



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE E TECNOLOGIE FARMACEUTICHE

Ciclo XXIII

PREPARAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI DUE SISTEMI CARRIER:
BEADS A BASE DI CHITOSANO E CHITOSANO/ALGINATO;
NANOPARTICELLE DI N-TRIMETILCHITOSANO

S.S.D Chim/09

Presentata da: Maria Cristina Meloni
Coordinatore Dottorato Prof. Elias Maccioni
Tutor Prof.ssa Anna Maria Maccioni

Esame finale anno accademico 2010 – 2011

Indice

1. Introduzione	1
1.1 Composizione delle dispersioni polimeriche	3
1.1.1 Chitina e Chitosano	3
1.1.1.2 Proprietà	4
1.1.2 L'Alginato di sodio	5
1.1.2.1 Proprietà dell'alginato.	7
1.1.3 Il Boswellin®	9
1.1.3.1 Meccanismo dell'azione anti-infiammatoria.	11
1.4 Il targeting al colon	13
1.5 Le beads	14
1.5.1 Metodo di preparazione	15
2 Beads a base di Chitosano e Alginati	18
2.1 Scopo del lavoro	18
2.2. Parte sperimentale	19
2.2.1 Materiali	19
2.2.2 Strumenti Utilizzati	19
2.2.3 Metodo generale per la preparazione della dispersione di Chitosano M (1)	20
2.2.4 Metodo generale per la preparazione della dispersione di Alginato di Sodio (2)	20
2.2.5 Metodo generale per la preparazione delle soluzioni di BaCl ₂ e CaCl ₂ .	21
2.2.6 Metodo generale per la preparazione delle <i>beads</i> di controllo di Chitosano (A)	21
2.2.7 Metodo generale per la preparazione delle <i>beads</i> di controllo di Alginato di Sodio/Cloruro di Bario(B) e Alginato di sodio/Cloruro di calcio (C)	22
2.2.8 Preparazione della soluzione etanolica di Boswellin® al 10%	23
2.2.9 Determinazione del pH della soluzione etanolica di Boswellin®	23
2.2.10 Determinazione del pH delle dispersioni con e senza Boswellin®	23
2.2.11 Metodo generale per la preparazione dei beads a base di Chitosano contenenti Boswellin® (A1)	24
2.2.12 Metodo generale per la preparazione delle <i>beads</i> a base di Alginato/Ba ⁺⁺ e Alginato/Ca ⁺⁺ contenenti Boswellin® (B1 e C1)	25
2.2.13 Misure di viscosità delle dispersioni di Chitosano M e Alginato di sodio	27
2.2.14 Valutazione della resa del campione A1 (Chitosano M)	28
2.2.15 Valutazione della resa del campione B1 (Alginato di Bario) e del campione C1 (Alginato di Calcio).	29

2.2.16 Valutazione delle dimensioni (ad umido e a secco)	30
2.2.17 Saggio di STRESS alla centrifuga	30
2.2.18 Saggio di STRESS agli ultrasuoni	30
2.2.19 Swelling- ratio in diversi medium (NaCl 0,9% p/v, HCl 0,1N – pH 1, tampone (Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄) – pH 7,4	30
2.2.20 Analisi spettrofotometrica	31
2.2.21 Capacità incapsulante delle beads	32
2.2.22 Calcolo della % Incapsulante	33
2.2.23 Calcolo del Titolo % in Boswellin® nei campioni di beads	34
2.2.24 Metodica di Rilascio	34
2.3 Risultati e discussione	36
2.3.1 Misure di Viscosità apparente delle dispersioni di chitosano e di alginato di sodio.	36
2.3.2 Comportamento all'evaporazione	39
2.3.3 Preparazione delle beads	42
2.3.3.1 Metodica per la realizzazione delle beads	43
2.3.3.2 Morfologia e dimensioni	46
2.3.3.3 Capacità di rigonfiamento (<i>swelling-ratio</i>)	49
2.3.3.4 Capacità incapsulante (E%)	54
2.3.3.5 Studi di rilascio	56
2.3.3.6 Conclusioni	58
3 Beads a base di una combinazione polimerica Chitosano/Alginato	59
3.1 Scopo del lavoro	59
3.2. Parte Sperimentale	60
3.2.1 Materiali	60
3.2.2 Strumenti Utilizzati	60
3.2.3 Preparazione delle soluzioni e dispersioni occorrenti per la preparazione delle <i>Beads</i> secondo la METODICA A	61
3.2.3.1 Realizzazione Beads - Campione A	63
3.2.3.2 Realizzazione Beads - Campione A1	63
3.2.4 Preparazione delle soluzioni e dispersioni occorrenti per la preparazione delle Beads secondo la METODICA B	64
3.2.4.1 Realizzazione Beads - Campione B	65
3.2.4.2 Realizzazione Beads - Campione B1	65
3.2.5. Misure di viscosità delle dispersioni di Chitosano M e Alginato di sodio	67
3.2.6. Determinazione della resa del CAMPIONE A1	68

