl <sub>2</sub> % (p/v)	TCL (min)
CF020	8	2,5	20
CF020	8	5	20
CF020	8	20	20
CF020	8	20	5
AU701	2	20	20

Dal grafico (fig 13) possiamo notare che in ambiente gastrico nessuna ms rilascia il farmaco. In tampone intestinale, in assenza di enzimi pectinolitici, all'aumentare della concentrazione di calcio diminuisce la quantità di farmaco rilasciata, come già osservato da altri autori [27-28]. Questo può essere attribuito ad una minore permeabilità all'acqua delle ms preparate con alte concentrazioni di calcio (tab 1) dove il maggiore livello di cross linking tra le molecole di pectina e l'incremento del diametro delle ms rende più lenta la diffusione del farmaco nel mezzo di dissoluzione via via che la matrice si erode [18-29]. Il TCL non influisce in modo considerevole sulla percentuale di farmaco rilasciata e quindi una sua variazione non porta ad un cambiamento nella struttura delle ms ma solo ad una variazione nell'efficacia di incapsulazione; aumentando il TCL, la teofillina, che è un farmaco idrofilo, ha più tempo a disposizione per diffondere nel mezzo durante la fase di preparazione delle ms e quindi l'efficacia di incapsulazione diminuisce.





**Figura 13:** Profilo di rilascio di teofillina in ambiente gastro-intestinale da ms rivestite con Eudragit® in assenza di enzimi pectinolitici



**Figura 14:** Profilo di rilascio di teofillina in ambiente gastro-intestinale da ms rivestite con Eudragit® in presenza di enzimi pectinolitici. Nel riquadro è riportata la foto SEM di una ms di pectina CF020 dopo il test di rilascio

Al contrario di quanto riferito in letteratura [18-30-31] gli enzimi pectinolitici non sono risultati efficaci nel promuovere la degradazione delle ms (fig 14). Tuttavia esistono opinioni contrastanti a riguardo. Secondo alcuni autori infatti gli enzimi pectinolitici non hanno alcun effetto su ms di calcio pectinato rivestite o introdotte in capsule enteriche [28-32]. Un' ipotesi che può essere fatta a riguardo è che la presenza di ioni calcio liberi riduca l'attività enzimatica. E' infatti riportato [22] che solo una piccola

parte degli ioni calcio prende parte alla formazione della matrice di calcio-pectinato mentre la maggior parte rimane in forma libera e potrebbe essere questa componente ad inibire gli enzimi pectinolitici [32] Per questo motivo è stato introdotto successivamente nel processo di preparazione uno step in cui le ms vengono lavate tre volte in una soluzione di NaOH 0.2 N.

### 1.4 Conclusioni

- Le ms realizzate con pectina CF020 sono risultate migliori rispetto a quelle di AU701 perché più stabili durante lo stoccaggio, di forma sferica regolare e dimensioni omogenee.
- Aumentando la concentrazione di ioni calcio diminuisce la velocità con cui la teofillina viene rilasciata a livello intestinale. Per concentrazioni di  $\text{CaCl}_2$  superiori al 5% le ms non si dissolvono completamente in 24 ore, conseguentemente la quantità di farmaco rilasciata è insufficiente per l'azione terapeutica.
- Nel caso della pectina CF020 si riescono ad ottenere ms sferiche e regolari anche con basse concentrazioni di ioni calcio, mentre nel caso della pectina AU701 per ottenere una buona riproducibilità nella forma e nelle dimensioni occorre una concentrazione di  $\text{CaCl}_2$  almeno del 20 % (p/v). Quindi, anche per quanto riguarda le condizioni ottimali di rilascio, la pectina CF020 è preferibile alla pectina AU701 ed in particolare le ms migliori sono risultate quelle costituite da pectina CF020 8% (p/v),  $\text{CaCl}_2$  2,5% (p/v) rivestite con Eudragit® (100% (p/p)) e realizzate con un  $\text{TCL}=5$  min. Queste ms proteggono completamente il farmaco in ambiente gastrico, limitando ad una percentuale inferiore al 10% il rilascio di teofillina dopo 2 ore a pH 6.8 e permettendo di raggiungere il 100% di farmaco rilasciato dopo 23 in mezzo colonico.

## 1.5 Bibliografia

- [1] M. Saffran, C. Bedra, G.S Kumar, D.C. Neckers, Vasopressin: a model for the study of effects of additives on the oral and rectal administration of peptide drugs, *J. Pharm. Sci.*, 77 (1988) 33-38
- [2] K.H. Antonin, V. Saano, P. Bieck, J. Hastewell, R. Fox, P. Lowe, M. Mackay, Colonic absorption of human calcitonin in man, *Clin. Sci.*, 83 (1992) 627-631
- [3] V. Pillay, R. Fassihi, In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. I. Comparison of pH – responsive drug release and associated kinetics, *J. Contr. Rel.*, 59 (1999) 229-242
- [4] M. Ashford, J.T. Fell, Targeting drugs to the colon: delivery systems for oral administration, *J. Drug Target*, 2 (1994) 241-257
- [5] L. Yang, J.S. Chu, J.A. Fix, Colon specific drug delivery: next approaches and in vitro/in vivo evaluation, *Int. J. Pharm.*, 235 (2002) 1-15
- [6] R. Kinget, W.Kalala, L.Vervoort, G.Van Den Mooter, Colonic drug targeting, *J. Drug Target*, 6 (1998) 129 – 149
- [7] A. Rubinstein, Approaches and opportunities in colon-specific drug delivery, *Crit. Rev. Ther., Drug Carrier Syst.*, 12 (1995) 101-149
- [8] T. Minko, Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates, *Adv. Drug Del. Rev.*, 56 (2004) 491-509
- [9] C.H. Gleiter, K.H. Antonin, P. Bieck, J.Godbillon, W. Schnoleber, H. Malchow, Colonoscopy in the investigation of drug absorption in healthy volunteers, *Gastrointest. Endosc.*, 31 (1985) 71-73
- [10] D.A.White, S.P.Thompson, C.G.Wilson, G.D Bell, A pharmacokinetic comparison of two delayed release peppermint oil preparations; Colpermin and Mintec, for treatment of the irritable bowel syndrome, *Int. J. Pharm.*, 40 (1987) 151-155
- [11] D. Brockmeier, H.G. Grigoliet. H. Leonhardt, Absorption of glibenclamide from different sites of the gastrointestinal tract, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 29 (1985) 193-197
- [12] P. Langguth, G. Breves, A. Stockli, H.P. Merckle S.Wolffram, Colonic absorption and bioavailability of the pentapeptide metkephamid in the rat, *Pharm. Res.*, 11 (1994) 1640-1645
- [13] V.R. Sinha, R. Kumria, Polysaccharides to the target drugs to the colon, *Carbohydr. Polym.*, 48 (2002) 219-231
- [14] P. Mura, F. Maestrelli, M. Cirri, M.L. Gonzalez Rodriguez, A.M. Rabasco Alvarez, Development of enteric-coated pectin-based matrix tablets for colonic delivery of theophylline, *J. Drug. Targ.*, 11 (2003) 365-371.

- [15] M. Ashford, J.T. Fell, D. Attwood, H. Sharma, P. Woodhead, Studies on pectin formulations for colonic drug delivery, *J. Control. Release*, 30 (1994) 225-232
- [16] A. Rubinstein, R. Radaï, M. Ezra, S. Pathak, J.S. Rokem, In vitro evaluation of calcium pectinate: a potential colon-specific drug delivery carrier, *Pharm. Res.*, 10 (1993) 258-263.
- [17] A. Rubinstein, R. Radaï, In vitro and in vivo analysis of colon specificity of calcium pectinate formulations, *Eu. J. Pharm. Biopharm.*, 41(1995) 291-295.
- [18] P. Sriamornsak, Investigation of pectin as a carrier for oral delivery of proteins using calcium pectinate gel beads, *Int. J. Pharm.*, 169 (1998) 213-220
- [19] Z. Wakerly, J. Fell, D. Attwood, D. Parkins, Studies on amidated pectins as potential carriers in colonic drug delivery, *J. Pharm. Pharmacol.*, 49 (1997) 622-625.
- [20] J. Krämer, H. Blume, Biopharmaceutical aspects of multiparticulates, in: Y. Ghebre-Sellasie, (Eds.), *Multiparticulate Oral Drug Delivery*, Marcel Dekker, New York, (1994) 307-332.
- [21] M. Rodriguez, J.L. Vila-Jato, D. Torres, Design of a new multiparticulate system for potential site-specific and controlled drug delivery to the colonic region. *J. Control. Rel.*, 55 (1998) 67-77.
- [22] S. Bourgeois, M. Gernet, D. Pradeau, A. Andremont, E. Fattal, Evaluation of critical formulation parameters influencing the bioactivity of  $\beta$ -lactamases entrapped in pectin beads, *Int. J. Pharm.*, 324 (2006) 2-9
- [23] G. Dupuis, O. Chambin, C. Gélenot, , Colonic drug delivery: influence of cross-linking agent on pectin beads properties and role of the shell capsule type, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 32 (2006) 847-855
- [24] P. Sriamornsak, N. Thirawong, Use of back-scattered electron imaging as a tool for examining matrix structure of calcium pectinate, *Int. J. Pharm.*, 267 (2003) 151-156
- [25] V. Pillary, R. Fassihy, In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. II. Physicochemical characterization of calcium-alginate, calcium-pectinate and calcium-alginate-pectinate pellets, *J. Control. Release* 59 (1999) 243-256
- [26] S. Nurjaya, T.W. Wong, Effect of microwave on drug release properties of matrices of pectin, *Carbohydr. Polym.*, 62 (2005) 245-257
- [27] P. Sriamornsak, J. Nunthanid, Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery. I: Preparation and in vitro release studies, *Int. J. Pharm.*, 160 (1998) 207-212

- [28] O. Chambin, G. Dupuis, D. Champion, A. Voilley, Y. Pourcelot, Colon-specific drug delivery: influence of solution reticulation properties upon pectin beads performance, *Int. J. Pharm.*, 321 (2006) 86-93
- [29] S. Sungthongjeen, P. Sriamornsak, T. Pitaksuteepong, A. Somsiri, S. Puttipipatkachorn, Effect of degree of esterification of pectin and calcium amount on drug release from pectin-based matrix tablets, *AAPS Pharm. Sci. Technol.*, 5 (2004) 1-8
- [30] T.F. Vandamme, A. Lenourry, C. Charrueau, J.C. Chaumeil, The use of polysaccharides to target drug to thev colon, *Carbohydr. Polym.*, 48 (2002) 219-231
- [31] L. Liu, M.L. Fishman, J. Kost, K.B. Hicks, Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route, *Biomaterials*, 24 (2003) 3333-3343
- [32] R. Semdè, K. Amighi, M.J. Devleeschouwer, A. J. Moës, Effect of pectinolytic enzymes on the theophylline release from pellets coated with water insoluble polymers containing pectin HM or calcium pectinate, *Int. J. Pharm.*, 197 (2000) 169-179

## ***Capitolo 2***

---

### ***Microsfere di Chitosano-Calcio-Pectinato***

## 2.1 Introduzione

Gli studi discussi nel capitolo 1 hanno permesso di testare l'effettiva efficacia delle microsfere (ms) di calcio-pectinato come carriers, per un rilascio colon specifico. Per rendere maggiormente stabile la matrice di calcio-pectinato, limitando ulteriormente la liberazione prematura del farmaco, è stato successivamente aggiunto nella preparazione delle ms il chitosano (CSL), polisaccaride biocompatibile, biodegradabile, mucoadesivo e non tossico [1-2]. Il chitosano interagisce con la pectina attraverso legami ad idrogeno e di natura elettrostatica [3-4], che concorrono a stabilizzare la matrice riducendo inoltre la perdita di farmaco durante la preparazione delle ms [5]. Le ms di chitosano-calcio-pectinato mantengono le caratteristiche di biodegradabilità a livello colonico della pectina ma presentano anche proprietà enhancer e mucoadesive [3-6-7-8].

Per verificare l'effettivo vantaggio dell'aggiunta di chitosano nella preparazione delle ms, sono stati fatti studi di mucoadesione e test di permeazione di teofillina attraverso un monostrato di cellule Caco-2.

Poiché, come abbiamo visto, numerose sono le variabili che influenzano la "performance" della formulazione ottenuta (tipo di pectina, % p/v di pectina,  $\text{CaCl}_2$  e TCL) abbiamo pensato di ricorrere al disegno statistico sperimentale per ottimizzare la composizione delle ms di chitosano-calcio-pectinato. In particolare abbiamo studiato l'influenza delle percentuali relative di pectina,  $\text{CaCl}_2$  e CSL sull'efficacia di incapsulazione del principio attivo, considerata come risposta da massimizzare. L'ottimizzazione della formulazione è stata ottenuta con l'utilizzo del disegno di Doehlert, che permette di studiare le variabili a più livelli mettendo in luce eventuali interazioni positive o negative tra i fattori ed inoltre dà facoltà di estensione in una direzione qualunque del dominio sperimentale; se i risultati di una prima sperimentazione lasciano apparire la necessità di spostare il dominio di interesse, è possibile riutilizzare i punti sperimentali limitrofi alla nuova zona da esplorare trasladando il Doehlert verso la direzione di risposta ottimale. Se al contrario la conoscenza di una regione del dominio studiato deve essere più dettagliata, si ridurranno le dimensioni del disegno.

Poiché l'efficacia di incapsulazione dipende anche dalle caratteristiche chimico-fisiche del farmaco da introdurre nelle ms, questa varierà in base alla natura idrofila o lipofila del principio attivo. Per tale motivo, al fine di studiare anche l'influenza di questo fattore sull'efficacia di incapsulazione, abbiamo condotto lo studio utilizzando teofillina e prednisone rispettivamente come modello di farmaco insolubile e lipofilo ( $\log p=1,5$ ) e relativamente solubile e idrofilo ( $\log p=-0,02$ ). Entrambi i farmaci sono buoni candidati per un targeting colonico in quanto questo potrebbe portare ad un incremento della loro efficacia terapeutica [9-10]. Le ms sono state realizzate con pectina CF020 che, come visto dai risultati discussi nei precedenti paragrafi, è la più idonea per la realizzazione di un drug delivery system colonico. Teofillina e prednisone sono stati solubilizzati o dispersi in una soluzione acquosa di pectina prima della preparazione delle ms, ad una concentrazione rispettivamente dello 2,5% e 0,1% (p/v), basandosi sui



dosaggi utilizzati comunemente nelle formulazioni farmaceutiche. Il dominio sperimentale di ciascun eccipiente delle ms è stato scelto sulla base di uno screening preliminare tenendo conto della resa, della consistenza, sfericità e omogeneità nelle dimensioni delle ms ottenute. In particolare la concentrazione di chitosano è stata variata tra 0-2% (p/v) tenendo conto dei risultati ottenuti da nostri precedenti studi [11]. Per quanto riguarda il  $\text{CaCl}_2$  non sono state valutate concentrazioni superiori al 10% (p/v) per evitare eventuali effetti negativi dovuti ad un eccesso di ioni calcio [12]. La concentrazione di pectina è stata invece variata tra 6 e 12% (p/v) poichè concentrazioni più basse non permettevano di ottenere ms di adeguata consistenza e con valori più alti si ottenevano soluzioni eccessivamente viscosi difficili da lavorare. Il tempo di cross linking è stato fissato a 5 min. Infatti, come già visto nel paragrafo 1.3.4, questo è il tempo minimo per ottenere la completa formazione di ms, mentre TCL maggiori di 5 minuti portavano ad una riduzione dell'efficacia di incapsulazione della teofillina.

Ottimizzata la composizione delle ms tramite l'applicazione del disegno sperimentale, sono stati effettuati studi di rilascio in ambiente gastro-intestinale sia per la teofillina che per il prednisone, ed è stata valutata l'eventuale necessità di un rivestimento gastro-resistente di Eudragit S-100. Da questi studi è emerso che il rilascio di prednisone presenta un eccessivo "lag time" e non è completo neppure dopo 24 ore. Abbiamo ipotizzato che ciò fosse dovuto alla bassa solubilità del farmaco in soluzione acquosa.

Al fine di raggiungere una più rapida dissoluzione del prednisone nei fluidi colonici e quindi migliorarne la biodisponibilità, abbiamo pensato di complessarlo con ciclodestrina. Sono stati quindi preparati sistemi binari farmaco-ciclodestrina e sono stati caratterizzati sia in soluzione, tramite studi di solubilità di fase, sia allo stato solido tramite DSC, diffrazione dei raggi X e FTIR.

Selezionata la migliore tecnica di preparazione del sistema binario, questo è stato incapsulato nelle ms di chitosano-calcio-pectinato e ne è stato studiato il profilo di rilascio in ambiente gastro-intestinale.

## 2.2 Materiali e Metodi

### 2.2.1 Materiali

<b>Prodotto</b>	<b>Ditta produttrice</b>
Acido acetico glaciale	Riedel deHaën
Acido cloridrico 37%	Riedel deHaën
Calcio cloruro	Fluka
Chitosano a basso peso molecolare (150 kDa) grado di deacetilazione = 75-85%	Aldrich
$\beta$ -ciclodestrina ( $\beta$ CD) PM = 1135	Roquette
Etanolo 96%	Fluka
Eudragit <sup>®</sup> S100	Röhm Pharma GmbH
Idrossipropil- $\beta$ -ciclodestrina (HP $\beta$ CD) DS= 0,6; PM medio =1400	Cavasol
Glicina $\geq$ 99%	Aldrich
Pectina CF020 DA = 19-23%; DE = 25-31%	Herbstreith &Fox
Potassio fosfato monobasico	Fluka
prednisone	Sigma-Aldrich
Sodio cloruro	Fluka
Sodio fosfato bibasico	Fluka
Teofillina	Aldrich

### 2.2.2 Metodi

#### 2.2.2.1 Valutazione della mucoadesione

La mucoadesione è stata valutata utilizzando un cilindro rotante con dimensioni pari a 2,5 cm di diametro e 3,5 cm di altezza. Una porzione di piccolo intestino di suino è stata lavata e introdotta nel cilindro con la porzione della mucosa rivolta verso l'esterno. Sono state prelevate 25 ms da ogni lotto e sono state idratate per 10 minuti in 10 ml di tampone fosfato a pH 7,4, dopodiché le ms sono state fatte aderire alla mucosa intestinale per due minuti senza l'applicazione di alcuna forza. Successivamente il

cilindro è stato posto all'interno di un beaker contenente il tampone a pH 7,4 termostattizzato a 37 °C. La velocità di rotazione imposta al cilindro è stata di 300 rpm per un tempo di 60 minuti. Come parametro per la misura della mucoadesione è stato utilizzato il numero di adesione, come spiegato nel paragrafo 2.3.1.

### **2.2.2.2 Valutazione della proprietà enhancer del chitosano**

#### Colture cellulari

Le proprietà enhancer del chitosano sono state verificate con prove di permeazione della teofillina, contenuta nelle ms, attraverso cellule Caco-2. Le cellule sono state fatte crescere a 37 °C in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) a pH 7,4 addizionato con siero fetale bovino (10%) e amminoacidi non essenziali (1%). Al passaggio numero 80-85, le cellule sono state insemiante su filtri di policarbonato (area 1,13 cm<sup>2</sup>) ad una densità di 10<sup>2</sup> cellule/cm<sup>2</sup> in placche Costar Transwell a sei pozzetti. Ogni due giorni è stato rinnovato il mezzo di coltura ed è stato addizionato di benzilpenicillina (110 U/ml) e streptomina (100µ/ml). Le cellule sono state tenute a 37 °C in atmosfera con umidità del 95% e CO<sub>2</sub> al 10%, ed i filtri sono stati utilizzati per gli studi di trasporto 21-28 giorni dopo l'inseminazione.

#### Studi di trasporto

Gli studi di trasporto sono stati condotti per 2 ore a 37°C in HBSS (Hanks balance salt solution) tamponato a pH 7,4 con HEPES. Le soluzioni dei campioni (teofillina ad una concentrazione di 1,85 mg/l o due microsfere dei lotti selezionati ) sono state applicate nel compartimento apicale. A prestabiliti intervalli di tempo (30, 69, 90 ,120 minuti) sono stati fatti prelievi sia nel compartimento apicale che basolaterale, rimpiazzandoli con ugual volume di HBSS. La teofillina è stata dosata con spettrometro UV Perkin-Elmer Lambda 40 ad una lunghezza d'onda di 266 nm. Il coefficiente di permeabilità apparente è stato calcolato secondo questa equazione:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} * \frac{1}{AC_0}$$

Dove  $dQ/dT$ (µg/sec) rappresenta la quantità di teofillina che è permeata nell'unità di tempo, A è la superficie della membrana espressa in cm<sup>2</sup> e C<sub>0</sub> (µg/mL) rappresenta la concentrazione iniziale di farmaco nella camera apicale. I risultati degli studi di permeazione sono stati espressi come media di 6 misure.

Misure di resistenza elettrica transepiteliale (TEER) hanno permesso di verificare l'integrità del monostrato cellulare durante la durata del test di permeazione. Queste misure sono state condotte ogni 30 minuti con un ohmetro Millipore. I valori di TEER per cellule non trattate sono di 250 Ω cm<sup>2</sup>. Variazioni maggiori del 25 % durante l'esperimento indicano un'alterazione delle giunzioni serrate e sofferenza cellulare.

### **2.2.2.3 Disegno sperimentale**

L'efficacia di incapsulazione delle ms caricate con prednisone o teofillina è stata ottimizzata con l'utilizzo del disegno sperimentale di Dohler, in cui i fattori valutati sono stati: % (p/v) di pectina,  $\text{CaCl}_2$  e chitosano. Il piano sperimentale prevedeva 15 prove, comprese le repliche al centro, che sono state poi ridotte con l'applicazione del D-optimal design. I risultati sperimentali sono stati trattati statisticamente tramite analisi della varianza. Sia la generazione del disegno sperimentale che il trattamento statistico dei dati, sono stati effettuati con il programma NEMRODW.

### **2.2.2.4 Metodo di preparazione delle ms**

La pectina CF020 è stata dispersa a differenti concentrazioni in acqua distillata; successivamente il farmaco, teofillina (0,1 % p/v) o prednisone (2,5% p/v) come tale o liofilizzato con HP $\beta$ CD, è stato aggiunto alla soluzione di pectina; 5 ml di chitosano, preventivamente disciolto a differenti concentrazioni in acido acetico glaciale al 5%, sono stati aggiunti in 250 ml di una soluzione acquosa di  $\text{CaCl}_2$  di varia concentrazione. La soluzione di pectina è stata sgocciolata, utilizzando un ago con diametro di 0,7 mm, nella soluzione contenente chitosano e  $\text{CaCl}_2$ , tenuta temperatura ambiente e sotto agitazione (100 rpm) per 5 minuti. Le soluzioni di pectina,  $\text{CaCl}_2$  e chitosano sono state preparate alle diverse concentrazioni previste dal disegno sperimentale. Dopo un tempo di cross linking di 5 minuti, le ms sono state trasferite in una beuta contenete 50 ml di acqua distillata (nel caso del prednisone) o in NaOH 0,2 N (nel caso della teofillina) e sono state lavate per 5 minuti sotto agitazione. Questa operazione è stata ripetuta tre volte, dopodiché le ms sono state filtrate ed essiccate in stufa per 24 ore a 50 °C.

### **2.2.2.5 Calcolo della resa e delle dimensioni delle microsfere**

Dopo la preparazione e l'essiccamento delle microsfere, ne è stata calcolata la resa, come rapporto percentuale tra il peso secco e la quantità totale di eccipienti e di farmaco utilizzati per il loro ottenimento. Per la determinazione delle dimensioni è stato misurato il diametro di 10 microsfere di ciascun lotto, utilizzando un calibro, ed è stato poi calcolato un valore medio.

### **2.2.2.6 Determinazione dell'efficacia di incapsulazione**

L'efficacia di incapsulazione, sia della teofillina che del prednisone, è stata ricavata secondo il metodo indiretto riportato nel paragrafo 1.2.2.4; per entrambi i farmaci la determinazione quantitativa è stata effettuata tramite spettrometro Shimadzu UV-1601 ad una lunghezza d'onda rispettivamente di 266 e 243 nm. Alle concentrazioni a cui abbiamo operato il chitosano non interferiva sulla determinazione quantitativa dei due principi attivi.

### **2.2.2.7 Rivestimento delle ms con Eudragit® S100**

Anche per le ms di chitosano-calcio-pectinato, caricate con teofillina o prednisone, tal quale o come complesso con ciclodestrina, si è reso necessario un rivestimento con Eudragit® S100, per proteggere il farmaco da un prematuro rilascio prima del raggiungimento del colon. Il metodo utilizzato per il rivestimento è analogo a quello descritto nel paragrafo 1.2.2.5. E' stata scelta una percentuale di rivestimento p/p = 100%, che aveva garantito una totale protezione dal prematuro rilascio in ambiente gastrico della teofillina da ms di calcio pectinato (paragrafo 1.3.8).

### **2.2.2.8 Studi rilascio in vitro**

Anche per le ms di chitosano-calcio-pectinato gli studi di rilascio in vitro, sono stati effettuati con il metodo della "dispersed amount" nelle stesse condizioni descritte nel paragrafo 1.2.2.8. Questi studi sono stati condotti su ms caricate con teofillina, prednisone o con liofilizzato prednisone-HP $\beta$ CD. Le ms sono state aggiunte nel mezzo di dissoluzione in quantità tale da consentire il mantenimento delle "sink conditions" durante tutta la durata del test. La quantità di teofillina o prednisone rilasciata è stata determinata mediante dosaggio UV, rispettivamente a 266 e 243 nm, utilizzando uno spettrometro Shimadzu UV-1601. I tamponi necessari per la simulazione dell'ambiente gastrointestinale sono stati preparati come descritto nel paragrafo 1.2.2.9.

### **2.2.2.9 Preparazione dei sistemi binari prednisone-HP $\beta$ CD**

Inizialmente è stata preparata una miscela fisica mescolando in mortaio il prednisone e la ciclodestrina in rapporto 1:1 molare, come suggerito dagli studi di solubilità di fase. Successivamente, dalla miscela fisica è stato ottenuto il comacinato tramite macinazione con micro-molino a palle (Retsch MM 200) a 24 Hertz per 30 minuti.

Lo kneaded è stato ottenuto umettando la miscela fisica con una miscela etanolo/acqua 50:50 (1.5 ml per 500 mg di miscela fisica) e impastando poi fino ad evaporazione del solvente ed ottenimento di una polvere, che è stata poi posta in stufa per essere essicata completamente.

Per la preparazione del coevaporato, prednisone e ciclodestrina sono stati solubilizzati rispettivamente in 25 ml di etanolo e in 25 ml di acqua, dopodiché le due soluzioni sono state miscelate ed il solvente allontanato con rotavapor. Il sistema binario ottenuto è stato posto in essiccatore per 48 ore in modo da rimuovere completamente il solvente.

Per l'ottenimento del coliofilizzato, inizialmente è stata solubilizzata la ciclodestrina in acqua e il prednisone in una minima quantità di etanolo. Successivamente la soluzione etanolica di prednisone è stata aggiunta sotto agitazione a quella acquosa della ciclodestrina. La soluzione così ottenuta, dopo congelamento, è stata liofilizzata (Lyovac GT2 -Leybold-Haeraeus.) e quindi conservata in essiccatore.

### **2.2.2.10 Caratterizzazione dei sistemi binari prednisone-ciclodestrina**

#### Studi di solubilità di fase

Gli studi di solubilità di fase sono stati effettuati in maniera analoga a quanto descritto nel paragrafo 3.2.2.2.

#### Caratterizzazione allo stato solido dei sistemi binari prednisone-HP $\beta$ CD

Tutte le tecniche di caratterizzazione allo stato solido utilizzate (DSC, diffrazione dei raggi X e FTIR) sono state applicate sia ai prodotti puri che ai vari sistemi binari.

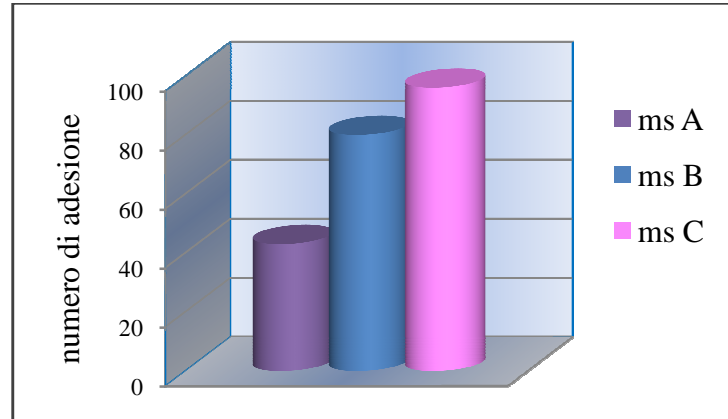
DSC: Per effettuare questo tipo di analisi è stato utilizzato uno strumento Mettler TA4000 dotato di cella DSC 25. I campioni, pesati con bilancia analitica Mettler M3 (5-10 mg) all'interno di crogioli di alluminio poi sigillati e quindi forati per permettere l'eventuale fuoriuscita di gas, sono stati sottoposti ad un aumento programmato della temperatura tra 30 e 300 °C ad una velocità di 10 °C al minuto sotto aria statica.

Diffrazione dei raggi X: I diffrattogrammi dei vari campioni sono stati ottenuti utilizzando un diffrattometro per polveri Philips PW 1130 con una velocità di scansione di 0,05°/min in un range compreso tra 5° e 35°  $2\theta$ .

FTIR: Gli spettri FTIR sono stati realizzati con uno strumento Perkin- Elmer Mod. 1600 tra 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ , disperdendo il campione in Nujol.

## 2.3 Risultati e Discussione

### 2.3.1 Valutazione di mucoadesione di microsfere di chitosano-calcio-pectinato



**Figura 1:** Numero di adesione di ms realizzate con pectina CF020 8% (p/v), CaCl<sub>2</sub> 5% (p/v) senza chitosano (A) e con chitosano all'1% (p/v) (B) o al 2% (p/v) (C)

Le proprietà mucoadesive delle ms, realizzate aggiungendo chitosano alla matrice di calcio-pectinato, sono state studiate attraverso un test di mucoadesione in cui è stato valutato come parametro il numero di adesione [13] calcolato con la seguente formula:

$$Na=(N/No)*100$$

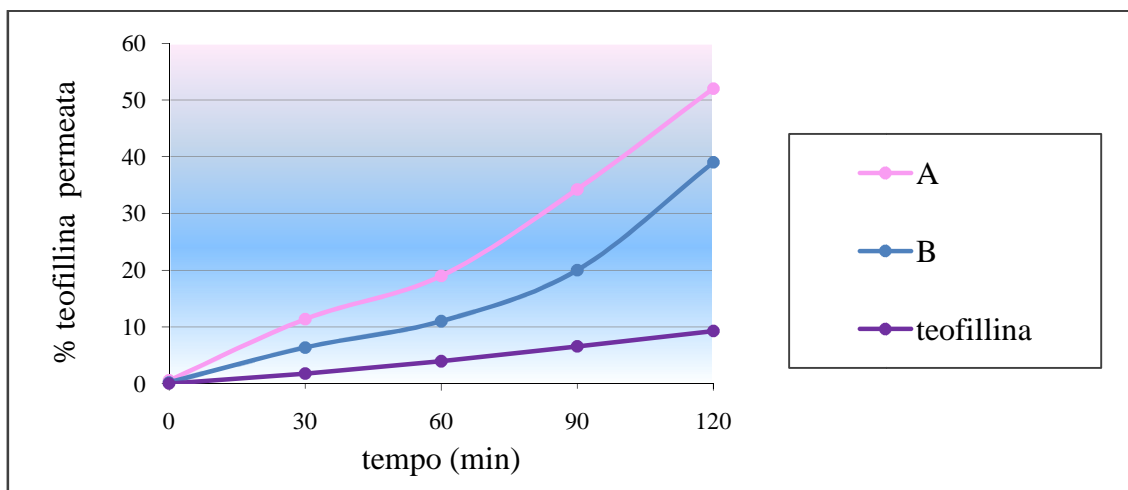
No=numero di ms analizzate

N=numero di ms rimaste attaccate alla mucosa

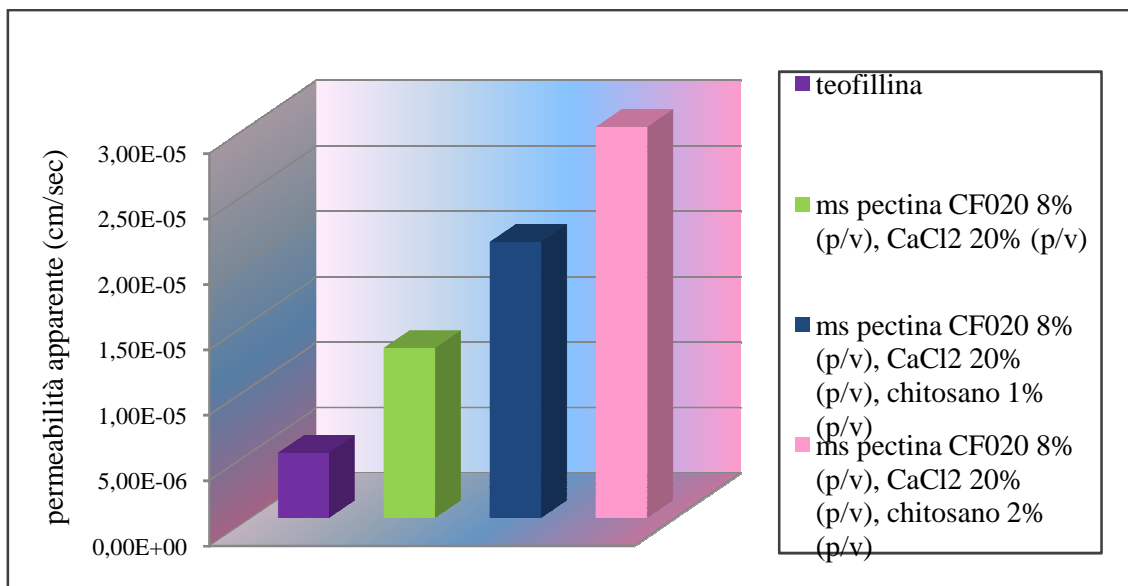
Le ms analizzate avevano uguale contenuto di pectina (CF020 8% p/v), CaCl<sub>2</sub> (5% p/v) e quantità crescenti di chitosano (0-1-2% p/v) ed erano state realizzate utilizzando un TCL=5 min. Come mostrato in fig 1 tutti i lotti di ms hanno presentato proprietà mucoadesive, in particolare abbiamo riscontrato una proporzionalità diretta tra il numero di adesione e la concentrazione di chitosano utilizzata nella preparazione delle ms. Questo ha confermato le caratteristiche di bioadesività del polimero in accordo a quanto riportato in letteratura [1-2].

### 2.3.2 Valutazione delle proprietà enhance del chitosano

Le proprietà enhancer del chitosano sono state verificate con esperimenti di permeazione della teofillina, contenuta nelle ms, attraverso cellule Caco-2.



**Figura 2:** Percentuale di teofillina permeata attraverso un monostrato di cellule Caco-2 libera o incapsulata in ms realizzate con pectina CF020 8% (p/v),  $\text{CaCl}_2$  5% (p/v) e chitosano 1% (p/v) (B) o 2% (p/v) (A)

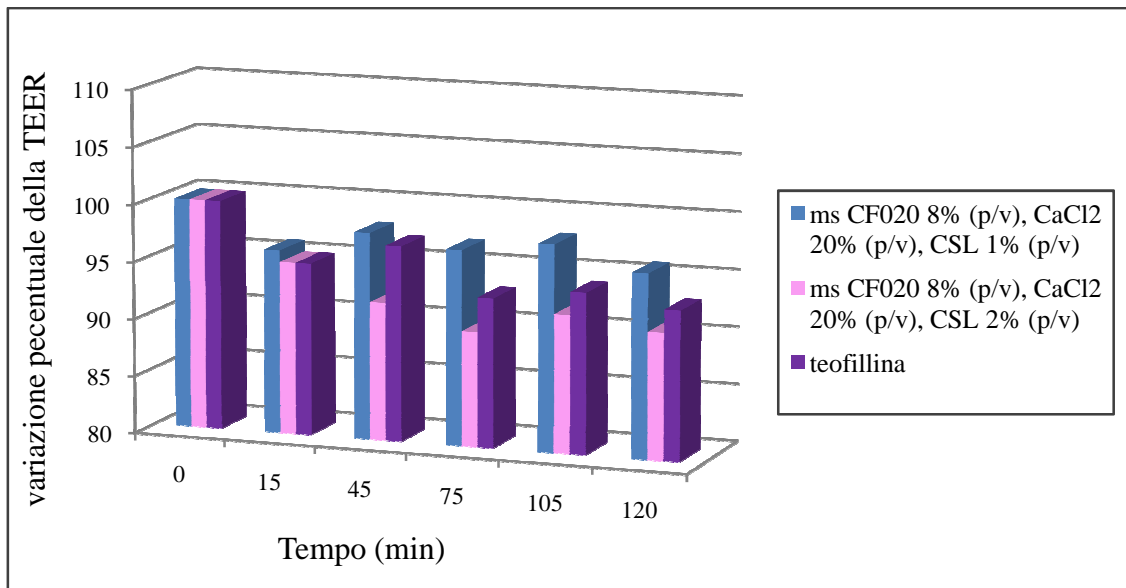


**Figura 3:** Permeabilità apparente (cm/sec) di teofillina libera e caricata in ms attraverso cellule Caco-2

Come mostrano le figure 2 e 3 la quantità di teofillina che permea attraverso le membrane cellulari è maggiore quando il farmaco è caricato in ms; inoltre, al crescere della percentuale (p/v) di chitosano nella composizione delle ms, aumenta la permeabilità della teofillina sia in termini di flusso percentuale che in termini di permeabilità apparente. Questo può essere attribuito ad un effetto enhancer del chitosano, i valori di TEER infatti non sono mai scesi al di sotto del 10% dei valori iniziali, dimostrando così assenza di alterazioni delle giunzioni serrate del monostrato (fig 4). Abbiamo potuto verificare inoltre che la presenza di chitosano rende le ms meno



igroscopiche e quindi più stabili se conservate in condizioni ambiente di temperatura e pressione.



**Figura 4:** Variazione percentuale della TEER durante l'esperimento di permeazione della teofillina attraverso cellule Caco-2

I positivi dati di mucoadesione e di permeabilità ottenuti, oltre alla maggiore stabilità conferita alle ms dalla presenza di chitosano, hanno motivato quindi l'aggiunta del polimero nella composizione delle ms che abbiamo successivamente realizzato, sulla base anche di studi da noi condotti in precedenza [11], in cui la combinazione calcio-pectinato-chitosano si era rivelata un valido carrier per lo sviluppo di un drug delivery colonico.

### 2.3.3 Disegno sperimentale

Il disegno di Doehlert prevede un numero di esperimenti pari a  $k^2+k+n$  dove  $k$  è il numero di fattori ed  $n$  il numero di repliche al centro del disegno sperimentale, che vengono effettuate per ricavare informazioni sulla riproducibilità dei risultati ottenuti. Poiché tre era il numero di fattori da noi valutati (percentuale (p/v) di pectina, CaCl<sub>2</sub> e chitosano) il disegno prevedeva un piano di 15 esperimenti, comprese le repliche al centro. In realtà, grazie all'applicazione del "D-optimal design" è stato possibile ridurre il numero di esperimenti da effettuare con guadagno quindi di tempo, forza lavoro e materiale, pur mantenendo una buona qualità dell'informazione ottenuta [14]. Il D-optimal design è un algoritmo che consiste nel minimizzare il determinante della matrice di dispersione; viene specificato il numero desiderato di punti sperimentali da esaminare ed un iniziale set arbitrario di esperimenti. Attraverso una procedura di tipo iterativo, l'iniziale set viene modificato cancellando o aggiungendo esperimenti in modo che venga minimizzato il determinante della matrice di dispersione. Si ottengono così più matrici caratterizzate da diversi criteri di qualità; si sceglie quindi la matrice che costituisce il miglior compromesso tra la qualità dell'informazione ottenuta e il numero

di esperimenti da eseguire [15]. Nel nostro caso la matrice selezionata comprendeva 11 esperimenti con tre repliche al centro. Le tre variabili, percentuale (p/v) di pectina, chitosano e  $\text{CaCl}_2$ , sono state studiate rispettivamente a tre, cinque e sette livelli. Per il  $\text{CaCl}_2$  è stato scelto un numero maggiore di livelli rispetto agli altri fattori, in quanto dai precedenti screening effettuati, sembrava avere un maggior peso sull'efficacia di incapsulazione del principio attivo. In accordo alla matrice selezionata, sono state preparate due serie di ms di 11 lotti ciascuna, caricate rispettivamente con prednisone o con teofillina e ne è stata determinata l'efficacia di incapsulazione (tab 1). Gli esperimenti sono stati eseguiti in modo random al fine di ridurre gli errori sistematici.

CSL % (p/v)	$\text{CaCl}_2$ % (p/v)	Pectina % (p/v)	Prednisone EE%	Teofillina EE%
2,0	5,1	9,0	53,30	51,16
0,0	5,1	9,0	63,06	43,72
1,5	10,0	9,0	43,03	30,88
0,5	0,2	9,0	59,80	54,61
0,5	10,0	9,0	53,60	37,69
1,5	6,73	12,0	61,60	41,93
1,5	3,47	6,0	62,50	61,50
1,0	8,37	6,0	56,80	56,13
0,5	6,73	12,0	57,10	35,07
1,0	1,83	12,0	59,30	41,92
1,0	5,10	9,0	61,10	43,78
1,0	5,10	9,0	59,00	41,34
1,0	5,10	9,0	59,80	40,84

**Tabella 1:** Piano sperimentale e rispettivi valori di efficacia di incapsulazione (EE%) osservati per ms caricate con prednisone o teofillina

Come possiamo osservare in tabella 1 l'efficacia di incapsulazione dei lotti analizzati varia in un ampio range, tra 43% e 63,1% per il prednisone e tra 30,9% e 61,5% per la teofillina; questo sta ad indicare che la risposta sperimentale è fortemente dipendente dalle variabili selezionate. I più bassi valori di efficacia di incapsulazione osservati per i lotti contenenti teofillina, rispetto alle ms caricate con prednisone, è attribuibile alla più alta solubilità della teofillina in soluzione acquosa che, come già precedentemente detto (paragrafo 1.3.3), porta ad una maggiore perdita di farmaco in fase di preparazione delle ms stesse. Un analogo effetto è stato osservato anche tra farmaci lipofili e i loro complessi di inclusione con ciclodestrine [11-16], dove il più basso valore di efficacia di incapsulazione, osservato per le ms contenenti il complesso, rispetto a quelle caricate con il farmaco tal quale, è stato attribuito alla più alta solubilità in soluzione acquosa del principio attivo complessato rispetto al farmaco libero.

Una volta condotti gli esperimenti, secondo quanto dettato dalla matrice sperimentale, sono stati prima calcolati i coefficienti del modello ipotizzato, tramite regressione multivariata, e poi è stata eseguita l'analisi statistica dei dati effettuando l'ANOVA (analisi della varianza). L'ANOVA è una tecnica statistica usata per analizzare i risultati che dipendono dalla simultanea variazione di un certo numero di fattori. Nel disegno sperimentale tale tecnica è usata per valutare la significatività e la validità del modello di regressione assunto. Il modello è significativo se, cambiando il livello dei fattori, si ha una variazione statisticamente significativa della risposta e valido se descrive bene il fenomeno in studio.

L'analisi ANOVA dei risultati sperimentali, ottenuti per le ms caricate con prednisone (tab 2), indica che il modello di regressione assunto è valido e significativo.

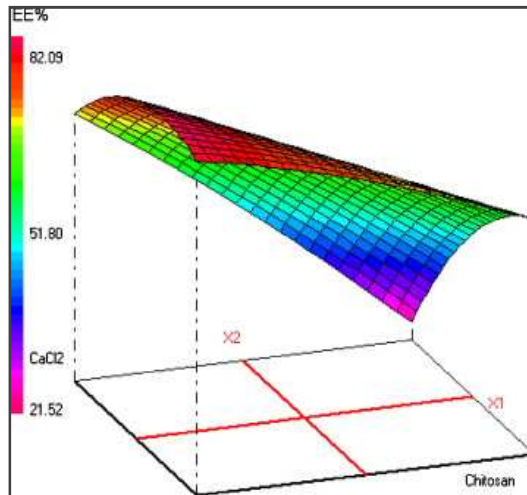
<b>Sorgente di variazione</b>	<b>Somma dei quadrati</b>	<b>Gradi di libertà</b>	<b>Quadrati medi</b>	<b>Rapporto F</b>
Regressione	342	9	38	48,6 <sup>a</sup>
Residui	2,34	3	0,782	
validità	0,0987	1	0,0987	0,0881 <sup>b</sup>
Errore	2,25	2	1,12	
totale	344	12		
<sup>a</sup> 48,58 > F critico (8,81) con 9 e 3 gradi di libertà e $\alpha=0,05$				
<sup>b</sup> 0,0881 < F critico (18,51) con 1 e 2 gradi di libertà e $\alpha=0,05$				

**Tabella 2:** Tabella riassuntiva dell'analisi ANOVA per la risposta sperimentale efficacia di incapsulazione di ms caricate con prednisone

In figura 5 è riportata la superficie di risposta per le ms caricate con prednisone, che è la rappresentazione grafica tridimensionale dell'equazione del modello ottenuto. La superficie di risposta evidenzia l'effetto della variazione delle variabili indipendenti sull'efficacia di incapsulazione delle ms. Visto che non sembra influenzare la risposta, la percentuale (p/v) di pectina (variabile  $X_3$ ) è stata mantenuta costante al 6% (p/v) in accordo ad alcune considerazioni tecnologiche: infatti, la soluzione acquosa al 6% (p/v) di pectina ha una viscosità ideale, che permette di ottenere una più omogenea dispersione del principio attivo lipofilo ed un più rapido sgocciolamento nella soluzione di  $\text{CaCl}_2$ , senza influenzare negativamente la consistenza, la forma e le dimensioni delle ms ottenute. Per quanto riguarda le altre due variabili, osservando la superficie di risposta, possiamo evincere che l'efficacia di incapsulazione è massimizzata quando il chitosano è a bassi livelli e il  $\text{CaCl}_2$  ad alti livelli. Al contrario, quando il  $\text{CaCl}_2$  è ad alti livelli, la variazione della percentuale di chitosano non ha effetto importante sulla risposta.

Applicando il modello matematico ottenuto con l'utilizzo del disegno sperimentale, la risposta risulterebbe massimizzata per i seguenti valori delle variabili: pectina 6% (p/v),  $\text{CaCl}_2$  7,9% (p/v), chitosano 0,75% (p/v) con un valore predetto di efficacia di incapsulazione di  $63,13\% \pm 3,15$ . Abbiamo quindi preparato tre lotti di ms di questa

composizione e ne abbiamo determinato l'efficacia di incapsulazione. Il valore medio sperimentale ottenuto è stato  $61,10\% \pm 0,6$ ; questo ha dimostrato la validità del modello in quanto tale valore rientra nel limite di confidenza della risposta predetta. La tabella 3 mostra l'ottima corrispondenza tra i valori di efficacia di incapsulazione ottenuti sperimentalmente e quelli predetti.



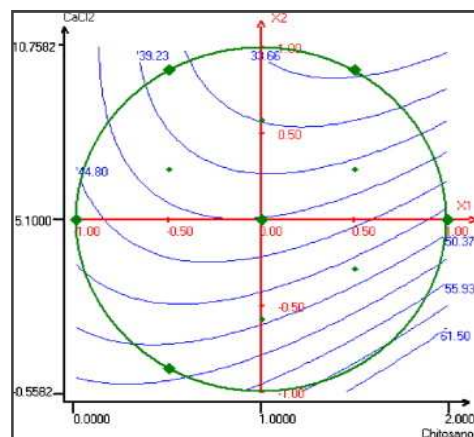
**Figura 5:** Superficie di risposta che mostra l'effetto della concentrazione di chitosano ( $X_1$ ) e  $\text{CaCl}_2$  ( $X_2$ ) sull'efficacia di incapsulazione (EE%) di ms caricate con prednisone mantenendo costante concentrazione di pectina al 6% (p/v)

No Esperimento	Risposta sperimentale EE%	Risposta calcolata EE%
1	53,30	53,41
2	63,06	62,95
3	43,03	42,92
4	59,80	59,91
6	53,60	53,60
7	61,60	61,60
9	62,50	62,39
10	56,80	56,91
11	57,10	57,21
12	59,30	59,19
13a	61,10	59,97
13b	59,00	59,97
13a	59,80	59,97

**Tabella 3:** Efficacia di incapsulazione del prednisone: risposte sperimentali e calcolate dal modello quadratico assunto

Al contrario di quanto visto per il prednisone, l'analisi della varianza (ANOVA) ha rivelato che il modello di regressione assunto per la teofillina non era valido. È stato quindi necessario eseguire un nuovo disegno scegliendo un più adeguato dominio sperimentale. Per fare ciò abbiamo analizzato la superficie di iso-risposta, rappresentazione bidimensionale della superficie di risposta, costituita da linee concentriche lungo le quali la risposta si mantiene costante. Da questo studio è emerso

che alti valori di efficacia di incapsulazione potrebbero essere ottenuti ad alte concentrazioni di pectina, tuttavia per problemi legati all'alta viscosità della soluzione, abbiamo ritenuto opportuno utilizzare una concentrazione pari al 9% (p/v), che è stata mantenuta costante nel nuovo piano sperimentale. In figura 6 è riportata la superficie di iso-risposta per il chitosano e il  $\text{CaCl}_2$  mantenendo costante la concentrazione di pectina al 9% (p/v). Possiamo vedere come i più alti valori di efficacia di incapsulazione sono ottenuti con alti livelli di chitosano e bassi livelli di  $\text{CaCl}_2$ . Basandosi su queste indicazioni abbiamo scelto un nuovo dominio sperimentale, in cui abbiamo considerato come fattori le percentuali (p/v) di chitosano e di  $\text{CaCl}_2$  che sono state variate rispettivamente nel range 1-3% (p/v) e 3-5% (p/v). Anche in questo caso è stato postulato un modello polinomiale di secondo ordine ed è stato applicato in disegno sperimentale di Doehlert.



**Figura 6:** Superficie di iso-risposta per ms caricate con teofillina in funzione delle variabili % (p/v) di CSL e  $\text{CaCl}_2$  mantenendo costante al 9% (p/v) la concentrazione di pectina

In accordo al piano sperimentale riportato in tabella 4, è stata preparata una nuova serie di lotti di ms caricate con teofillina e ne è stata determinata l'efficacia di incapsulazione, ripetendo tre volte gli esperimenti al centro del dominio. L'analisi ANOVA eseguita sui risultati ottenuti ha indicato che il nuovo modello di regressione era valido e significativo (tab 5). La superficie di risposta (fig 7) mostra che i più importanti effetti sono per entrambi i fattori quelli quadratici, infatti il più alto valore di efficacia di incapsulazione corrisponde alle condizioni al centro del dominio sperimentale. Conseguentemente la migliore composizione prevista dal modello per le ms caricate con teofillina è risultata essere: pectina 9% (p/v),  $\text{CaCl}_2$  4% (p/v), chitosano 3% (p/v) con un valore predetto di efficacia di incapsulazione di  $50,39\% \pm 1,2$ . Il valore sperimentale ottenuto, ripetendo tre volte l'esperimento per la composizione ottimizzata, è stato  $50,37\% \pm 0,93$ . Questo risultato ha confermato la validità del modello matematico assunto.

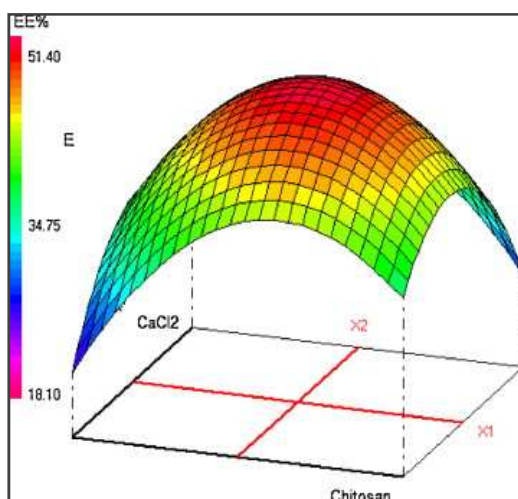
CSL % (p/v)	CaCl <sub>2</sub> % (p/v)	EE%
5,0	4,0	39,47
1,0	4,0	37,79
4,0	5,0	40,30
2,0	3,0	36,20
4,0	3,0	45,12
2,0	5,0	37,30
3,0	4,0	50,10
3,0	4,0	49,60
3,0	4,0	51,40

**Tabella 4:** Piano sperimentale e rispettivi valori di efficacia di incapsulazione (EE%) osservati per la nuova serie di ms caricate con teofillina

Sorgente di variazione	Somma dei quadrati	Gradi di libertà	Quadrati medi	Rapporto F
Regressione	275,4378	5	55,0876	8,7784 <sup>a</sup>
Residui	50,2029	8	6,2754	
validità	17,4763	1	17,4763	3,7380 <sup>b</sup>
Errore	32,7267	7	4,6752	
totale	325,6407	13		

<sup>a</sup>8,7784 > Fcritico (3,69) con 5 e 8 gradi di libertà e  $\alpha=0,05$   
<sup>b</sup>3,7380 < F critico (10,13) con 1 e 3 gradi di libertà e  $\alpha=0,05$

**Tabella 5:** Tabella riassuntiva dell'analisi ANOVA per la risposta sperimentale efficacia di incapsulazione della nuova serie di ms caricate con teofillina



**Figura 7:** Superficie di risposta che mostra l'effetto della concentrazione di chitosano ( $X_1$ ) e  $CaCl_2$  ( $X_2$ ) sull'efficacia di incapsulazione (EE%) di ms caricate con teofillina mantenendo costante la concentrazione di pectina al 9%

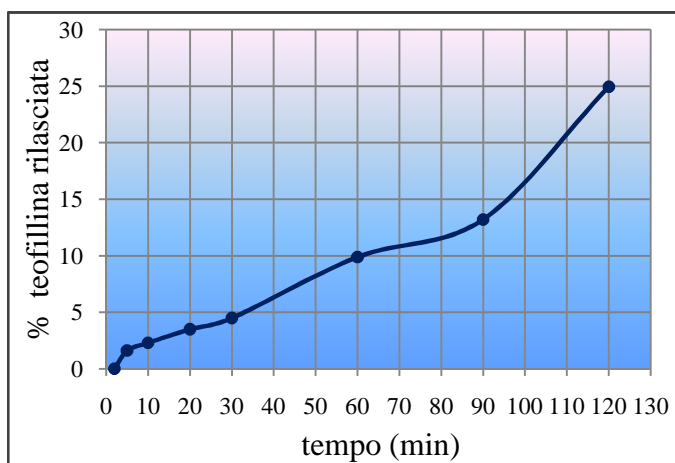
Confrontando la composizione ottimale trovata per le ms caricate con prednisone con quella trovata per le ms caricate con teofillina possiamo notare che il contenuto totale di cross-linker è molto simile (8,65% contro 7,0%), ma è molto diversa la percentuale relativa di chitosano e  $\text{CaCl}_2$ ; nel caso delle ms contenenti prednisone la percentuale del sale (7,9%) è molto più alta di quella di chitosano (0,75%) mentre per le ms contenenti teofillina la percentuale di chitosano (3%) è molto vicina a quella di  $\text{CaCl}_2$  (4%). Probabilmente l'azione combinata del calcio-pectinato e del chitosano-pectinato, portando ad una più rapida formazione del gel, è più efficace nell'intrappolare e trattenere la teofillina, riducendo così la perdita del farmaco durante la formazione delle ms e permettendo di ottenere valori di efficacia di incapsulazione maggiori e più riproducibili. Il prednisone invece ha mostrato una maggiore affinità per il calcio-pectinato rispetto al chitosano-pectinato, infatti la sua efficacia di incapsulazione aumenta al diminuire della concentrazione di chitosano nelle ms.

### 2.3.4 Caratteristiche morfologiche e dimensionali delle ms caricate con prednisone o teofillina

Tutti i lotti di ms preparate seguendo il disegno sperimentale erano di adeguata consistenza, di forma sferica e dimensioni omogenee. Le dimensioni delle ms caricate con prednisone erano molto simili a quelle delle ms caricate con teofillina, variando da un minimo di  $1,54 \pm 0,04$  ad un massimo di  $1,63 \pm 0,05$  mm le une e tra  $1,98 \pm 0,05$  e  $2,08 \pm 0,06$  mm le altre. Anche la resa è risultata molto simile per le due serie di ms, in particolare da 49 a 51% per le ms di prednisone e da 56 a 58% per le ms di teofillina.

### 2.3.5 Studi di rilascio di teofillina in ambiente gastrico da ms di chitosano-calcio-pectinato

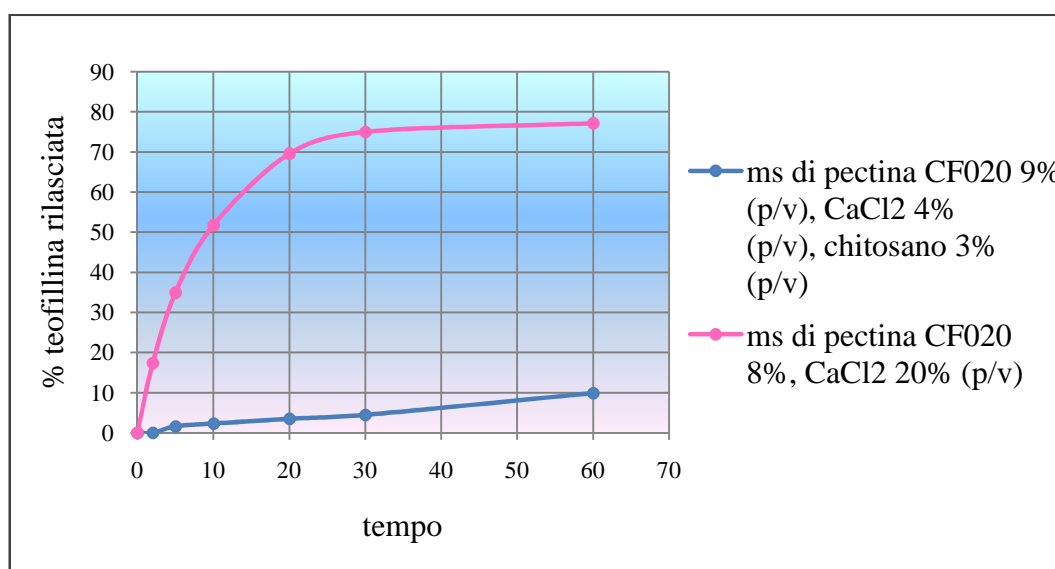
Come già precedentemente fatto per le ms di calcio-pectinato (paragrafo 1.3.7) anche per le ms di chitosano-calcio-pectinato, di composizione ottimizzata (pectina 9% (p/v),  $\text{CaCl}_2$  4% (p/v), chitosano 3% (p/v)), sono stati effettuati studi di rilascio in ambiente gastrico di teofillina, per valutare la necessità o meno di un rivestimento gastro-resistente.



**Figura 8:** Profilo di rilascio di teofillina in ambiente gastrico da ms di pectina CF020 9% (p/v),  $\text{CaCl}_2$  4% (p/v), chitosano 3%



Come possiamo vedere in figura 8, dopo 2 ore di permanenza in ambiente gastrico, le ms hanno rilasciato un 25% di teofillina, sebbene la loro struttura sia rimasta inalterata durante tutta la durata del test. Quindi, nonostante la presenza di chitosano conferisca maggiore compattezza alle ms, anche in questo caso è stato necessario un rivestimento di Eudragit® per evitare la diffusione del farmaco attraverso i pori della matrice e quindi un suo prematuro rilascio. Tuttavia, se paragoniamo il profilo di dissoluzione di teofillina da ms di calcio-pectinato preparate con o senza chitosano (fig 9), possiamo osservare che la presenza di quest'ultimo determina una forte riduzione (oltre il 60% nella prima ora dall'inizio del test) della percentuale di farmaco rilasciata in ambiente gastrico (sebbene le ms preparate senza chitosano contengano una più alta percentuale di CaCl<sub>2</sub>, che come abbiamo visto, rende la matrice più compatta). Quindi la presenza del chitosano protegge le ms da un rilascio prematuro di teofillina.

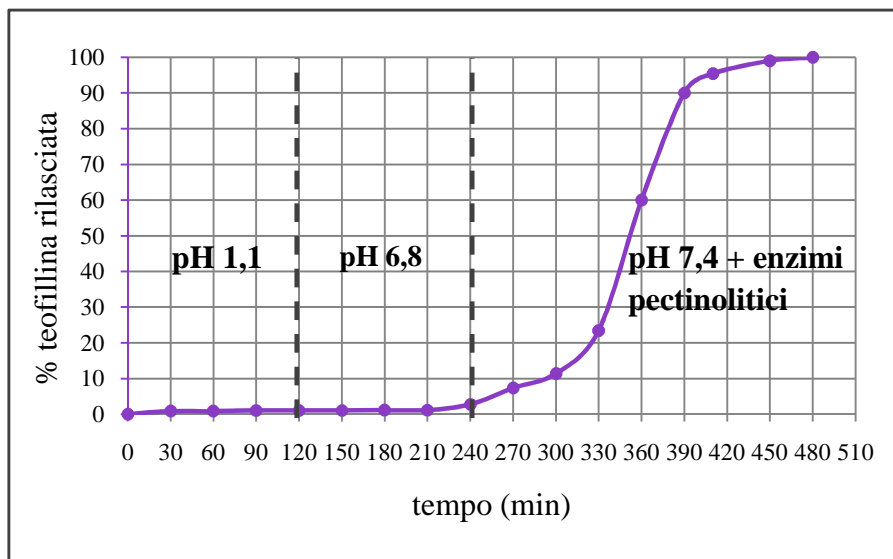


**Figura 9:** Profilo di rilascio di teofillina in ambiente gastrico da ms di calcio-pectinato (in rosa) o chitosano-calcio-pectinato (in azzurro)

### 2.3.6 Studi di rilascio in ambiente gastro-intestinale di ms caricate con teofillina e rivestite con Eudragit® S100

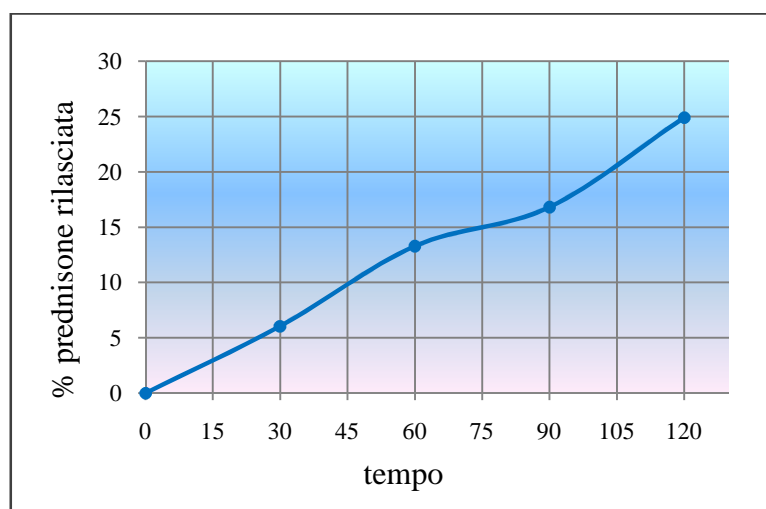
Al fine di evitare un prematuro rilascio del farmaco, abbiamo rivestito le ms di chitosano-calcio-pectinato con Eudragit® 100% (p/p) che aveva garantito una totale protezione, in ambiente gastrico, delle ms realizzate senza chitosano (paragrafo 1.3.8). Come possiamo osservare in figura 10, il rivestimento con Eudragit® ha impedito il rilascio di teofillina nelle prime due ore a pH 1,1 e nelle due ore successive a pH 6,8, mentre in ambiente colonico, in presenza di enzimi pectinolitici, il rilascio del farmaco è stato immediato e completo. L'introduzione della fase di lavaggio durante la preparazione delle ms ha permesso quindi di eliminare l'eccesso di ioni calcio che, come abbiamo visto per le ms di calcio-pectinato (paragrafo 1.3.9), inibiva gli enzimi pectinolitici, che risultavano così inefficaci nel promuovere la degradazione delle ms.





**Figura 10:** Profilo di rilascio di teofillina in ambiente gastro-intestinale ms rivestite con Eudragit® S-100

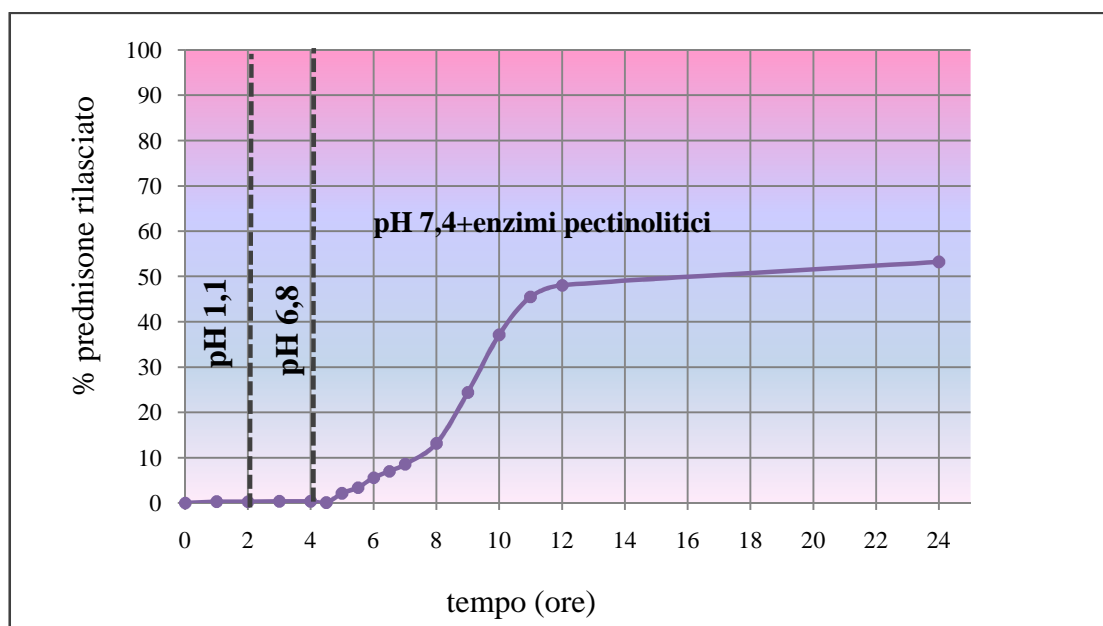
### 2.3.7 Studi di rilascio di prednisone da ms di chitosano-calcio-pectinato in ambiente gastro-intestinale



**Figura 11:** Profilo di rilascio di prednisone in ambiente gastrico da ms di pectina CF020 6% (p/v), CaCl<sub>2</sub> 7.9% (p/v), chitosano 0.75% (p/v)

In figura 11 è riportato il profilo di rilascio di prednisone da ms di calcio-pectinato in ambiente acido; possiamo constatare che anche in questo caso, come già osservato per la teofillina, dopo due ore viene rilasciato un 25% del principio attivo contenuto nelle ms; si è reso quindi necessario anche per il prednisone un rivestimento gastro-resistente di Eudragit®.

Analizzando i risultati ottenuti dagli studi di rilascio di prednisone in ambiente colonico (fig 12) e in presenza di enzimi pectinolitici possiamo notare che il profilo di dissoluzione del farmaco da ms di chitosano-calcio-pectinato presenta un eccessivo “lag time” e non si ottiene un rilascio completo del farmaco neppure dopo 24 ore. Abbiamo ipotizzato che ciò fosse dovuto alla bassa solubilità del prednisone in soluzione acquosa. Al fine di raggiungere una più rapida dissoluzione del farmaco nei fluidi colonici e quindi migliorarne la biodisponibilità, abbiamo pensato di complessare il prednisone con ciclodestrina.



**Figura 12:** Profilo di rilascio di prednisone in ambiente gastro-intestinale da ms di pectina CF020 6% (p/v),  $\text{CaCl}_2$  7.9% (p/v), chitosano 0.75% (p/v) rivestite con Eudragit® in presenza di enzimi pectinolitici

### 2.3.8 Caratterizzazione dei sistemi binari prednisone-ciclodestrina

#### 2.3.8.1 Studi di solubilità di fase

Inizialmente sono stati eseguiti studi di solubilità di fase in cui è stato studiato il comportamento in soluzione acquosa del prednisone in presenza di concentrazioni crescenti di  $\beta$ -ciclodestrina ( $\beta$ CD) o di idrossipropil- $\beta$ -ciclodestrina (HP $\beta$ CD). Come si può osservare nelle tabelle 6 e 7, in entrambi i casi l'equilibrio è stato raggiunto già dopo 24 ore. Il diagramma di solubilità di fase ottenuto con la  $\beta$ CD è di tipo Bs [17], indicativo della precipitazione di un complesso insolubile ad alte concentrazioni del carrier (fig 13). Al contrario con la HP $\beta$ CD si è ottenuto un diagramma di tipo A<sub>L</sub> [17] tipico della formazione di un complesso solubile farmaco-ciclodestrina di stechiometria 1:1 mol/mol. Con entrambe le ciclodestrine si è osservato un aumento della solubilità del principio attivo in funzione della concentrazione di ciclodestrina in soluzione, ma

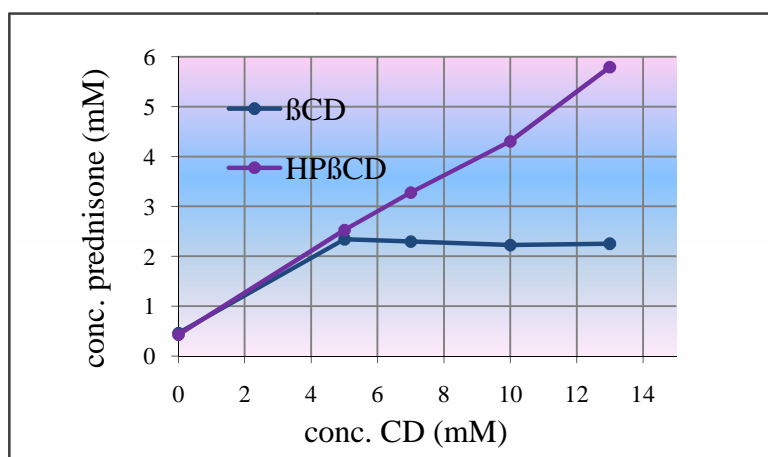
l'incremento di solubilità ottenuto con la HP $\beta$ CD è risultato maggiore rispetto a quello raggiunto con la  $\beta$ CD, per cui per la realizzazione del complesso con il prednisone è stata scelta la HP $\beta$ CD, considerata tra l'altro non irritante e priva di citotossicità dalla FDA e dall'OMS. La costante di stabilità apparente calcolata nel tratto lineare del diagramma è risultata essere  $1555 \text{ M}^{-1}$ .

	24 h	48 h
conc. $\beta$ CD (mM)	conc prednisone (mM) (media $\pm$ DS)	conc. prednisone (mM) (media $\pm$ DS)
0	$0,46 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,02$
5	$2,78 \pm 0,07$	$2,36 \pm 0,04$
7	$2,12 \pm 0,07$	$2,3 \pm 0,05$
10	$2,19 \pm 0,11$	$2,2 \pm 0,07$
13	$2,14 \pm 0,01$	$2,25 \pm 0,01$

**Tabella 6:** Studi di solubilità di fase di prednisone in presenza di concentrazioni crescenti di  $\beta$ CD

	24 h	48 h
conc. HP $\beta$ CD (mM)	conc prednisone (mM) (media $\pm$ DS)	conc. prednisone (mM) (media $\pm$ DS)
0	$0,46 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,02$
5	$2,64 \pm 0,01$	$2,53 \pm 0,01$
7	$3,37 \pm 0,06$	$3,28 \pm 0,15$
10	$4,5 \pm 0,06$	$4,31 \pm 0,27$
13	$5,74 \pm 0,06$	$5,8 \pm 0,01$

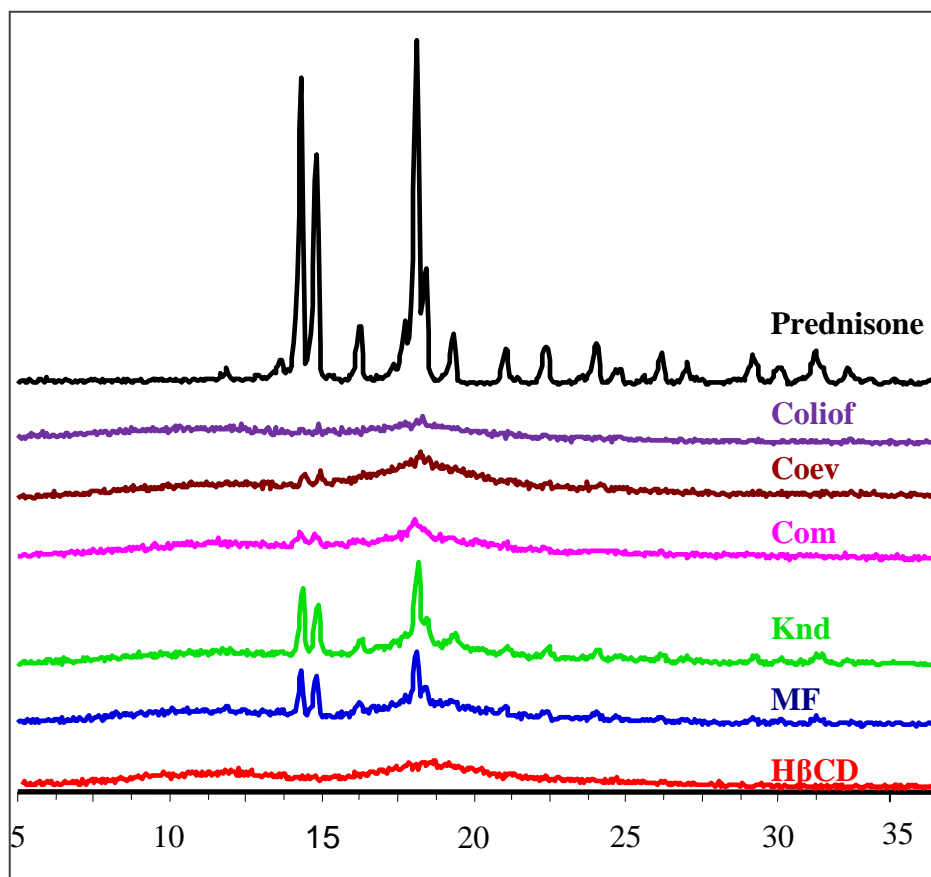
**Tabella 7:** Studi di solubilità di fase di prednisone in presenza di concentrazioni crescenti di HP $\beta$ CD



**Figura 13:** Diagrammi di solubilità di fase di prednisone in presenza di BCD e HP $\beta$ CD

### 2.3.8.2 Caratterizzazione allo stato solido di sistemi binari prednisone-HP $\beta$ CD

Alla luce dei risultati di solubilità di fase sono stati preparati sistemi farmaco ciclodestrina in rapporto stechiometrico 1:1 mol/mol utilizzando tecniche quali comacinazione, kneading, coevaporazione e coliofilizzazione. Tali sistemi sono stati caratterizzati allo stato solido tramite calorimetria differenziale a scansione (DSC), diffrazione dei raggi X e spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR).

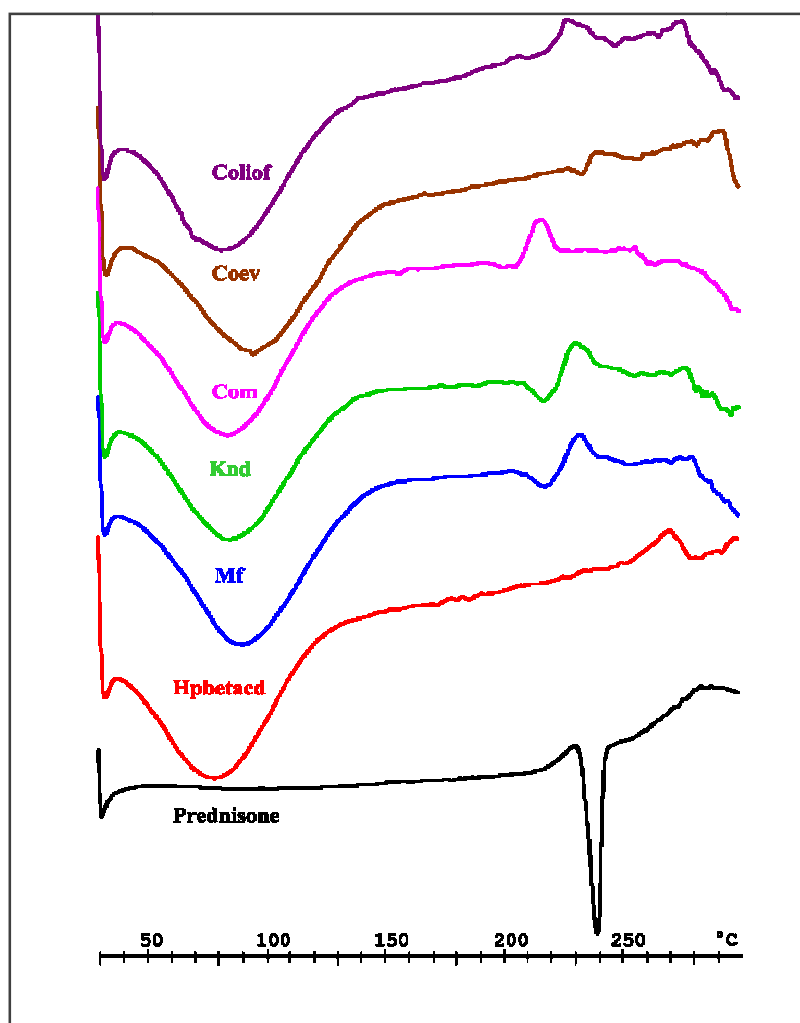


**Figura 14:** Spettri di diffrazione dei raggi X di prednisone, HP $\beta$ CD, miscela fisica prednisone-HP $\beta$ CD (MF) e dei complessi prednisone-HP $\beta$ CD ottenuti con le tecniche dello kneading (Knd) comacinazione (Com), coevaporazione (Coev) e coliofilizzazione (Coliof)

Come mostrato in figura 14 il diffrattogramma del prednisone presenta picchi intensi e molto stretti tipici di un solido cristallino mentre quello della HP $\beta$ CD è costituito da poche bande molto slargate indice della sua natura amorfa. In tutti i sistemi binari farmaco-ciclodestrina sono ancora evidenti i picchi di cristallinità del prednisone eccetto nel liofilizzato dove l'amorfizzazione del farmaco è completa.

Le curve termiche dei componenti puri e dei vari sistemi binari sono riportati in figura 15. La curva termica del prednisone è caratterizzata da un picco endotermico di fusione molto stretto ed intenso a 240 °C mentre il termogramma della HP $\beta$ CD presenta

un'endoterma di disidratazione a 90,60 °C, a cui segue, a temperatura maggiore (oltre i 270,8 °C), un picco di decomposizione. Già nella semplice miscela fisica si osserva uno spostamento dell'esoterma di decomposizione della CD a temperatura minore, che copre parzialmente il picco di fusione del farmaco. Quindi, negli altri sistemi binari esaminati, non si è in grado di determinare con sicurezza se l'osservata modifica e/o scomparsa di tale picco, è attribuibile all'avvenuta complessazione con CD o ad un suo mascheramento da parte del picco di decomposizione della HP $\beta$ CD.



**Figura 15:** Termogrammi di prednisone, HP $\beta$ CD, miscela fisica prednisone-HP $\beta$ CD (Mf) e dei complessi prednisone-HP $\beta$ CD ottenuti con le tecnica dello kneading (Knd), comacinazione (Com) , coevaporazione (Coev) e coliofilizzazione (Coliof)

Come possiamo vedere in figura 16, lo spettro IR della miscela fisica prednisone-HP $\beta$ CD è semplicemente una media pesata degli spettri dei due componenti puri. Mentre nei sistemi kneaded (fig 17) e comacinato (fig 18) non si è osservato alcuno shift dello stretching del carbonile del prednisone, nel coevaporato (fig 19) e nel liofilizzato (fig 20) si è avuto uno spostamento di tale picco verso frequenze più basse, da 1665 a 1655  $\text{cm}^{-1}$ . Questo può essere attribuito alla formazione di legami a idrogeno

tra farmaco e ciclodestrina a seguito dell'inclusione del principio attivo all'interno del carrier, in accordo ai risultati ottenuti con gli studi di diffrazione dei raggi X.

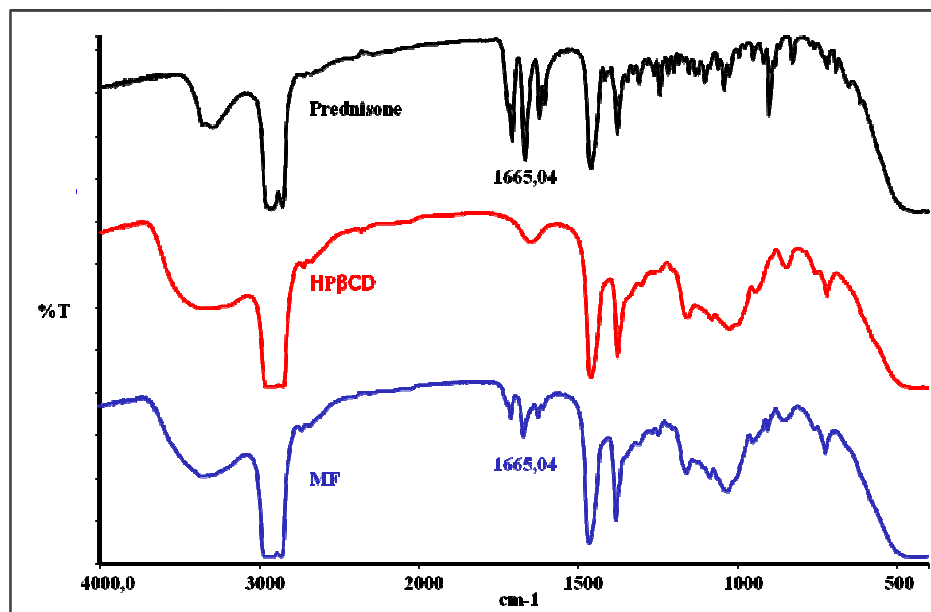


Figura 16: Spettri FTIR di prednisone, HPβCD e miscela fisica prednisone-HPβCD

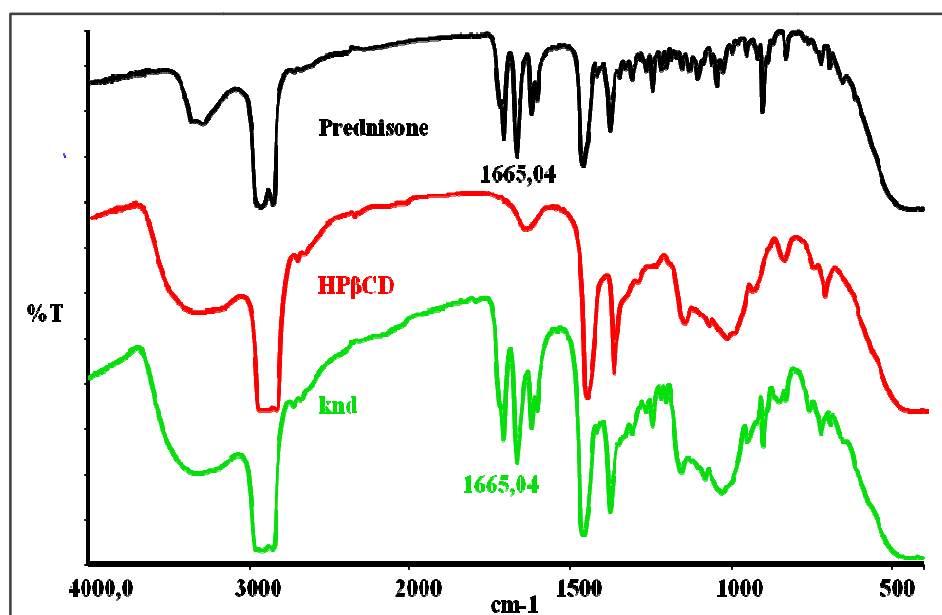


Figura 17: Spettri FTIR di prednisone, HPβCD e kneaded prednisone-HPβCD

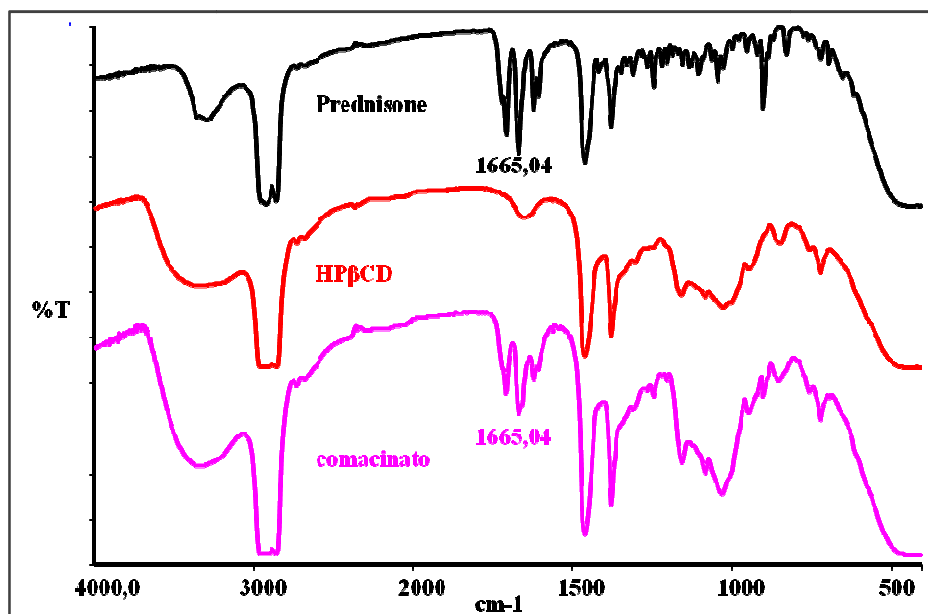


Figura 18: Spettri FTIR di prednisone, HPβCD e comacinato prednisone-HPβCD

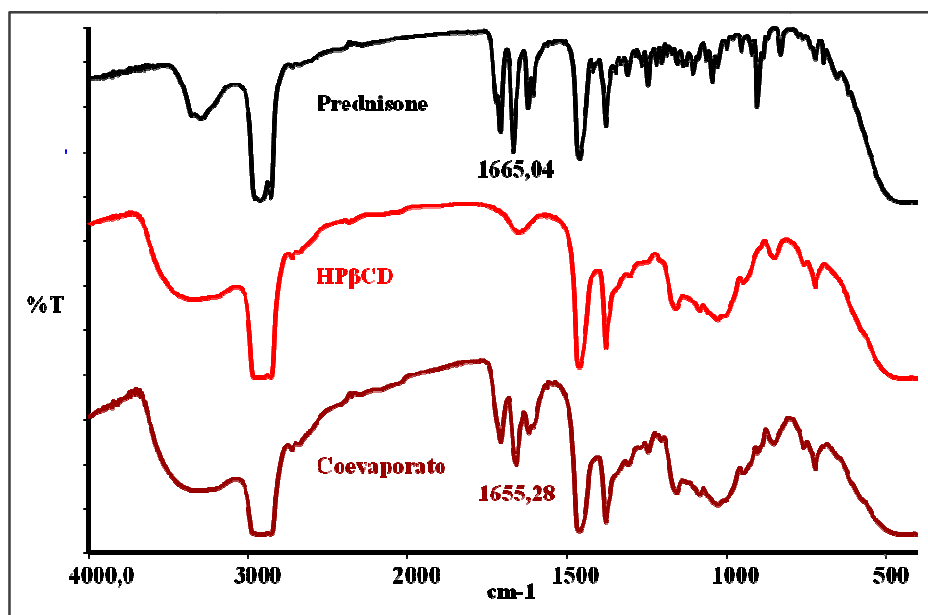


Figura 19: Spettri FTIR di prednisone, HPβCD e coevaporato prednisone-HPβCD

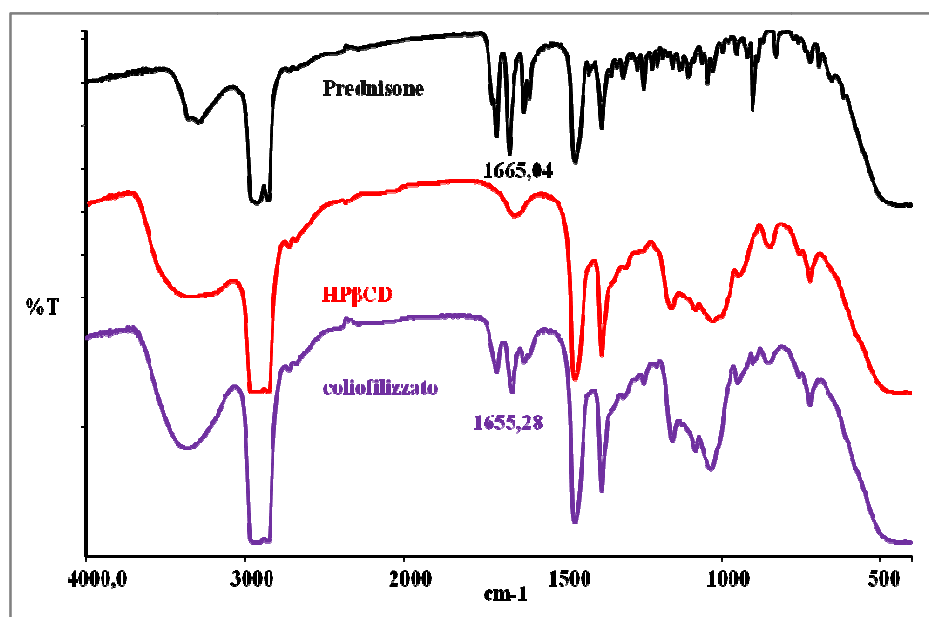


Figura 20: Spettri FTIR di prednisone, HPβCD e coliofilizzato prednisone-HPβCD

### 2.3.9 Realizzazione di ms di chitosano-calcio-pectinato contenenti il complesso prednisone-HPβCD ottenuto con la tecnica della liofilizzazione

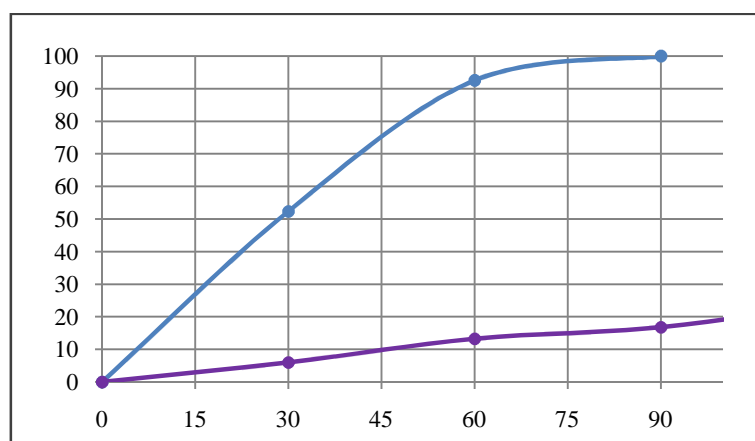
Basandosi sui risultati ottenuti con gli studi allo stato solido, il liofilizzato prednisone-HPβCD è stato selezionato per essere incapsulato nelle ms di chitosano-calcio-pectinato, in virtù della più forte interazione farmaco-ciclodestrina che ha mostrato rispetto agli altri sistemi. Sono state quindi preparate ms di pectina CF020 6% (p/v), CaCl<sub>2</sub> 7.9% (p/v), chitosano 0.75% (p/v) caricate con il liofilizzato, in quantità tale da contenere 5 mg di prednisone. L'efficacia di incapsulazione ottenuta per queste ms è stata del  $38,4 \pm 0,9\%$ , inferiore rispetto a quella osservata per il prednisone non complessato ( $61,10\% \pm 0,6$ ). Questo può essere attribuito alla maggiore solubilità del farmaco quando complessato con ciclodestrina, che ne causa una maggiore perdita durante la fase di preparazione delle ms. Al fine di ridurre questa perdita di principio attivo, abbiamo apportato una variazione alla tecnica di preparazione delle ms, riducendo da tre a uno il numero dei lavaggi in acqua; Ricordo che avevamo introdotto questa fase di lavaggio, per eliminare l'eccesso di ioni calcio che portava ad una inibizione degli enzimi pectinolitici (paragrafo 1.3.9). Questa modifica ha portato ad ottenere una maggiore efficacia di incapsulazione, pari a  $57,1\% \pm 0,81$  ed è stata sufficiente inoltre ad eliminare gli ioni calcio in eccesso, come sarà mostrato successivamente (paragrafo 2.3.10). L'incapsulazione del prednisone come liofilizzato non ha portato ad una significativa modifica delle dimensioni delle ms come mostrato in tabella 8.