3.2.7 Determinazione della resa del CAMPIONE B1	69
3.2.8 Determinazione delle dimensioni ad umido e a secco	70
3.2.9. Saggio di STRESS alla centrifuga	70
3.2.10 Saggio di STRESS agli ultrasuoni	70
3.2.11 Swelling- ratio in diversi medium (HCl 0,1N – pH 1, tampone Citrato/NaOH - pH 5, tampone (Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄) – pH 7,4)	70
3.2.12 Analisi spettrofotometrica	71
3.2.13 Calcolo del Titolo % in Boswellin® nei campioni di beads	71
3.2.14 Capacità incapsulante	72
3.2.15 Calcolo della % Incapsulante	72
3.2.16 Proprietà di rilascio	73
3.3. Risultati e discussione	75
3.3.1 Metodi di preparazione	75
3.3.2 Preparazione delle <i>beads</i>	77
3.3.3 Morfologia e dimensioni	80
3.3.4 Capacità di rigonfiamento (<i>swelling-ratio</i>)	83
3.3.5 Capacità incapsulante (E%)	89
3.3.6 Proprietà di rilascio	91
3.4 Conclusioni	96
Bibliografia	98
4. Le nanoparticelle di trimetilchitosano	101
4.1 Sistemi nanoparticellari	101
4.2 <i>Tecniche di preparazione delle nanoparticelle</i>	104
4.2.1 <i>Metodi che utilizzano polimeri preformati</i>	105
4.3 La barriera ematoencefalica	105
4.4 I Prioni	105
4.5 Il trimetilchitosano cloridrato	108
4.6 Scopo del Lavoro	109
4.7 Parte sperimentale	110
4.7.1 <i>Materiali</i>	110
4.7.2 <i>Strumenti</i>	110
4.7.3 <i>Metodi</i>	111

4.7.3.1 Preparazione del Chitosano in funzione della sintesi del TMC	111
4.7.3.2 Preparazione del TMC.	111
4.7.3.3 Sintesi del TMC: 1° variazione della metodica di sintesi.	112
4.7.3.4 Sintesi del TMC: 2° <i>variazione della metodica di sintesi</i>	113
4.7.3.5 Sintesi del TMC: 3° <i>variazione della metodica di sintesi</i>	113
4.7.3.6 <i>Analisi del TMC mediante Spettroscopia NMR.</i>	114
4.7.3.7 <i>Analisi di diffrazione ai raggi X (XRD)</i>	115
4.7.3.8 <i>Determinazione della solubilità TMC in funzione del grado di quaternizzazione</i>	117
4.7.3.9 <i>Preparazione della dispersione di TMC</i>	117
4.7.3.10 Analisi di Viscosità delle diverse dispersioni di TMC.	117
4.7.3.11 Determinazione dell'Indice di flusso	118
4.7.3.12 Analisi di pH delle dispersioni	119
4.7.3.13. Preparazione delle nanoparticelle	119
4.7.3.14 Metodica	120
4.7.3.15 Trattamento agli ultrasuoni	120
4.7.3.16 Determinazione del diametro medio e della distribuzione dimensionale	122
4.7.3.17 Determinazione della Resa %	122
4.7.3.18 Analisi allo Spettrofotometro UV e Associazione % del Progesterone alle nanoparticelle	123
4.7.3.19 Analisi di Microscopia elettronica a scansione (SEM)	124
4.8 Risultati e discussione	125
4.8.1 Caratterizzazione del TMC mediante Spettroscopia ¹ H- NMR	125
4.8.2 Determinazione della percentuale di quaternizzazione	133
4.8.3 Caratterizzazione XRD	135
4.8.4 Analisi del pH delle dispersioni del TMC e delle sospensioni nanoparticellari	136
4.8.5 Analisi di viscosità	137
4.8.6 Diametro medio, Potenziale zeta, PDI e Resa % delle nanoparticelle	142
4.8.7 Prove di caricamento del Progesterone	144
4.8.8 Caratterizzazione preliminare SEM delle nanoparticelle	144
4.9 Conclusioni	145
Bibliografia	146

1. Introduzione

Nella Farmacopea II Ed. vengono definite “*forme farmaceutiche a rilascio modificato*” quelle preparazioni in cui la velocità e/o sito di rilascio del/dei principi attivi sono differenti da quella di una forma farmaceutica convenzionale ^[1].

Questa deliberata modificazione si ottiene con uno speciale progetto di formulazione e/o metodo di produzione. In tal senso, le forme farmaceutiche a rilascio modificato possono essere a: a)*rilascio prolungato*, b)*rilascio ritardato*, c)*rilascio ripetuto*.

Per chiarire meglio, rispetto alla *Forma Farmaceutica convenzionale*, il rilascio del farmaco o principio attivo potrà essere modificato in termini di:

- a. Velocità. Si potrà avere un incremento, nel caso sia necessaria un’azione rapida del farmaco, oppure un rallentamento, nel caso sia necessaria una cessione protratta nel tempo con un mantenimento prolungato dei livelli ematici nell’intervallo terapeutico.
- b. Tempo. Si potrà avere il rilascio del principio attivo che inizia solo dopo un certo intervallo dalla somministrazione, oppure è pulsante a intervalli regolari e/o in relazione alle esigenze terapeutiche del momento.
- c. Luogo. La cessione del principio attivo potrà avvenire in siti o distretti specifici dell’organismo, come per esempio, il rilascio specifico a livello del colon. In questi casi si usa il termine di *targeting* “direzionamento” del principio attivo ^[2].

In definitiva, una *Forma Farmaceutica a rilascio modificato* potrà sicuramente migliorare il profilo di un farmaco e allo stesso tempo rendere più semplici le modalità e i tempi di somministrazione aumentando la cosiddetta “*compliance*” del paziente (capacità di rispettare i tempi e modi di somministrazione dei medicinali secondo prescrizione medica).

Per la progettazione di un sistema a rilascio modificato, sono inoltre necessarie una serie di conoscenze che riguardano, in primo luogo, i meccanismi che determinano il rilascio del farmaco e delle cinetiche correlate; tali conoscenze sono importanti soprattutto per prevedere la durata del processo di rilascio dal farmaco, rilascio che è controllato dal tipo e dalla struttura del sistema.

Inoltre, le caratteristiche chimico fisiche del principio attivo, correlate nelle equazioni cinetiche, e cioè la sua solubilità in acqua, il pKa, le dimensioni molecolari, la forma cristallina, il legame alle proteine etc. rendono conto dell'influenza di tali fattori sulla fabbricazione del sistema e sull'andamento del rilascio da esso ^[3].

I sistemi a rilascio modificato sono spesso definiti sistemi polimerici, in quanto il controllo del rilascio viene effettuato mediante un materiale polimerico, che ingloba, associa o contiene il farmaco. La natura del materiale polimerico, le sue proprietà chimico fisiche, la capacità di rispondere ad eventuali stimoli chimici, fisici o fisiologici, influenzeranno il meccanismo o la velocità con cui un farmaco verrà rilasciato da questi sistemi stessi. I principali meccanismi che regolano il processo di rilascio sono: la diffusione, il rigonfiamento, la bioerosione o la dissoluzione del materiale polimerico.