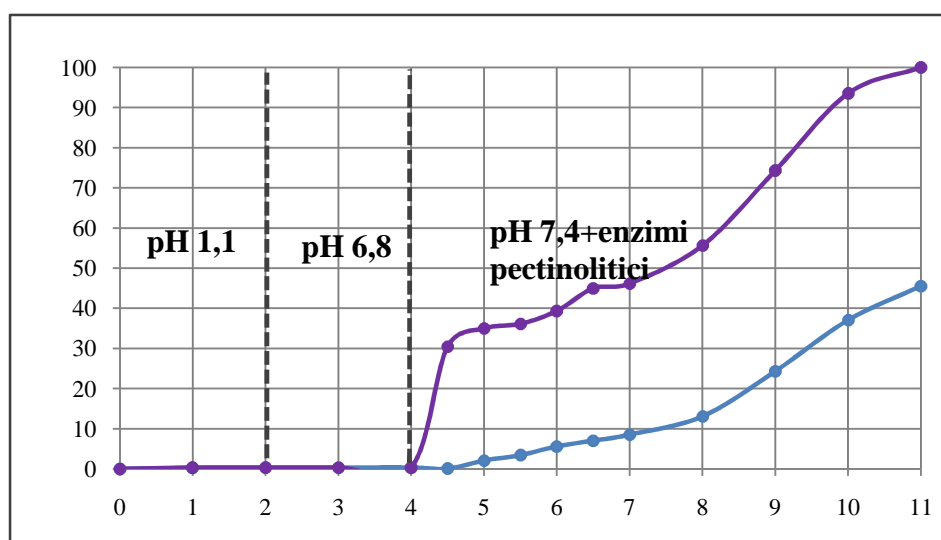
Diametro (mm) ms prednisone (media $\pm$ DS)	Diametro (mm) ms liofilizzato (media $\pm$ DS)
1,54 $\pm$ 0,04	1.50 $\pm$ 0.02

**Tabella 8:** Diametro medio di ms di pectina CF020 6% (p/v), CaCl<sub>2</sub> 7.9% (p/v), chitosano 0.75% (p/v) caricate con prednisone o con il liofilizzato prednisone-HP $\beta$ CD

### 2.3.10 Studi di rilascio di prednisone in ambiente gastro-intestinale da ms di chitosano-calcio-pectinato caricate con liofilizzato prednisone-HP $\beta$ CD

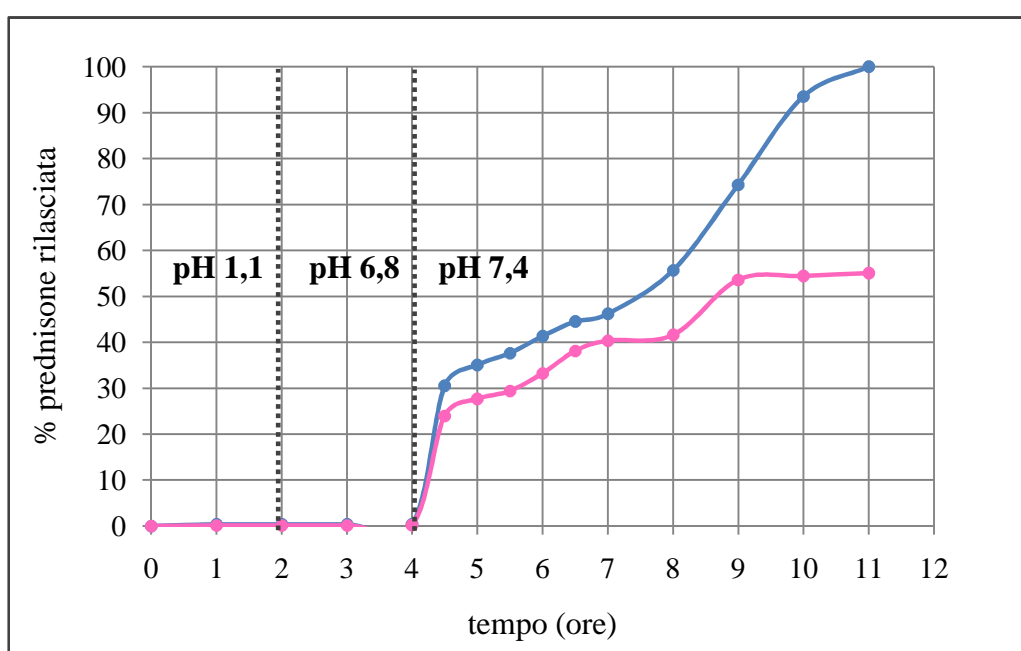


**Figura 21:** Profilo di rilascio di prednisone in ambiente gastrico da ms di pectina CF020 6% (p/v), CaCl<sub>2</sub> 7.9% (p/v), chitosano 0.75% (p/v) caricate con liofilizzato (in azzurro) o prednisone (in viola)



**Figura 22:** Profilo di rilascio di prednisone in ambiente gastro-intestinale da ms di pectina CF020 6% (p/v), CaCl<sub>2</sub> 7.9% (p/v), chitosano 0.75% (p/v) rivestite con Eudragit<sup>®</sup> caricate con prednisone (in azzurro) o liofilizzato prednisone-HP $\beta$ CD (in viola)

Come possiamo notare dalla figura 21, anche per le ms di chitosano-calcio-pectinato, caricate con liofilizzato prednisone-HP $\beta$ CD, è stato necessario un rivestimento con Eudragit<sup>®</sup>; infatti, con la complessazione, si è ottenuto un incremento della solubilità del principio attivo (anche in conseguenza alla sua amorfizzazione, come osservato negli studi allo stato solido), per cui la quantità rilasciata in ambiente gastrico è aumentata rispetto al farmaco tal quale. Tuttavia, la complessazione con ciclodestrina, ha portato ad un più rapido e totale rilascio di prednisone in mezzo colonico (fig 22), riducendo l'eccessivo "lag time" osservato per le ms caricate con solo prednisone, con cui non si raggiungeva neppure dopo 24 ore il 100% di farmaco rilasciato. La maggiore velocità di rilascio ha quindi più che compensato la minore efficacia di incapsulazione osservata per il liofilizzato rispetto al farmaco libero.



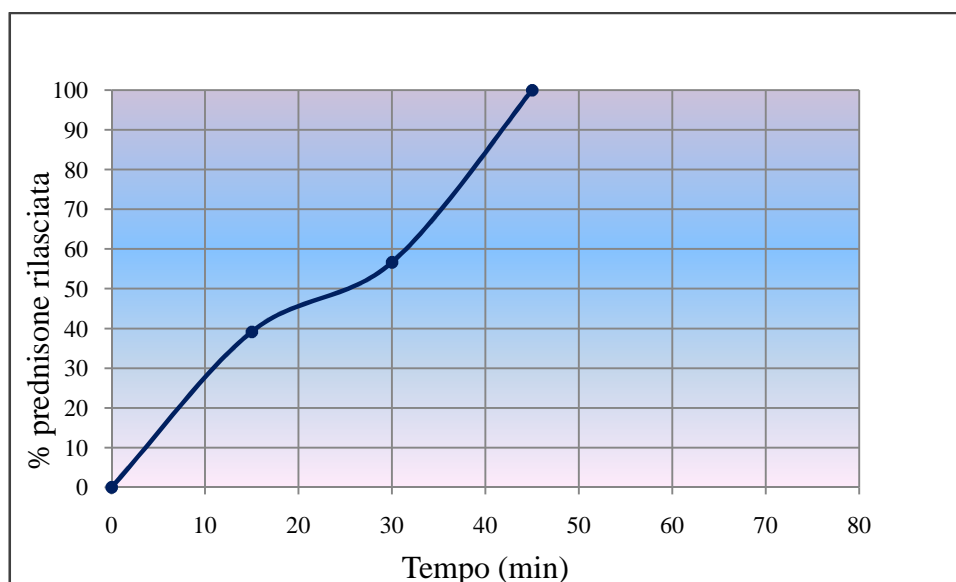
**Figura 23:** Profilo di rilascio di prednisone in ambiente gastro-intestinale da ms di pectina CF020 6% (p/v), CaCl<sub>2</sub> 7.9% (p/v), chitosano 0.75% (p/v) rivestite con Eudragit<sup>®</sup> caricate con liofilizzato prednisone-HP $\beta$ CD con (in azzurro) e in assenza (in rosa) di enzimi pectinolitici

In figura 23 è rappresentato il profilo di rilascio di prednisone complessato con ciclodestrina da ms di chitosano-calcio-pectinato, in assenza e in presenza di enzimi pectinolitici. Possiamo osservare che dopo 7 ore di permanenza delle ms in ambiente colonico, si è ottenuto un rilascio di prednisone del 100%, in presenza di enzimi pectinolitici, e solo del 55 % in assenza di enzimi. Quindi, sebbene sia stato ridotto da tre a uno il numero dei lavaggi durante la preparazione delle ms (al fine di aumentare l'efficacia di incapsulazione del liofilizzato prednisone-HP $\beta$ CD), siamo riusciti ugualmente ad eliminare l'eccesso di ioni calcio, che aveva causato inibizione enzimatica nel caso delle ms di calcio pectinato, caricate con teofillina (paragrafo 1.3.9). Tuttavia, nelle prime 3 ore di permanenza in ambiente colonico, non si osserva una grossa differenza nel profilo di rilascio di prednisone in presenza o in assenza di enzimi

pectinolitici, è come se in questa prima fase l'attività enzimatica fosse ridotta. In realtà questo ritardo nel rilascio del farmaco può essere spiegato con la formazione di un biofilm sulla matrice o alla presenza di sali insolubili della pectina che ostacolano la diffusione del farmaco dalla matrice erosa [18].

### 2.3.11 Effetto delle dimensioni delle ms sulla velocità di rilascio di prednisone in ambiente colonico

Al fine di valutare l'influenza delle dimensioni delle ms sulla velocità di rilascio di prednisone nel colon, abbiamo preparato ms di chitosano-calcio-pectinato caricate con prednisone, utilizzando un ago più piccolo (0,5 mm). Le ms così ottenute avevano un diametro medio inferiore ( $0,83 \pm 0,04$  mm) rispetto a quello ottenuto preparando le ms con ago 0,7 mm ( $1,50 \pm 0,02$  mm) a parità di composizione (pectina CF020 6% (p/v)  $\text{CaCl}_2$  7,9% (p/v), chitosano 0,75% (p/v)). Su queste ms sono stati fatti studi rilascio a livello colonico in presenza di enzimi pectinolitici, previo rivestimento con Eudragit<sup>®</sup>.



**Figura 24:** Profilo di rilascio di prednisone in ambiente colonico da ms di pectina CF020 6% (p/v),  $\text{CaCl}_2$  7,9% (p/v), chitosano 0,75% (p/v) con diametro medio di  $0,83 \pm 0,04$  mm

Come mostrato in figura 24, la velocità di rilascio di prednisone da queste ms più piccole è molto più rapida, infatti dopo soli 45 minuti in mezzo colonico si raggiunge già il 100% di farmaco rilasciato mentre, nel caso delle ms con diametro di 1,50 mm solo un 2%. Questa maggiore velocità di rilascio del farmaco, al diminuire delle dimensioni delle ms, può essere spiegata con il fatto che un diametro minore comporta, a parità di volume, una maggiore superficie esposta al mezzo di dissoluzione; inoltre più breve è il tragitto che il prednisone deve compiere per attraversare i pori della matrice polimerica e quindi liberarsi nel mezzo colonico.

## 2.4 Conclusioni

- L'aggiunta di chitosano nella composizione di ms di calcio-pectinato ha portato ad un incremento delle loro proprietà di mucoadesione ed enhancer e le ha rese meno igroscopiche e quindi più stabili se conservate in condizioni ambiente di temperatura e pressione.
- L'applicazione della strategia multivariata ha confermato che il disegno sperimentale è uno strumento utile negli studi di pre-formulazione, infatti è un mezzo molto efficace e rapido per ricavare una grande quantità di informazioni e portare all'ottenimento della formulazione ottimizzata risparmiando materiale, tempo e costi.
- L'efficacia di incapsulazione di prednisone e teofillina, rispettivamente modelli di farmaco lipofilo ed idrofilo, è stata ottimizzata utilizzando il disegno di Doehlert, che ha generato, per entrambi i farmaci, modelli matematici validi e significativi. Tali modelli hanno permesso di identificare la migliore combinazione dei tre costituenti le ms (pectina, CaCl<sub>2</sub> e chitosano), al fine di ottenere la più alta efficacia di incapsulazione compatibilmente con le caratteristiche morfologiche e dimensionali delle ms stesse.
- Le composizioni risultate migliori sono state le seguenti:

	pectina % (p/v)	CaCl <sub>2</sub> % (p/v)	chitosano % (p/v)
teofillina	9	4	3
prednisone	6	7,9	0,75

- La corrispondenza tra i valori calcolati e sperimentali, ha dimostrato la validità dei modelli statistici, generati dall'applicazione del disegno sperimentale, nel predire l'efficacia di incapsulazione di entrambi i farmaci.
- Una differente composizione ottimizzata è stata trovata per prednisone e teofillina considerando come risposta da massimizzare l'efficacia di incapsulazione. Questo ha suggerito l'importante influenza delle caratteristiche idrofile o lipofile del farmaco sulla determinazione della composizione ottimale delle ms, che dipende sia dall'affinità per la matrice polimerica che dalla tendenza ad uscire dalle ms nella fase di cross linking.
- Un rivestimento pH dipendente è stato necessario per impedire un prematuro rilascio del farmaco nel primo tratto gastrointestinale, per diffusione dai pori della matrice polimerica.
- La complessazione con HP $\beta$ CD ha portato ad amorfizzazione del prednisone ed ad un forte incremento della sua solubilità. Questo ha avuto come conseguenza una diminuzione dell'efficacia di incapsulazione del farmaco ma ha permesso di ottenere un suo più rapido e completo rilascio in mezzo colonico. Grazie

all'aumento della solubilità è stato possibile anche ottenere una completa solubilizzazione del prednisone nella soluzione di pectina, in fase di preparazione delle ms e quindi, conseguentemente una maggiore uniformità di contenuto delle ms stesse.

- La riduzione da tre ad uno del numero dei lavaggi, ha portato all'ottenimento di una maggiore efficacia di incapsulazione del prednisone in ms caricate con liofilizzato, permettendo comunque l'eliminazione degli ioni calcio in eccesso, che causa inibizione degli enzimi pectinolitici.
- Le dimensioni delle ms influenzano fortemente la velocità di rilascio del farmaco, infatti passando da un diametro medio di 1,50 mm a 0,83 mm, si ha un incremento del 98% della quantità di farmaco rilasciata dopo 45 minuti di permanenza in ambiente colonico. Questo può essere attribuito sia ad un aumento della superficie esposta al mezzo di dissoluzione che ad una diminuzione del cammino diffusionale delle molecole del farmaco. Quindi, in base alle esigenze, è possibile modulare la velocità di rilascio del farmaco anche con una opportuna scelta del diametro dell'ago utilizzato per la preparazione delle ms.

## 2.5 Bibliografia

- [1] L. Illum, Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient, *Pharm. Res.*, 15 (1998) 1326-1331
- [2] W. Paul, C.P. Sharma, Chitosan, a drug carrier for the 21<sup>st</sup> century, *S.T.P, Pharma Sci.*, 10 (2000) 5-22
- [3] K.L.B. Chang, J. Lin, Swelling behaviour and the release of protein from chitosan-pectin composite particles, *Carbohydr. Polym.*, 43 (2000) 163-169
- [4] M. Marudova, A.J. MacDougall, S.G. Ring, Pectin-chitosan interactions and gel formation, *Carbohydr. Res* 339 (2004) 1933-1939
- [5] M. George, T.E. Abraham, Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan –a review, *J. Control. Rel.*, 114 (2006) 1-14
- [6] O. Munjeri, J.H. Collett, J.T. Fell, Hydrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery: the role of chitosan in modifying drug release, *J. Control. Rel.*, 46 (1997) 273-278
- [7] F. Atyabi, S. Majzoob, M. Iman. M. Salehi, F. Dorkoosh, In vitro evaluation and modification of pectinate gel beads containing trimethyl chitosan as a multi-particulate system for delivery of water-soluble macromolecules to colon, *Carbohydr. Polym.* 61 (2005) 39-51
- [8] M. Hiorth, T. Versland, J. Heikkilä, I. Tho, S.A. Sande, Immersion coating of pellets with calcium pectinate and chitosan, *Int. J. Pharm.*, 308 (2006) 25-32
- [9] G. Buckton, D. Ganderton, R. Shah, In vitro dissolution of some commercially available sustained-release theophylline preparations, *Int. J. Pharm.*, 42 (1988) 35-39
- [10] H. Kaiser, H.K. Kley, *Cortisontherapie. Corticoide in klinik und praxis*, 11th ed. Georg Thieme, Stuttgart, Germany (2002)
- [11] F. Maestrelli, M. Cirri, G. Corti, N. Mennini, P. Mura, Microspheres for colonic delivery of ketoprofen-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin complex, *Eur. J. Pharm. Sci.* 34 (2008) 1-11
- [12] S. Bourgeois, M. Gernet, D. Pradeau, A. Andremont, E. Fattal, Evaluation of critical formulation parameters influencing the bioactivity of  $\beta$ -lactamases entrapped in pectin beads, *Int. J. Pharm.*, 324 (2006) 2-9
- [13] A. Ahuja, R.K. Khar, J. Ali, Mucoadhesive drug delivery systems, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 23 (1997) 489-515
- [14] D. Mathieu, R. Phan-Tan-Luu, M. Sergent, Criblage et etude des facteurs, LPRAI SARL., Marseille, France (1996)

- [15] G.A. Lewis, D. Mathieu, R. Phan-Tan-Luu, *Pharmaceutical Experimental Design*, Marcel Dekker, New York (1999)
- [16] J. Filipović-Grčić, D. Voinovich, M. Moneghini, M. Bećirević-Laćan, L. Magarotto, I. Jalšenjak, Chitosan microspheres with hydrocortisone and hydrocortisone-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 9 (2000) 373-379
- [17] T. Higuchi and K.A. Connors, Phase solubility techniques, *Adv. Anal. Chem. Instrum.*, 4 (1965) 117–212
- [18] P. Sriamornsak, Chemistry of pectin and its Pharmaceutical uses: a review *Silpakorn Univ. Int. J.*, 3 (2003) 206–228.

## ***Capitolo 3***

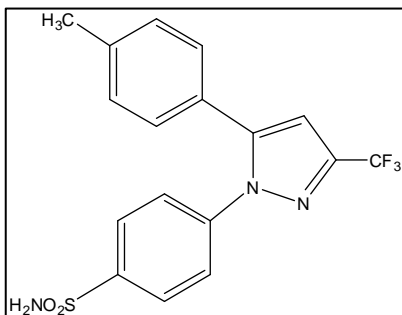
---

### ***Microsfere di Chitosano-Calcio-Alginato***



### 3.1 Introduzione

Lo scopo di questa seconda parte del lavoro di tesi è stato la realizzazione di microsfere (ms) di chitosano-calcio-alginato per il rilascio colon specifico di celecoxib.



Il celecoxib è un farmaco antinfiammatorio non steroideo ed è stato il primo inibitore selettivo della ciclossigenasi-2 (COX-2) [1] approvato dalla FDA nel 1998. Esso è utilizzato principalmente nel trattamento dell'artrite reumatoide e dell'osteoartrite [2-3-4-5]. Numerosi studi hanno dimostrato inoltre che la somministrazione giornaliera di celecoxib riduce l'incidenza di tumori al colon in pazienti affetti da

poliposi adenomatosa familiare [6-7-8]. Il celecoxib viene utilizzato anche per il trattamento di tumori della pelle [9], del seno [10] e del colon [11]. Il vantaggio degli inibitori selettivi COX-2 rispetto ai tradizionali farmaci antinfiammatori non steroidei è la minore gastro-tossicità [12-13-14]. Trials endoscopici hanno dimostrato una significativa riduzione dell'incidenza di ulcera associata all'utilizzo di inibitori COX 2 rispetto ai tradizionali NSAIDs [15]. Tuttavia, poiché diversi studi clinici hanno messo in luce l'aumentata incidenza di effetti collaterali cardiovascolari associata alla loro somministrazione [16], l'EMA ha posto delle restrizioni al loro impiego, in particolare:

- Tutti i coxib sono controindicati nei pazienti affetti da insufficienza cardiaca congestizia (NYHA II-IV), cardiopatia ischemica, malattia cerebrovascolare conclamata.
- I pazienti con fattori di rischio significativi per eventi cardiovascolari (es.: ipertensione, iperlipidemia, diabete mellito, abitudine al fumo) o arteriopatia periferica devono essere trattati solo dopo attenta valutazione.
- La durata del trattamento deve essere la più breve possibile e deve essere utilizzato il dosaggio giornaliero minimo efficace.

E' importante evidenziare che il targeting colonico è particolarmente indicato nel caso dell'artrite reumatoide, patologia soggetta a ritmo circadiano [17] con massima acutizzazione della sintomatologia al mattino. I livelli di cortisolo hanno un andamento circadiano, con un picco alle 6-7 del mattino e un minimo tra le 22 e le 2. Nell'artrite reumatoide il ritmo è alterato e l'ormone aumenta prima, tra mezzanotte e le 2; un anticipo preceduto e forse causato dall'incremento di una citochina pro-infiammatoria, l'interleuchina 6, (crescita che nelle persone sane non si osserva). Questo si lega al caratteristico quadro mattutino della malattia, con rigidità articolare, dolore e gonfiore. Gli antinfiammatori, quali glucocorticoidi e celecoxib, sono efficaci contro i sintomi dell'artrite reumatoide e riducono anche le citochine pro-infiammatorie quali l'interleuchina 6. Di recente [18] si è suggerito che la somministrazione al mattino non sia ottimale perché a quel punto lo stimolo pro-infiammatorio ha già esplicito i suoi effetti nocivi: anche la Lega europea contro i reumatismi, ha sottolineato l'importanza

del “timing” e dei ritmi circadiani, ipotizzando una migliore efficacia della somministrazione notturna. Assumere di routine un farmaco di notte è però ovviamente una via poco praticabile.

Sulla base di tali premesse lo scopo di questo lavoro è stata la realizzazione di un sistema a rilascio colónico di celecoxib, con un duplice obiettivo:

- permettere l'assunzione serale del farmaco, con un rilascio ritardato, in corrispondenza con la necessità terapeutica, migliorandone l'efficacia nel trattamento dell'artrite reumatoide, con possibilità di ridurre la dose e quindi gli effetti collaterali.
- massimizzare il targeting colónico, per una applicazione locale del celecoxib come antitumorale.

Inizialmente è stato necessario mettere a punto un adeguato metodo di estrazione del celecoxib dalla specialità commerciale Celebrix<sup>®</sup>, non essendo reperibile il principio attivo puro. Il prodotto estratto è stato identificato tramite calorimetria differenziale a scansione (DSC). Sempre tramite DSC è stato possibile determinare anche il grado di purezza del prodotto ottenuto.

Il celecoxib è un farmaco che appartiene alla classe 2 del sistema di classificazione biofarmaceutico [19]; infatti, malgrado la sua alta permeabilità gastrointestinale, presenta una bassissima solubilità in acqua (3 µg/ml); Possedendo un gruppo ammidico debolmente acido, con una pKa di circa 11, risulta praticamente insolubile a pH fisiologico. La scarsa solubilità ne causa una inadeguata dissoluzione nei fluidi gastro-intestinali e quindi uno scarso e variabile assorbimento [20]. La biodisponibilità orale del celecoxib varia tra il 22 e 40% [21]. Un incremento della solubilità in acqua del celecoxib permetterebbe quindi di ottenere un incremento della sua efficacia terapeutica. Molti approcci sono stati tentati a tale scopo: utilizzo di cosolventi come etanolo, glicerolo e PEG [22], preparazione di dispersioni solide tramite la tecnica della fusione [23], deposizione del farmaco sottoforma di particelle molto fini sulla superficie di super disgreganti come la croscarmellosa sodica e complessazione con ciclodestrine [24-25-26-27].

Nel presente studio abbiamo confrontato l'effetto di due diverse ciclodestrine, la βCD e il suo derivato idrossipropilato, HPβCD, e della nicotinammide sulla solubilità in acqua del celecoxib. L'uso della nicotinammide come agente solubilizzante è stato ampiamente riportato [28-29-30-31], in virtù anche della sua bassa tossicità e basso costo. Il meccanismo tramite il quale la nicotinammide determina un incremento della solubilità viene definito solubilizzazione idrotropica, risultato di una “stacking complexation” [32]. La “driving force per questo tipo di processo è spesso passiva, in altre parole il farmaco e l'agente complessante potrebbero non avere un'affinità diretta ma interagire per minimizzare la superficie di esposizione all'ambiente acquoso. L'idea che la nicotinammide possa agire tramite questo meccanismo è stata proposta da molti autori [33-34-35-36].

Studi di solubilità di fase hanno permesso di selezionare tra  $\beta$ CD, HP $\beta$ CD e nicotinammide il carrier che permetteva di ottenere il maggiore incremento della solubilità del principio attivo, che è risultato essere la HP $\beta$ CD.

Al fine di ottenere un complesso celecoxib-HP $\beta$ CD allo stato solido sono state utilizzate tecniche quali la comacinazione (com), lo kneading (knd), la coevaporazione (coev) e la coliofilizzazione (coliof), preparando sistemi farmaco-carrier in rapporto 1:1 molare in accordo ai risultati ottenuti dagli studi di solubilità di fase. I sistemi binari ottenuti sono stati caratterizzati allo stato solido tramite DSC, diffrazione dei raggi X e spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR). Da tali studi è emerso che solo con la coliofilizzazione si ottiene la completa amorfizzazione del celecoxib, tuttavia dati gli elevati costi nella realizzazione e la resa molto bassa non è stata scelta come tecnica di preparazione del complesso. La comacinazione e lo kneading invece sono risultate due tecniche di preparazione efficaci e di facile realizzazione.

E' stato anche valutato l'effetto dell'aggiunta al sistema binario celecoxib-HP $\beta$ CD, di un polimero idrofilo al 10% p/p, secondo quanto suggerito da alcuni autori [37]. Lo scopo dell'aggiunta di questo terzo componente é stato quello di ottenere un ulteriore incremento della solubilità al fine di:

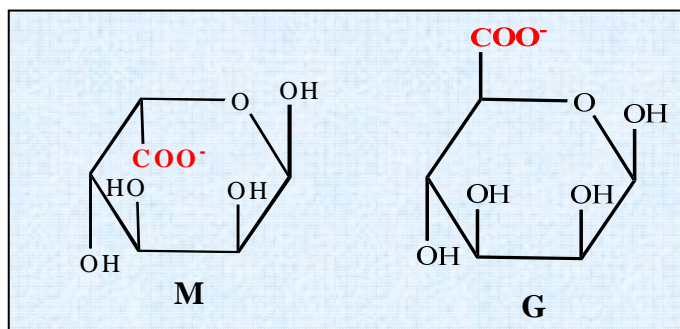
- massimizzare la velocità di dissoluzione e quindi la biodisponibilità del celecoxib.
- facilitare la sua solubilizzazione nella soluzione di alginato durante la preparazione delle ms e quindi ottenere una sua più omogenea distribuzione nelle stesse.
- migliorare le caratteristiche morfologiche del celecoxib, che presenta di per sé una struttura aghiforme poco scorrevole [38].

A tal fine sono stati testati tre polimeri idrofili, quali polivinilpirrolidone (PVP), polietilenglicole (PEG) e idrossipropilmetilcellulosa (HPMC). L'analisi allo stato solido di tali sistemi (DSC, diffrazione dei raggi X, FTIR) ha messo in evidenza una totale amorfizzazione del celecoxib solo nel sistema ternario comacinato celecoxib-HP $\beta$ CD-PVP. Test di velocità di dissoluzione condotti a 37° C in tampone fosfato a pH 7,4, hanno dimostrato che l'amorfizzazione totale del farmaco nel sistema ternario comacinato, osservata con gli studi allo stato solido, si traduceva effettivamente in un notevole incremento della sua velocità di dissoluzione non solo rispetto al celecoxib tal quale ma anche al sistema binario celecoxib-HP $\beta$ CD. Quindi il comacinato ternario è stato selezionato come sistema da introdurre nelle ms di chitosano-calcio-alginato che abbiamo successivamente realizzato.

Tra le possibili strategie a disposizione per ottenere un rilascio colon specifico è stato scelto un sistema sia pH che microflora dipendente. In particolare sono state realizzate ms di chitosano-calcio-alginato resistenti a pH gastrico, sensibili alla microflora del colon e solubili al suo pH. Gli alginati sono una famiglia di polisaccaridi ricavati da varie specie di alghe brune o Phaeophyceae, caratterizzati da un ampio range di

composizione chimica, peso molecolare e proprietà funzionali. Il principale vantaggio nell'utilizzo di polisaccaridi come veicoli per il rilascio dei farmaci è la loro biodegradabilità in vivo.

Chimicamente gli alginati sono copolimeri lineari non ramificati di acido  $\beta$ -D-mannuronico (M) e del suo C-5 epimero acido  $\alpha$ -L-guluronico (G), legati da legami  $\alpha$ -1,4.



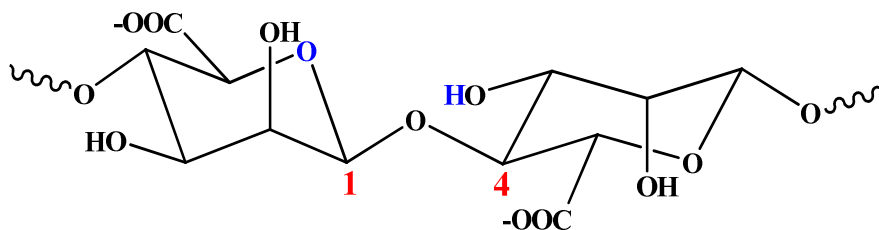
**Figura 1:** Struttura dell'acido  $\beta$ -D-mannuronico (M) e  $\alpha$ -L-guluronico (G)

Gli alginati non sono copolimeri "Random" ma, a seconda della specie di alghe da cui provengono (tab 1), consistono di blocchi omopolimerici (blocchi M, composti esclusivamente da residui di acido mannuronico, e blocchi G, composti esclusivamente da residui di acido guluronico) variamente intercalati da blocchi eteropolimerici (-MGMGMG-), ciascuno dei quali ha differente conformazione e comportamento.

Specie di alga	% di catena -M-M-M-M	% di catena -G-G-G-G-	% di catena -M-G-M-G-
Macrocystis pyrifera	40,6	17,7	41,7
Ascophyllum nodosum	38,4	20,7	41,0
Laminaria digitata	12,7	60,5	26,8

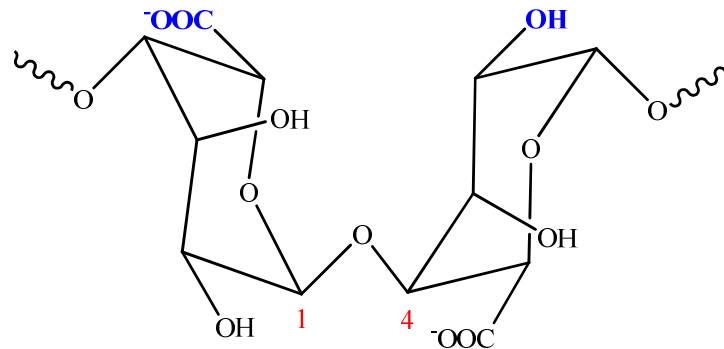
**Tabella 1:** Proporzioni percentuali di catene -M-M-M-M-, -G-G-G-G- e -M-G-M-G- presenti negli alginati provenienti da alcuni tipi di alghe brune officinali

Nei blocchi -M-M-M-M- i residui di acido mannuronico sono legati da legami  $\beta$ -(1,4)-glicosidici diequatoriali stabilizzati da legami ad idrogeno tra l'OH dell'atomo di carbonio in posizione 3 e l'atomo di ossigeno dell'anello in quinta posizione del residuo adiacente.

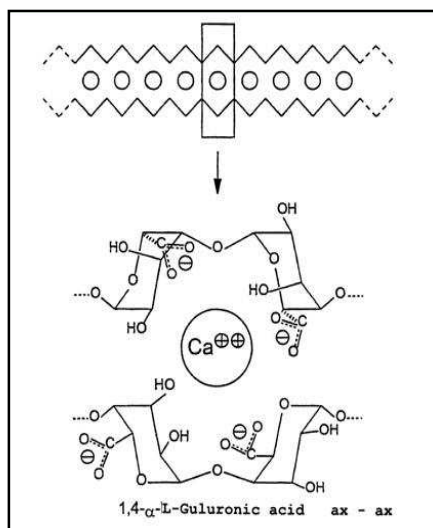


La struttura risultante dei blocchi di acido polimannuronico è un'elica sinistrorsa stabilizzata da questi deboli legami a idrogeno.

Nei blocchi -G-G-G-G- i residui di acido guluronico sono legati da legami  $\alpha$ -(1,4)-glicosidici diassiali e la struttura è stabilizzata da legami a idrogeno tra l'ossigeno del gruppo carbossilico e l'OH del carbonio 2 nel residuo seguente.



I blocchi di acido poliguluronico formano strette eliche stabilizzate da legami a idrogeno.



La conformazione dei blocchi di acido polimannuronico sarà lineare distesa mentre quella dell'acido poliguluronico sarà lineare più contratta. A questa differenza è dovuta la capacità dei cationi bivalenti come  $\text{Ca}^{2+}$  di fare gelificare le molecole di alginato solo in corrispondenza dei blocchi -GGGGGG-; i cationi si legano a questo blocco perché vengono chelati dai gruppi carbossilici di due catene adiacenti; questo determina un cambiamento conformazionale che dà origine ad una struttura rigida tridimensionale definita "egg box". Questo processo viene definito "ionotropic gelation" e porta alla formazione delle ms.

Il principale svantaggio dei sistemi puramente pH dipendenti è dovuto alla variabilità intra- ed inter-individuale del pH del tratto gastro intestinale.

Per ottenere un rilascio di celecoxib più riproducibile, potenziare il targeting colonico e migliorare l'efficacia di incapsulazione, in associazione al calcio alginato è stato usato il chitosano. Tale polimero aveva infatti dimostrato la sua capacità di potenziare le proprietà mucoadesive ed enhancer delle ms di calcio-pectinato (vedi capitolo 2). Inoltre, essendo il chitosano carico positivamente, esso dà origine ad una interazione ionica con l'alginato, conferendo maggiore rigidità alla parete delle ms ed ostacolando così un rilascio prematuro del farmaco. Una volta raggiunto il colon, il chitosano viene degradato dalla microflora batterica [39] e le ms iniziano a rigonfiare in quanto, per uno scambio tra ioni calcio legati alle sequenze di polimannuronato e ioni sodio, presenti in

loco, si ha un rilassamento delle catene seguito da un uptake di acqua. Successivamente anche gli ioni calcio legati ai gruppi carbossilici delle unità di poliguluronato iniziano a scambiarsi con gli ioni sodio, portando alla completa disintegrazione delle ms [40].

Visti gli ottimi risultati ottenuti nel precedente studio mediante l'impiego del disegno sperimentale per l'ottimizzazione dell'efficacia di incapsulazione di teofillina e prednisone in ms di chitosano-calcio-pectinato, abbiamo ritenuto opportuno utilizzare il disegno di Doehlert anche per lo sviluppo delle ms di chitosano-calcio-alginato caricate con il complesso celecoxib-HP $\beta$ CD-PVP. Come variabili sono state scelte il tempo di cross linking (TCL) e le concentrazioni percentuali (p/v) delle soluzioni di alginato di sodio, CaCl<sub>2</sub> e chitosano utilizzate nella preparazione delle ms. Come risposte sono state considerate sia l'efficacia di incapsulazione che la percentuale di farmaco rilasciata dopo 4 ore in tampone fosfato a pH 7.4 a 37 °C, in modo da ottimizzarle contemporaneamente. Poiché i risultati del disegno sperimentale hanno indicato che la variazione dei fattori aveva effetti opposti sulle due risposte, è stata necessaria l'applicazione della funzione di desiderabilità per trovare il miglior compromesso al fine di ottenere la loro simultanea ottimizzazione.

**3.2 Materiali e Metodi****3.2.1 Materiali**

<b>Prodotto</b>	<b>Ditta produttrice</b>
Acido acetico glaciale	Riedel deHaën
Acido cloridrico 37%	Riedel deHaën
Alginato di sodio viscosità 20-40 cP, 1 % in acqua; 40,6% di acido guluronico	Aldrich
Calcio cloruro	Fluka
Celebrex <sup>®</sup> Cps da 200 mg	Pfizer
CD <sub>3</sub> OD % D 99,9	Aldrich
Chitosano a basso peso molecolare (150 kDa) grado di deacetilazione = 75-85%	Aldrich
β-ciclodestrina (βCD) PM = 1135	Roquette
D <sub>2</sub> O % D 99,9	Aldrich
Idrossipropil-β-ciclodestrina (HPβCD) DS= 0,6; PM medio=1400	Cavasol
Idrossipropilmetilcellulosa (HPMC)	Sigma
Glicina ≥99%	Aldrich
Metanolo ≥ 99,9%	Fluka
Nicotinammide	Sigma-Aldrich
Polietilenglicole (PEG) 4000	Merck
Polivinilpirrolidone (PVP) PM = 40000 Da	Fluka
Potassio bromuro per IR	Sigma
Potassio fosfato monobasico	Fluka
Sodio cloruro	Fluka
Sodio dodecil solfato (SDS)	Fluka
Sodio fosfato bibasico	Fluka



### 3.2.2 Metodi

#### 3.2.2.1 Estrazione del celecoxib

In una beuta contenente 100 ml di metanolo è stato aggiunto il contenuto di 20 capsule di celebrex<sup>®</sup> (circa 5,3 g di polvere). La beuta è stata lasciata sotto agitazione per 15 minuti, dopodiché la sospensione ottenuta è stata filtrata in un pallone ed il solvente, contenente celecoxib in soluzione più eventuali eccipienti solubili in metanolo, è stato rimosso con rotavapor (Büchi R-200/R-205). Al pallone è stata poi aggiunta acqua deionizzata e la sospensione ottenuta è stata filtrata. Il precipitato rimasto sulla carta da filtro, dopo un secondo lavaggio, è stato risospeso in acqua e lasciato tutta la notte in agitazione in modo da far passare in soluzione l'impurezza di lattosio. Il celecoxib è stato quindi recuperato nuovamente per filtrazione, asciutto in stufa a 40 °C per 24 ore e macinato con molino a palle (Retsch MM 200) per 20 minuti a 24 Hertz. La polvere ottenuta è stata poi setacciata con Analisette (Retsch) per 10 minuti con ampiezza di vibrazione di 70 rpm, in modo da selezionare una polvere con granulometria compresa tra 0,25 e 0,21 mm.

#### 3.2.2.2 Studi di solubilità di fase

Gli studi di solubilità di fase sono stati condotti aggiungendo un eccesso di celecoxib in beute contenenti 10 ml di acqua deionizzata o di una soluzione acquosa a varia concentrazione di carrier (da 5 a 13 mM per la  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD e da 5 mM a 1,06 M per la nicotinammide). Le beute sono state immerse in un bagno termostattizzato a 25 °C e mantenute sotto continua agitazione attraverso ancorette magnetiche. Ad intervalli di tempo sono stati fatti prelievi utilizzando siringhe munite di setto filtrante (0,45  $\mu$ m) e sulle soluzioni limpide è stato effettuato il dosaggio del celecoxib tramite HPLC. Questa operazione è stata ripetuta fino a raggiungimento dell'equilibrio, cioè fino a quando la concentrazione di farmaco in soluzione è rimasta costante. Ogni prova è stata effettuata in triplo e i risultati sono stati espressi come  $media \pm$  deviazione standard. La costante di stabilità dei complessi è stata calcolata nel tratto lineare dei diagrammi di solubilità applicando la formula:

$$K_{stab} = \frac{\text{pendenza}}{\text{intercetta} * (1 - \text{pendenza})}$$

#### 3.2.2.3 Dosaggio HPLC del celecoxib

L'analisi del celecoxib nei vari campioni è stata effettuata con un sistema HPLC Merck Hitachi (Elite La Chrome) dotato di una pompa L 2130 e di un detector UV L-2400 con selezionata  $\lambda = 250$  nm. Come colonna è stata impiegata una Supercosil<sup>™</sup> C18 in fase inversa (5  $\mu$ m, 4 mm x 250 mm). L'analisi è stata condotta a 25 °C in isocratica, utilizzando come fase mobile una miscela metanolo:acqua 70:30 v/v con flusso di 0,9 ml/min, volume di iniezione di 20  $\mu$ l. In queste condizioni il tempo di ritenzione del



farmaco è risultato di 6,9 minuti. Di seguito è riportata l'equazione della curva standard ottenuta come media di tre curve realizzate in tre giorni consecutivi:

$$y = 266472X + 11436 \quad R^2 = 0,9992$$

con valori di LOQ e LOD rispettivamente di 0,21 µg/ml e 0,06 µg/ml.

### **3.2.2.4 Preparazione dei sistemi binari celecoxib-HPβCD e ternari celecoxib-HPβCD- polimero idrofilo allo stato solido**

Tutti i sistemi sono stati preparati con un rapporto farmaco:ciclodestrina 1:1 molare in accordo ai risultati ottenuti dagli studi di solubilità di fase, utilizzando le tecniche della semplice miscelazione, della comacinazione, dello kneading, della coevaporazione e della coliofilizzazione.

#### Miscela Fisica

La miscela fisica è stata preparata mescolando in un mortaio le polveri, preventivamente setacciate, di celecoxib e HPβCD seguendo il metodo delle diluizioni geometriche.

#### Comacinato

E' stato preparato macinando la miscela fisica in un micro-mulino a palle (Retsch MM 200) per 30 minuti a 27 Hertz.

#### Coevaporato

Per l'ottenimento del coevaporato inizialmente è stata preparata una soluzione acquosa di ciclodestrina ed una soluzione metanolica di celecoxib, utilizzando la minima quantità di solvente possibile; dopodiché le due soluzioni sono state miscelate insieme, il solvente è stato allontanato con rotavapor e il prodotto posto in essiccatore.

#### Coliofilizzato

La sua preparazione è risultata difficile ed è ha portato ad una bassa resa di prodotto data la scarsa solubilità in acqua del celecoxib. Inizialmente è stata preparata una soluzione acquosa della HPβCD, cui è stato addizionato, lentamente e sotto agitazione, un eccesso di farmaco. Per favorire la solubilizzazione del celecoxib è stata aggiunta una minima quantità di solvente organico. Dopo 24 ore la sospensione è stata filtrata ed è stata determinata la concentrazione di principio attivo in soluzione, per poter determinare la resa. Il filtrato è stato poi congelato e liofilizzato tramite l'uso di un liofilizzatore Lyovac GT2 (Leybold-Haeraeus).

### Kneaded

Lo kneaded è stato ottenuto umettando la miscela fisica celecoxib-HP $\beta$ CD con alcune gocce di una miscela etanolo:acqua 50:50 v/v, e impastando poi fino a completa evaporazione del solvente. Il prodotto ottenuto, di consistenza pastosa, è stato poi essiccato in stufa a 50 °C.

I sistemi ternari comacinato e kneaded sono stati preparati con lo stesso metodo utilizzato per ottenere i rispettivi sistemi binari, con l'unica differenza che è stato aggiunto il polimero idrofilo (PVP K 30, HPMC o PEG 4000) al 10 % p/p durante la preparazione della miscela fisica.

### **3.2.2.5 Metodi di analisi allo stato solido dei sistemi binari celecoxib-HP $\beta$ CD e ternari celecoxib-HP $\beta$ CD-polimero idrofilo**

#### Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC)

L'analisi termica è stata condotta con uno strumento Mettler TA4000 dotato di una cella DSC 25. I campioni, pesati con una bilancia analitica Mettler M3 (5-10 mg), sono stati posti in crogioli di alluminio sigillati e preventivamente perforati per permettere l'eventuale fuoriuscita di gas durante l'analisi. Successivamente sono stati sottoposti ad un aumento programmato della temperatura ad una velocità di 10 °C al minuto in un range di temperatura da 30 a 300 °C sotto aria statica.

#### Diffrazione dei raggi X

I diffrattogrammi dei vari campioni sono stati ottenuti utilizzando un diffrattometro per polveri Philips PW 1130 con una velocità di scansione di 1°/min in un range compreso tra 5° e 50° 2  $\theta$ .

#### Spettroscopia FTIR

Gli spettri FTIR sono stati realizzati con uno spettrofotometro PerkinElmer 1600 (risoluzione 4 cm<sup>-1</sup>) tra 4000 e 400 cm<sup>-1</sup>. Il campione è stato macinato e quindi aggiunto al KBr anidro (da 10 a 100 volte il suo peso) in un mortaio di agata ed infine compresso sottovuoto con una pressa idraulica, fino ad ottenere una pastiglia omogenea.

### **3.2.2.6 Studi di velocità di dissoluzione**

Gli studi di dissoluzione sono stati condotti secondo FU utilizzando uno strumento Sotax AT7 con il metodo dell'agitatore a paletta; la velocità di rotazione delle pale è stata fissata a 100 rpm. I campioni, contenenti tutti 10 mg di celecoxib, sono stati introdotti in vessels in cui erano presenti 900 ml del mezzo di dissoluzione ovvero tampone fosfato a pH 7,4 e sodio dodecil solfato (1,7 % p/v) al fine di garantire il mantenimento delle sink conditions durante il test di dissoluzione, come spiegato più dettagliatamente nel paragrafo 3.3.5 (infatti in presenza di tensioattivo in questa percentuale si ottiene un valore di solubilità del celecoxib in tampone fosfato di 112,5

µg/ml). I vessels sono stati mantenuti ad una temperatura costante di  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  per tutta la durata della prova, per riprodurre la temperatura corporea. A prestabiliti intervalli di tempo dall'inizio del test sono stati fatti prelievi di 1 ml del mezzo di dissoluzione. In ogni aliquota prelevata è stata determinata, previa filtrazione, la concentrazione di celecoxib tramite HPLC. Dopo ciascun prelievo è stato aggiunto 1 ml di solvente fresco, quindi la concentrazione rivelata in ogni aliquota, eccetto la prima, è stata incrementata di un valore correttivo che tiene conto di tale diluizione. Ogni prova è stata effettuata in triplo e ciascun valore riportato rappresenta la media di 3 misure.

### **3.2.2.7 Preparazione dei tamponi**

Tutti i tamponi sono stati preparati secondo le indicazioni riportate in FU.

#### Tampone gastrico pH 1,1

0,5 g di NaCl e 0,5 g di glicina sono stati solubilizzati in 80 ml di HCl 1N e portati ad 1 litro con acqua deionizzata.

#### Tampone fosfato pH 6,8

A 51 ml di una soluzione (27,2 g/l) di potassio fosfato monobasico sono stati aggiunti 49 ml di una soluzione (71,6 g/l) di sodio fosfato bibasico.

#### Tampone fosfato pH 7,4

19,2 g di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  e 1,8 g di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sono stati solubilizzati in acqua deionizzata e la soluzione portata ad 1 litro.

### **3.2.2.8 Spettroscopia NMR**

Gli esperimenti  $^1\text{H}$  NMR sono stati eseguiti a 400 MHz usando uno spettrometro Bruker Avance 400 a 298 °K. I campioni analizzati sono stati solubilizzati in una miscela  $\text{CD}_3\text{OD}:\text{D}_2\text{O}$  50:50 (v/v).

### **3.2.2.9 Disegno sperimentale**

Le caratteristiche del disegno sperimentale sono dettagliatamente riportate nel paragrafo 3.3.5. In breve, è stato applicato un disegno sperimentale di Doehlert con 23 esperimenti incluse le repliche al centro. Al fine di ridurre gli errori sistematici gli esperimenti sono stati eseguiti in ordine randomizzato. E' stata valutata l'influenza di 4 fattori (% p/v di alginato,  $\text{CaCl}_2$ , chitosano (CSL) e tempo di cross linking (TCL)) su due risposte, efficacia di incapsulazione (EE%) e percentuale di farmaco rilasciata dopo 4 ore in mezzo colonico (pH = 7,4). Il dominio sperimentale delle variabili indipendenti, scelto sulla base di fattori tecnologici é stato quello di seguito riportato:

alginato di sodio	3-5 % (p/v)
$\text{CaCl}_2$	7-12 (p/v)
CSL	0-4 (p/v)
TCL	5-30 (min)

Per la generazione e la valutazione statistica del disegno sperimentale è stato utilizzato il software NEMRODW.

### **3.2.2.10 Metodo di preparazione delle microsfere**

Quantità pesate di alginato di sodio sono state solubilizzate in 10 ml di acqua deionizzata cui, successivamente, sono stati aggiunti 20 mg di celecoxib [41] come sistema ternario con HP $\beta$ CD e PVP; 5 ml di chitosano, preventivamente disciolto a differenti concentrazioni in acido acetico glaciale al 5%, sono stati aggiunti in 30 ml di una soluzione acquosa di CaCl<sub>2</sub> di varia concentrazione. La soluzione di alginato di sodio (5 ml) è stata sgocciolata, utilizzando un ago con diametro di 0,9 mm, nella soluzione contenente chitosano e CaCl<sub>2</sub>, tenuta sotto agitazione a 300 rpm e a temperatura ambiente. Le microsfere formate sono state lasciate nella soluzione cross linkante per un tempo determinato, definito tempo di cross linking (TCL). Successivamente sono state lavate con 50 ml di acqua deionizzata, filtrate e lasciate in stufa ad essiccare per 24 h a 40 °C. Il TCL e le percentuali (p/v) di alginato, CaCl<sub>2</sub> e CSL, usate nella preparazione delle microsfere, sono state definite dal piano sperimentale generato dall'applicazione del disegno di Doehlert.

### **3.2.2.11 Determinazione dell'efficacia di incapsulazione**

Le microsfere (ms) appena preparate, non ancora essiccate, sono state pesate e ne è stata prelevata esattamente un'aliquota, corrispondente a circa metà del peso totale. Su questa porzione è stata determinata la quantità di farmaco incapsulata: le ms ancora umide sono state frantumate in mortaio, trasferite in una beuta contenente 100 ml di metanolo e lasciate sotto agitazione per una notte. La quantità di celecoxib contenuta è stata determinata tramite analisi HPLC, dopo filtrazione della soluzione metanolica. Conoscendo il peso complessivo delle microsfere, è stato quindi possibile ricavare la quantità totale di farmaco incapsulata nell'intero lotto e determinare l'efficacia di incapsulazione del celecoxib tramite la seguente formula:

$$\frac{Q_i}{Q_t} * 100$$

dove  $Q_i$  rappresenta la quantità di farmaco incapsulata e  $Q_t$  la quantità di farmaco totale utilizzata per la preparazione delle microsfere.

### **3.2.2.12 Test di rilascio del celecoxib da microsfere di chitosano-calcio-alginato**

Per effettuare il test di rilascio del celecoxib dopo 4 ore di permanenza delle microsfere in ambiente colonico, è stata utilizzata una quantità pesata di microsfere, corrispondente a circa la metà del peso totale di ciascun lotto. Il test di rilascio è stato condotto con l'utilizzo dello strumento Sotax AT7 con il metodo dell'agitatore a paletta. Tale

strumento, essendo dotato di 7 vessels, ha permesso di effettuare contemporaneamente il test su più campioni, consentendo una maggiore riproducibilità dei risultati e un notevole guadagno di tempo. Le microsfere provenienti dai vari lotti sono state poste nei vessels, cui sono stati aggiunti successivamente 500 ml di mezzo di dissoluzione. I vessels sono stati mantenuti ad una temperatura costante di  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  per tutta la durata della prova e la velocità di rotazione delle pale è stata fissata a 100 rpm. I campioni sono stati lasciati 2 ore in ambiente gastrico (pH = 1,1), 2 ore a pH = 6,8 e 4 ore in ambiente colonico a pH 7,4 per simulare la variazione di pH presente a livello gastrointestinale, sempre in presenza di sodio dodecil solfato (1,7 % p/v) per garantire il mantenimento delle sink conditions. Dopo 4 ore di permanenza in ambiente colonico è stata prelevata un'aliquota del mezzo di dissoluzione da ciascun vessel e ne è stata determinata, previa filtrazione, la concentrazione di celecoxib, tramite analisi HPLC. Conoscendo la quantità totale di farmaco presente nelle microsfere (vedi paragrafo 3.2.2.11) è stato possibile calcolare la % di principio attivo rilasciata da ciascun lotto dopo 4 ore di permanenza in ambiente colonico.

### **3.2.2.13 Calcolo della resa e delle dimensioni delle microsfere**

Dopo la preparazione e l'essiccamento delle microsfere, ne è stata calcolata la resa, come rapporto percentuale tra il peso secco e la quantità totale di eccipienti e di farmaco utilizzati per il loro ottenimento. Per la determinazione delle dimensioni delle microsfere, è stato misurato il diametro di 10 microsfere di ciascun lotto, utilizzando un calibro, ed è stato poi calcolato un valore medio.

### **3.2.2.14 Analisi morfologica delle microsfere**

L'analisi morfologica delle microsfere è stata eseguita utilizzando uno strumento ESEM (Environmental Scanning Electron Microscope) Quanta-200 FEI con risoluzione di 0,3 nm a 30 kV. La modalità ESEM non ha richiesto alcun trattamento del campione ed è stato anche possibile effettuare una microanalisi tramite uno spettrometro EDS (Energy Dispersive Spectrometry), che rivela il segnale degli elettroni caratteristici. Il risultato viene trasferito su grafici in cui viene riportato sull'asse orizzontale il livello di energia dei raggi X, caratteristico di ogni elemento, e sull'asse verticale il numero di conte, ovvero di raggi X giunti allo spettrometro per ogni livello di energia. L'altezza e ampiezza dei picchi danno un'informazione qualitativa sulla presenza nel campione di un determinato elemento.

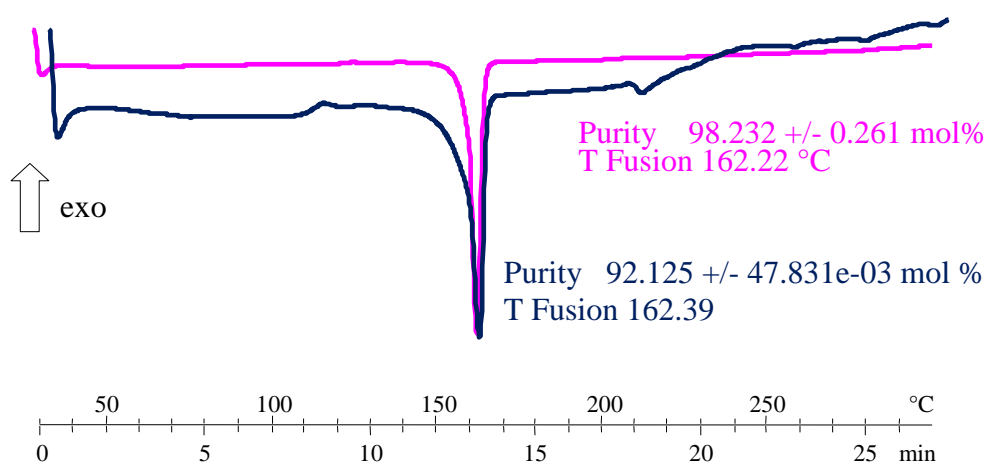
### 3.3 Risultati e discussione

#### 3.3.1 Estrazione di celecoxib da Celebrex®

Come ampiamente spiegato nel capitolo materiale e metodi, l'estrazione del celecoxib è stata messa a punto sfruttando la sua alta solubilità in metanolo e la sua scarsa solubilità in acqua. Tramite DSC è stato possibile identificare il prodotto estratto (confrontando il suo punto di fusione con quello riportato in letteratura [25-27]) e determinarne il grado di purezza utilizzando l'EIA (Eutectic Impurity Analysis); questo metodo si basa sulla formazione di un eutettico tra farmaco ed impurezza, il cui contenuto può essere quantificato in base all'abbassamento del punto di fusione rispetto al farmaco puro, secondo la legge di Van't Hoff :

$$T_0 - T_m = RT_0^2 X_2 / \Delta H_f$$

Dove  $T_0$  e  $T_m$  sono rispettivamente la temperatura di fusione del prodotto puro e del prodotto contenente impurezze,  $\Delta H_f$  la sua entalpia di fusione,  $X_2$  la frazione molare di impurezza ed  $R$  la costante dei gas. All'aumentare della percentuale di impurezza si osserva una graduale diminuzione della temperatura di fusione del campione ed una progressiva scodatura del picco. Il vantaggio dell'EIA sta nel fatto che non c'è necessità di avere un prodotto puro come standard di riferimento, ma  $T_0$  viene calcolato direttamente dal software dello strumento tramite il "purity program". Inizialmente abbiamo ottenuto un grado di purezza del celecoxib estratto del 92%; successivamente, con l'introduzione di una ulteriore e più prolungata fase di lavaggio in acqua, siamo riusciti ad eliminare completamente l'impurezza del lattosio e ad ottenere un prodotto con picco di fusione più stretto ed grado di purezza superiore, pari al 98% (Figura 2).



**Figura 2:** Termogrammi del celecoxib a più alto (in rosa) e a più basso (in blu) grado di purezza

### 3.3.2 Caratterizzazione dei sistemi binari celecoxib-carrier idrofilo

#### 3.3.2.1 Studi di solubilità di fase

Come si può osservare nelle tabelle 2-3-4, la concentrazione di celecoxib in soluzione ha raggiunto l'equilibrio già dopo 24 ore con tutti e tre i carriers. L'utilizzo della nicotinammide, anche ad alte concentrazioni (818 e 1064 mM), non ha portato ad un incremento significativo della solubilità del farmaco (fig 3-4) mentre, con entrambe le ciclodestrine, si è osservato un maggior incremento della solubilità del principio attivo in funzione della loro concentrazione in soluzione; in particolare con la HP $\beta$ CD si è ottenuto un diagramma di solubilità di fase di tipo A<sub>L</sub> mentre con la  $\beta$ CD di tipo B<sub>s</sub> [42], indicativi rispettivamente della formazione di un complesso solubile farmaco-ciclodestrina (di stechiometria 1:1 mol/mol) e di un complesso poco solubile. Come è possibile osservare nelle figure 3 e 4 la HP $\beta$ CD ha portato ad un maggiore incremento della solubilità del farmaco rispetto alla  $\beta$ CD; inoltre la costante di stabilità del complesso celecoxib-HP $\beta$ CD è risultata più alta ( $K_{1:1} = 1572 \text{ M}^{-1}$ ) rispetto a quella ottenuta con  $\beta$ CD ( $K_{1:1} = 458 \text{ M}^{-1}$ ); alla luce di questi risultati abbiamo selezionato la HP $\beta$ CD come miglior carrier per complessare il celecoxib ed aumentare la sua solubilità.

	24 h	48 h
$\beta$ CD conc. (mM)	conc. celecoxib (mM) (media $\pm$ DS)	conc. celecoxib (mM) (media $\pm$ DS)
0	7,33E-03 $\pm$ 5,69E-04	7,01E-03 $\pm$ 6,24E-04
5	2,78E-02 $\pm$ 3,39E-03	2,84E-02 $\pm$ 6,75E-04
7	3,07E-02 $\pm$ 5,46E-03	3,52E-02 $\pm$ 1,61E-03
10	4,24E-02 $\pm$ 1,94E-03	4,39E-02 $\pm$ 5,14E-04
13	4,20E-02 $\pm$ 8,27E-04	4,40E-02 $\pm$ 1,84E-03

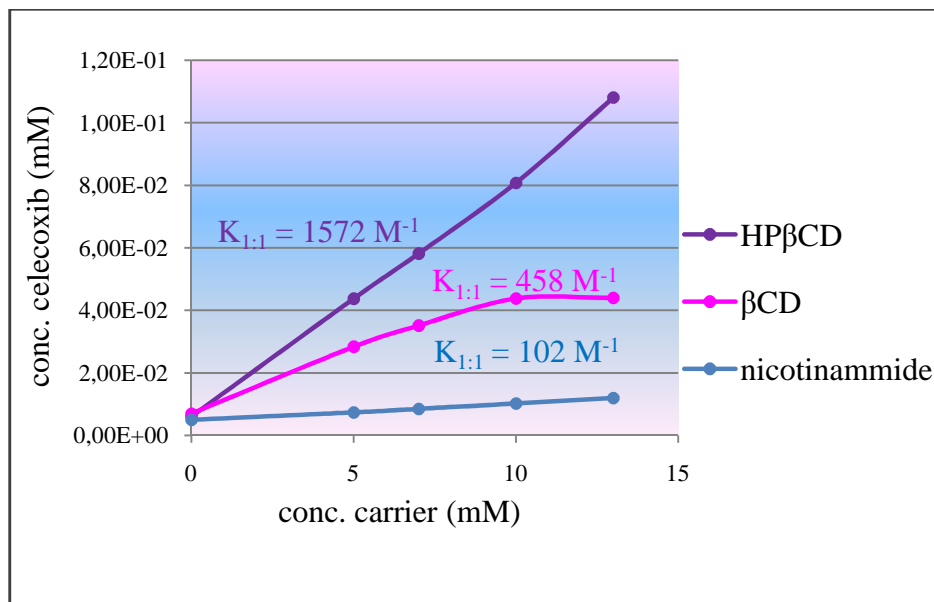
**Tabella 2:** Studi di solubilità di fase di celecoxib in presenza di concentrazioni crescenti di  $\beta$ CD

	24 h	48 h
HP $\beta$ CD conc. (mM)	conc. celecoxib (mM) (media $\pm$ DS)	conc. prednisone (mM) (media $\pm$ DS)
0	6,29E-03 $\pm$ 1,30E-03	6,05E-03 $\pm$ 9,96E-04
5	4,72E-02 $\pm$ 1,16E-03	4,37E-02 $\pm$ 5,38E-04
7	5,40E-02 $\pm$ 4,91E-03	5,82E-02 $\pm$ 5,86E-03
10	7,59E-02 $\pm$ 6,74E-03	8,08E-02 $\pm$ 2,87E-03
13	1,00E-01 $\pm$ 2,75E-03	1,08E-01 $\pm$ 1,51E-02

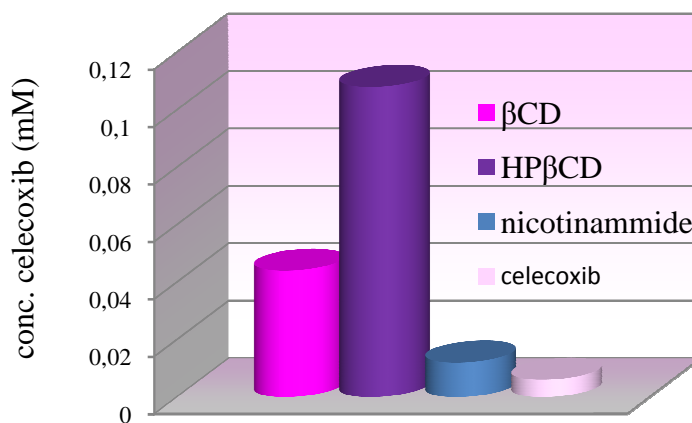
**Tabella 3:** Studi di solubilità di fase di celecoxib in presenza di concentrazioni crescenti di HP $\beta$ CD

	24 h	48 h
nicotinammide conc.(mM)	conc. celecoxib (mM) (media $\pm$ DS)	conc. celecoxib (mM) (media $\pm$ DS)
0	5,10E-03 $\pm$ 2,83E-04	5,05E-03 $\pm$ 4,95E-04
5	7,45E-03 $\pm$ 2,12E-04	7,40E-03 $\pm$ 2,83E-04
7	8,40E-03 $\pm$ 1,41E-04	8,50E-03 $\pm$ 2,83E-04
10	9,75E-03 $\pm$ 7,07E-05	1,03E-02 $\pm$ 1,06E-03
13	1,13E-02 $\pm$ 1,77E-03	1,20E-02 $\pm$ 1,41E-03
818	1,22E-02 $\pm$ 1,63E-03	1,23E-02 $\pm$ 1,38E-03
1064	1,25E-02 $\pm$ 1,49E-03	1,27E-02 $\pm$ 1,6E-03

**Tabella 4:** Studi di solubilità di fase di celecoxib in presenza di concentrazioni crescenti di nicotinammide



**Figura 3:** Diagrammi di solubilità di fase di celecoxib in presenza di  $\beta$ CD, HP $\beta$ CD e nicotinammide



**Figura 4:** concentrazione di celecoxib in soluzione in presenza di  $\beta$ CD, HP $\beta$ CD e nicotinammide 13 mM



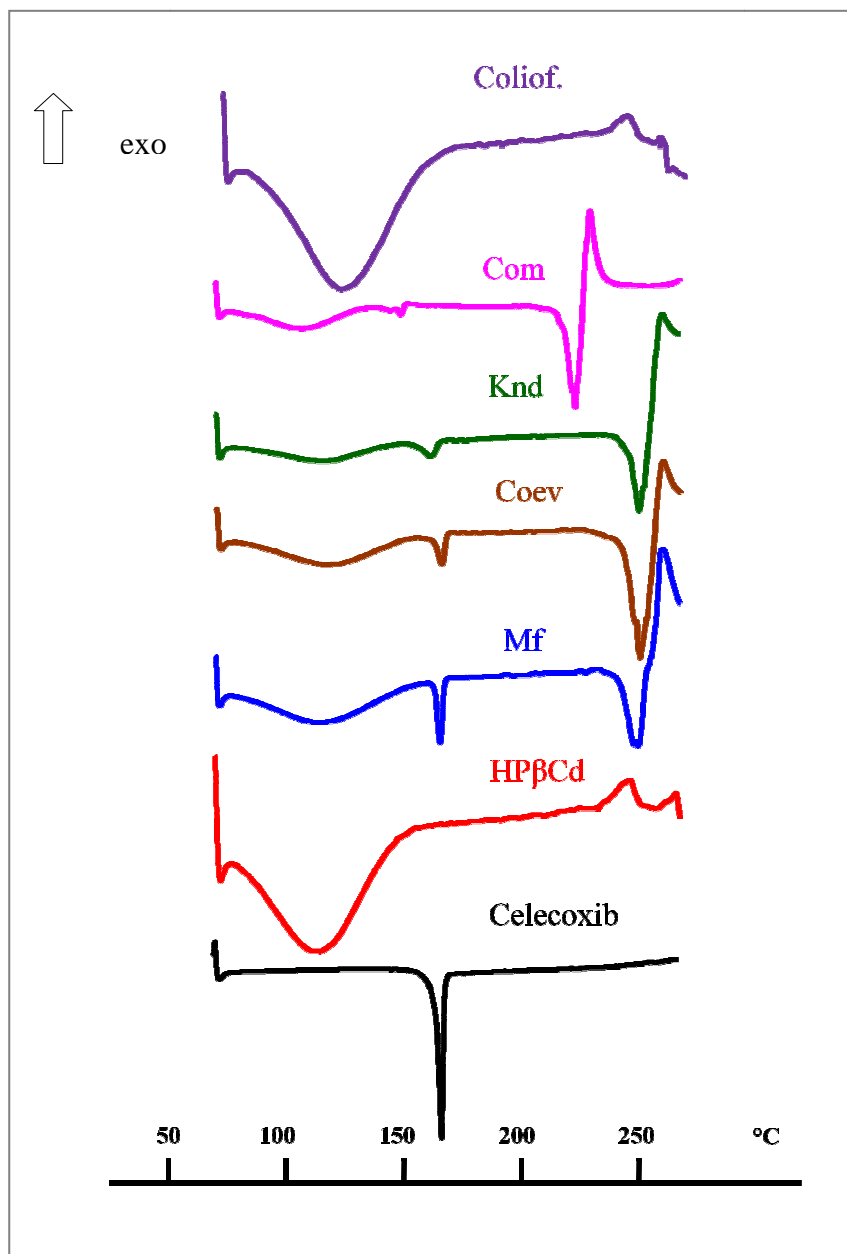
Al fine di ottenere un complesso celecoxib/HP $\beta$ CD allo stato solido sono state utilizzate tecniche quali la comacinazione, lo kneading, la coevaporazione e la coliofilizzazione, preparando sistemi farmaco-carrier in rapporto 1:1 molare in accordo ai risultati ottenuti con gli studi di solubilità di fase. Tali sistemi binari sono stati caratterizzati sia allo stato solido, tramite analisi DSC, diffrazione dei raggi X e FTIR, che in soluzione tramite spettroscopia  $^1\text{H}$  NMR.

### 3.3.2.2 Caratterizzazione allo stato solido dei sistemi binari - HP $\beta$ CD

In figura 5 sono mostrate le curve termiche dei componenti puri e dei vari sistemi binari farmaco-HP $\beta$ CD mentre in tabella 5 sono riportate le temperature di fusione del celecoxib da solo e nei vari sistemi binari, con la relativa variazione di entalpia associata. Il celecoxib presenta un picco di fusione a 161,38 °C stretto ed intenso, tipico di un prodotto cristallino, a cui è associato un  $\Delta\text{H}$  di fusione di -88,98 J/g. La HP $\beta$ CD presenta una larga banda di disidratazione seguita da una esoterma di decomposizione ad una temperatura di circa 250 °C. Nella miscela fisica farmaco-ciclodestrina non si ha alcuno spostamento del picco di fusione del celecoxib, ma solo una riduzione di intensità dovuta alla presenza del carrier amorfo; lo stesso dicasi per il coevaporato. Nel comacinato invece il picco di fusione del farmaco si sposta da 161,38 °C a 154,75 °C con notevole riduzione di intensità fino a quasi totale scomparsa indice di elevata amorfizzazione del principio attivo. Anche con lo kneaded si osserva una intensa interazione tra farmaco e carrier ma inferiore a quella osservata con il comacinato. Solo con il coliofilizzato si è ottenuta la totale scomparsa dell'endoterma di fusione del celecoxib, che indica completa amorfizzazione del principio attivo ma non assicura la formazione del complesso allo stato solido, che deve essere verificata confrontando anche altre tecniche di analisi quali FTIR e diffrazione dei raggi X.

Campione	Punto di fusione (°C)	$\Delta\text{H}$ J/g
Celecoxib	161,38	-88,98
Miscela fisica	160,94	-56,38
Coevaporato	160,17	-13,5
Kneaded	157,92	-12,5
comacinato	154,75	-10,5
coliofilizzato	-	-

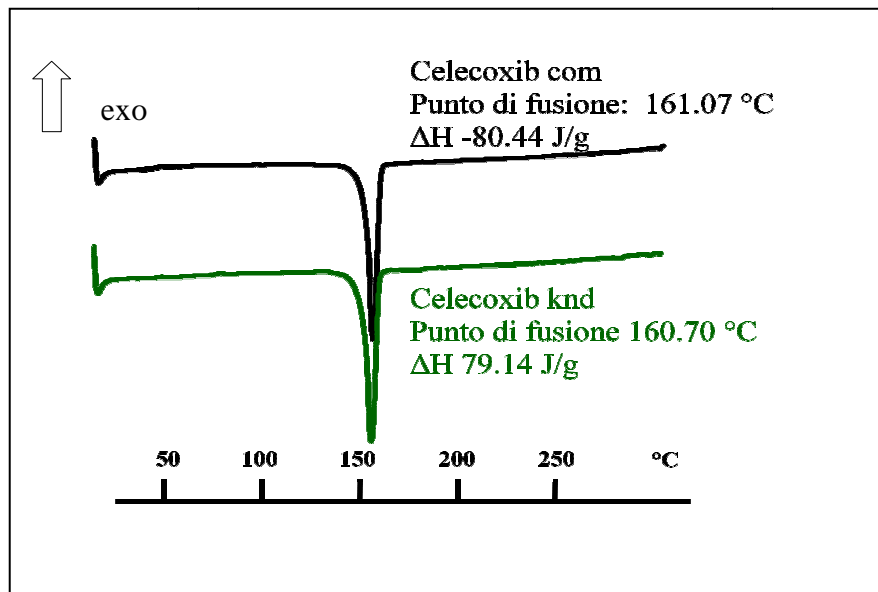
**Tabella 5:** Punto di fusione ed entalpia di fusione di celecoxib puro e nei vari sistemi binari farmaco-HP $\beta$ CD



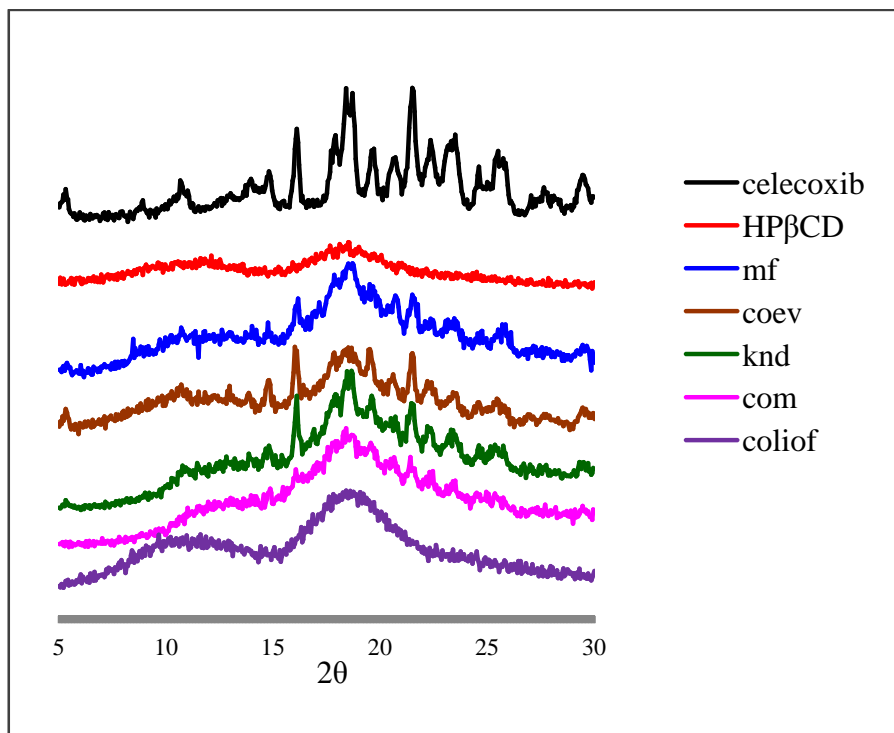
**Figura 5:** Termogrammi di celecoxib, HP $\beta$ CD, e sistemi binari celecoxib-HP $\beta$ CD ottenuti mediante miscela fisica (Mf), kneading (Knd), comacinazione (Com), coevaporazione (Coev) e coliofilizzazione (Coliof).

Il picco endotermico che possiamo osservare a temperature superiori ai 200 °C in tutti i sistemi binari, ad eccezione del liofilizzato, è da attribuirsi ad un prodotto di interazione tra celecoxib e HP $\beta$ CD che si forma ad alte temperature, in quanto non è presente nei termogrammi dei componenti puri.

In figura 6 è mostrato come in assenza di ciclodestrina non si abbia modifica del picco di fusione del farmaco, sebbene sottoposto a macinazione e a kneading. Questo conferma che non è la tecnica di preparazione ma la presenza della HP $\beta$ CD a causare riduzione e spostamento dell'endoterma di fusione del celecoxib.



**Figura 6:** Termogrammi di celecoxib sottoposto a macinazione e kneading in assenza di HP $\beta$ CD



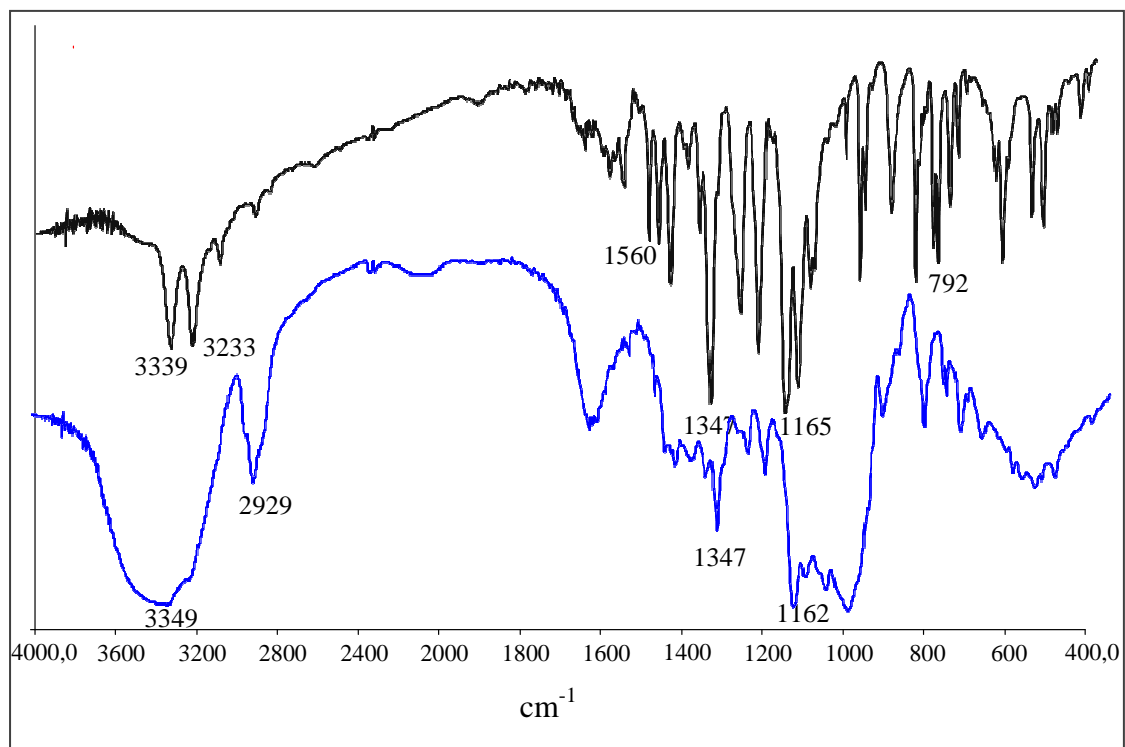
**Figura 7:** Spettri di diffrazione dei raggi X di celecoxib, HP $\beta$ CD, e sistemi binari celecoxib-HP $\beta$ CD ottenuti mediante miscela fisica (Mf), kneading (Knd), comacinazione (Com), coevaporazione (Coev) e coliofilizzazione (Coliof).

Gli studi di diffrazione dei raggi X hanno confermato sostanzialmente i risultati ottenuti con l'analisi DSC. Come si può osservare in figura 7, il diffrattogramma del celecoxib

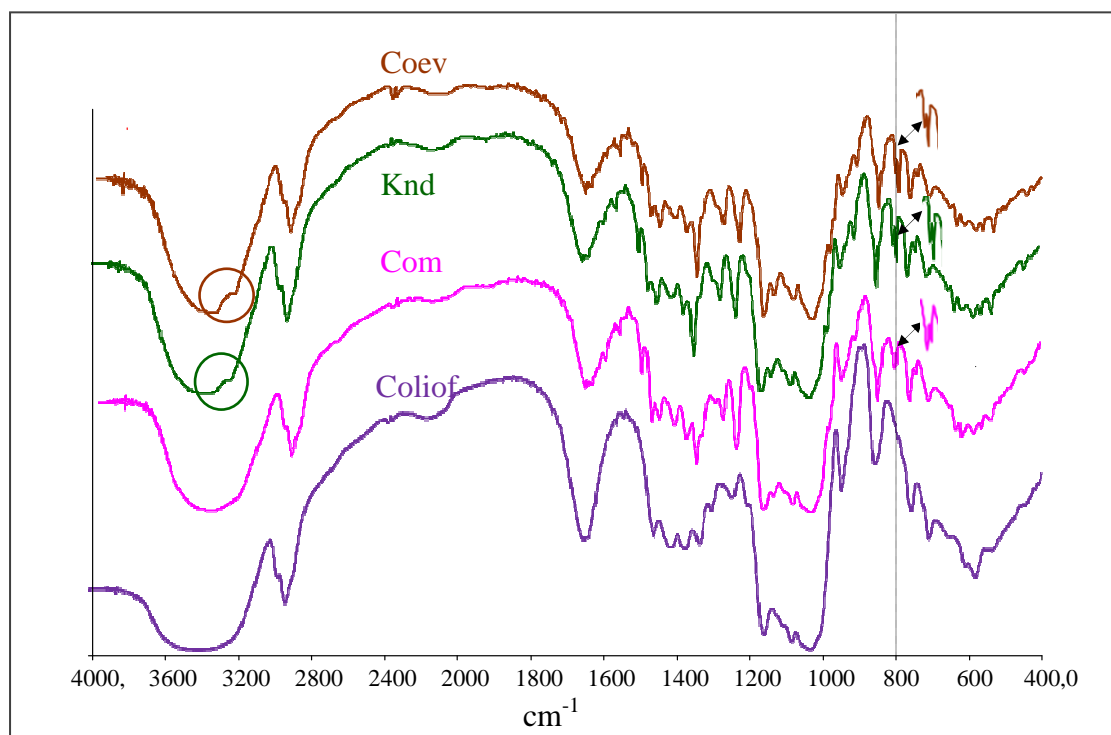
presenta molti picchi definiti ed intensi, caratteristici di un composto cristallino, mentre la HP $\beta$ CD ha uno spettro caratterizzato da bande molto slargate, indice di una struttura amorfa. Nei vari sistemi binari il grado di amorfizzazione del celecoxib cresce gradualmente passando dalla semplice miscela fisica al coevaporato, kneaded, comacinato fino al coliofilizzato in cui si ha una totale scomparsa dei picchi di cristallinità del principio attivo. Questo conferma che l'amorfizzazione del farmaco, precedentemente osservata nell'analisi DSC (fig 5), non è promossa dal processo di riscaldamento a cui è sottoposto il campione durante l'analisi termica, ma è effettivamente indotta dalla presenza della ciclodestrina.

Nelle figure 8 e 9 sono riportati gli spettri FTIR del celecoxib e dei vari sistemi binari farmaco-ciclodestrina. La spettroscopia infrarossa è una tecnica di supporto alla diffrazione dei raggi X e alla DSC, in quanto da sola non permette di stabilire l'avvenuta complessazione a causa di fenomeni di sovrapposizione tra le bande dell'host (HP $\beta$ CD) e del guest (farmaco). Lo spettro del celecoxib presenta a 1165 cm<sup>-1</sup> e a 1347 cm<sup>-1</sup> due bande relative rispettivamente allo stretching simmetrico e asimmetrico del gruppo SO solfonammidico; a 3233 cm<sup>-1</sup> e 3339 cm<sup>-1</sup> sono evidenti i picchi corrispondenti allo stretching asimmetrico e simmetrico del gruppo NH<sub>2</sub> solfonammidico mentre le bande dei bending NH e CH aromatico cadono rispettivamente a 1560 cm<sup>-1</sup> e a 792 cm<sup>-1</sup>. Lo spettro della miscela fisica appare sostanzialmente come la somma degli spettri dei singoli componenti puri. I picchi relativi allo stretching NH<sub>2</sub> sono probabilmente coperti dalla banda di stretching del gruppo OH della ciclodestrina. Passando da coevaporato, a kneaded, a comacinato e a coliofilizzato si ha una progressiva riduzione dei picchi del celecoxib, indice di un progressivo aumento dell'interazione tra farmaco e ciclodestrina. In particolare mentre nella miscela fisica, nello kneaded e nel coevaporato sembra essere presente ancora, sotto al segnale di stretching del gruppo OH della ciclodestrina, il segnale di stretching del gruppo NH<sub>2</sub> del celecoxib, questo scompare completamente nel comacinato e nel coliofilizzato. Nel comacinato si può osservare inoltre un cambiamento dell'intensità relativa dei picchi a 792 e 801 cm<sup>-1</sup>, se confrontato con tutti gli altri sistemi, escluso il coliofilizzato in cui tali segnali sono completamente scomparsi.

Dagli studi allo stato solido è emerso che la coliofilizzazione è la tecnica che permette la massima interazione tra celecoxib e HP $\beta$ CD e l'unica con cui si riesce ad ottenere la totale amorfizzazione del principio attivo. Tuttavia, a causa degli elevati costi e soprattutto della bassa resa, dovuta alla scarsa solubilità del celecoxib in soluzione acquosa, abbiamo escluso questa tecnica di preparazione del sistema binario e abbiamo optato per la comacinazione e lo kneaded, che hanno comunque mostrato di dar luogo ad una buona interazione tra farmaco e ciclodestrina.



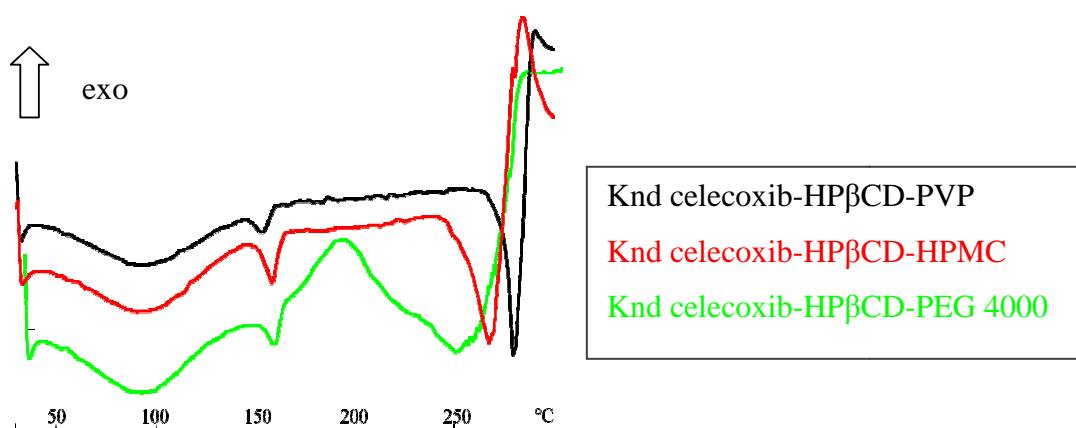
**Figura 8:** Spettri FTIR di celecoxib e della miscela fisica celecoxib-HP $\beta$ CD



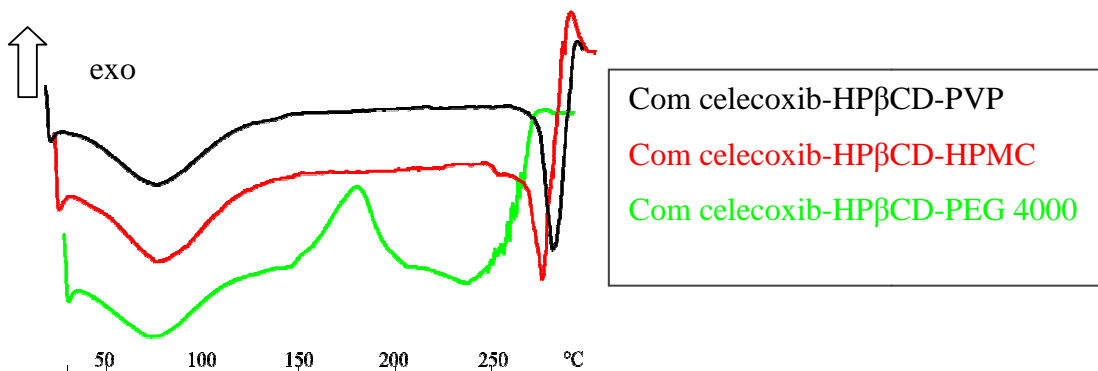
**Figura 9:** Spettri FTIR dei sistemi binari celecoxib-HP $\beta$ CD ottenuti mediante coevaporazione (Coev), kneading (Knd), comacinazione (Com) e coliofilizzazione (Coliof)

### 3.3.3 Caratterizzazione allo stato solido dei sistemi ternari celecoxib-HP $\beta$ CD-polimero idrofilo

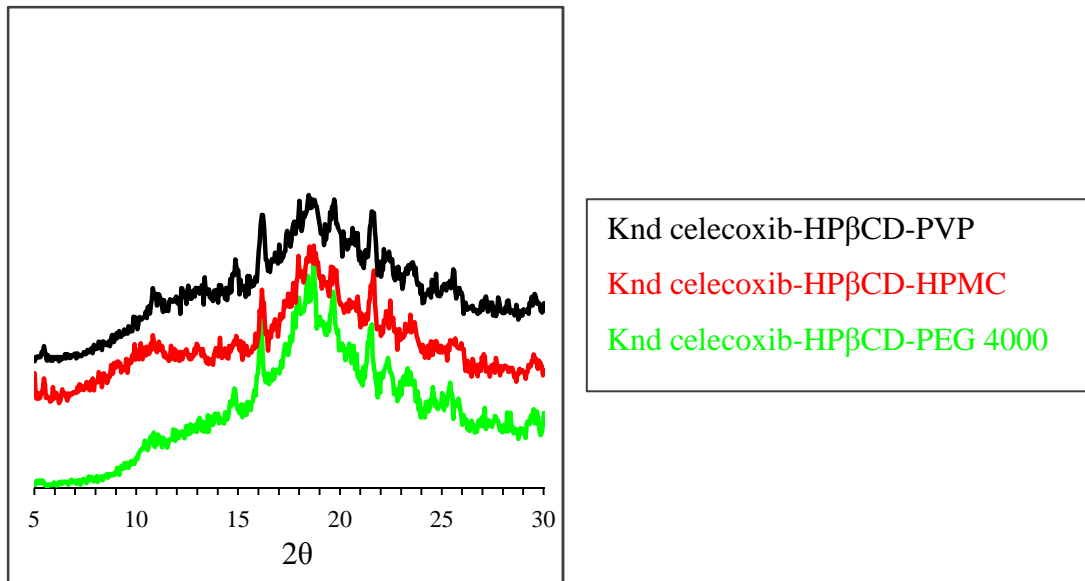
Scelte le tecniche più appropriate di ottenimento dei sistemi binari, è stato valutato anche l'effetto dell'aggiunta, nel comacinato e nello kneaded celecoxib-HP $\beta$ CD, di un terzo componente, costituito da un polimero idrofilo (PVP K30, PEG 4000, HPMC) al 10% p/p. Lo scopo dell'aggiunta di questo polimero è stato quello di incrementare ulteriormente la solubilità del principio attivo, e quindi la sua biodisponibilità, ed ottenere una formulazione in cui esso fosse omogeneamente distribuito nelle microsfere. L'analisi termica di questi sistemi ternari (fig 10-11) ha rivelato che la totale scomparsa del picco di fusione del farmaco si aveva solo con la tecnica dello comacinazione. Anche dall'analisi di diffrazione dei raggi X (fig 12-13) la tecnica più efficace di preparazione del sistema ternario è risultata essere la comacinazione. Dei tre polimeri idrofili, PVP e HPMC hanno mostrato una maggiore interazione con il celecoxib. Per la preparazione del sistema ternario, è stato infine scelto il PVP K30 perché studi di stabilità, condotti a T ambiente ed umidità controllata, hanno dimostrato che il PVP stabilizza maggiormente rispetto a HPMC la forma amorfa del farmaco.



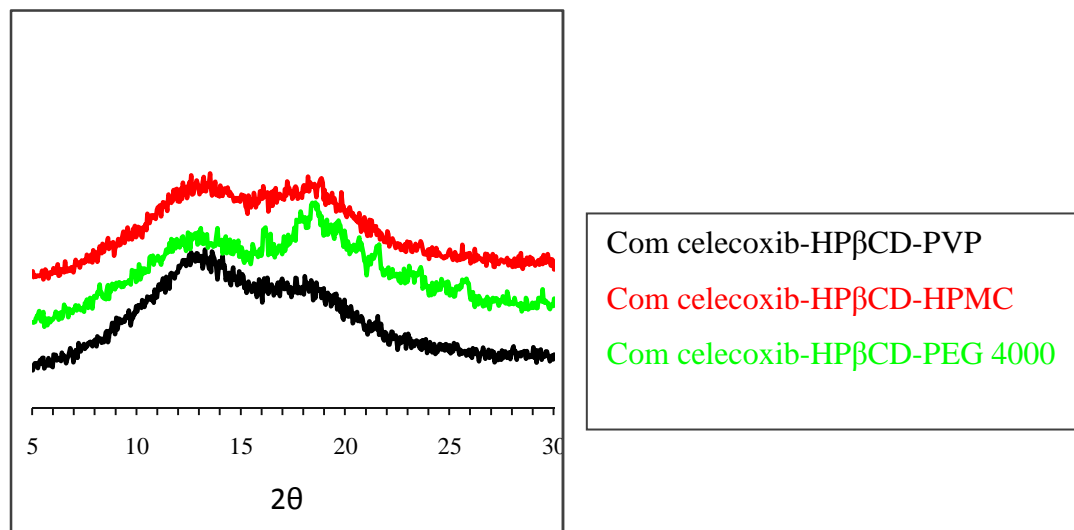
**Figura 10:** Termogrammi dei sistemi ternari celecoxib-HP $\beta$ CD-PVP, celecoxib-HP $\beta$ CD-HPMC e celecoxib-HP $\beta$ CD-PEG 4000 ottenuti con la tecnica dello kneading



**Figura 11:** curve termiche dei sistemi ternari celecoxib-HP $\beta$ CD-PVP, celecoxib-HP $\beta$ CD-HPMC e celecoxib-HP $\beta$ CD-PEG 4000 ottenuti con la tecnica della comacinazione.



**Figura 12:** Spettri di diffrazione dei raggi X dei sistemi ternari celecoxib-HP $\beta$ CD-PVP, celecoxib-HP $\beta$ CD-HPMC e celecoxib-HP $\beta$ CD-PEG 4000 ottenuti con la tecnica dello kneading

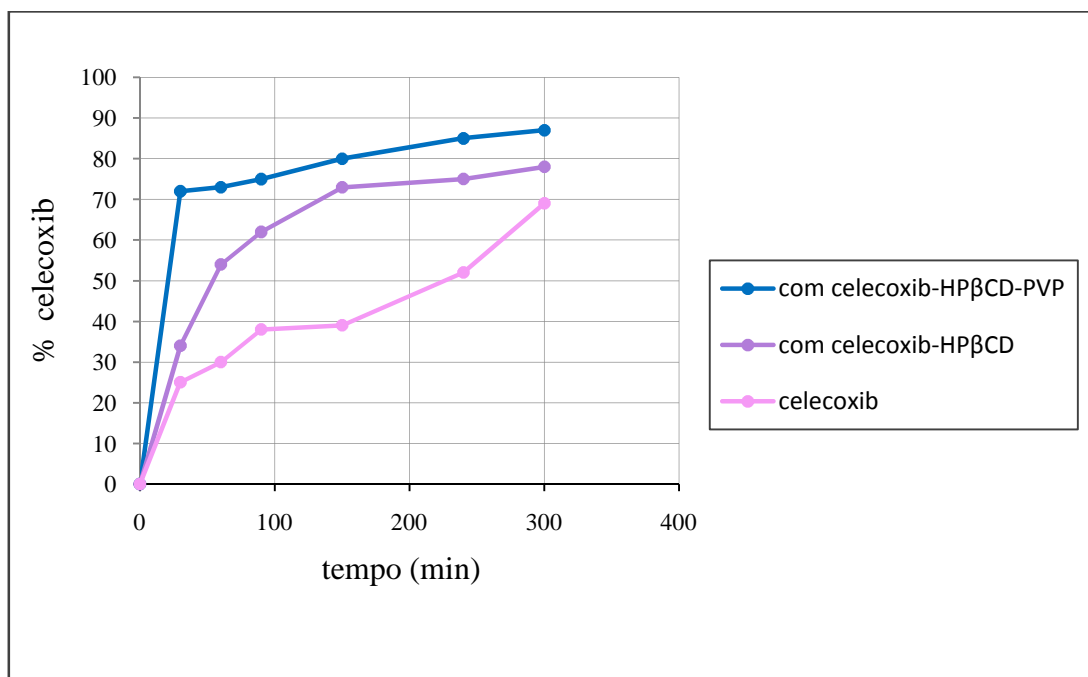


**Figura 13:** Spettri di diffrazione dei raggi X dei sistemi ternari celecoxib-HP $\beta$ CD-PVP, celecoxib-HP $\beta$ CD-HPMC e celecoxib-HP $\beta$ CD-PEG 4000 ottenuti per comacinazione

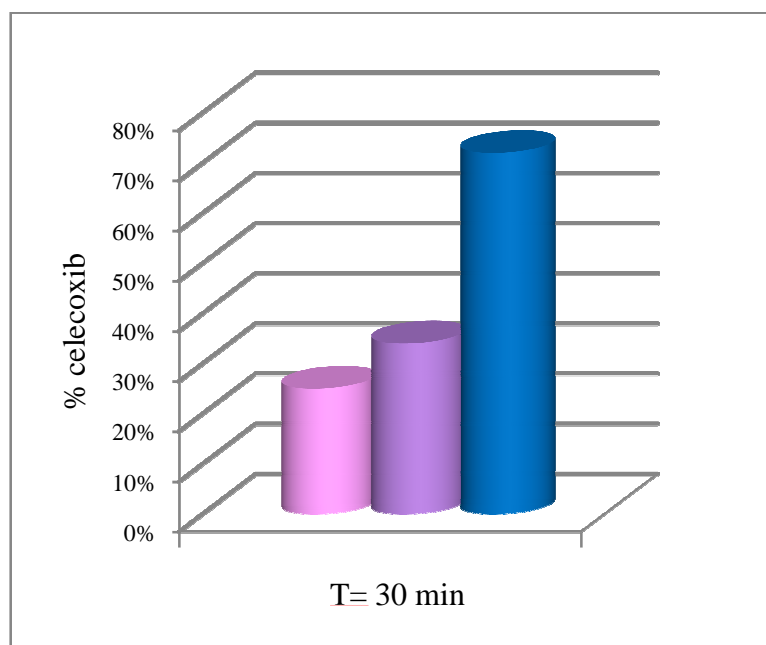
### 3.3.4 Studi di velocità di dissoluzione

Studi di velocità di dissoluzione (fig 14), condotti a 37° C in tampone fosfato (pH 7.4) ed in presenza di sodio dodicil solfato (al fine di mantenere le sink conditions durante tutta la durata del test), hanno dimostrato che la totale amorfizzazione del celecoxib nel sistema ternario, si traduce effettivamente in un notevole incremento della sua velocità di dissoluzione: dopo 30 minuti dall'inizio del test (fig 15), la percentuale di farmaco

dissolta nel sistema ternario era più del doppio rispetto al sistema binario e circa tre volte quella del farmaco tal quale.



**Figura 14:** Profilo di dissoluzione in tampone fosfato (pH 7,4) di celecoxib puro e dei sistemi comacinati binario (celecoxib-HPβCD) e ternario (celecoxib-HPβCD-PVP)

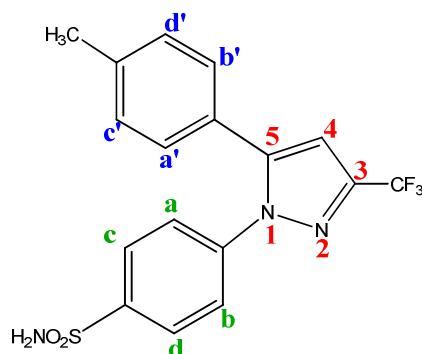


**Figura 15:** Percentuale disciolta di celecoxib puro e nei sistemi comacinati binario (celecoxib-HPβCD) e ternario (celecoxib-HPβCD-PVP) dopo 30 minuti in tampone fosfato (pH 7,4)



### 3.3.5 Caratterizzazione in soluzione dei sistemi binario celecoxib-HP $\beta$ CD e ternario celecoxib- HP $\beta$ CD-PVP: Spettroscopia NMR

Spettri  $^1\text{H}$  NMR sono stati eseguiti su celecoxib e sui sistemi binario e ternario al fine di verificare l'effettiva formazione del complesso farmaco-ciclodestrina in soluzione ed ottenere informazioni sulla possibile geometria del complesso.



Formula di struttura del celecoxib

Protoni	Celecoxib $\delta$ (ppm)	Sistemi binari $\Delta\delta$ (ppm)	Sistemi ternari $\Delta\delta$ (ppm)
<b>H4</b>	8.349	0.041	0.055
<b>H a'-b'-c'-d'</b>	8.587	0.000	0.006
<b>H a-b</b>	8.924	0.013	0.020
<b>H c-d</b>	9.359	0.010	0.013
<b>Methyl</b>	3.675	0.087	0.087

**Tabella 6:** Chemical shifts dei protoni del celecoxib libero e del celecoxib nei sistemi binario e ternario.

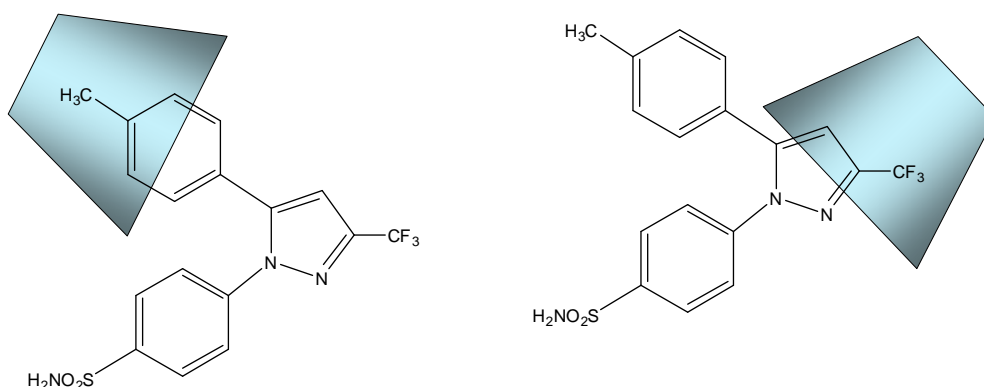
In tabella 6 sono riportati i chemical shifts dei protoni del celecoxib libero e del celecoxib nei sistemi binario e ternario. Non riuscendo ad ottenere uno spettro ben risolto per la HP $\beta$ CD, non è stato possibile apprezzare variazioni dei chemical shifts dei protoni della ciclodestrina in presenza del farmaco; quindi, per valutare l'interazione farmaco-carrier, sono state considerate solo variazioni dei chemical shifts dei protoni del celecoxib. Il motivo per cui non si riesce ad ottenere uno spettro ben risolto della HP $\beta$ CD è legato al fatto che:

- la HP $\beta$ CD è ottenuta per reazione della  $\beta$ CD con ossido di propilene. Il numero di ossidrili della  $\beta$ CD è fisso ma la loro reattività è diversa, per cui la

idrossipropilazione avviene in modo casuale e il prodotto ottenuto è una miscela di  $\beta$ CD derivate con vari gradi di sostituzione.

- La HP $\beta$ CD presenta un centro stereogenico per cui non abbiamo un solo prodotto ma una miscela di stereoisomeri.

In tabella 6 possiamo notare un notevole shift dei segnali del protone H4 e dei protoni metilici del celecoxib, passando dal farmaco tal quale ai sistemi binario e ternario. Lo spostamento dei segnali verso campi più bassi è il risultato della complessazione con ciclodestrina, che determina un effetto descherante, dovuto alle forze di Van der Waals che si vengono a stabilire tra farmaco e carrier. L'osservazione in spettri ROESY di un intenso effetto NOE tra i protoni H3 e H5 della HP $\beta$ CD (situati all'interno della cavità della ciclodestrina) ed i protoni H4 e metilici del celecoxib ha confermato l'effettiva formazione in soluzione di un complesso di inclusione tra farmaco e ciclodestrina. Inoltre, poichè si ha uno shift maggiore dei segnali nei sistemi ternario rispetto al binario, si può dedurre che il PVP ha un effetto stabilizzante sulla formazione del complesso. In base ai risultati ottenuti con gli studi NMR abbiamo ipotizzato due possibili modi di interazione farmaco-HP $\beta$ CD, riportati in figura 16.



**Figura 16:** Possibili modi di interazione tra celecoxib e HP $\beta$ CD

### 3.3.6 Disegno sperimentale

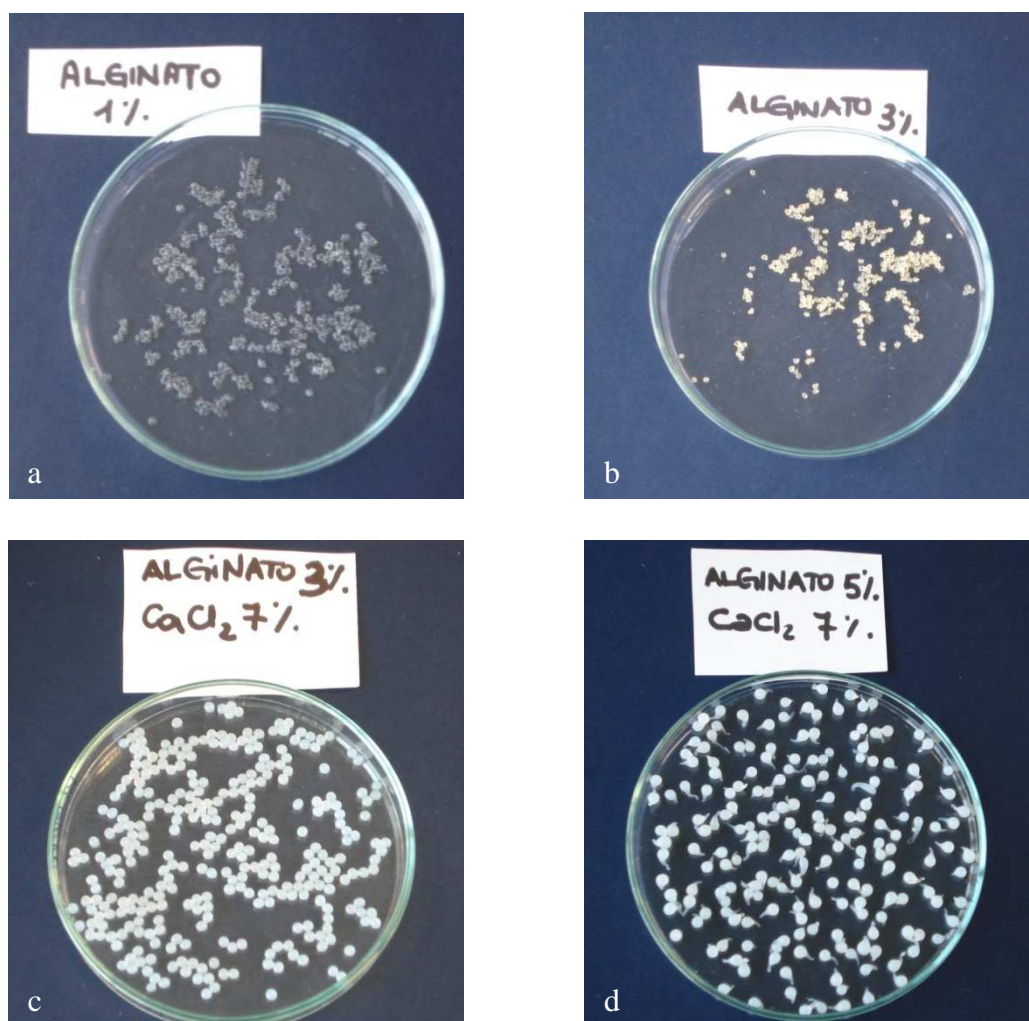
Il sistema ternario comacinato celecoxib-HP $\beta$ CD-PVP, una volta caratterizzato, è stato incapsulato in microsfere (ms) di chitosano-calcio-alginato, la cui composizione è stata ottimizzata con l'utilizzo del disegno sperimentale di Doehlert. Grazie all'incremento di solubilità del celecoxib raggiunto con la realizzazione del sistema ternario, è stato possibile ottenere un'omogenea distribuzione del principio attivo nelle ms e quindi un'elevata uniformità di contenuto delle stesse. Nel disegno sperimentale è stata valutata l'influenza di quattro variabili (% di alginato,  $\text{CaCl}_2$ , chitosano (CSL) e tempo di cross linking (TCL)) sull'efficacia di incapsulazione e sulla quantità di farmaco rilasciata dopo quattro ore in ambiente colonico, considerate come risposte da ottimizzare. Nella

realizzazione del test di dissoluzione in tampone fosfato (pH 7,4) è stato aggiunto nel mezzo di dissoluzione un tensioattivo, il sodio dodecil solfato, per assicurare il mantenimento delle sink conditions per tutta la durata del test di dissoluzione. Infatti, vista la scarsa solubilità in acqua del celecoxib, è impossibile il mantenimento delle “sink conditions” utilizzando i metodi di dissoluzione convenzionali, descritti nelle principali Farmacopee. Molti metodi sono stati proposti per la realizzazione di test di dissoluzione di farmaci scarsamente solubili: l'utilizzo di sistemi bifasici ottanolo/acqua, di grandi volumi del mezzo di dissoluzione, di miscele di acqua e solventi miscibili in acqua o l'aggiunta di fasi organiche o adsorbenti al mezzo di dissoluzione [43-44]. Molti di questi approcci non simulano l'ambiente biologico, sono di difficile realizzazione e richiedono laboriose procedure analitiche. Alcuni autori [45] hanno utilizzato un sistema a flusso continuo per effettuare il test di dissoluzione della nifedipina. Tale metodo, rinnovando continuamente il mezzo di dissoluzione a contatto con la forma farmaceutica, permette di mantenere le sink conditions. Il metodo della cella a flusso presenta però alcuni svantaggi, legati alla difficoltà nell'ottenimento di un flusso laminare e a problemi di modifica delle condizioni idrodinamiche, che non consentono di ottenere risultati riproducibili. Soluzioni di surfactanti vengono spesso proposte come mezzi di dissoluzione per farmaci scarsamente solubili in acqua [46-47-48] e sono anche raccomandate dalla Farmacopea USP. L'impiego di tensioattivi permette una miglior simulazione delle condizioni fisiologiche rispetto all'utilizzo di adsorbenti o mezzi idroalcolici o alifatici. Inoltre è riportato che l'aggiunta di surfactanti naturali nel mezzo di dissoluzione, quali i sali biliari, dà risultati comparabili con quelli ottenuti utilizzando molecole meno costose, quali il sodio dodecil solfato [49]. Per questo motivo abbiamo deciso di aggiungerlo al tampone fosfato per effettuare i tests di dissoluzione del celecoxib. La concentrazione di sodio dodecil solfato utilizzata (0.17 % p/v) è stata scelta basandosi su dati riportati in letteratura [50].

Per quanto riguarda la determinazione del dominio sperimentale delle variabili indipendenti, è stato fatto uno screening iniziale basato su fattori tecnologici come per esempio la regolarità nella forma, l'omogeneità nelle dimensioni e la consistenza delle ms ottenute, oltre che una facile siringabilità delle soluzioni necessarie per la loro preparazione. Per quanto riguarda la soluzione di alginato di sodio la concentrazione è stata variata tra 3 e 5% p/v; infatti per valori inferiori si ottenevano ms di forma irregolare e “appiccicose” (fig 17a). Soluzioni di alginato al 3% (p/v) presentano una buona siringabilità e permettono di ottenere ms di forma regolare e sferica (fig 17b). Aumentando la concentrazione di  $\text{CaCl}_2$  da 5 a 7 % p/v si risolve il problema della tendenza delle ms ad aderire tra di loro (fig 17c); per questo la concentrazione minima di  $\text{CaCl}_2$  è stata fissata al 7% p/v mentre la massima al 12% p/v, per evitare eventuali effetti negativi dovuti ad un eccesso di ioni calcio [51]. Soluzioni di alginato al 5% p/v risultano di difficile siringabilità e danno origine a ms molto scodate (fig 17d); per tale ragione questo è stato fissato come valore limite superiore di concentrazione per l'alginato di sodio.

Per il chitosano il valore massimo di concentrazione selezionato è stato il 4% (p/v),

oltre il quale è difficile ottenere una soluzione di adeguata viscosità. Il valore più basso di TCL valutato è stato 5 minuti perché, come già visto per le ms di calcio-pectinato, è il tempo minimo necessario per la formazione dei legami crociati e quindi per l'ottenimento di una struttura "egg box" di sufficiente consistenza. In tabella 7 sono riassunti i domini sperimentali delle quattro variabili indipendenti: %p/v di alginato,  $\text{CaCl}_2$ , chitosano e TCL studiate rispettivamente a 5, 7, 7, e 3 livelli.



**Figura 17:** Foto digitali di ms ottenute utilizzando soluzioni di alginato di sodio e  $\text{CaCl}_2$  di varia concentrazione

Alginato % (p/v)	$\text{CaCl}_2$ % (p/v)	Chitosano % (p/v)	TCL (min)
3-5	7-12	0-4	5-20

**Tabella 7:** Dominio sperimentale delle variabili indipendenti

Di seguito è riportato il modello matematico postulato, che è una funzione polinomiale di secondo ordine, che descrive la risposta come funzione delle quattro variabili. La scelta del modello è legata strettamente al dominio sperimentale: più il dominio è piccolo, più il modello è semplice.

$$Y = b_0 + b_1 * X_1 + b_2 * X_2 + b_3 * X_3 + b_4 * X_4 + b_{11} * (X_1 * X_1) + b_{22} * (X_2 * X_2) + b_{33} * (X_3 * X_3) + b_{44} * (X_4 * X_4) + b_{12} * (X_1 * X_2) + b_{13} * (X_1 * X_3) + b_{23} * (X_2 * X_3) + b_{14} * (X_1 * X_4) + b_{24} * (X_2 * X_4) + b_{34} * (X_3 * X_4)$$

Dalla scelta del modello dipendono il tipo di informazione ottenuta, il numero e il tipo di esperimenti da condurre e quindi il tipo di pianificazione sperimentale. La matrice sperimentale deve infatti contenere un numero minimo di esperimenti pari al numero di coefficienti da determinare, nel nostro caso 15.

Il nostro obiettivo è stato quello di studiare la dipendenza tra le risposte sperimentali e i fattori selezionati. A questo scopo abbiamo deciso di utilizzare il disegno di Doehlert, in cui le variabili sono studiate a più di due livelli, il che consente di stimare i coefficienti del modello quadratico da noi scelto. Il Doehlert è una figura geometrica i cui vertici individuano gli esperimenti da effettuare. Tale figura consiste di punti uniformemente spazati su sfere concentriche; i punti sono generati a partire da un simplex regolare, che è una figura geometrica con  $K+1$  vertici in uno spazio a  $k$  dimensioni dove  $k$  corrisponde al numero dei fattori. Il software Nemrodw, sulla base del disegno da noi scelto, ha generato una matrice sperimentale che permettesse di stimare correttamente i coefficienti del modello. La matrice sperimentale (tab 8) consiste in una tabella di dati costituita da  $N$  righe, corrispondenti a  $n$  esperimenti e  $K$  colonne, corrispondenti alle  $k$  variabili studiate.

N° exp	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>
1	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2	-1,0000	0,0000	0,0000	0,0000
3	0,5000	0,8660	0,0000	-0,7906
4	-0,5000	-0,8660	0,0000	0,0000
5	0,5000	-0,8660	0,0000	0,0000
6	-0,5000	0,8660	0,0000	0,0000
7	0,5000	0,2887	0,8165	0,0000
8	-0,5000	-0,2887	-0,8165	0,0000
9	0,5000	-0,2887	-0,8165	0,0000
10	0,0000	0,5774	-0,8165	0,0000
11	-0,5000	0,2887	0,8165	0,0000
12	0,0000	-0,5774	0,8165	0,0000
13	0,5000	0,2887	0,2041	0,7906
14	-0,5000	-0,2887	-0,2041	-0,7906

**Tabella 8:** Matrice sperimentale

In tabella 9 è riportato il piano sperimentale, che è la traduzione della matrice sperimentale in variabili naturali; in pratica si tratta di una tabella contenente i dati espressi nelle loro unità di misura direttamente utilizzabili dallo sperimentatore. Sempre in tabella 9 sono riportati anche i risultati in termini di efficacia di incapsulazione e percentuale di farmaco rilasciata dopo 4 ore in ambiente colonico, ottenuti effettuando gli esperimenti secondo quanto dettato dal piano sperimentale, e seguendo due principi:

- **Replicazione:** ripetizione per tre volte delle prove condotte al centro del disegno sperimentale nelle stesse condizioni, per stimare l'errore sperimentale.
- **Randomizzazione:** effettuazione delle prove in ordine casuale per eliminare possibili errori sistematici.

N° Exp	alginato	CaCl <sub>2</sub>	CSL	TCL	EE	% 4 h
	%	%	%	min	%	%
1	5.0	9.5	2.0	12.5	94.6	6.5
2	3.0	9.5	2.0	12.5	92.1	12.0
3	4.5	12.0	2.0	5.0	91.4	58.7
4	3.5	7.0	2.0	12.5	98.7	55.3
5	4.5	7.0	2.0	12.5	96.6	27.3
6	3.5	12.0	2.0	12.5	100.0	60.3
7	4.5	10.3	4.0	12.5	91.2	19.1
8	3.5	8.7	0.0	12.5	87.0	62.3
9	4.5	8.7	0.0	12.5	76.5	14.4
10	4.0	11.2	0.0	12.5	85.4	21.0
11	3.5	10.3	4.0	12.5	91.1	31.9
12	4.0	7.8	4.0	12.5	92.0	8.5
13	4.5	10.3	2.5	20.0	96.2	1.9
14	3.5	8.7	1.5	5.0	88.8	25.8
15	4.5	8.7	1.5	5.0	88.6	18.8
16	4.0	11.2	1.5	5.0	89.4	22.7
17	4.0	9.5	3.5	5.0	89.0	51.7
18	3.5	10.3	2.5	20.0	97.5	65.3
19	4.0	7.8	2.5	20.0	91.1	6.8
20	4.0	9.5	0.5	20.0	91.9	1.0
21	4.0	9.5	2.0	12.5	95.9	5.0
22	4.0	9.5	2.0	12.5	96.7	10.3
23	4.0	9.5	2.0	12.5	96.1	9.6

**Tabella 9:** Piano sperimentale

Ottenute le risposte sperimentali, i dati sono stati analizzati statisticamente tramite analisi della varianza (ANOVA), i cui risultati sono riportati in tabella 10. Nell'ANOVA viene effettuato l'F-test, cioè il test del rapporto della varianza: vengono calcolati i rapporti dei quadrati medi tra diverse sorgenti di variazione, ottenendo così i rapporti F, che vengono confrontati con un F critico tabulato. L'obiettivo del test di significatività è valutare se i coefficienti del modello sono significativi. Secondo l'ipotesi nulla  $H_0$  i coefficienti del modello non apportano informazioni alla descrizione

del fenomeno, mentre secondo l'ipotesi alternativa  $H_1$  i coefficienti apportano informazioni. Affinchè il modello sia significativo occorre che  $F$  sia maggiore di  $F$  critico, in modo da accettare l'ipotesi alternativa. Per quanto riguarda la validità occorre verificare l'ipotesi nulla secondo la quale la perdita di aderenza rispetto al modello è paragonabile all'errore puramente sperimentale. Il modello risulta valido se  $F$  è minore di  $F$  critico. Dall'analisi statistica dei dati sperimentali il nostro modello è risultato valido e significativo ad un livello di significatività del 99%.

<b>Sorgente di variazione</b>	<b>Somma dei quadrati</b>	<b>Gradi di libertà</b>	<b>Quadrati medi</b>	<b>Rapporto F</b>
Regressione	547,2532	14	39,0895	225,5164 <sup>a</sup>
Residui	40,4259	8	5,0532	
validità	40,0792	6	6,6799	38,5377 <sup>b</sup>
Errore	0,3467	2	0,1733	
totale	587,6791	22		
<sup>a</sup> 225,5164 > $F_{\text{critico}}$ (5,559) con 14 e 8 gradi di libertà e $\alpha=0,01$ <sup>b</sup> 38,5377 < $F_{\text{critico}}$ (99,33) con 6 e 2 gradi di libertà e $\alpha=0,01$				

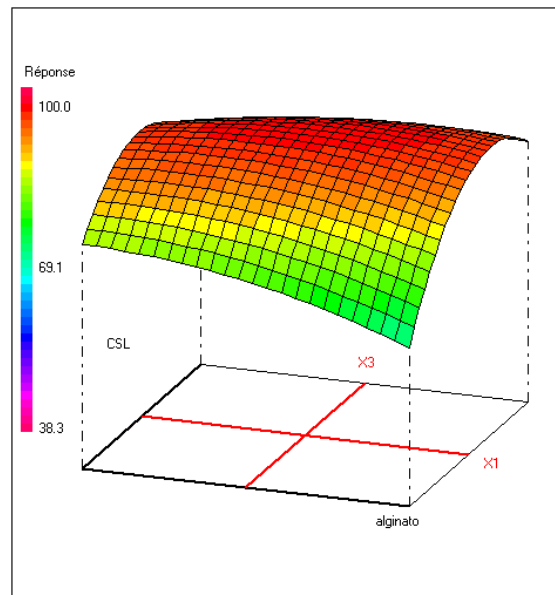
**Tabella 10** :Tabella riassuntiva dell'analisi ANOVA per le risposte sperimentali efficacia di incapsulazione e percentuale di farmaco rilasciata dopo 4 ore in ambiente colonico da ms di chitosano-calcio-alginato

Come possiamo osservare in tabella 9 i valori di efficacia di incapsulazione del celecoxib nelle ms di chitosano-calcio-alginato sono risultati sempre molto alti, non inferiori al 76,5% fino ad arrivare anche al 100%. Questo può essere attribuito alla scarsa solubilità in acqua del celecoxib, che ne limita fortemente la perdita durante il processo di cross linking. Per quanto riguarda invece la percentuale di farmaco rilasciata dopo 4 ore di permanenza in ambiente colonico, i valori più alti si sono ottenuti per basse concentrazioni di alginato, probabilmente perchè, essendo inferiore il numero di legami crociati tra alginato e ioni calcio, le ms risultano meno strutturate e più porose, per cui si disgregano più rapidamente nel mezzo di dissoluzione. Interessanti considerazioni possono essere fatte dall'analisi delle superfici di risposta, che sono la rappresentazione grafica dell'equazione del modello.

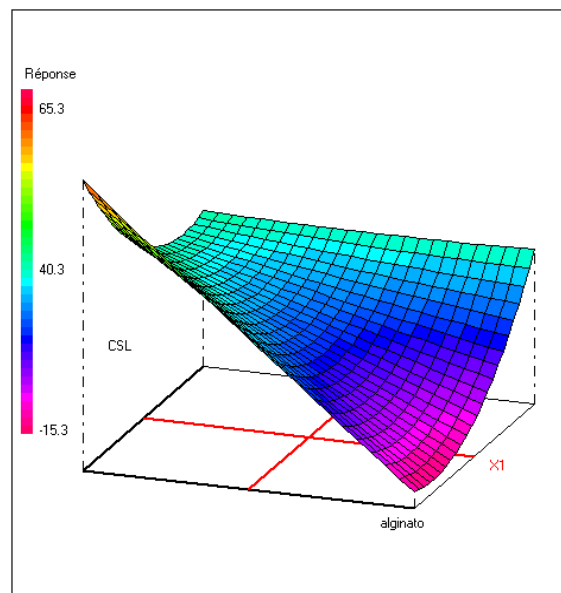
Osservando la figura 18 possiamo vedere come con l'aumentare della percentuale di chitosano nelle ms aumenta l'efficacia di incapsulazione, indipendentemente dal



contenuto di alginato, mentre si ha una riduzione della quantità di farmaco rilasciata dopo 4 ore in ambiente colonico, a bassi livelli di alginato (fig 19).



**Figura 18:** Superficie di risposta che mostra l'effetto della variazione della concentrazione di alginato e chitosano sull'efficacia di incapsulazione del celecoxib in ms di chitosano-calcio-alginato per valori costanti di  $\text{CaCl}_2$  (9,5% p/v) e TCL (12,5 min)

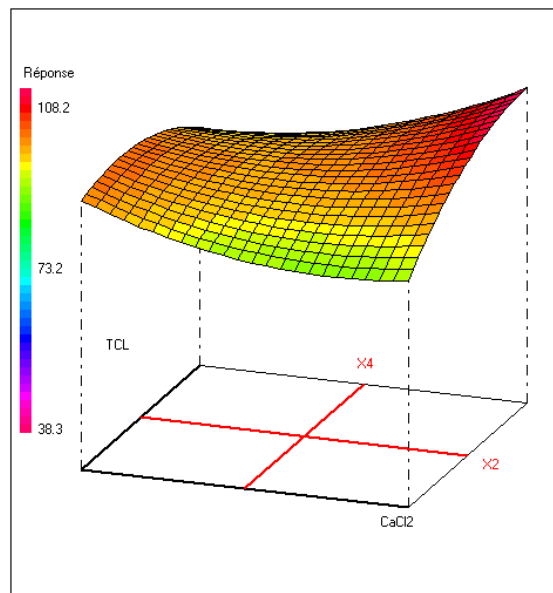


**Figura 19:** Superficie di risposta che mostra l'effetto della variazione della concentrazione di alginato e chitosano sulla percentuale di celecoxib rilasciata dopo 4 ore in ambiente colonico da ms di chitosano-calcio-alginato, per valori costanti di  $\text{CaCl}_2$  (9,5% p/v) e TCL (12,5 min)



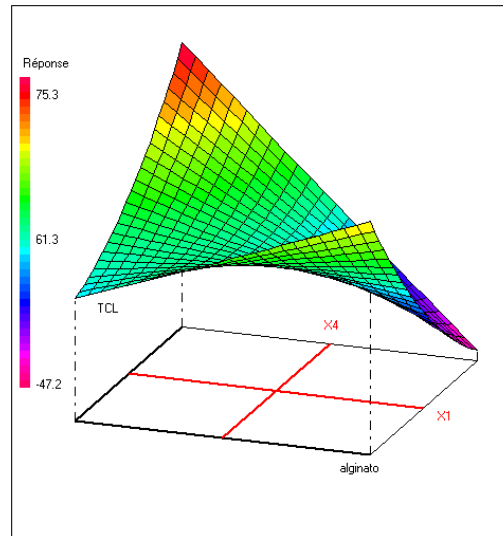
Questi risultati possono essere spiegati in base all'interazione tra i gruppi carbossilici dell'alginato e i gruppi ammoniacali del chitosano, che porta alla formazione di un complesso CSL-alginato. Come risultato di tale interazione si ottiene una maggiore efficacia di incapsulazione del farmaco, ma, d'altra parte, la sua diffusione attraverso la matrice risulta ostacolata. Tuttavia, quando la concentrazione di chitosano diventa troppo elevata, questo effetto si riduce, perchè l'aumentata viscosità della soluzione riduce la mobilità e rallenta la diffusione delle catene di chitosano, ostacolando così la loro interazione con le catene di alginato. Per quanto riguarda la percentuale di farmaco rilasciata dopo 4 ore, la conseguenza di quest'ultimo effetto tende a prevalere in presenza di alti livelli di alginato, rivelando una interazione positiva tra i fattori.

L'efficacia di incapsulazione cresce con l'aumentare della concentrazione di  $\text{CaCl}_2$  e con il TCL, perchè è favorita la reazione di cross linking (fig 20).



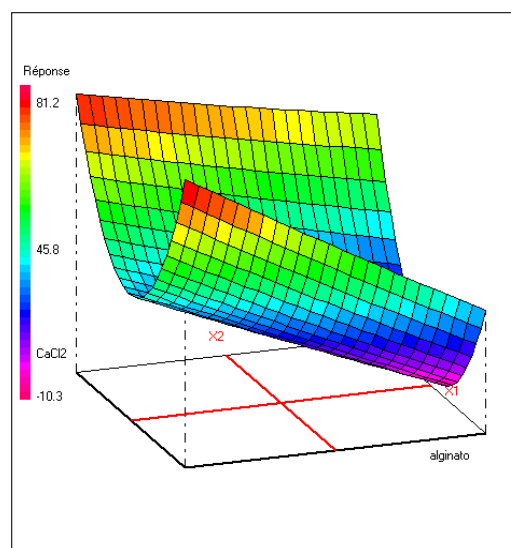
**Figura 20:** Superficie di risposta che mostra l'effetto della variazione della concentrazione di  $\text{CaCl}_2$  e del TCL sull'efficacia di incapsulazione del celecoxib in ms di chitosano-calcio-alginato, per valori costanti di alginato (4% p/v) e CSL (2% p/v)

Un diverso comportamento è stato invece osservato per quanto riguarda il rilascio del farmaco. In particolare è stata riscontrata un'interazione negativa tra alginato e TCL (fig 21): infatti le percentuali più alte di farmaco rilasciato sono state osservate per alti valori di TCL e bassi valori di alginato e viceversa.



**Figura 21:** Superficie di risposta che mostra l'effetto della variazione della concentrazione di  $\text{CaCl}_2$  e del TCL sulla percentuale di celecoxib rilasciata dopo 4 ore in ambiente colonico da ms di chitosano-calcio-alginato, per valori costanti di  $\text{CaCl}_2$  (9,5% p/v) e CSL (2% p/v)

Inaspettatamente, per alti valori di  $\text{CaCl}_2$  si è osservato un aumento della quantità di farmaco rilasciata dopo 4 ore, a parità di concentrazione di alginato e chitosano e di TCL (fig 22). Probabilmente all'aumentare della concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$ , a parità di alginato, si ha inizialmente una riduzione della percentuale di farmaco rilasciata, perchè aumenta il numero di legami crociati; successivamente, una volta chelati i residui carbossilici di acido poliguluronico dell'alginato, l'eccesso di  $\text{Ca}^{2+}$  interagisce con i blocchi di acido polimannuronico, responsabili del rigonfiamento delle ms in mezzo colonico, per scambio con ioni sodio presenti in loco, determinando un rilassamento delle catene seguito da uptake di acqua, tanto maggiore quanto più alto è il numero di residui di acido polimannuronico coinvolti.



**Figura 22:** Superficie di risposta che mostra l'effetto della variazione della concentrazione di  $\text{CaCl}_2$  e di alginato sulla percentuale di celecoxib rilasciata dopo 4 ore in ambiente colonico da ms di chitosano-calcio-alginato, per valori costanti di TCL (12,5 min) e CSL (2% p/v)

Poichè, come abbiamo potuto osservare da un'attenta analisi delle superfici di risposta, i fattori considerati hanno influenza opposta sulle risposte valutate, è stata necessaria l'applicazione di una funzione di desiderabilità per trovare il migliore compromesso tra i valori delle variabili in modo da massimizzare contemporaneamente le due risposte esaminate. La funzione di desiderabilità è una strategia multicriterio, che permette di ottimizzare risposte diverse anche in contrasto tra di loro. Viene definita una funzione di desiderabilità parziale  $d_i$  per ognuno dei criteri considerati. La desiderabilità ha valori compresi tra 0 (non accettabile) e 1 (massima desiderabilità), in questo caso ulteriori miglioramenti non hanno importanza. In un secondo passaggio la qualità totale  $D$  è calcolata effettuando la media geometrica delle singole  $d_i$ :

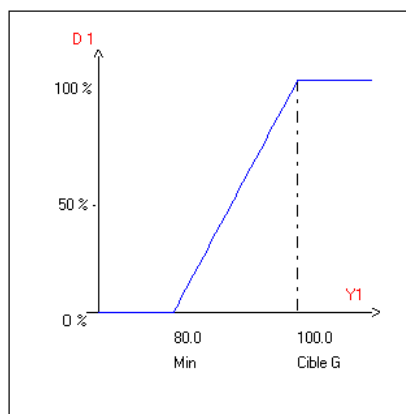
$$D = \sqrt[m]{d_1 * d_2 * \dots * d_m}$$

Inoltre, in dipendenza dell'importanza attribuita alle risposte, le  $d_i$  possono essere pesate :

$$D = \sqrt{w_1 + w_2 + \dots + w_m} d_1^{w_1} * d_2^{w_2} * \dots * d_m^{w_m}$$

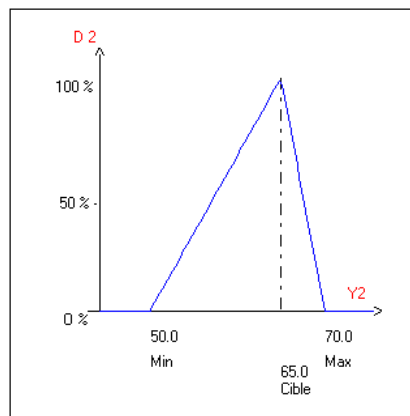
Viene poi determinato il set dei valori delle variabili che massimizzano  $D$ , per cui la combinazione dei differenti criteri è globalmente ottimale.

Per quanto riguarda l'efficacia di incapsulazione abbiamo scelto come desiderabilità parziale quella riportata in figura 23, in cui si accetta come valore minimo di efficacia di incapsulazione l'80%, sotto a tale valore  $d_i$  è uguale a zero; tanto più la risposta è alta tanto più alta è la desiderabilità fino ad arrivare al 100%.

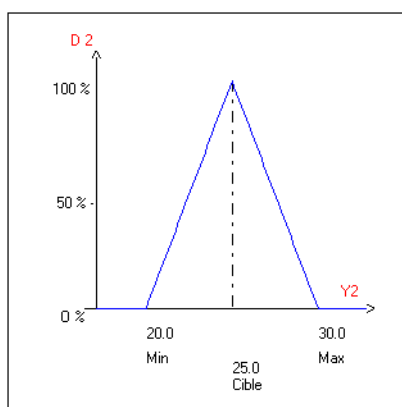


**Figura 23:** Rappresentazione grafica della desiderabilità parziale per l'efficacia di incapsulazione del celecoxib in ms di chitosano-calcio-pectinato

Nelle figure 24 e 25 è riportata la rappresentazione grafica della desiderabilità parziale per la percentuale di farmaco rilasciata dopo 4 ore in ambiente colonico. In questo caso abbiamo considerato due diverse funzioni di desiderabilità, una relativa all'ottenimento di un rilascio colonico per l'impiego sistemico di celecoxib contro l'artrite reumatoide, l'altra relativa all'ottenimento di un rilascio protratto locale di celecoxib nella cura di patologie del colon. Nel primo caso abbiamo scelto una desiderabilità parziale con un valore minimo del 50%, un massimo di 70% e un valore desiderabile del 60% (fig 24). Nel caso dell'utilizzo per patologie locali l'obiettivo è quello di aumentare al massimo, compatibilmente con il tempo di transito gastro-intestinale, il tempo di permanenza del farmaco nel colon; per questo abbiamo posto come valori di minimo e massimo rispettivamente 20 e 30% e desiderabile 25% per cui  $d_i$  è uguale a 1 (fig 25). Valori superiori ed inferiori sono meno desiderabili ( $0 < d_i < 1$ ). Da 20 in giù e da 30 in su  $d_i$  è uguale a zero.



**Figura 24:** Rappresentazione grafica della desiderabilità parziale per la percentuale di celecoxib rilasciata dopo 4 ore di permanenza in ambiente colonico, in caso di applicazione sistemica del farmaco



**Figura 25:** Rappresentazione grafica della desiderabilità parziale per la percentuale di celecoxib rilasciata dopo 4 ore di permanenza in ambiente colonico, in caso di applicazione locale del farmaco

Definite le funzioni di desiderabilità parziali, il programma ha calcolato i valori delle variabili in modo tale da ottimizzare entrambe le risposte sperimentali contemporaneamente. Tali valori sono riportati nelle tabelle 11 e 12 rispettivamente per un'applicazione sistemica e locale del celecoxib.

Alginato % (p/v)	CaCl <sub>2</sub> % (p/v)	Chitosano % (p/v)	TCL (min)	EE %	% 4 h
3,9	7,2	0,5	12	90	65

**Tabella 11:** Applicazione sistemica del celecoxib : Valori delle variabili per la contemporanea ottimizzazione dell'efficacia di incapsulazione e della percentuale di farmaco rilasciata dopo 4 ore in ambiente colonico

Alginato % (p/v)	CaCl <sub>2</sub> % (p/v)	Chitosano % (p/v)	TCL (min)	EE %	% 4 h
4,5	11	2,6	18,5	99,6	25

**Tabella 12:** Valori delle variabili per la contemporanea ottimizzazione dell'efficacia di incapsulazione e della percentuale di farmaco rilasciata in ambiente colonico dopo 4 ore

Sono state quindi realizzate ms rispettando le concentrazioni delle variabili suggerite dalla funzione di desiderabilità, sia per una applicazione sistemica che locale del celecoxib. I valori ottenuti sperimentalmente di efficacia di incapsulazione e di percentuale di farmaco ceduta dopo 4 ore, riportati in tabella 13, sono risultati molto vicini a quelli previsti confermando la validità del modello matematico applicato.

	Applicazione locale		Applicazione sistemica	
	EE %	% 4 ore	EE %	% 4 ore
Valore previsto	99,6	25	90	65
Valore sperimentale	97,8 ± 0,9	23,9 ± 1.3	92,1 ± 0.75	63,85 ± 1,8

**Tabella 13:** Valori previsti e sperimentali di efficacia di incapsulazione e di percentuale di farmaco rilasciata dopo 4 ore in ambiente colonico per una applicazione locale o sistemica di celecoxib

A differenza di quanto visto nella prima parte di questo lavoro di tesi per le ms caricate con prednisone e teofillina, nel caso del celecoxib, non è stato necessario rivestire con Eudragit<sup>®</sup> le ms di chitosano-calcio-alginato, in quanto, probabilmente a causa della sua limitata solubilità, la percentuale di farmaco rilasciata prima del raggiungimento del colon é risultata molto bassa (tab 14).

	Ms di alginato 3,9 % (p/v), CaCl <sub>2</sub> 7,2 % (p/v), CSL 0,5 % (p/v),	Ms di alginato 4,5 % (p/v), CaCl <sub>2</sub> 11% (p/v), CSL 2,6 % (p/v)
% di celecoxib rilasciata dopo 2 ore a pH 1,1	0,48 %	0,36 %
% di celecoxib rilasciata dopo 2 ore a pH 6,8	0,89 %	0,73 %

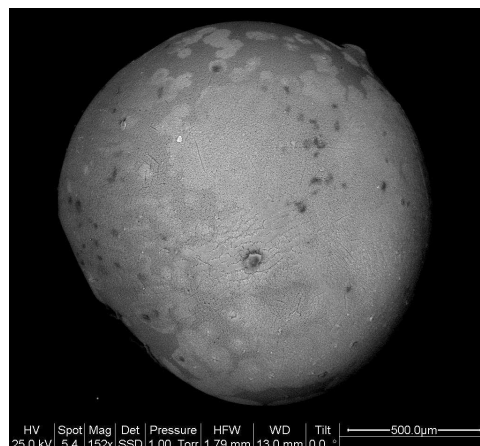
**Tabella 14:** percentuale di celecoxib rilasciata dopo 2 ore di permanenza in ambiente gastrico e 2 ore a pH 6,8 da ms di chitosano-calcio-alginato di composizione ottimizzata

### 3.3.7 Studi morfologici delle microsfere

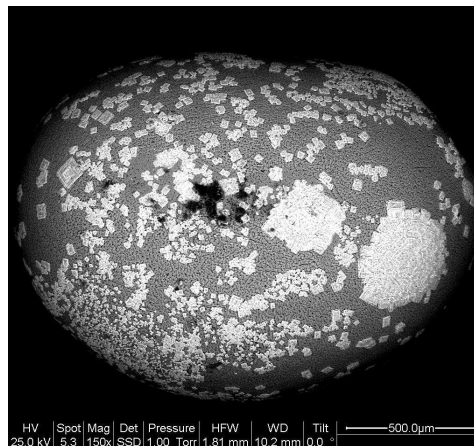
Tutti i lotti di ms preparate secondo le composizioni indicate dal disegno sperimentale erano di adeguata consistenza, di forma sferica e regolare, con una resa tra il 78 e il 90%.; le dimensioni variavano da un minimo di  $0.9 \pm 0,01$  mm ad un massimo di  $1,37 \pm 0,01$  mm.

Nelle figure 26 e 27 sono riportate le foto ESEM (Environmental Scanning Electron Microscope) di due lotti di ms realizzate in presenza ed assenza di chitosano. L'ESEM permette di ottenere immagini ad altissimo ingrandimento, ad elevata risoluzione e profondità di campo, senza necessità di preparare un campione in modo particolare provocandone alterazioni irreversibili (metallizzazioni a oro o grafite) e senza dover lavorare in altissimo vuoto.

Osservando le figure 26 e 27 possiamo notare che le ms presentano una superficie morfologicamente molto diversa se preparate con o senza chitosano; nel primo caso la ms appare levigata e di forma regolare (fig 26); nel secondo caso presenta in superficie delle strutture rettangolari, omogeneamente distribuite, dovute al parziale rivestimento di chitosano.

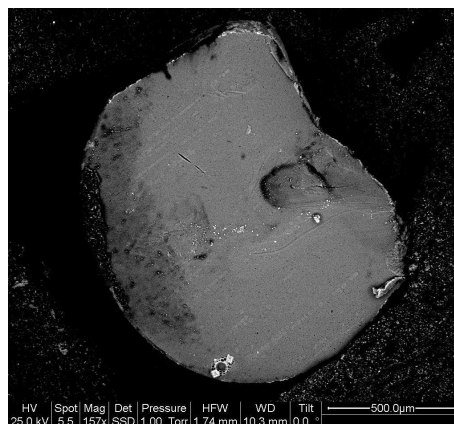


**Figura 26:** Foto ESEM di ms realizzate con alginato e CaCl<sub>2</sub> rispettivamente al 3,5 % e 8,7 % (p/v)



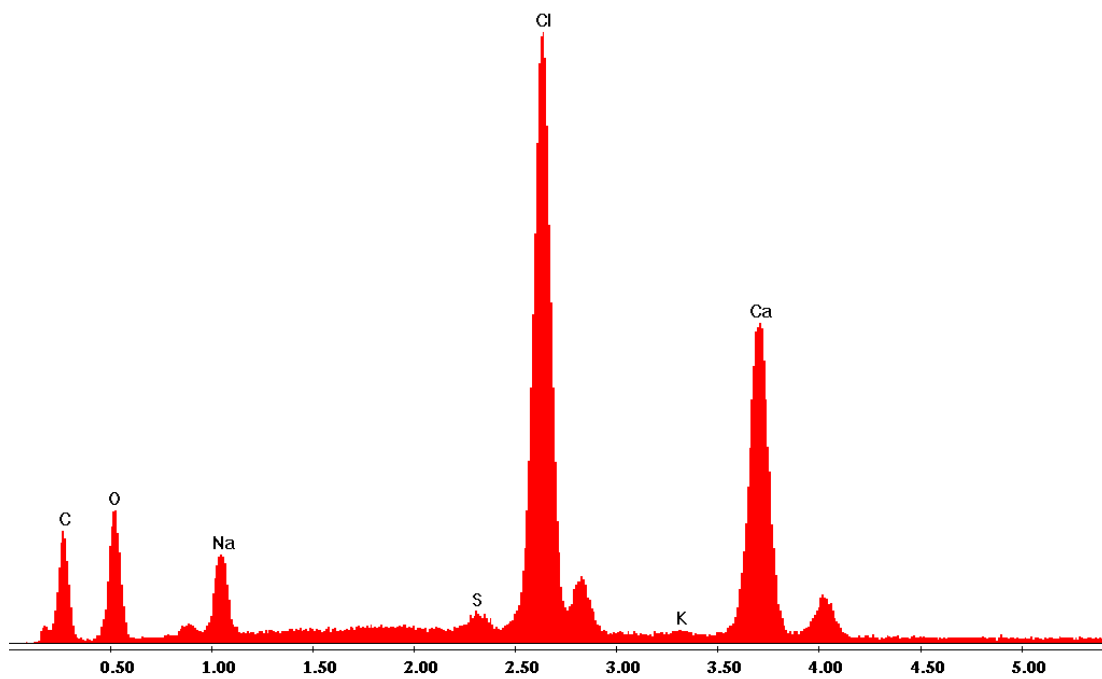
**Figura 27:** Foto ESEM di ms realizzate con alginato,  $\text{CaCl}_2$  e chitosano rispettivamente al 3,5 %, 10,3 % e 2,5 % (p/v)

La figura 28 rappresenta una sezione di una ms realizzata in presenza di chitosano. Come possiamo osservare all'interno non sono presenti le strutture rettangolari che avevamo osservato precedentemente in superficie (fig 28), ciò significa che il chitosano si colloca solo all'esterno della ms, mentre la matrice interna è costituita solo da calcio-alginato.



**Figura 28:** Foto ESEM che rappresenta la sezione di una ms realizzata con alginato,  $\text{CaCl}_2$  e chitosano rispettivamente al 3,5 % e 10,3 % e 2,5 % (p/v)

Tramite ESEM è stato possibile effettuare, oltre ad un'analisi morfologica, anche un'analisi chimica del campione. In figura 29 è riportata la composizione chimica del lotto di ms realizzate in assenza di chitosano. I picchi più intensi sono dovuti ad elementi presenti in maggiore quantità o più pesanti. E' necessario precisare che l'azoto, essendo volatile spesso non è visibile con un'analisi di questo tipo. L'informazione più importante che abbiamo potuto ottenere da questa analisi chimica è che spostandosi nelle varie zone della ms la composizione era identica, per cui le ms sono risultate di struttura omogenea.



**Foto 29:** Composizione chimica di una ms realizzata con alginato e  $\text{CaCl}_2$  rispettivamente al 3,5 % e 10,3 % (p/v)



### 3.4 Conclusioni

- Lo scopo di questo lavoro è stato la realizzazione di un sistema orale a rilascio colon specifico di celecoxib per un suo impiego sia a livello locale che sistemico. A tal fine sono state realizzate ms di chitosano-calcio-alginato che sono sistemi sia pH che microflora dipendenti, permettendo così di superare il problema della variabilità inter-individuale del pH gastrointestinale, che è il limite principale presentato dai sistemi puramente pH dipendenti.
- Inizialmente, al fine di aumentare la scarsa solubilità del farmaco, che ne limita fortemente la biodisponibilità e ne impedisce una omogenea distribuzione nelle ms, è stata valutata l'efficacia solubilizzante di tre carriers idrofili: nicotinamide,  $\beta$ CD e HP $\beta$ CD. Studi di solubilità di fase hanno dimostrato la maggiore efficacia della HP $\beta$ CD rispetto agli altri agenti complessanti, nell'incrementare la solubilità in acqua del celecoxib; inoltre il complesso celecoxib-HP $\beta$ CD è risultato più stabile ( $1572 \text{ M}^{-1}$ ) rispetto a quello ottenuto con la  $\beta$ CD ( $K_{1:1} = 458 \text{ M}^{-1}$ ) e con la nicotinamide ( $102 \text{ M}^{-1}$ ).
- Sono stati quindi preparati sistemi binari celecoxib-HP $\beta$ CD con la tecnica della comacinazione, kneading, coevaporazione e coliofilizzazione. I risultati ottenuti dalla caratterizzazione allo stato solido dei sistemi binari farmaco-ciclodestrina, hanno messo in evidenza una totale amorfizzazione del principio attivo solo nel coliofilizzato. Tuttavia, dati gli alti costi richiesti da questa tecnica e la bassa resa di complesso ottenuta, per la realizzazione dei sistemi binari sono state scelte le tecniche di comacinazione e kneading, che avevano comunque permesso di ottenere una buona interazione farmaco-ciclodestrina.
- La realizzazione di un sistema ternario per aggiunta del 10 % di PVP K30 al sistema binario celecoxib-HP $\beta$ CD ha portato ad una totale amorfizzazione del principio attivo e ad un ulteriore incremento della sua solubilità e conseguentemente della sua velocità di dissoluzione rispetto al farmaco tal quale e al sistema binario. Come tecnica di ottenimento del sistema ternario è stata scelta la comacinazione basandosi sui risultati ottenuti da studi allo stato solido.
- Sono state realizzate quindi ms di chitosano-calcio-alginato caricate con comacinato celecoxib-HP $\beta$ CD-PVP.
- L'utilizzo del disegno sperimentale di Doehlert ha permesso di ottimizzare la composizione percentuale delle ms, in termini di efficacia di incapsulazione e di percentuale di farmaco rilasciata dopo 4 ore in ambiente colonico, considerate come risposte da ottimizzare. L'analisi della superficie di risposta ha mostrato un incremento dell'efficacia di incapsulazione del celecoxib all'aumentare del TCL e della concentrazione (p/v) di alginato,  $\text{CaCl}_2$  e chitosano ma un decremento

della percentuale di farmaco rilasciata dopo 4 ore in ambiente colonico (ad eccezione del  $\text{CaCl}_2$  che ad alte concentrazioni ottimizza entrambe le risposte).

- Dal momento che la variazione delle 4 variabili considerate ha in generale avuto effetto opposto sulle due risposte valutate, è stata necessaria l'applicazione della funzione di desiderabilità per trovare un compromesso per la simultanea ottimizzazione delle due risposte, finalizzata sia ad un'applicazione sistemica che locale del celecoxib.
- La matrice di chitosano-calcio-alginato ha garantito una totale protezione del farmaco fino al raggiungimento del colon; non è stato necessario quindi il rivestimento gastro-resistente di Eudragit<sup>®</sup>, che era risultato indispensabile per le ms di chitosano-calcio-pectinato caricate con teofillina o prednisone.

### 3.5 Bibliografia

- [1] G.S. Geis, Update on clinical development with celecoxib, a new specific COX-2 inhibitor: what can we expect? *Scand. J. Rheumatol. Suppl.*, 109 (1999) 31-37
- [2] Martindale The Extra Pharmacopoeia, 32nd., The Pharmaceutical Press, London (1999) 2-12
- [3] L.S. Simon, F.L. Lanza, P.E. Lipsky, Preliminary study of the safety and efficacy of SC-58635, a novel cyclooxygenase-2 inhibitor. *Arthritis Rheum.*, 41 (1998) 1591-1602
- [4] G. Annoni, E. Strumia, in: G. Annoni, E. Strumia (Eds.), *Celebrex. Il capostipite degli inibitori specifici della COX-2*, Sprinter-Verlag, Italia, Milano, (2000)
- [5] J.Fort, Celecoxib, a COX-2-specific inhibitor: The clinical data, *Am. J. Orthop.*, 28 (1999) 13-18
- [6] G. Steinbach, P.M. Lynch, R.K. Phillips, M.H. Wallace, E. Hawk, G.B. Gordon et al., The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in a familial adenomatous polyposis, *N. England J. Med.*, 342 (2000) 1946-1952
- [7] E.P. Connor, *Physicians' desk reference*. (57<sup>th</sup> ed.). New Jersey: Medical Economics Company Inc., (2003) 2589-2593
- [8] N.M. Davies, A.J. Mclachlan, R.O. Day, K.M. Williams, Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib a selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, *Clinical Pharmacokinetics*, 38 (2000) 225-242
- [9] S.M. Fisher, H.H. Lo, G.B. Gordon, K. Seibert, G. Kelloff, R.A. Lubet, C.J. Conti, Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, and indomethacin against ultraviolet light-induced skin carcinogenesis, *Mol. Carcinog.*, 25 (1999) 231-240
- [10] R.E Harris, G.A. Alshafie, H. Asbou-Issa, K. Seibert, Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a specific cyclo-oxygenase inhibitor. *Cancer Res.*, 60 (2000) 2101-2103
- [11] T. Kawamori, C.V. Rao, K. Seibert, B.S. Reddy, Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis, *Cancer Res.*, 58 (1998) 409-412
- [12] L.M. Jackson, C.J. Hawkey, COX-2 selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs, *Drugs*, 59 (2000) 1207-1216
- [13] E. Tindall, Celecoxib for the treatment of pain and inflammation: the preclinical and clinical results, *J. Am. Osteopath. Assoc.*, 99 (1999) 13-17
- [14] M. Dougados, J.M. Beier, I. Joichine, A. Calin, D. vander Heijde, I. Olivieri, H. Zeidler, H. Herman, Efficacy of celecoxib, a cyclo-oxygenase 2-specific inhibitor, in the

treatment of ankylosing spondylitis: a six week controlled study with comparison against a conventional nonsteroidal anti inflammatory drug. *Arthritis Rheum.*, 44 (2001) 180-185

[15] L. Laine, Gastrointestinal effects of NSAIDs and coxibs. *J Pain Symptom Manage* (2003), 25

[16] R.J. Bing, Cyclooxygenase-2 inhibitors: is there an association with coronary or renal events?, *Curr. Atherosclerl. Rep.*, 5 (2003) 114-117

[17] F. Salaffi, A. Stancati, R. Procaccini, F. Cioni, W. Grassi, Valutazione del ritmo circadiano del dolore e della rigidità nelle malattie reumatiche secondo la metodica EMA. Compliance del paziente con un diario elettronico. *Reumatismo*, 57 (2005) 238-249

[18] F. Buttgerit, Efficacy of modified-release versus standard prednisone to reduce duration of morning stiffness of the joints in rheumatoid arthritis (CAPRA-1): a double-blind, randomized controlled trial. *Lancet*, 371 (2008) 205-214

[19] G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah, J.R. Crison, A theoretical basic for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vitro bioavailability, *Pharm. Res.*, 12 (1995) 413-419

[20] S. Paulson, M. Vaughn, S. Jessen, Y. Lawal, C. Gresk, B. Yan, T. Maziasz, C. Cook, A. Karim, Pharmacokinetics of celecoxib after oral administration in dogs and humans: effect of food and site of absorption, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 297 (2001) 638-645

[21] G.A. FitzGerald, C. Patrono, The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2, *N. Engl. J. Med.* 354 (2001) 433-442

[22] N. Seedher, S. Bathia, Solubility enhancement of Cox-2 inhibitors using various solvent systems. *AAPS PharmSciTech.*, 4 (2003) 1-9

[23] V.K. Devi, P. Vijayalakhmi, M. Avinash, Preformulation studies on celecoxib with a view to improve bioavailability, *Ind. J. Pharm. Sci.*, 65 (2003) 542-545

[24] R. Swati, K.J. Sanjay, Solubility enhancement of celecoxib using  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes, *Eur. J. Pharm. Sci. Biopharm.*, 57 (2004) 263-267

[25] V.R. Sinha, R. Anitha, S. Ghosh, A. Nanda, R. Kumria, Complexation of celecoxib with  $\beta$ -cyclodextrin: characterization of the interaction in solution and in solid state, *J. Pharm. Sci.*, 94 (2005) 676-687

[26] C.A. Ventura, I. Giannone, D. Paolino, V. Pistarà, A. Corsaro, G. Puglisi, Preparation of celecoxib-dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: characterization and in vitro permeation study, *Eur. J. Med. Chem.*, 40 (2005) 624-631

- [27] M.N. Reddy, T. Rehana, S. Ramakrishna, P.V. Diwan, K.P.R. Chowdary,  $\beta$ -cyclodextrin complexes of celecoxib: molecular modeling, characterization and dissolution studies. *AAPS PharmSci.*, 6 (2004) 7
- [28] A.A.Rasool, A.A. Hussain, L.W. Dittert, Solubility enhancement of some water insoluble drugs in the presence of nicotinamide and related compounds, *J. Pharm. Sci.*, 80 (1991) 387-393
- [29] L. Lim, M. Go, Caffeine and Nicotinamide enhances the aqueous solubility of the antimalarial agent halofantrine, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 10 (2000) 17-28
- [30] J. Lee, S.C. Lee, G. Acharya, C. Chang, K. Park, Hydrotropic solubilisation of paclitaxil: analysis of chemical structures for hydrotropic property, *Pharm. Res.*, 20 (2003) 1022-1030
- [31] S. Agrawal, S.S. Pancholi, N.K. Jain, G.P. Agrawal, Hydrotropic solubilization of nimesulide for parenteral administration, *Int. J. Pharm.*, 274 (2004) 149-155
- [32] R. Sanghavi, D. Evans, S.H. Yalkowsky, Stacking complexation by nicotinamide: A useful way of enhancing drug solubility, *Int. J. Pharm.*, 336 (2007) 35-41
- [33] M.A. Hussain, R.C. Diluccio, M.B.Maurin, Complexation of moricizine with nicotinamide and evaluation of complexation constants by various methods, *J. Pharm. Sci.*, 82 (1993) 77-79
- [34] A.X. Chen, S.W. Zito, R.A. Nash, Solubility enhancement of nucleosides and structurally related compounds by complex formation. *Pharm. Res.*, 11 (1994) 398-401
- [35] H. Suzuki, H. Sunada, Mechanistic studies on hydrotropic solubilization of nifedipine in nicotinamide solution, *Chem. Pharm. Bull.*, 46 (1998) 125-130
- [36] R.E. da Silva, M. Spitzer, L.H.M. da Silva, W. Loh, Investigation on the mechanism of aqueous solubility increase caused by some hydrotropes, *Thermochim. Acta*, 328 (1999) 161-167
- [37] K.P. Chowdary, S.V. Srinivas, Influence of hydrophilic polymers on celecoxib complexation with hydroxypropyl beta-cyclodextrin, *AAPS PharmSciTech*, 7 (2006) 79
- [38] G. Chawla, P. Gupta, R. Thilagavathi, A.K. Chakraborti, A.K. Bansal, Characterization of solid-state forms of celecoxib, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 20 (2003) 305-317
- [39] V. Sinha, R. Kumria, Polysaccharides in colon specific drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 224 (2001) 19-38
- [40] S.K. Bajpai, S. Sharma, Investigation of swelling/degradation behavior of alginate beads crosslinked with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  ions, *React. Funct. Polym.*, 59 (2004) 129-140

- [41] H. Thakkar, R.K. Sharma, A.K. Mishra, K. Chuttani, R.S.R, Murthy, Celecoxib incorporated chitosan microspheres: in vitro and in vivo evaluation, *J. Drug. Target*, 12 (2004) 549-557
- [42] T. Higuchi and K.A. Connors, Phase solubility techniques, *Adv. Anal. Chem. Instrum.*, 4 (1965) 117–212
- [43] W.D. Walking, R.K. Nayak, J. Plostnieks, W.A. Cressman, A partially organic dissolution medium for griseofulvin dosage forms, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 5 (1979) 17-27
- [44] M. Takahashi, M. Mochizuki, T. Itoh, M. Otha, Dissolution tests for soft gelatin capsules. IV. Dissolution test of nifedipine soft gelatin capsules containing water soluble vehicles by the rotating dialysis cell method, *Chem. Pharm. Bull.*, 42 (1994) 333-336
- [45] S.A. Quereshi, G. Caillé, R. Brien, G. Piccirilli, V. Yu, I.J. McGilveray, Application of flow-through dissolution method for the evaluation of oral formulations of nifedipine, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 20 (1994) 1869-1882
- [46] V.P. Shan, J.J. Konecny, R.L. Everett, B. McCullough, A.C. Noorizadeh, J.P. Skelly, In vitro dissolution profile of water insoluble drug dosage forms in the presence of surfactants, *Pharm. Res.* 6 (1989) 612-618
- [47] M.D. Veiga, J. Alvarez de Eulate, Dissolution study of spiramycin: influence of agitation intensity and addition of several substance to the dissolution medium. *Int. J. Pharm.*, 110 (1994) 223-229
- [48] B. Abrahamsson, D. Johansson, A. Torstensson, K. Wingstrand, Evaluation of solubilizers in the drug release testing of hydrophilic matrix extended-release tablets of felodipine, *Pharm. Res.* 11 (1994) 1093-1097
- [49] P. Buri, J. Humbert-Droz, Solubilization de principes actif insolubles par des constituants des sucs digestifs, *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Congress of Pharmaceutical Technology*, vol 4, Paris (1983), 136-143
- [50] L. Maggi, M.L. Torre, P. Giunchedi, U. Conte, Supramicellar solutions of sodium dodecyl sulphate as dissolution media to study the in vitro release characteristics of

sustained-release formulations containing an insoluble drug: nifedipine, *Int. J. Pharm.*, 135 (1996) 73-79

[51] S. Bourgeois, M. Gernet, D. Pradeau, A. Andremont, E. Fattal, Evaluation of critical formulation parameters influencing the bioactivity of  $\beta$ -lactamases entrapped in pectin beads, *Int. J. Pharm.*, 324 (2006) 2-9

## ***Capitolo 4***

### ***Micelle a base di GCPQ***

---



## 4.1 Introduzione

Questa ultima parte del lavoro di tesi è stata svolta presso la “School of Pharmacy” di Londra sotto la supervisione della Prof. Ijeoma Uchegbu ed ha avuto come scopo la realizzazione di sistemi nanoparticellari per il rilascio di doxorubicina a livello cerebrale.

Il limitato trasporto di farmaci attraverso la barriera emato-encefalica (BEE) rappresenta un grosso impedimento per il trattamento di tumori cerebrali e di malattie neurodegenerative quali Parkinson e Alzheimer [1]. I capillari cerebrali sviluppano un'area superficiale totale di circa 20 m<sup>2</sup> con la possibilità virtuale di distribuzione di farmaci in tutte le zone del cervello. Sfortunatamente le caratteristiche fisiologiche di questi capillari restringono enormemente il numero di farmaci che possono raggiungerlo dopo somministrazione sistemica. Una delle strategie utilizzabili per superare la BEE è l'utilizzo di nanoparticelle [2]. Vari tipi di nanoparticelle sono state sviluppate per il drug delivery [3-4]. In particolare, in questo lavoro, abbiamo utilizzato micelle polimeriche costituite da un polimero amfilico; quando le catene del polimero sono disciolte in mezzo acquoso, al di sopra della concentrazione micellare critica (CMC), esse formano spontaneamente aggregati micellari.

I tumori cerebrali includono: gliomi (astrocitomi, oligodendrogliomi, ependimomi e glioblastomi multiformi), meningiomi e tumori cerebrali secondari, in cui la patologia interessa il SNC in seguito a metastasi di focolai tumorali sorti in altre aree del corpo, quali i polmoni, il seno, il collo e la pelle. I tumori cerebrali di basso grado sono trattati principalmente per via chirurgica e radioterapica mentre molti farmaci sono stati valutati per il trattamento di tumori di alto grado, in particolare per il trattamento del glioblastoma multiforme tra cui: temozolomide, paclitaxel, cisplatino, doxorubicina [5], lirinotecan, metotressato e carmustina. Tuttavia, molti di questi agenti antitumorali sono grosse molecole incapaci di attraversare la BEE e inoltre sono substrato delle pompe di efflusso, espresse sia dai vasi cerebrali che dalle cellule tumorali. Queste pompe, responsabili della MDR (multi drug resistance), espellono il farmaco dalle cellule riducendone così la concentrazione al di sotto del valore necessario per esplicare l'attività.

La doxorubicina è un antibiotico di natura antraciclinica ed è uno dei più potenti e versatili agenti antitumorali conosciuti, ma non è capace di attraversare la BEE dopo somministrazione sistemica [5].

Il GCPQ (Quaternary ammonium Palmitoyl Glycol Chitosan) è un polimero, derivato del chitosano, sintetizzato presso il laboratorio della Prof. Uchegbu [6]. Nanoparticelle realizzate con questo polimero, hanno dimostrato di promuovere il rilascio di farmaci attraverso la BEE, aumentandone l'attività di più di dieci volte dopo somministrazione intravena [7]. Il meccanismo con cui il GCPQ aumenta la concentrazione di principi attivi a livello cerebrale non è ancora completamente noto; può essere ipotizzato che, dando origine a micelle molto piccole di diametro, permetta di prolungare il tempo di

permanenza del farmaco in circolo e quindi di raggiungere concentrazioni maggiori a livello cerebrale. Sulla base di queste premesse, lo scopo di questo lavoro è stato lo sviluppo di micelle a base di GCPQ, mirate ad un rilascio cerebrale di doxorubicina, per una applicazione terapeutica contro il glioblastoma. Inoltre, poiché la doxorubicina è substrato della glicoproteina P [8], che ne causa il fenomeno della resistenza, l'utilizzo di nanosistemi potrebbe, oltre a favorire il rilascio del farmaco a livello cerebrale, proteggerlo dai fenomeni di efflusso e di degradazione e quindi permettere di ridurre la dose terapeutica, riducendo così anche la comparsa di effetti collaterali avversi. La doxorubicina infatti ha un elevato potere cardiotossico dose-dipendente; se viene superato il dosaggio di  $550 \text{ mg/m}^2$  di superficie corporea, il 30% dei pazienti sviluppa insufficienza cardiaca [9]; il suo metabolita inoltre, il doxorubicinolo è 20-40 volte più attivo nell'inibire la contrattilità miocardica.

All'inizio di questo lavoro è stata effettuata la sintesi del GCPQ.

Come già visto nei precedenti capitoli, il chitosano è un polimero largamente usato in campo farmaceutico, per le sue proprietà di biodegradabilità, biocompatibilità [10] e bassa tossicità. Il chitosano ha una pKa tra 5,5 e 6,5 ed è quindi insolubile a valori di pH superiori a 6,5 [11], quindi anche a pH fisiologico. Il glicol-chitosano invece è un derivato del chitosano solubile in un più ampio range di pH.

Nella sintesi del GCPQ residui palmitoilici ( $-C_{16}$ ) sono stati legati al glicol chitosano in modo da ottenere un polimero amfifilo capace di auto-assemblarsi in mezzo acquoso.

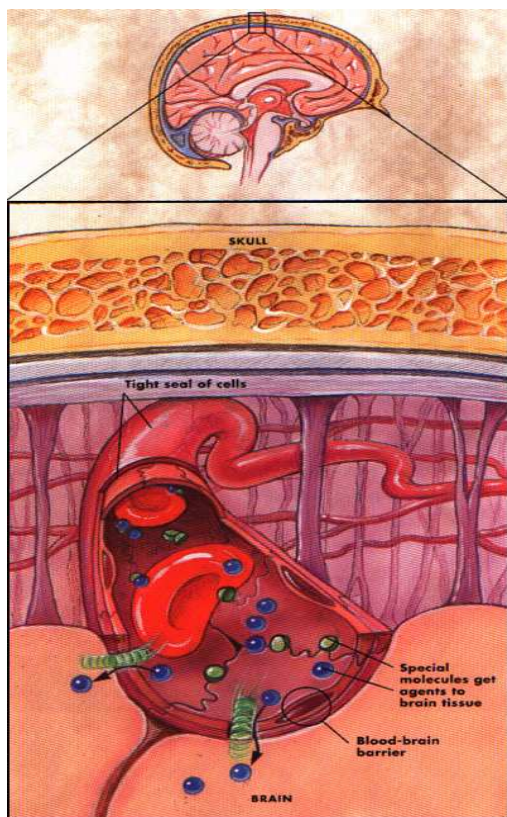
E' dimostrato che, aumentando le proprietà cationiche delle nanoparticelle, se ne favorisce la permeabilità attraverso la BEE [12]. Tuttavia, studi effettuati su colture cellulari hanno dimostrato che polimeri contenenti ammine primarie sono più tossici degli stessi composti in cui queste ammine sono convertite in gruppi ammoniaci quaternari. E' riportato infatti che le ammine primarie potrebbero interagire con il DNA e causare apoptosi/necrosi cellulare [13]. Quindi al fine di aumentare le caratteristiche di idrofilicità ed il profilo di sicurezza del palmitoil glicol chitosano, abbiamo convertito le ammine primarie in gruppi ammoniaci quaternari, attraverso una reazione di metilazione.

Il polimero sintetizzato è stato analizzato tramite DSC, diffrazione dei raggi X, FTIR. Studi NMR sono stati effettuati per avere conferma della sintesi del GCPQ e per determinare il suo grado di palmitoilazione e quaternizzazione. Il peso molecolare medio del polimero è stato determinato attraverso cromatografia a permeazione di gel (GPC).

Ottenuto il polimero sono state preparate micelle caricate con doxorubicina cloridrato e sono state caratterizzate in termini di efficacia di incapsulazione, dimensioni, indice di polidispersione, potenziale Z e aspetto morfologico.

## **Barriera emato-encefalica (BEE)**

La barriera emato-encefalica è un'importante interfaccia tra il sangue ed il cervello, costituita da cellule endoteliali di rivestimento dei capillari [14], che protegge il cervello dagli xenobiotici e regola l'omeostasi cerebrale. Le cellule endoteliali sono unite tra di loro da giunzioni cellulari occludenti (o tight junctions). Questa maggiore compattezza impedisce il passaggio di sostanze idrofile e/o con elevato peso molecolare dal flusso sanguigno all'interstizio (e quindi ai neuroni), con una capacità di filtraggio molto più selettiva rispetto a quella effettuata dalle cellule endoteliali dei capillari di altre parti del corpo. Un ulteriore fattore che contribuisce alla formazione di questa unità anatomico-funzionale è costituito dalle proiezioni delle cellule astrocitarie, chiamate peduncoli



**Figura 1:** Barriera emato-encefalica

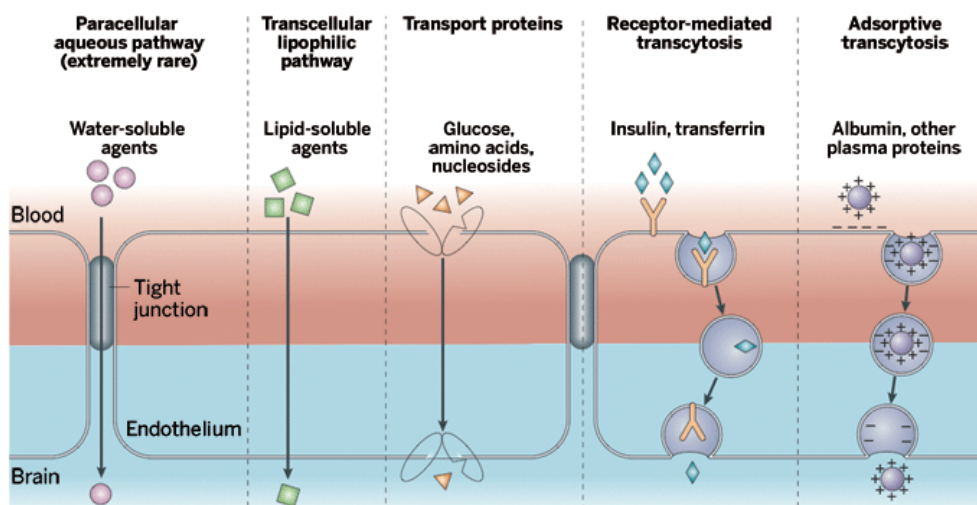
astrocitari, che circondano le cellule endoteliali. Inoltre, c'è una membrana basale continua e sono assenti le vescicole pinocitotiche, quindi non c'è la possibilità di attraversamento della barriera da parte di sostanze che abbiano un peso molecolare piuttosto consistente. Abbondanti i mitocondri che possono fornire energia per processi di tipo attivo. A questa architettura particolare dell'endotelio, si aggiunge la presenza di astrociti che concorrono in maniera determinante ad influenzare i processi di diffusione delle sostanze attraverso questa barriera. Vi sono, poi, dei trasportatori che permettono l'ingresso di sostanze tramite un processo di trasporto facilitato e quindi sempre dipendente dal gradiente di concentrazione. Si ha anche un trasporto attivo laddove è importante eliminare dei metaboliti (ad esempio, neurotrasmettitori del SNC verso la periferia).

Il farmaco per poter penetrare nel SNC deve avere delle caratteristiche ben precise che dipendono da:

- Grado di legame con le proteine plasmatiche, che impedisce il passaggio a livello del SNC.
- Grado di ionizzazione, dato che i farmaci ionizzati non penetrano a livello del SNC.
- Coefficiente di ripartizione lipidi/acqua (dà l'idea di una maggiore o minore liposolubilità o idrosolubilità). Farmaci con un coefficiente di ripartizione elevato, ossia liposolubili, penetrano facilmente nel SNC.

Anche farmaci con basso coefficiente di ripartizione possono penetrare nel SNC ma mentre nel primo caso il passaggio avviene per semplice diffusione passiva, nel secondo caso avviene mediante trasporto mediato da carrier. Ci sono 6 classi di carriers: carrier degli esosi (glucosio, galattosio, mannosio), degli acidi monocarbossilici, degli amminoacidi (neutri, a catena lunga, basici, acidi), delle basi puriniche, dei glicosidi e delle amine. Per evitare l'ingresso massivo di farmaci il carrier si trova in condizione di semisaturazione (è la semisaturazione ad impedire l'ingresso massivo del farmaco). In questo modo la possibilità di raggiungere grandi concentrazioni di farmaco è molto limitata.

Infine, la maggior o minor liposolubilità comporta una diversa velocità di passaggio attraverso i capillari. Questo processo di diffusione passiva semplice avviene per l'esistenza di un gradiente di concentrazione tra due compartimenti separati da una membrana. Quanto più velocemente il farmaco passa attraverso la membrana, tanto più velocemente verrà raggiunto l'equilibrio, prima del decadimento della concentrazione plasmatica. Una sostanza molto liposolubile raggiunge l'equilibrio in tempi molto rapidi, quando la concentrazione plasmatica è ancora alta; una sostanza che ha più difficoltà ad attraversare la membrana, invece, raggiunge l'equilibrio quando la concentrazione plasmatica già decade, con conseguente concentrazione ridotta nel tessuto.



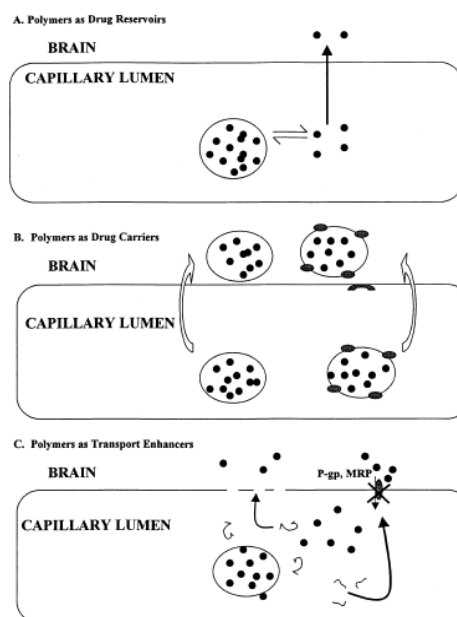
**Figura 2:** sistemi di trasporto attraverso la barriera emato-encefalica

Molte sono le strategie che sono state sviluppate per promuovere il rilascio di farmaci a livello cerebrale:

- Conversione di farmaci idrosolubili, che non possono attraversare la BEE, in farmaci lipofili [14]. Alternativamente carrier lipidici possono essere collegati a farmaci idrofili. La concentrazione di farmaci raggiungibile a livello cerebrale è direttamente correlata al loro coefficiente di permeabilità e alla loro concentrazione plasmatica. Questa metodica può portare ad un aumento del coefficiente di permeabilità del farmaco, ma può anche ridurre l'AUC.

- Infusioni o iniezioni intracerebrali [15]: questa strategia risulta essere piuttosto invasiva, in quanto può determinare un danneggiamento del tessuto cerebrale e provocare infezione.
- Utilizzo della via olfattiva per molecole piccole e liposolubili [16].
- Modulazione della barriera emato-encefalica [17]. Questa strategia consiste nel modulare le tight junctions aprendo così la via paracellulare di accesso al cervello. Questo può essere ottenuto per via osmotica, o utilizzando ultrasuoni o radiazioni elettromagnetiche. Il rischio di questa tecnica è che anche virus, neurotrasmettitori eccitatori o altri potenziali agenti dannosi, potrebbero passare dal sangue al cervello.
- Rilascio attraverso trasportatori endogeni: conoscendo la stereochimica di questi sistemi di trasporto, è possibile disegnare farmaci come pseudosubstrati per promuoverne l'uptake nel cervello [18].
- Sviluppo di inibitori specifici delle pompe di efflusso. A lungo andare l'utilizzo di questa strategia può portare ad un facilitato passaggio di sostanze tossiche nel cervello [2].
- Utilizzo di vettori peptidici (CPP = cell penetrating peptide vectors) [19-20]: in questi sistemi domini idrofobici si alternano a domini carichi positivamente, costituiti da sequenze di amminoacidi quali arginina e lisina. Non è ancora molto chiaro il meccanismo con cui questi sistemi attraversano le membrane, ma è escluso che si tratti di un meccanismo mediato da recettori, per cui è aspecifico.
- Utilizzo di nanoparticelle come liposomi o micelle [21]: Questi sistemi possono essere usati come reservoir di farmaci, per incrementarne la diffusione passiva attraverso la BEE, come drug-carrier e come agenti modificatori del trasporto (per esempio inibendo le pompe di efflusso). In figura 3 sono riassunte le possibili strategie per promuovere il rilascio di farmaci a livello cerebrale, utilizzando formulazioni a base polimerica. La superficie di questi sistemi può essere opportunamente modificata in modo tale da ottenere un targeting attivo [22].

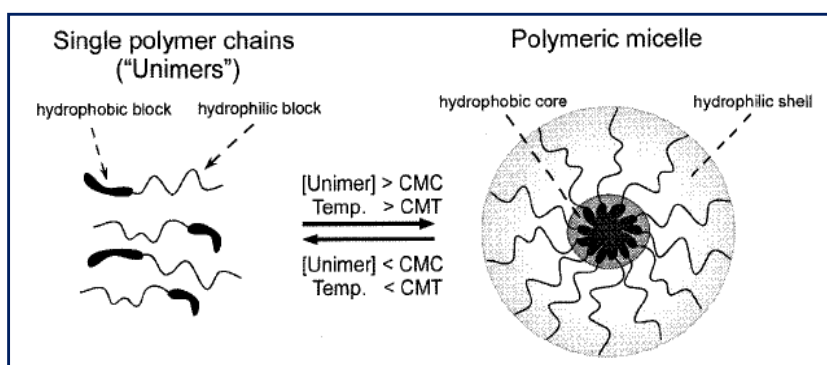
**Figura 3:** Possibili strategie per promuovere il rilascio di farmaci a livello cerebrale utilizzando formulazioni a base polimerica





## Micelle

Le micelle sono delle dispersioni colloidali di dimensioni generalmente inferiori a 100 nm, costituite da polimeri anfifili, nel nostro caso da GCPQ. A basse concentrazioni queste molecole esistono separatamente come unimeri; quando la loro concentrazione in soluzione acquosa supera la CMC (concentrazione micellare critica), esse iniziano ad aggregarsi spontaneamente in micelle (metodo della dissoluzione) [23], cioè in sistemi in cui le porzioni idrofile sono rivolte verso il mezzo acquoso, mentre le porzioni lipofile vanno a formare il core della micella.



**Figura 4:** Schema che illustra la formazione di una micella

Polimeri anfifili, con scarsa solubilità in acqua, possono essere alternativamente disciolti in un solvente organico volatile, dializzato poi contro un tampone acquoso (metodo della dialisi) [24].

Nei sistemi acquosi le molecole non polari si dispongono all'interno della micella, nel core, le molecole polari sono adsorbite sulla superficie e le sostanze con polarità intermedia si dispongono tra le catene delle molecole di surfactante.

Le micelle utilizzate per il rilascio di farmaci devono essere costituite da polimeri biodegradabili [25-26] e di peso molecolare inferiore a 40 KDa, in modo che possano essere eliminate per via renale, evitando così fenomeni di accumulo, che potrebbero causarne tossicità [27].

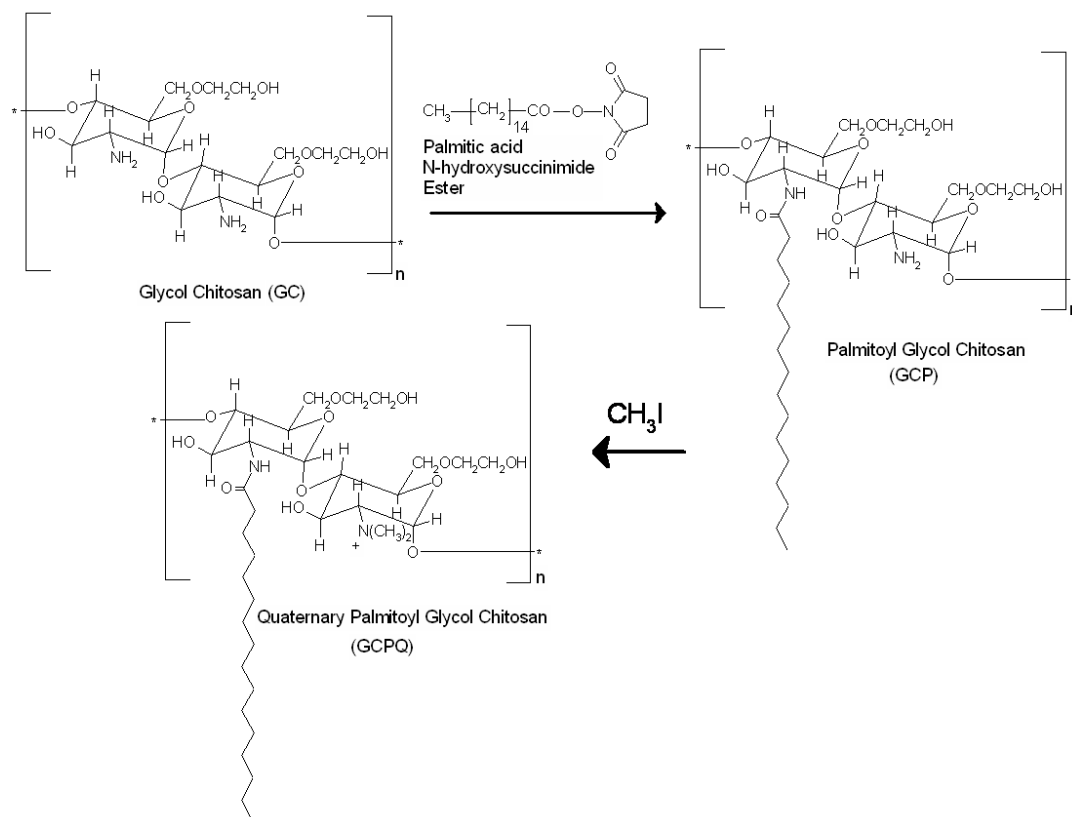
La formazione delle micelle è un processo termodinamico e quindi reversibile. E' fondamentale che le micelle rimangano stabili dopo somministrazione intravenosa e conseguentemente in condizioni di estrema diluizione [28]. La stabilità termodinamica delle micelle è inversamente proporzionale alla CMC. Un aumento della lunghezza della porzione idrofobica, diminuisce significativamente la CMC dell'unimero e quindi aumenta la stabilità termodinamica delle micelle polimeriche; al contrario, un aumento della porzione idrofila aumenta la CMC e quindi diminuisce la stabilità delle micelle [24].

**4.2 Materiali e Metodi****4.2.1 Materiali**

<b>Prodotto</b>	<b>Ditta Produttrice</b>
acido acetico	VWR international
acetonitrile HPLC grade	Fischer Scientific
acido cloridrico	VWR International
acido palmitico N-idrossisuccinimide 98.00%	Sigma
acqua deionizzata	Millipore Elix –Progaard 2
acqua deuterata %D 99.9 %	Aldricho Goss Scientific Instruments Ltd.
dietiletere 99.5%	BDH or Fischer Scientific
doxorubicina cloridrato 2mg/ml	Ebewe
etanolo assoluto 99%	School of Pharmacy, University of London
glicol chitosano $\geq 60\%$	SIGMA
Idrossido di sodio 99.13%	Fischer Scientific
metanolo-d4 99.80%	Cambridge Isotope Laboratories, Inc.
1-metil-2-pirrolidone 99+%	Sigma-Aldrich
metil ioduro	Sigma-Aldrich
sodio bicarbonato 99.5%	Fluka
sodio ioduro 99.5%	Fluka
sodio acetato anidro	Sigma-Aldrich
sodio diidrogenofosfato monoidrato	FLUKA
tubi da dialisi Visking MWCO 3.5 KDa, 12-14 Kda, 7 Kda	Medicell International Ltd., London

## 4.2.2 Metodi

### 4.2.2.1 Sintesi del GCPQ



**Figura 5:** Schema della sintesi del GCPQ

La sintesi del GCPQ è stata realizzata secondo il metodo descritto da Uchegbu e altri, con alcune modifiche [6-7]. Questo consiste di tre fasi (fig 5); nella prima fase viene effettuata una degradazione acida del glicol chitosano (GC) in modo da ridurne il peso molecolare; in questo modo è possibile poi ottenere micelle di dimensioni molto piccole, adatte ad un rilascio cerebrale. Nel secondo step, residui palmitoili (-C16) vengono legati al glicol chitosano degradato, al fine di ottenere un polimero anfifilico, in grado di auto-assemblarsi in soluzione acquosa. Nell'ultima fase della sintesi, per aumentare le caratteristiche di idrofilicità e il profilo di sicurezza (vedi paragrafo 4.1) del palmitoil glicol chitosano (PGC), ne abbiamo convertito le ammine primarie in gruppi ammonici quaternari, attraverso una reazione di metilazione.



#### Degradazione del glicol chitosano

5 g di glicol chitosano sono stati solubilizzati in 380 ml di acido cloridrico 4N e posti in un bagno preriscaldato a 50 °C per 48 ore, sotto agitazione. Il tempo di permanenza nel bagno termostattizzato (tempo di degradazione) è determinante per il peso molecolare del polimero finale [29]; aumentando il tempo di degradazione diminuisce infatti il peso molecolare. Il prodotto ottenuto è stato purificato per dialisi contro acqua deionizzata per 24 ore (con 6 cambi di acqua in totale) e utilizzando tubi con cutoff di 3,5 KDa. Il prodotto dializzato è stato poi liofilizzato; si è ottenuto così un materiale color crema di aspetto cotonoso.

#### Palmitoilazione del glicol chitosano degradato

Glicol chitosano degradato (500 mg) e sodio bicarbonato (376 mg) sono stati disciolti in una miscela di etanolo assoluto (24 ml) e acqua deionizzata (76 ml). Alla soluzione di glicol chitosano è stato aggiunto goccia a goccia acido palmitico N-idrossisuccinimide (NHPA) (792 mg) preventivamente disciolto in etanolo assoluto (150 ml). La miscela è stata tenuta sotto agitazione per 72 ore protetta dalla luce, dopodiché il prodotto è stato isolato per evaporazione dell'etanolo, e successiva estrazione della rimanente fase acquosa (100 ml) con dietilere. Quest'ultima, contenente il polimero, è stata poi dializzata contro acqua deionizzata per 24 ore, utilizzando tubi con cutoff di 12-14 KDa. Il prodotto ottenuto dopo liofilizzazione aveva sempre un aspetto cotonoso ed era di colore bianco.

#### Quaternizzazione del palmitoil glicol chitosano

Il PGC (300 mg) è stato disperso in N-metil-2-pirrolidone (25 ml) e lasciato 1 ora sotto agitazione; successivamente sono stati aggiunti 1 ml di una soluzione etanolica 1 mM di idrossido di sodio, 0,44 ml di metil ioduro e 45 mg ioduro di sodio. La reazione è stata lasciata sotto agitazione per 3 ore a 36 °C, protetta dalla luce e in atmosfera di azoto. Il prodotto quaternarizzato è stato precipitato con dietilere (400 ml), lavato due volte sempre con dietilere ed una volta con etanolo assoluto. Si è ottenuto così un solido marrone che successivamente, disciolto in acqua, ha dato origine ad una soluzione di colore giallo. Tale soluzione, dopo dialisi (tubi con cutoff di 7000 Da), è stata passata attraverso una colonna impaccata con Amberlite IRA-93 Cl-1, in cui precedentemente era stata fatta scorrere una soluzione di acido cloridrico 1 M (120 ml), seguita poi da acqua deionizzata (10 L) fino a raggiungimento di pH neutro. L'eluato dalla colonna è stato raccolto e, dopo liofilizzazione, è stato ottenuto come prodotto un solido fibroso.

La resa della reazione che da glicol chitosano ha portato a palmitoil glicol chitosano quaternarizzato è stata del 57,4%.

### **4.2.2.2 Caratterizzazione del GCPQ**

#### Cromatografia di esclusione e MALLS (multi-angle laser light scattering)

I pesi molecolari del GC degradato e del GCPQ sono stati determinati con uno strumento GPC-MALLS, dotato di una pompa HPLC Waters 515, di un light scattering multi angolo DAWN<sup>®</sup> EOS<sup>™</sup> MALLS ( $\lambda=690$  nm), di un rifrattometro-interferometro Optilab DSP e di un rivelatore QELS (Wyatt Technology Corporation, USA). I campioni sono stati fatti correre utilizzando, come fase mobile, un tampone acetato (CH<sub>3</sub>COONa 0,3M / CH<sub>3</sub>COOH 0,2 M) nel caso del GC degradato o una miscela tampone acetato /metanolo 35:65 per il GCPQ; i polimeri sono stati disciolti nella fase mobile (5 mg/ml), filtrati con filtri 0.2  $\mu$ m e iniettati in una pre-colonna POLYSEP TM-GFC-P (35x7.8 mm, Phenomenex, UK) collegata ad una colonna POLYSEP TM-GFC-P 4000 (300x7.8 mm, Phenomenex, UK). Sono state fatte misure in quadruplo a temperature ambiente con un flusso della fase mobile di 1 ml/min per il GC e 0,7 ml/min per il GCPQ. I dati sono stati analizzati utilizzando un software ASTRA . I valori dn/dc del GC degradato e del GCPQ sono stati misurati in triplicato nei rispettivi solventi, sopra riportati, a 40 °C con un Optilab DSP rifrattometro-interferometro ( $\lambda=690$  nm). I campioni filtrati di concentrazione tra 0.1-0.7 mg/ml sono stati iniettati manualmente utilizzando una velocità di flusso di 0.3 ml/min. I dati sono stati poi processati con un software Wyatt DNDC.

#### Spettroscopia <sup>1</sup>H NMR e FTIR

Gli spettri <sup>1</sup>H NMR del GCPQ sono stati ottenuti in metanolo deuterato utilizzando uno spettrometro Bruker AMX 400 MHz .

Per quanto riguarda gli spettri FTIR sono stati effettuati con uno strumento Perkin Elmer Spectrum 100 - Universal Single bounce Diamond ATR. L'analisi è stata eseguita direttamente su polvere senza alcun trattamento del campione.

#### Analisi DSC e diffrazione dei raggi X

Per effettuare l'analisi DSC del GCPQ è stato utilizzato uno strumento Mettler TA4000 dotato di cella DSC 25. Il campione, opportunamente pesato con bilancia analitica Mettler M3 (5 mg), è stato sottoposto ad un aumento programmato della temperatura in un range tra 30 e 350 °C ad una velocità di 10 °C al minuto.

I diffrattogramma del GCPQ è stato ottenuto con un diffrattometro per polveri Philips PW 1130 ad una velocità di scansione di 0,05°/min con  $2\theta$  compreso tra 5° e 35°.

#### **4.2.2.3 Preparazione delle micelle**

Una volta sintetizzato e caratterizzato il polimero, sono state realizzate micelle a base di GCPQ caricate con doxorubicina cloridrato. In questi sistemi è stato scelto un rapporto farmaco-polimero 1:5, in quanto da studi precedentemente condotti dal gruppo di lavoro della Prof. Uchegbu, aveva dato i migliori risultati in termini di efficacia di incapsulazione.

Utilizzando questo rapporto doxorubicina-GCPQ, si riusciva comunque ad ottenere un formulazione con un diametro medio delle particelle molto piccolo e inoltre la soluzione risultante, non era eccessivamente viscosa. Queste proprietà sono importanti quando la via di somministrazione è, come nel nostro caso, endovenosa.

Inizialmente il GCPQ (10 mg) è stato solubilizzato in 2 ml di una soluzione fisiologica; successivamente, la soluzione del polimero, è stata aggiunta ad una quantità esatta (1ml= 2 mg) di doxorubicina HCl preventivamente liofilizzata.

La soluzione ottenuta è stata sonicata per 10 minuti (MSE Sonipreb 150, MSE Instruments, UK) protetta dalla luce e immersa in ghiaccio per evitare che il calore, sviluppato durante il processo di sonicazione, danneggiasse il farmaco.

La soluzione micellare, dopo sonicazione è stata applicata su una colonna Sephadex G 25, al fine di separare il farmaco incapsulato da quello libero, che è più trattenuto dalla colonna e quindi esce successivamente alla doxorubicina cloridrato. Come eluente è stata utilizzata fisiologica.

#### **4.2.2.4 Determinazione dell'efficacia di incapsulazione delle micelle**

L'efficacia di incapsulazione (EE%) è stata calcolata applicando la seguente formula:

$$EE\% = \frac{Qt - Ql}{Qt} * 100$$

dove Qt è la quantità totale di doxorubicina a cui, nella fase iniziale di preparazione delle micelle, era stato addizionato il GCPQ; Ql è la quantità di farmaco libera ovvero non incapsulata nelle micelle, che viene determinata raccogliendo le frazioni in uscita dalla colonna sephadex, successive alla eluizione delle micelle. La concentrazione di farmaco in queste frazioni è stata determinata tramite HPLC.

#### **4.2.2.5 Analisi HPLC della doxorubicina**

La determinazione quantitativa della doxorubicina è stata effettuata con un sistema HPLC munito di una pompa Waters TM 515 HPLC, connessa ad un autocampionatore Waters TM 17 con detector Waters TM 486. E' stata utilizzata una colonna C18 Cromolith Merck 5µm, 100 mm x 4,5 mm mantenuta ad una temperatura di 30 °C con un Jones Chromatography column heater modello 7971. La lunghezza d'onda selezionata era di 254 nm e il flusso 1,2 ml/min. La fase mobile scelta era costituita da acetonitrile: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mM (pH di 4,5). In queste condizioni il limite di quantificazione è stato osservato a 0.1 µg/ml.

#### **4.2.2.6 Determinazione del dimensioni e del potenziale Z delle micelle**

Le dimensioni delle micelle e il loro potenziale Z sono stati determinati tramite PCS (Malvern Zetasizer 3000HS<sub>A</sub>). Le misure sono state effettuate in triplo e prima

dell'inizio di ciascuna analisi i campioni sono stati lasciati a temperatura ambiente per 30 minuti.

#### **4.2.2.7 Analisi morfologica delle micelle**

Le micelle sono state esaminate morfologicamente tramite TEM (Transmission Electron Microscopy) CM 12 Philips con telecamera digitale. Prima di ogni analisi una goccia di ciascun campione è stata posta su una griglia rivestita con Formvar<sup>®</sup>/Carbon.

## 4.3 Risultati e Discussione

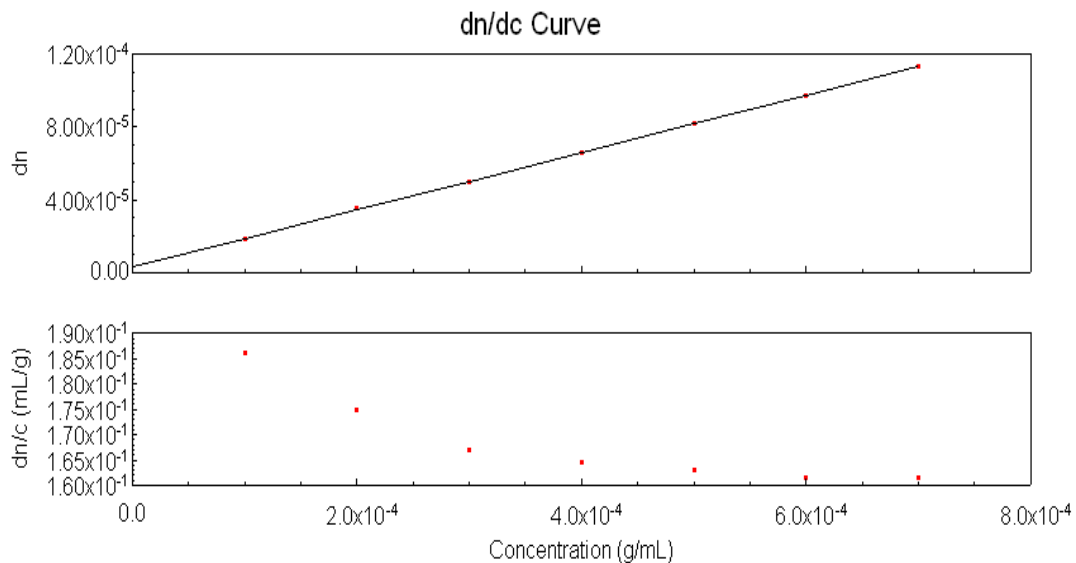
### 4.3.1 Caratterizzazione del GCPQ

#### 4.3.1.1 Cromatografia di esclusione e MALLS (multi-angle laser light scattering)

Questa tecnica è stata utilizzata per determinare il peso molecolare del polimero sintetizzato e la sua distribuzione.

La GPC (gel permeation chromatography) o cromatografia di esclusione è una tecnica che permette di separare i polimeri in base al loro volume idrodinamico, peso molecolare e viscosità. A tale scopo vengono utilizzati materiali come Sephadex, che sospesi in acqua rigonfiano; si formano così al loro interno dei pori di diametro molto regolare. Ponendo a contatto una soluzione contenente molecole di varia grandezza con il gel, si verifica che quelle con raggio idrodinamico molto grande, non possono diffondere attraverso i pori ed eluiscono per prime dalla colonna, mentre le molecole più piccole, diffondono all'interno dei pori e vengono eluite più tardi, in base al loro peso molecolare. Quindi la selettività della tecnica dipende dalle dimensioni dei pori del gel. Collegato alla GPC si trova un MALLS (multi-angle laser light scattering), utilizzato per determinare il peso molecolare dei polimeri eluiti. Le molecole, dopo aver attraversato la colonna, passano attraverso un light scattering detector e successivamente attraverso un detector di concentrazione, che rivela variazioni di indice di rifrazione. In un sistema GPC/MALLS, il segnale proveniente dal light scattering detector, è proporzionale al peso molecolare del polimero eluito moltiplicato la concentrazione; quindi la massa molare può essere calcolata dalla combinazione dei due segnali, uno proveniente dal light scattering e uno dal rivelatore di indice di rifrazione. Il rapporto  $dn/dc$  è un valore fondamentale per la determinazione del peso molecolare del polimero. Esso rappresenta la variazione dell'indice di rifrazione al variare della concentrazione del campione in soluzione. Questo valore viene determinato iniettando nel detector di indice di rifrazione soluzioni del polimero a varia diluizione; il software (ASTRA) provvede poi a calcolare il valore  $dn/dc$ . In figura 6 è riportata a titolo esemplificativo la curva  $dn/dc$  ottenuta per il glicol chitosano degradato.

In tabella 1 sono riportati i valori di peso molecolare medio del GC degradato (partendo da un GC di 66050 Da) e del GCPQ sintetizzato, con i rispettivi valori di polidispersione. Dalla tabella si evince che, avendo il GCPQ un peso molecolare inferiore a 40 KDa, può essere eliminato per via renale, evitando così i fenomeni di accumulo, che si possono avere con polimeri più grossi [27]. L'alto indice di polidispersione può essere attribuito al fatto che le reazioni di palmitoilazione e quaternizzazione avvengono in modo random, cioè alcune catene polimeriche presentano un maggiore grado di derivatizzazione rispetto ad altre. Inoltre la variabilità del peso molecolare può essere attribuita anche alla reazione di degradazione del glicol chitosano con HCl; è infatti dimostrato che all'aumentare del tempo di degradazione aumenta la distribuzione della massa molare [29].



**Figura 6:** Curva dn/dc di GC degradato

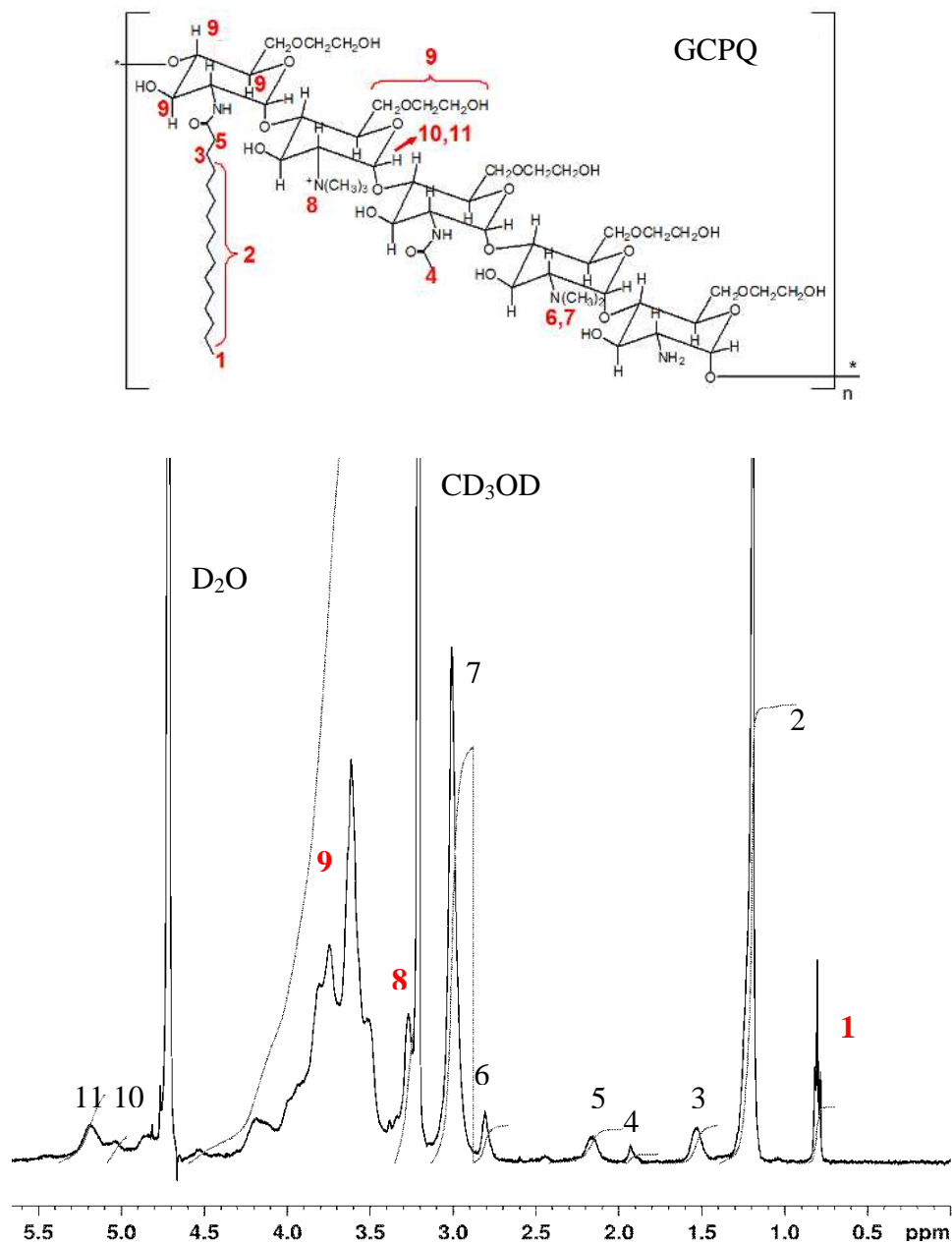
Campione	Peso molecolare medio (Da)	Polidispersione
GC degradato	8974	1,12
GCPQ	11354,2	1,79

**Tabella 1 :** valori di peso molecolare medio e di polidispersione del GC degradato e del GCPQ

#### 4.3.1.2 Spettroscopia $^1\text{H}$ NMR

In figura 7 possiamo osservare lo spettro  $^1\text{H}$  NMR del GCPQ. La presenza di determinati segnali, caratteristici di questo polimero, ne ha confermato la sintesi; di seguito è riportata l'attribuzione dei singoli chemical shift dello spettro:

$\delta$  0.78-0.82 = CH<sub>3</sub> (palmitoilico);  $\delta$  1.19 = CH<sub>2</sub> (palmitoilico);  $\delta$  1.53 = CH<sub>2</sub> (palmitoilico deschermato dal carbonile);  $\delta$  1.93 = CH<sub>3</sub> (acetil glicol chitosano);  $\delta$  2.73-3.13 = CH<sub>3</sub> (dimetilammino);  $\delta$  3.27 = CH<sub>3</sub> (trimetilammino);  $\delta$  3.37-4.60 = (protoni dello zucchero);  $\delta$  3.21 = CD<sub>3</sub>OD; and  $\delta$  4.8 = D<sub>2</sub>O  $\delta$  5.03-5.20= (protoni anomeric).



**Figura 7:** Spettro  $^1\text{H}$  NMR del GCPQ in metanolo- $\text{d}_4$

Grazie alla spettroscopia NMR è stato possibile anche calcolare il grado di palmitoilazione e quaternizzazione del GCPQ confrontando nel primo caso i segnali **1** e **9** e nel secondo caso **8** e **9** e considerando che il segnale **1** rappresenta tre protoni mentre i segnali **8** e **9** entrambi 9 protoni. Applicando le formule sotto riportate abbiamo trovato, per il GCPQ sintetizzato, un grado di palmitoilazione e quaternizzazione rispettivamente del 21,6% e del 6,4 %.

$$\% \text{ palmitoilazione} = \frac{\delta_{1/3}}{\delta_{9/9}} * 100$$

$$\% \text{ quaternizzazione} = \frac{\delta_{8/3}}{\delta_{9/9}} * 100$$

#### 4.3.1.3 Spettroscopia Infrarossa in Trasformata di Fourier (FTIR)

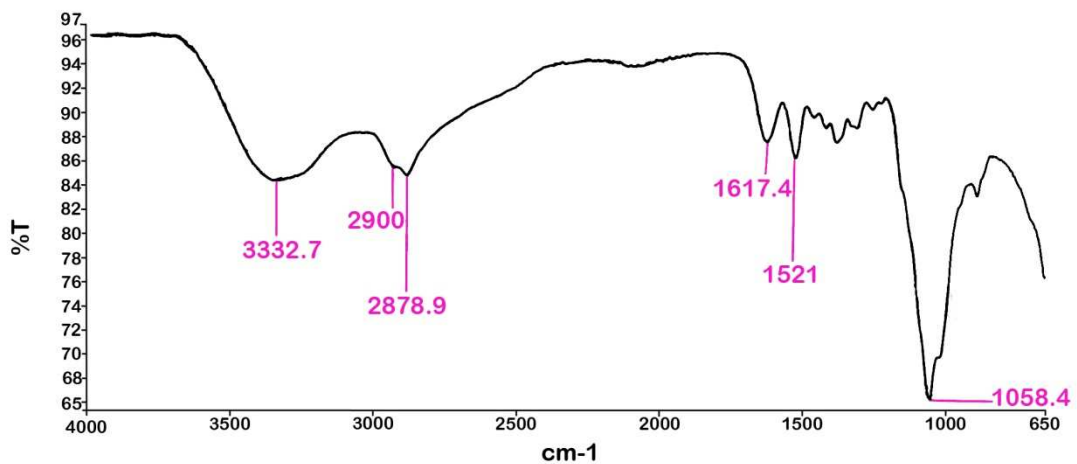


Figura 8: Spettro FTIR del GC degradato

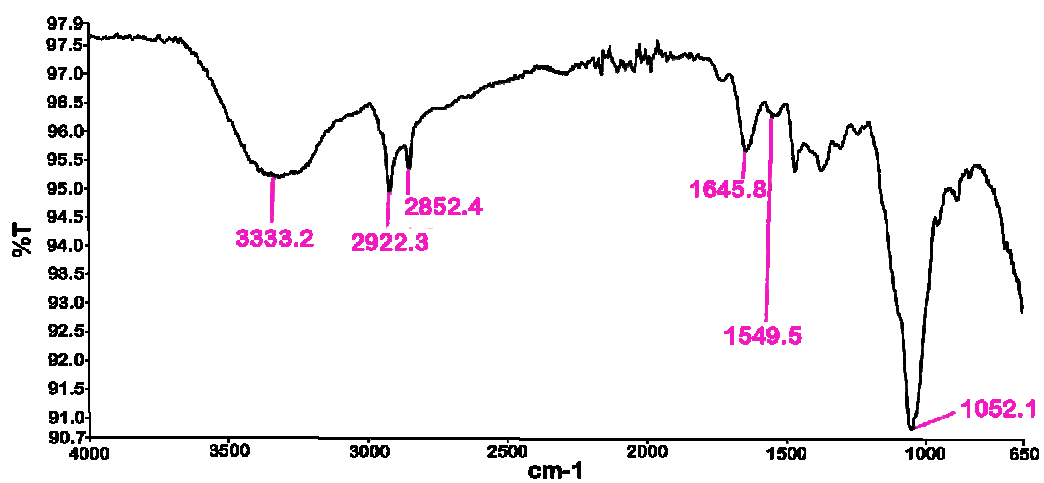


Figura 9: Spettro FTIR del GCPQ



Nelle figure 8 e 9 sono riportati gli spettri FTIR del GC degradato e del GCPQ. La spettroscopia FTIR è stata utilizzata come tecnica di supporto alla spettroscopia NMR per confermare l'avvenuta sintesi del polimero.

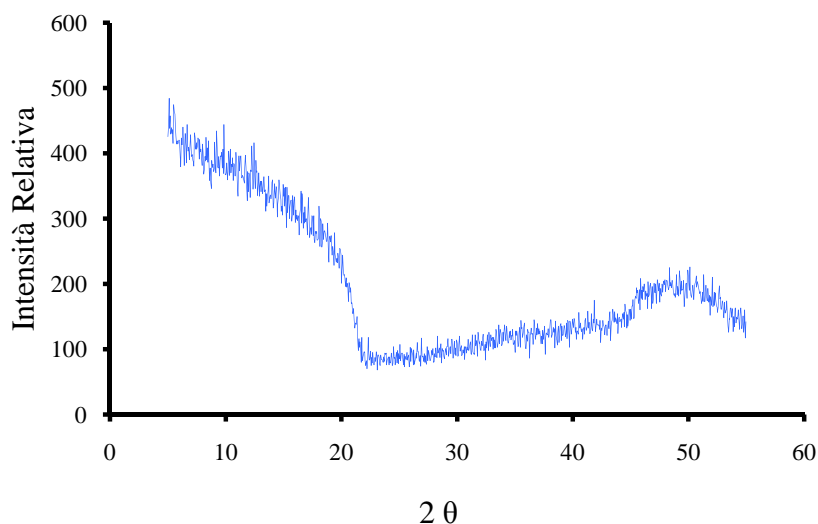
A  $3332\text{ cm}^{-1}$  possiamo osservare una larga banda, attribuibile agli stretching NH e OH sovrapposti, che rimane invariata nei due spettri.

Confrontando gli spettri del GC e del GCPQ si può notare che in quest'ultimo si è avuto un aumento di intensità dei picchi relativi allo stretching CH di catene alchiliche sature ( $2922$  e  $2852\text{ cm}^{-1}$ ). Questo conferma l'avvenuto legame del residuo palmitoico al glicol chitosano.

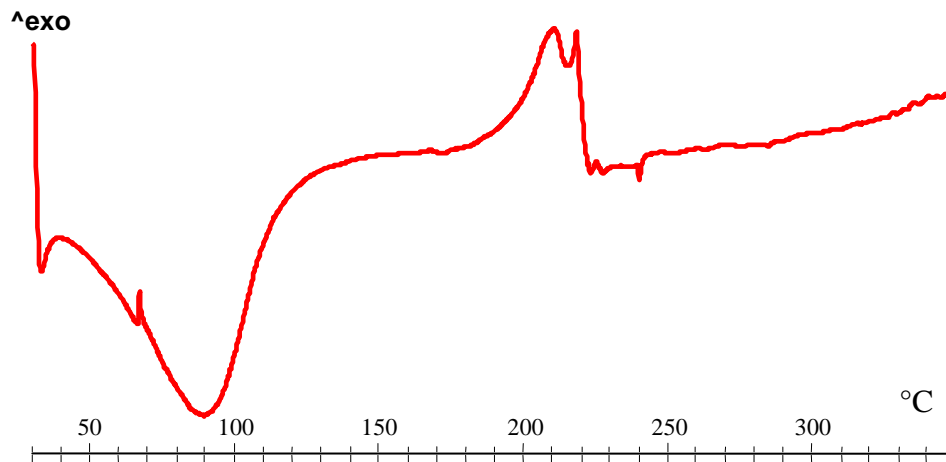
Inoltre, nello spettro del GC, il picco di stretching CO ammidico non cade a numeri d'onda canonici ma a valori più bassi ( $1617\text{ cm}^{-1}$ ), indicando formazione di legami a idrogeno inter ed intramolecolari; nel GCPQ invece questo stesso picco si ritrova a numeri d'onda maggiori ( $1645\text{ cm}^{-1}$ ); da ciò si evince che la presenza della catena palmitoica sul GC determina ingombro sterico, che impedisce la formazione dei legami a idrogeno.

Infine la larga banda tra  $1100$  e  $900\text{ cm}^{-1}$ , caratteristica della struttura zuccherina, appare immodificata in entrambi i polimeri, indicando che il legame della catena palmitoica al GC non ne provoca cambiamenti nella struttura originaria.

#### 4.3.1.4 Analisi DSC e diffrazione dei raggi X del GCPQ



**Figura 10:** Diffrattogramma del GCPQ



**Figura 11:** Curva DSC del GCPQ

In figura 10 e 11 sono riportati rispettivamente il diffrattogramma e la curva termica del GCPQ. Entrambe le analisi hanno messo in evidenza la natura amorfa del polimero. Infatti, nello spettro di diffrazione, si osservano poche bande molto slargate e poco intense.

Anche la curva termica ha un profilo tipico di un prodotto amorfo idrato, in cui si può osservare un primo picco di disidratazione seguito, a temperature più alte, oltre i 200 °C, da una endoterma attribuibile a fenomeni di degradazione.

#### 4.3.2 Caratterizzazione delle micelle a base di GCPQ caricate con doxorubicina: Determinazione dell'EE%, delle diametro medio e del potenziale Z.

EE%	Diametro medio nm	Indice di polidispersione	Potenziale Z mV
35,3 ±0,9	79,9±1,38	0.33±0,032	20±1,11

**Tabella 2:** Diametro medio, indice di polidispersione e potenziale Z di micelle a base di GCPQ caricate con doxorubicina cloridrato

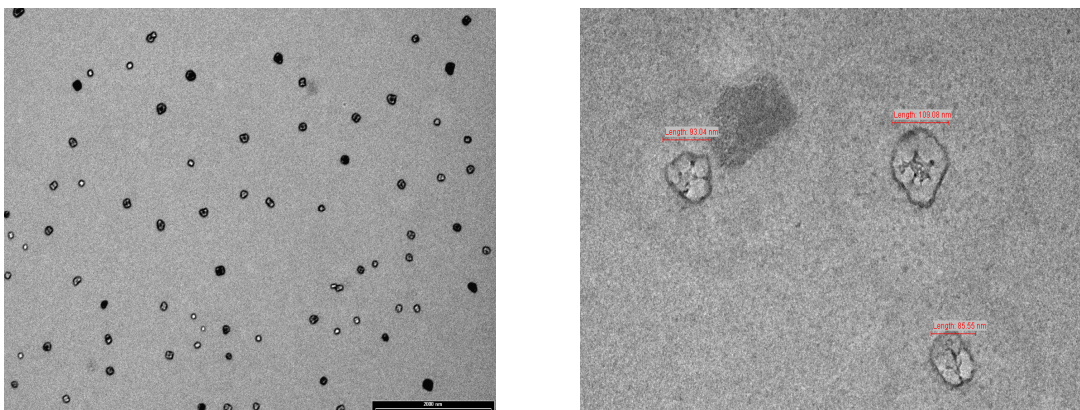
Come possiamo vedere in tabella 2 le nanoparticelle prodotte sono di dimensioni colloidali, inferiori a 100 nm. Questo ha chiaramente delle conseguenze importanti sulla loro distribuzione in vivo; infatti piccole dimensioni significa maggiore uptake intracellulare e più ampio range di targets biologici, grazie anche alla loro maggiore mobilità; per esempio è riportato che nanoparticelle di dimensioni ridotte possono attraversare la BEE aprendo le tight junctions [30] e quindi potrebbero essere ottime

candidate per il trattamento di tumori cerebrali. Come possiamo osservare in tabella 9 l'indice di polidispersione è relativamente alto e questo può essere dovuto, come già detto (4.3.1.1) al fatto che non tutte le catene polimeriche presentano lo stesso grado di derivatizzazione.

Per quanto riguarda il potenziale Z è una caratteristica di superficie molto importante delle nanoparticelle che è influenzata sia dalla loro composizione che dal mezzo in cui sono disperse. Nanoparticelle con potenziale Z superiore a (+/-) 30 mV presentano una sufficiente carica superficiale che le rende stabili, non soggette a fenomeni di aggregazione nel tempo. Le micelle a base di GCPQ hanno esibito una carica superficiale positiva, che è sicuramente vantaggiosa in vista di una loro applicazione per promuovere il rilascio cerebrale di doxorubicina [12]. Tuttavia questa carica è inferiore a 30 mV e quindi si potrebbero avere nel tempo fenomeni di instabilità. Studi di particle size effettuati, e a distanza di due mesi dalla preparazione delle micelle, non hanno evidenziato variazione nelle loro dimensioni e quindi abbiamo al momento escluso fenomeni di aggregazione.

In tabella 2 è riportata anche l'efficacia di incapsulazione della doxorubicina in micelle di GCPQ. Come possiamo vedere questo valore è relativamente basso; la causa può essere ricercata nella sua idrofilicità. Molti autori hanno infatti cercato di superare questo problema, coniugando la doxorubicina con polimeri idrofobi [26] o convertendola nella corrispondente base.

### 4.3.3 Caratterizzazione morfologica delle micelle di GCPQ caricate con teofillina



**Figura 12** : Immagini TEM di micelle a base di GCPQ caricate con doxorubicina cloridrato

Come possiamo vedere in figura 12 le immagini TEM delle micelle hanno rivelato una forma sferica omogenea, senza fenomeni di aggregazione. E' chiaramente identificabile la tipica struttura core-shell in cui abbiamo un nucleo interno costituito dalla porzione idrofobica del polimero e una corona esterna costituita dalla porzione idrofilica. Questa interagisce fortemente con l'ambiente acquoso circostante e assume un aspetto definito "brush" [31] che limita stericamente i fenomeni di opsonizzazione da parte dei

componenti del sangue, portando così ad una maggiore resistenza alla fagocitosi. Questo ha come conseguenza un prolungamento del periodo di permanenza in circolo.

#### 4.4 Conclusioni

- Negli ultimi anni il chitosano ha riscosso molta attenzione per le sue proprietà enhancer, mucoadesive e di biodegradabilità. Il glicol chitosano rispetto al chitosano presenta una maggiore solubilità a pH neutro e basico, che ne evita la precipitazione a pH fisiologico. La palmitoilazione permette di ottenere un polimero capace di auto-assemblarsi in soluzione acquosa, mentre la quaternizzazione ne incrementa ulteriormente la solubilità.
- In questo lavoro è stato sintetizzato il GCPQ, secondo un metodo messo a punto dal gruppo di ricerca diretto dalla Prof. Uchegbu, presso la School of Pharmacy di Londra, in cui ho svolto 4 mesi della mia ricerca di dottorato.
- L'avvenuta sintesi del polimero, con resa pari al 57,4 %, è stata confermata tramite spettroscopia NMR e FTIR, mentre studi di diffrazione dei raggi X e studi calorimetrici hanno messo in luce la natura amorfa del GCPQ.
- Sempre tramite spettroscopia NMR è stato possibile calcolare il grado di palmitoilazione e quaternizzazione che sono risultati essere rispettivamente 21,6% e 6,4%. Cambiando opportunamente le condizioni di reazione è possibile modificare il grado di derivatizzazione del GCPQ e quindi ottenere un polimero di adeguate proprietà, in base all'applicazione a cui è destinato.
- Il peso molecolare del polimero, determinato tramite GPC-MALLS è risultato essere 11354. Essendo questo valore inferiore a 40 KDa, il GCPQ non dovrebbe causare problemi di tossicità dovuti ad accumulo.
- L'indice di dispersione relativamente alto del peso molecolare può essere attribuito sia ad un diverso grado di derivatizzazione delle catene polimeriche, sia alla reazione di degradazione del glicol chitosano in HCl.
- Utilizzando il polimero sintetizzato sono state preparate micelle cariche di doxorubicina al fine di favorirne il rilascio a livello cerebrale. Questo farmaco infatti è potenzialmente molto efficace per la cura di tumori cerebrali, se iniettato intra-cerebro-ventricolare ma non è capace di attraversare la BBE.
- Le micelle sono state preparate con una metodica estremamente semplice e rapida, sonicando per 10 minuti una soluzione acquosa contenente il farmaco e il polimero in rapporto 1:5 (p/p).
- L'avvenuta formazione delle micelle è stata confermata tramite TEM e PCS.
- Le dimensioni delle micelle sono risultate inferiori a 100 nm, quindi potrebbero essere delle buone candidate per il rilascio a livello cerebrale.
- La determinazione del potenziale Z delle micelle ha messo in evidenza la presenza di cariche positive superficiali e questa è una proprietà favorevole per il targeting cerebrale.
- Nonostante che i valori di potenziale Z registrati siano risultati inferiori a (+/-) 30 mV non sono stati evidenziati al momento fenomeni di aggregazione delle micelle; gli studi di stabilità sono però ancora in corso.
- Il valore di efficacia di incapsulazione della doxorubicina è risultato essere relativamente basso; ne abbiamo attribuito la causa alle caratteristiche di

idrofilicità del farmaco. Stiamo valutando quindi la possibilità di caricare le micelle di GCPQ con la rispettiva base. A tale proposito abbiamo già messo a punto un metodo di estrazione della doxorubicina base dalla doxorubicina cloridrato commerciale.

- Nell'ambito di una nostra collaborazione con il Dipartimento di Farmacologia dell'Università di Firenze e con l'ospedale pediatrico Meyer, le formulazioni realizzate verranno testate in vivo su ratti, al fine di verificare se effettivamente, l'utilizzo di micelle, ha portato ad un incremento significativo della quantità di farmaco rilasciata a livello cerebrale. Qualora gli esiti fossero negativi, valuteremo la possibilità, vista la grande versatilità offerta dal GCPQ, di funzionalizzare adeguatamente il polimero al fine di ottenere un brain targeting attivo.

## 4.5 Bibliografia

- [1] W.M. Pardridge, *Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2001
- [2] D. J. Begley, Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and possibilities, *Pharmacology & Therapeutics*, 104 (2004) 29-45
- [3] H.F. Amir, P. Wipf, Nanoparticles in cellular drug delivery, *Bioorg. Med. Chem.*, 17 (2009) 2950-2962
- [4] R. Gref, Y. Minamitake, M.T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, R. Langer Biodegradable long-circulating polymeric Nanospheres, *Science* 263 (1994) 1600-1603
- [5] J.J Lucienne, The targeted delivery of cancer drugs across the blood-brain barrier: chemical modifications of drugs or drug-nanoparticles? *Drug Discov.Today*, 13 (2008) 23-24
- [6] I F. Uchegbu, L. Sadiq, M. Arastoo, A. I. Gray, W.Wang, R.D. Waigh, A.G. Schätzlein, Quaternary ammonium palmitoyl glycol chitosan—a new polysoap for drug delivery, *Int. J. Pharm.*, 224 (2001) 185-199
- [7] X. Qu, V.V. Khutoryanskiy, A. Stewart, S. Raman, B. Papahadjopoulos- Sternberg, C. Dufes, D. McCarthy, C.G.Wilson, R. Lyons, K.C.Carter, I F. Uchegbu, A.G. Schätzlein, Carbohydrate-based micelle clusters which enhance hydrophobic drug bioavailability by up to 1 order of magnitude, *Biomacromolecules*, 7 (2006) 3452-3459
- [8] O. Toshimasa, I. Tamai, K. Sakanaka, A. Sakata, T. Yamashima, J. Yamashita, A. Tsuji, In vivo and in vitro evidence for ATP-dependency of P-glycoprotein-mediated efflux of doxorubicin at the blood-brain barrier, *Biochem. Pharmacol.*, 49 (1995) 1541-1544
- [9] N. D'Alessandro, L. Dusonchet, L. Rausa, M. Crescimanno, L. Crosta, Does catalase play a role in adriamycin induced cardiotoxicity? *Pharmacol. Res. Commun.*, 12 (1980) 441-446
- [10] R.D.Olson, P.S. Mushlin, Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses, *Faseb J.*, 4 (1990) 3076-3086
- [11] S. Hirano, H. Seino, Biocompatibility of chitosan by oral and intravenous administration, *Polym. Eng. Sci.* 59 (1989) 897-901.
- [12] E.S. Gil, J. Li, H. Xiao, T.L. Lowe, Quaternary ammonium betacyclodextrin nanoparticles for enhancing doxorubicin permeability across the in vitro blood-brain barrier, *Biomacromolecules*, 10 (2009) 505-516
- [13] J.H. Lee, Quaternized polyamidoamine dendrimers as novel gene delivery system: relationship between degree of quaternization and their influences, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 24 (2003) 1637-1640

- [14] A.G de Boer, I.C.J. van der Sandt, P.L Gaillard, The role of drug transporters at the blood–brain barrier, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 43 (2003) 629-656.
- [15] C.E. Krewson M.L. Saltzmann, Distribution of nerve growth factor following direct delivery into brain interstitium, *Brain. Res.*, 680 (1995) 196-206
- [16] T. Sakane, M. Akizuki, S. Yamashita, T. Nadai, M. Hashida, H. Sezaki, The transport of a drug to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity: the relation to the lipophilicity of the drug, *Chem. Pharm. Bull.*, 39 (1991) 1458-2456
- [17] E.A. Neuwelt, D.L. Goldman, S.A. Dahlborg, J. Crosen, F. Ramsey, S. Roman Goldstein, R. Brazoel, B. Dana, Primary CNS lymphoma treated with osmotic blood-brain barrier disruption: prolonged survival and preservation of cognitive function, *J. Clin. Oncol.*, 9 (1991) 1580-1590.
- [18] M. Chishty, D. G. Begley, N. J. Abbott, A. Reichel ,Interaction of nucleoside analogues with nucleoside transporters in rat brain endothelial cells, *J. Drug. Targ.*, 12 (2004) 265-272
- [19] C. Rousselle, P. Clair, J. Lefauconnier, M. Kaczorek, J.M. Schermann J.M. Tamsamani New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy, *Mol. Pharmacol.*, 57 (2000) 679-686
- [20] A.E. Gulyaev, S.E. Gelperina, I.N. Skidan, A.S. Antropov, Y. Kivman, J. Kreuter, Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80 coated nanoparticles, *Pharm. Res.*, 16 (1999) 1564-1569
- [21] D. W. Miller, A.V. Kabanov Potential applications of polymers in the delivery of drugs to the central nervous system, *Colloids Surf.*, B 16 (1999) 321-330
- [22] I. Sauer, H. Nikolenko, S. Keller, K.A. Ajaj, M. Bienert, M. Dathe, Dipalmitoylation of a cellular uptake-mediating apolipoprotein E-derived peptide as a promising modification for stable anchorage in liposomal drug carriers, *Biochimica et iophysica Acta* 1758 (2006) 552-561
- [23] A.V. Kabanov, I.R. Nazarova, I.V. Astafieva, E.V. Batrakova, V.Y. Alakhov, A.A. Yaroslavov, V.A. Kabanov , Micelle formation and solubilization of fluorescent probes in poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) solutions. *Macromolecules* 28 (1995) 2303-2314.
- [24] Allen C, Maysinger D and Eisenberg A (1999) Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Coll Surf B: Biointerf* 16 (1999) 3-27.
- [25] B. Jeong, Y.H. Bae S.W. Kim, Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers, *Control Rel* 63 (2000) 155-163.
- [26] H.S. Yoo , T.G Park , Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer, *Control Rel.*, 70 (2001) 63-70.



- [27] R. Duncan J. Kopecek, Soluble synthetic polymers as potential drug carriers, *AdvPolym Sci.*, 57 (1984) 51-101.
- [28] A.V. Kabanov, V.Y. Alakhov, Micelles of amphiphilic block copolymers as vehicles for drug delivery, in, Alexandridis P and Lindman B (eds.) *Amphiphilic Block Copolymers: Self-Assembly and Applications*: Elsevier: Amsterdam, Lausanne, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo, (2000) 347-376.
- [29] W.Wang, A.M. McConaghy, L. Tetley, I.F. Uchegbu, Controls on polymer molecular weight may be used to control the size of palmitoyl glycol chitosan polymeric vesicles, *Langmuir* 17 (2001) 631-636
- [30] R.A. Kroll, M.A. Pagel, L.L. Muldoon, S. Roman-Goldstein, S.A. Fiamengo, E.A. Neuwelt, Improving drug delivery to intracerebral tumor and surrounding brain in a rodent model: a comparison of osmotic versus bradykinin modification of the blood-brain and/or blood-tumor barriers. *Neurosurgery* 43 (1998) 879-886
- [31] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, J.P. Benoit, Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems, *Biomaterials.*, 27 (2006) 4356-4373

*Allegati*

---

*Articoli Pubblicati*

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ejps](http://www.elsevier.com/locate/ejps)

## Response surface methodology in the optimization of chitosan–Ca pectinate bead formulations

N. Mennini, S. Furlanetto, F. Maestrelli, S. Pinzauti, P. Mura\*

Department of Pharmaceutical Sciences, University of Florence, via Schiff, 50149 Sesto Fiorentino, Italy

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 May 2008

Received in revised form

18 July 2008

Accepted 31 July 2008

Published on line 20 August 2008

#### Keywords:

Experimental design

Doehlert design

D-optimal design

Microsphere encapsulation efficiency

Calcium pectinate

Chitosan

Prednisone

Theophylline

### ABSTRACT

This study describes the application of a multi-varied experimental design methodology to the optimization of a bead formulation based on a mixed network of Ca pectinate and chitosan. The effect of varying the relative percent of the three components used for the bead production, i.e. pectin, chitosan and CaCl<sub>2</sub>, has been systematically investigated with the aim of identifying their best levels to optimize drug encapsulation efficiency (considered as the experimental response to be maximized), as well as to highlight possible interactions among the components. The study was applied to two different drugs, i.e. prednisone and theophylline, selected, respectively, as model insoluble and relatively soluble drugs, in order to evaluate the influence of this parameter as well. Different bead batches were prepared according to Doehlert and D-optimal design and randomly evaluated for drug encapsulation efficiency. Analysis of response surface plots allowed identification of the best combination of the three bead components in order to maximize drug encapsulation efficiency. The most effective compositions were chitosan 3% (w/v), pectin 9% (w/v), CaCl<sub>2</sub> 4% (w/v) for the theophylline-loaded beads and chitosan 0.75% (w/v), pectin 6% (w/v), CaCl<sub>2</sub> 7.9% (w/v) for the prednisone-loaded ones. The good correspondence between calculated and experimental values indicated in both cases the validity of the generated statistical models for the prediction of microsphere encapsulation efficiency. The different results obtained for the two drugs indicated the importance of the greater or lesser drug lipophilicity in determining the optimal bead composition with the highest encapsulation efficiency.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

In recent years the development of colon-targeted drug delivery systems has gained increased importance not only for a better treatment of local pathologies, but also for the systemic therapy of both conventional and labile molecules, as well as a means of achieving chronotherapy for diseases sensitive to circadian rhythms, such as nocturnal asthma, angina and arthritis (Ashford and Fell, 1994; Yang et al., 2002). In fact this intestinal region presents distinct advantages with respect to the stomach and small intestine such as a some-

what less hostile environment (due to a near neutral pH and a reduced enzymatic activity), a longer residence time, and a greater responsiveness to drug absorption enhancers (Chourasi and Jam, 2003). Thus, colon-specific delivery could allow improvement of drug oral bioavailability, reduction of the total administered dose and a decrease of side effects (Yeh et al., 1995). Of the various strategies developed to achieve site-specific targeting of drugs to the colon (Yang et al., 2002; Chourasi and Jam, 2003; Ashford et al., 1993), the use of carriers that are degraded specifically by colonic bacteria seems, at present, the most promising one regarding

\* Corresponding author. Tel.: +39 055 4573672; fax: +39 055 4573673.

E-mail address: [paola.mura@unifi.it](mailto:paola.mura@unifi.it) (P. Mura).

0928-0987/\$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.ejps.2008.07.011



## Influence of the preparation method on the physical–chemical properties of ketoprofen–cyclodextrin–phosphatidylcholine ternary systems

Marzia Cirri, Francesca Maestrelli, Natascia Mennini, Paola Mura\*

Department of Pharmaceutical Sciences, University of Florence, via Schiff 6 Sesto Fiorentino 50019, Florence, Italy

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 July 2008  
Received in revised form 1 November 2008  
Accepted 5 November 2008  
Available online 13 November 2008

#### Keywords:

Ketoprofen–cyclodextrin–phosphatidylcholine ternary systems  
Microwave irradiation  
DSC  
X-ray powder diffractometry  
Stability studies

### ABSTRACT

The aim of this work was to assess the effectiveness and actual advantages of the microwave (MW) technology for preparing ternary complexes of ketoprofen (Keto) with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -Cd) or methylated- $\beta$ -cyclodextrin (Me $\beta$ -Cd) and phosphatidylcholine (EPC3) with respect to conventional preparation methods, such as co-grinding and sealed-heating. The products obtained with the different techniques were characterized by differential scanning calorimetry (DSC), X-ray powder diffractometry, FT-IR spectroscopy and dissolution studies. For each method, the influence of different experimental conditions on the physical–chemical properties of the final products has been also investigated. DSC analysis was used to monitor physical stability of ternary complexes during 2 years storage under ambient conditions. MW irradiation resulted to be a rapid and very convenient preparation technique. In fact, it was more effective than the considered conventional methods, enabling obtainment in shorter times of products with better performance. In particular, the Keto–Me $\beta$ -Cd–EPC3 product prepared by MW treatment at 750 W for 10 min allowed achievement of about 80% of drug dissolution after 60 min, in comparison with the 50% and 63% values obtained for the corresponding products prepared by 30-min co-grinding or 60-min sealed-heating. Moreover, such ternary products were more effective in improving drug dissolution than the corresponding Keto–Me $\beta$ -Cd systems. Furthermore, the MW treatment at such irradiation energy enabled obtainment of totally dehydrated samples, which maintained unchanged solid-state characteristics and showed no susceptibility to ambient humidity after 2 years storage at ambient temperature. Therefore, MW-treated Keto–Me $\beta$ -Cd–EPC3 systems can be successfully used for formulation of tablets with enhanced drug dissolution behaviour.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Ketoprofen is a potent non-steroidal anti-inflammatory drug belonging to Class II of Biopharmaceutics Classification System (BCS), whose poor water-solubility can cause formulation problems and limit its therapeutic applications and bioavailability. Cyclodextrin complexation has been successfully employed in improving the solubility and dissolution properties of ketoprofen [1] and a clear influence of the complex preparation methods on the drug dissolution behaviour has been demonstrated [2]. Moreover, previous studies pointed out that the presence of suitable auxiliary substances such as phospholipids had a synergistic effect in improving the cyclodextrin solubilizing power towards ketoprofen [3]. On the other hand, it has been demonstrated that the improved drug dissolution rate obtained by cyclodextrin complexation gives rise to a corresponding enhancement of its bioavailability [4].

Microwave (MW) technology has recently received an increasing interest in the pharmaceutical field even though its applications are still rather limited [5,6]. It has been shown that the polarizing aspect of MW heating gives rise to enhanced mass transport, and it can be exploited as an effective tool for generating drug solid dispersions at molecular or nano-scale level in a suitable stabilizing medium [7]. In particular, MW irradiation has been recently experimented as a new method for preparing interaction products of drugs with different kinds of cyclodextrins [8–13]. We recently used a new MW-based method for the preparation of ternary interaction products of ketoprofen with cyclodextrins and phospholipids which showed improved dissolution performance with respect to the corresponding binary drug–cyclodextrin or drug–phospholipid systems [3].

Therefore, in the present work, it seemed of interest to continue our studies and to investigate more in depth the actual effectiveness and advantages of such a new technology. With this aim we prepared selected ketoprofen:cyclodextrin:phosphatidylcholine ternary complexes by MW irradiation [3] and we characterized and compared their physical–chemical properties with those of the corresponding products obtained by conventional preparation

\* Corresponding author. Tel.: +39 055 4573672; fax: +39 055 4573673.  
E-mail address: [paola.mura@unifi.it](mailto:paola.mura@unifi.it) (P. Mura).



## Physical–chemical characterization of binary and ternary systems of ketoprofen with cyclodextrins and phospholipids

Marzia Cirri, Francesca Maestrelli, Natascia Mennini, Paola Mura\*

Department of Pharmaceutical Sciences, University of Florence, via Schiffi 6 Sesto Fiorentino, 50019 Florence, Italy

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 July 2008  
Received in revised form 28 October 2008  
Accepted 5 November 2008  
Available online 13 November 2008

#### Keywords:

Cyclodextrin  
Phospholipids  
Ketoprofen  
DSC  
X-ray powder diffractometry

### ABSTRACT

Binary and ternary interaction products of ketoprofen (an anti-inflammatory drug very poorly water soluble) with phospholipids (phosphatidylcholine (EPC3) and phosphatidylglycerol (EPG)) and cyclodextrins ( $\beta$ -cyclodextrin and its methylated derivative (Me $\beta$ Cd)), were prepared to evaluate their ability in improving drug dissolution properties. The different binary and ternary drug–carrier(s) systems were obtained by microwave irradiation, in order to investigate the effectiveness of such a newly proposed preparation technology in bringing about effective solid-state interactions among the components. The effect of different experimental conditions such as microwave irradiation power (500 and 750 W) and treatment time (5, 10 and 15 min) on the physicochemical properties of the products has been also assessed. All solid systems were characterized by differential scanning calorimetry (DSC) analysis, supported by X-ray powder diffractometry, and examined for dissolution properties. The study pointed out the better performance of ternary systems than the binary ones and allowed selection of the best drug–phospholipid–Cd combination and of the most effective preparation conditions. In particular drug–EPC3–Me $\beta$ Cd ternary systems obtained by using the greatest microwave irradiation energy and the longest treatment time exhibited complete drug amorphization and allowed achievement after 60 min of almost 80% dissolved drug, with an increase in dissolution efficiency of 10.7 and 1.4 times in comparison with drug alone and the corresponding drug–Cd binary system, respectively. The synergistic effect between cyclodextrin and phospholipid in enhancing the drug dissolution properties has been attributed to the combination of the surfactant properties of phospholipids and the wetting and solubilizing power of cyclodextrins and/or the possible formation of a “multicomponent” complex.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Natural cyclodextrins and their derivatives are known to form inclusion complexes with a variety of poorly soluble drugs [1]. Cyclodextrin complexation generally give rise to favourable changes of the characteristics of the guest molecule, such as increased solubility, enhanced dissolution properties, improved stability, reduced side effects, etc. [2–4]. Moreover, some works have demonstrated that the presence of a suitable third component can significantly improve cyclodextrin complexation and solubilizing efficiency [5–7]. The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients appears of particular interest, due to their demonstrated ability in improving the dissolution behaviour, and, consequently, the bioavailability of poorly soluble drugs [8–10]. However, at present, their use as possible ternary components to improve the cyclodextrin solubilizing and/or complexing effectiveness has not yet been considered.

On the other hand, different methods have been proposed for obtaining cyclodextrin inclusion complexes, including coprecipitation, freeze-drying, kneading and cogrinding and the most effective must be selected from time to time based on a series of factors such as low cost, swiftness, simplicity, ease of scaling up and performance of the obtained product.

Applications of microwave technology in chemical and pharmaceutical fields are attracting a growing interest, particularly in virtue of their speed of performance and cost savings [11]. Microwaves are electromagnetic waves with a frequency between 300 MHz and 300 GHz. The operating frequencies for industrial, scientific and domestic purposes range from 915 to 2450 MHz. Heating in a microwave oven is the result of the interaction of an electromagnetic field with the chemical components, giving rise to vibrations and molecular frictions within the materials [12]. However, the intensity of the resulting vibrations partly depends also on the structure of the molecules, their shape and size, the viscosity of the materials, the temperature and the intermolecular bonds. To date, only a few studies are reported in literature about the application of microwave technology in the pharmaceutical field, concerning the preparation of solid dispersions [13], the drug release from

\* Corresponding author. Tel.: +39 055 4573672 fax: +39 055 4573673.  
E-mail address: [paola.mura@unifi.it](mailto:paola.mura@unifi.it) (P. Mura).



J Incl Phenom Macrocycl Chem (2009) 63:17–25  
DOI 10.1007/s10847-008-9484-7

ORIGINAL ARTICLE

## Comparative study of oxaprozin complexation with natural and chemically-modified cyclodextrins in solution and in the solid state

Francesca Maestrelli · Matteo Cecchi · Marzia Cirri · Gaetano Capasso · Natascia Mennini · Paola Mura

Received: 23 May 2008 / Accepted: 11 July 2008 / Published online: 29 July 2008  
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

**Abstract** The complexing, solubilizing and amorphizing abilities toward oxaprozin (a poorly water-soluble anti-inflammatory agent) of some  $\beta$ -cyclodextrin derivatives (hydroxypropyl- $\beta$ Cd, heptakis-2,6-di-O-methyl- $\beta$ Cd (DIMEB) amorphous randomly substituted methyl- $\beta$ Cd (RAMEB) and semi-crystalline methyl- $\beta$ Cd (CRYSMEB)) were investigated and compared with those of natural ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -) cyclodextrins. The role of both the cavity size, the amorphous or crystalline state and the presence and type of substituent on the ability of cyclodextrins in establishing effective interactions with the drug has been evaluated. Equimolar drug-cyclodextrin solid systems were prepared by blending, kneading, co-grinding, sealed-heating, coevaporation, and colyophilization. Drug-carrier interactions were studied in both the liquid and solid state by phase-solubility analysis, differential scanning calorimetry, X-ray powder diffractometry, FT-IR spectroscopy and scanning electron microscopy.  $\beta$ Cd showed the best performance among the natural Cds, indicating that its cavity was the most suitable for accommodating the drug molecule. The presence of substituents on the rim of the  $\beta$ Cd cavity significantly improved its complexing and solubilizing effectiveness towards the drug, and methylated derivatives were better than the hydroxy-propylated ones. The amorphous nature of the partner was also important: among the examined methyl-derivatives, RAMEB proved to be the most effective in performing solid state interactions and in improving drug wettability and dissolution properties.

**Keywords** Oxaprozin · Cyclodextrin complexation · Dissolution rate · Differential scanning calorimetry · X-ray powder diffractometry · FTIR spectroscopy · Scanning electron microscopy

### Introduction

Oxaprozin (3-(4,5-diphenyl-1,3-oxazol-2-yl) propionic acid) is a Non-Steroidal Anti-Inflammatory drug, mainly used for the treatment of pain, pyrexia and various inflammatory disorders. Oxaprozin has become one of the leading NSAIDs on the US market, however its low aqueous solubility and poor stability may reduce its therapeutic effectiveness and enhance the appearance of some adverse events such as gastro-duodenal mucosal injury [1]. Cyclodextrins have been successfully used as carriers to improve solubility, dissolution rate, chemical stability and bioavailability of a number of poorly soluble drugs [2–5]. In particular, cyclodextrin complexation of anti-inflammatory drugs allowed obtainment of additional advantages such as masking of taste, lowering of dose, reduction of side effects (particularly gastric irritation) [6–9].

Therefore, in the present work we investigated the possibility of improving the unfavourable chemical-physical properties of oxaprozin by cyclodextrin complexation. With this aim we carefully examined the performance of a series of cyclodextrins, both natural ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Cd) and derivative (hydroxypropyl- $\beta$ Cd, heptakis-2,6-di-O-methyl- $\beta$ Cd, amorphous randomly substituted methyl- $\beta$ CD and semi-crystalline methyl- $\beta$ CD), in order to evaluate the role of both the cyclodextrin cavity size, their amorphous or crystalline state and the presence and type of substituent on their ability to establish effective interactions with the drug. Moreover, several methods have been proposed for

F. Maestrelli · M. Cecchi · M. Cirri · G. Capasso · N. Mennini · P. Mura (✉)  
Department of Pharmaceutical Sciences, University of Florence,  
via U. Schiff 6, Sesto Fiorentino, Florence 50019, Italy  
e-mail: paola.mura@unifi.it

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ejps](http://www.elsevier.com/locate/ejps)

## Microspheres for colonic delivery of ketoprofen-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin complex

F. Maestrelli<sup>a,\*</sup>, N. Zerrouk<sup>b</sup>, M. Cirri<sup>a</sup>, N. Mennini<sup>a</sup>, P. Mura<sup>a</sup><sup>a</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, University of Florence, via Schiff 6, 50019 Sesto Fiorentino, Florence, Italy<sup>b</sup> Labor. Pharmacie Galénique, Faculté de Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Univ. Paris V, 4 Av. de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 November 2007

Received in revised form

24 January 2008

Accepted 5 February 2008

Published on line 12 February 2008

#### Keywords:

Ketoprofen

Cyclodextrin

Colonic delivery

Microspheres

Ca-pectinate

Chitosan

### ABSTRACT

A new multiparticulate system, with the potential for site-specific delivery to the colon, has been developed using ketoprofen as model drug. The system simultaneously exploits cyclodextrin complexation, to improve drug solubility, and vectorization in microspheres (MS) based on Ca-pectinate and chitosan. The effect of complexation with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP $\beta$ CyD) and of chitosan presence on drug entrapment efficiency and release properties, as well on the drug permeation rate across Caco-2 cells has been investigated. Solid-state interactions between the components have been investigated by FTIR spectroscopy, differential scanning calorimetry and X-ray powder diffractometry. The morphology of MS was examined by scanning electron microscopy. Release studies revealed a different behaviour for MS containing drug alone or as complex: drug alone was released faster than in the presence of cyclodextrin from MS without chitosan, due to a reservoir effect. The opposite was found for MS containing chitosan, due to a competition effect between polymer and drug for the cyclodextrin. Cytotoxicity tests demonstrated the safety of these formulations. Permeation studies showed an increased permeation of the drug formulated as MS, particularly marked when it was used as complex, thus revealing an enhancing power of both cyclodextrin and chitosan with a synergistic effect in improving drug permeation.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The advantages of colonic drug delivery have been well demonstrated (Watts and Illum, 1997; Yang et al., 2002). Several kinds of delivery devices have been studied for the development of effective colonic drug delivery systems, such as matrices, beads, micro- and nano-particles. Among these, multiple-unit systems proved to be better than single dosage forms due to their more predictable and reproducible gastrointestinal transit time and less local irritation and/or adverse effects (Krämer and Blume, 1994). The main strate-

gies proposed to achieve colonic targeting are based on pH-sensitive, time-dependent and microflora-activated systems. These latter, triggered by enzymatic breakdown by specific colonic bacteria, have emerged as the most effective in assuring a selective colon delivery (Yang et al., 2002). In this ambit, various types of natural polysaccharides are currently under extensive investigation as candidates for the development of solid dosage forms for colonic delivery of drugs, in virtue of their specific biodegradation by colonic microflora (Vandamme et al., 2002). In particular, different types of pectins, consisting mainly of partially methoxylated

\* Corresponding author. Tel.: +39 0554573711; fax: +39 0554573780.

E-mail address: [francesca.maestrelli@unifi.it](mailto:francesca.maestrelli@unifi.it) (F. Maestrelli).

0928-0987/\$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.ejps.2008.02.001

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 69 (2008) 508–518

European  
Journal of  
Pharmaceutics and  
Biopharmaceutics[www.elsevier.com/locate/ejpb](http://www.elsevier.com/locate/ejpb)

Research paper

## Development of enteric-coated calcium pectinate microspheres intended for colonic drug delivery

Francesca Maestrelli, Marzia Cirri, Giovanna Corti, Natascia Mennini, Paola Mura \*

*Department of Pharmaceutical Sciences, University of Florence, Florence, Italy*

Received 12 July 2007; accepted in revised form 3 December 2007

Available online 15 December 2007

### Abstract

Enteric-coated calcium pectinate microspheres (MS) aimed for colon drug delivery have been developed, by using theophylline as a model drug. The influence of pectin type (amidated or non-amidated) and MS preparation conditions (CaCl<sub>2</sub> concentration and cross-linking time) was investigated upon the drug entrapment efficiency and its release behaviour. Drug stability and drug-polymer interactions were studied by Differential Scanning Calorimetry, thermogravimetry, X-ray diffractometry and FTIR spectroscopy. Enteric coating with Eudragit® S100 enabled maintenance of MS integrity until its expected arrival to colon. The coating was also useful to improve the stability of MS during storage, avoiding morphologic changes observed for uncoated MS stored under ambient conditions. Entrapment efficiency increased by reducing cross-linking time, and (only in the case of non-amidated pectin) by increasing CaCl<sub>2</sub> concentration. On the other hand, release tests performed simulating the gastro-intestinal pH variation evidenced an inverse relationship between CaCl<sub>2</sub> concentration and drug release rate, whereas no influence of both pectin type and cross-linking time was found. Unexpectedly, addition of pectinolytic enzymes to the colonic medium did not give rise to selective enzymatic degradation of MS. Notwithstanding this unforeseen result, coated MS prepared at 2.5% w/v CaCl<sub>2</sub> concentration were able to adequately modulate drug release through a mixed approach of pH and transit time control, avoiding drug release in the gastric ambient, and reaching the colonic targeting where 100% release was achieved within less than 24 h.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Colon delivery; Amidated and non-amidated pectin; Calcium pectinate microspheres; Cross-linking conditions; Eudragit S100; Theophylline; Drug release

### 1. Introduction

In the last years the development of colon-targeted drug delivery systems has received an increasing interest not only for a better treatment of specific local pathologies, but also for the systemic therapy of both conventional and labile molecules, as well as a means of achieving chronotherapy for diseases sensitive to circadian rhythms, such as asthma and arthritis [1,2]. Among the various strategies proposed to target orally administered drugs to the colon

[2–4] those based on drug release triggered by colon microflora are generally considered the most effective regarding target selectivity [5,6]. In this field, a particular interest has been directed to the employment of natural biodegradable polymers due to their ability to act as specific substrates for the colonic microflora combined with high safety, non-toxicity and biocompatibility characteristics [6–8]. Among such polymers, pectins, hydrophilic polysaccharides derived from plant cell walls mainly consisting of partially methoxylated poly  $\alpha$ -(1–4)-D-galacturonic acids, appear of great and practical interest, due to their low cost, wide availability and variety of types and flexibility in use. However, their solubility and swelling properties in aqueous media prevent them from efficiently avoiding drug release during transit through the upper gastrointestinal

\* Corresponding author. Department of Pharmaceutical Sciences, University of Florence, via Schiff 6, Sesto Fiorentino 50019, Florence, Italy. Tel.: +39 055 4573672; fax: +39 055 453673.  
E-mail address: [mura@unifi.it](mailto:mura@unifi.it) (P. Mura).





ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 68 (2008) 303–309

European  
Journal of  
Pharmaceutics and  
Biopharmaceutics[www.elsevier.com/locate/ejpb](http://www.elsevier.com/locate/ejpb)

Research paper

## Sustained-release matrix tablets of metformin hydrochloride in combination with triacetyl- $\beta$ -cyclodextrin

Giovanna Corti, Marzia Cirri, Francesca Maestrelli, Natascia Mennini, Paola Mura \*

Department of Pharmaceutical Sciences, University of Florence, Florence, Italy

Received 21 March 2007; accepted in revised form 4 June 2007

Available online 12 June 2007

### Abstract

The low bioavailability and short half-life of metformin hydrochloride (MH) make the development of sustained-release forms desirable. However, drug absorption is limited to the upper gastrointestinal (GI) tract, thus requiring suitable delivery systems providing complete release during stomach-to-jejunum transit. This study was undertaken to develop a MH sustained-release formulation in compliance with these requirements. The strategy proposed is based on direct-compressed matrix tablets consisting of a combination of MH with the hydrophobic triacetyl- $\beta$ -cyclodextrin (TA $\beta$ CD), dispersed in a polymeric material. Different polymers were tested as excipients, i.e. hydroxypropylmethylcellulose, xanthan gum, chitosan, ethylcellulose, Eudragit<sup>®</sup>L100-55, and Precirol<sup>®</sup>. Compatibility among the formulation components was assessed by DSC analysis. All the tablets were examined for drug release pattern in simulated gastric and jejunal fluids used in sequence to mimic the GI transit. Release studies demonstrated that blends of a hydrophobic swelling polymer (hydroxypropylmethylcellulose or chitosan) with a pH-dependent one (Eudragit<sup>®</sup>L100-55) were more useful than single polymers in controlling drug release. Moreover, the main role played by the MH-TA $\beta$ CD system preparation method (i.e. grinding or spray-drying) in determining the behaviour of the final formulation was evidenced. In fact, for a given matrix-tablet composition, different sustained-release effects were obtained by varying the relative amounts of MH-TA $\beta$ CD as ground or spray-dried product. In particular, the 1:1 (w/w) blend of such systems, dispersed in a Eudragit–chitosan polymeric matrix, fully achieved the prefixed goal, giving about 30% released drug after 2 h at gastric pH, and overcoming 90% released drug within the subsequent 3 h in jejunal fluid.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Metformin hydrochloride; Triacetyl- $\beta$ -cyclodextrin; Sustained release; Matrix tablets

### 1. Introduction

Metformin hydrochloride is a highly water-soluble anti-hyperglycaemic agent used in the treatment of type II non-insulin-dependent diabetes mellitus. Its relatively low (50–60%) bioavailability together with its short and variable biological half-life (0.9–2.6 h) [1–4] require repeated administrations of high doses to maintain effective plasma concentrations, thus reducing patient compliance and/or enhancing the incidence of side-effects. Sustained-release systems of metformin, developed in

order to overcome these problems, were however still less bioavailable than conventional immediate-release tablets [5–7]. Moreover, gastric-retentive swelling tablets of metformin showed only a 15% increase of bioavailability with respect to the immediate-release tablets [8]. These results could be attributed to a lack of correspondence between the time of transit of the drug delivery system across the upper part of the gastrointestinal (GI) tract and the time necessary for complete drug release and/or absorption. In fact, many studies have reported that the oral absorption of metformin is mainly confined to the small intestine, i.e. duodenum and jejunum and, to a lesser extent, ileum [3,9,10]. Therefore, a more effective rationalisation of the drug release pattern is clearly needed. This could be attained through the development of suitable drug delivery systems able to initiate release in the stomach

\* Corresponding author. Department of Pharmaceutical Sciences, University of Florence, via Schiff 6, Sesto Fiorentino 50019, Florence, Italy. Tel.: +39 055 4573672; fax: +39 055 4573673.  
E-mail address: [mura@unifi.it](mailto:mura@unifi.it) (P. Mura).

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 57 (2004) 93–99

European  
Journal of  
Pharmaceutics and  
Biopharmaceutics[www.elsevier.com/locate/ejpb](http://www.elsevier.com/locate/ejpb)

Research paper

## Comparison of the effect of chitosan and polyvinylpyrrolidone on dissolution properties and analgesic effect of naproxen

Naima Zerrouk<sup>a</sup>, Nataschia Mennini<sup>b</sup>, Francesca Maestrelli<sup>b</sup>, Chantal Chemtob<sup>a</sup>, Paola Mura<sup>b,\*</sup><sup>a</sup>Laboratoire de Pharmacie Galénique, Faculté de Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Paris V, Paris, France<sup>b</sup>Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Facoltà di Farmacia, Università di Firenze, Florence, Italy

Received 14 March 2003; accepted in revised form 12 May 2003

### Abstract

The solubilizing and absorption enhancer properties towards naproxen of chitosan and polyvinylpyrrolidone (PVP) have been investigated. Solid binary systems prepared at various drug–polymer ratios by mixing, cogrinding or kneading, were characterized by differential scanning calorimetry, X-ray diffractometry, Fourier transform infrared spectroscopy, and scanning electron microscopy, and tested for dissolution behavior. Both carriers improved drug dissolution and their performance depended on the drug–polymer ratio and the system preparation method. Chitosan was more effective than PVP, despite the greater amorphizing power of PVP as revealed by solid state analyses. The 3/7 (w/w) drug–carrier coground systems with chitosan and PVP were the best products enabling, respectively, an improvement of 4.8 and 3.6 times of drug dissolution efficiency. In vivo experiments in mice demonstrated that administration of 45 mg/kg of drug coground with PVP or chitosan resulted, respectively, in a 25 and 60% reduction of acetic acid-induced writhings in comparison to pure drug, which, instead, was statistically ineffective as compared to the control group. Moreover, the 3/7 (w/w) drug-chitosan coground product demonstrated an antiwrithing potency 2.4 times higher than the coground with PVP. Thus, the direct-compression properties and anticarcinogenic activity, combined with the demonstrated solubilizing power and analgesic effect enhancer ability towards the drug, make chitosan particularly suitable for developing a reduced-dose fast-release solid oral dosage form of naproxen.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Naproxen; Chitosan; Polyvinylpyrrolidone; Dissolution; Analgesic effect; Cogrounding

### 1. Introduction

Chitosan is a linear polycationic copolymer of  $\beta(1\text{--}4)$  linked 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose and 2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranose obtained from deacetylation of chitin, a structural polysaccharide which is very abundantly distributed in nature.

In recent years chitosan has gained increasing interest in the pharmaceutical field due to its favorable biological properties such as biocompatibility, biodegradability, and lack of toxicity, together with its wide availability, low cost and high versatility of use [1–4]. Previously chitosan was largely used as an excipient for oral drug solid dosage forms, due to its binder, anti-adherent and disintegrant properties [5–7]. More recently, it has been widely

investigated for its potential in the development of various kinds of drug delivery systems, due to its film-forming and gelation abilities, along with its cationic character, bioadhesiveness and absorption enhancer properties [4,8–12]. Moreover, its ability in improving the dissolution properties and bioavailability of poorly-soluble drugs has been proved [13–16]. Finally, its antiacid and antilucer activities [17] can be exploited to prevent or reduce gastric irritation induced by some active compounds, such as anti-inflammatory drugs [18,19].

We recently demonstrated the effectiveness of chitosan in enhancing the dissolution properties of naproxen, a very poorly water-soluble nonsteroidal anti-inflammatory drug [20]. The favorable effect of polyvinylpyrrolidone (PVP) on naproxen solubility and dissolution rate has also been previously demonstrated [21]. Therefore, it seemed worthy of interest to extend our investigations and compare in detail the performance of such polymers in improving naproxen dissolution behavior. Solid binary systems, prepared at

\* Corresponding author. Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Facoltà di Farmacia, Università di Firenze, Via Gino Capponi 9, 50121 Florence, Italy. Tel.: +39-055-275-7292; fax: +39-055-240776.

E-mail address: [mura@unifi.it](mailto:mura@unifi.it) (P. Mura).

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

European Journal of Pharmaceutical Sciences 19 (2003) 67–75

[www.elsevier.com/locate/ejps](http://www.elsevier.com/locate/ejps)

## Development and characterization of naproxen–chitosan solid systems with improved drug dissolution properties

Paola Mura<sup>a,\*</sup>, Naima Zerrouk<sup>b</sup>, Natascia Mennini<sup>a</sup>, Francesca Maestrelli<sup>a</sup>, Chantal Chemtob<sup>b</sup><sup>a</sup>Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Facoltà di Farmacia, Università di Firenze, Via Gino Capponi 9, 50121 Firenze, Italy<sup>b</sup>Laboratoire de Pharmacie Galénique, Faculté de Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Paris V, 4 Avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06, France

Received 29 July 2002; received in revised form 28 February 2003; accepted 17 March 2003

### Abstract

The solubilizing and amorphizing properties toward naproxen (a poorly water-soluble antiinflammatory drug) of chitosan, an emerging pharmaceutical biopolymer, have been investigated. Solid binary systems at different drug/polymer ratios have been prepared according to different techniques (mixing, cogrinding, kneading, coevaporation) using chitosan at low (CS-L<sub>w</sub>) and medium (CS-M<sub>w</sub>) molecular weight, and tested for dissolution properties. Drug-carrier interactions were investigated in both the liquid and solid state, by phase solubility analysis, differential scanning calorimetry, X-ray powder diffractometry, FT-IR spectroscopy, and scanning electron microscopy. Drug dissolution parameters improved with increasing the polymer amount in the mixture, reaching the highest values at the 1:9 (w/w) drug/polymer ratio, and CS-L<sub>w</sub> was more efficacious than CS-M<sub>w</sub>. Cogrinding was the most effective technique, showing the strongest amorphizing effect toward the drug and enabling an increase of more than ten times its relative dissolution rate. Coground mixtures at 3:7 (w/w) drug/polymer ratio were able to give directly compressed tablets which maintained unchanged the improved drug dissolution properties. Enhancer dissolution properties combined with its direct compression feasibility and antiulcerogenic action make CS-L<sub>w</sub> an optimal carrier for developing fast-release oral solid dosage forms of naproxen.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Naproxen; Chitosan; Dissolution enhancement; Cogrinding; Differential scanning calorimetry

### 1. Introduction

Chitosan [(1→4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glucan] is a linear cationic polysaccharide obtained by *N*-deacetylation of chitin, a naturally-occurring structural polysaccharide abundant in crab and shrimp shells. It has recently emerged as one of the most promising biopolymers for a variety of potential applications in both the biomedical and pharmaceutical fields since it exhibits several desirable biological properties such as non-toxicity, good biocompatibility and biodegradability, accompanied by wide availability in nature, low cost and high flexibility in use (Felt et al., 1998; Illum, 1998; Paul and Sharma, 2000). In addition to its use as an excipient for direct compression (Upadrashta et al., 1992; Ritthidej et al., 1994), chitosan has been thoroughly examined for its potential in the development of a variety of drug delivery systems, due to its polymeric

cationic character, gel- and film-forming abilities, bioadhesiveness and transmucosal penetration enhancer properties (Artursson et al., 1994; Henriksen et al., 1996; Kas, 1997; Felt et al., 1998; Illum, 1998; Kristl et al., 1999; Paul and Sharma, 2000). Moreover, some authors also refer to its effectiveness in enhancing the dissolution properties and bioavailability of poorly-soluble drugs (Sawayanagi et al., 1982, 1983; Shiraishi et al., 1990; Acarturk et al., 1993a,b; Portero et al., 1998). Finally, its antiacid and antiulcer properties can be exploited to prevent or reduce gastric irritation induced by some active compounds, such as anti-inflammatory drugs (Kawashima et al., 1985; Açıkoğuz et al., 1995).

Naproxen is a non-steroidal anti-inflammatory drug which, as a consequence of its scarce wettability and very poor water-solubility (0.025 mg/ml at 25 °C), can exhibit low and/or variable bioavailability after oral administration. Several approaches have been conducted in order to adequately improve the naproxen dissolution properties, mainly via the use of solid dispersions with polyethylene glycol (Mura et al., 1996, 1999) or polyvinylpyrrolidone

\*Corresponding author. Tel.: +39-055-275-7292; fax: +39-055-240-776.

E-mail address: [mura@farmfi.scifarm.unifi.it](mailto:mura@farmfi.scifarm.unifi.it) (P. Mura).