Inoltre, benché possano essere diversi i meccanismi che contribuiscono contemporaneamente al rilascio del farmaco, solitamente, si ha la prevalenza di uno solo di questi.

I materiali polimerici, utilizzati in campo farmaceutico e cosmetico, possono essere di origine naturale, semisintetica o sintetica.

Qualunque sia l'origine, il requisito fondamentale che si richiede ad un materiale da impiegare per la preparazione di un sistema a rilascio modificato è la biocompatibilità, ossia l'assenza di tossicità cellulare e tissutale. Tra questi materiali, alcuni polimeri naturali come il Chitosano e i Sali dell'acido alginico risultano di notevole interesse, proprio a causa della loro bassa tossicità, biodegradabilità e biocompatibilità ^[4,5,6,7,8].

1.1 Composizione delle dispersioni polimeriche

1.1.1 Chitina e Chitosano

La chitina è un polisaccaride composto da unità di N-acetilglucosamina legate fra loro da ponti β -1,4 glucosidici.

Nel regno animale, la chitina è un elemento strutturale dei tegumenti di numerosi invertebrati. Nel regno vegetale, essa si trova soprattutto a livello delle pareti cellulari, nelle ife o spore del terriccio.

Esistono tre tipi di strutture cristalline^[9]:

- ◆ La chitina alfa: le catene sono disposte in modo antiparallelo
- ◆ La chitina beta: le catene sono parallele
- ◆ La chitina gamma: alternanza di una catena in un senso e di altre due nel senso opposto

Il chitosano viene ricavato dalla chitina attraverso un processo di deacetilazione^[10] fino ad ottenere chitina deacetilata per il 65%, limite della solubilità del polimero in un mezzo acido diluito. Il chitosano ha pertanto dei gruppi ossidrilici e amminici liberi che possono essere modificati chimicamente per svariate applicazioni con eccellenti caratteristiche di biocompatibilità e biodegradabilità^[11,12] e che in soluzione acida risulta carico positivamente in seguito alla protonazione dei gruppi amminici liberi^[13] (Figura 1.1.1).

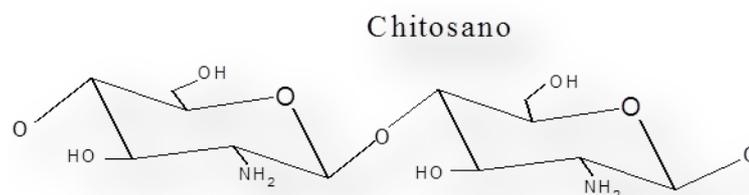


Fig. 1.1.1. Struttura del Chitosano

1.1.1.2 Proprietà

Il chitosano, di grado farmaceutico è deacetilato tra il 90% e il 95% , di grado alimentare tra il 75% e 80%.

Il chitosano è insolubile in acqua a valori di pH neutri o alcalini, mentre è in grado di formare sali in presenza di acidi inorganici e organici, quali l'acido cloridrico, lattico, acetico e glutammico e il risultante polisaccaride solubile è carico positivamente.

I sali del chitosano sono solubili in acqua e tale solubilità dipende dal grado di deacetilazione e dal pH: a basso grado di deacetilazione (40%) è solubile fino a pH 9, ad alto grado di deacetilazione (85%) è solubile fino a pH 6,5.

La viscosità di una soluzione di chitosano cresce sia con l'aumentare della concentrazione del chitosano che con il decrescere della temperatura. Inoltre la viscosità aumenta con il grado di deacetilazione, dal quale dipendono anche le differenti conformazioni che il chitosano può assumere in soluzione:

- ad un alto grado di deacetilazione corrisponde un chitosano con molte catene flessibili,
- a basso grado di deacetilazione la molecola del chitosano assume una forma a bacchetta, a spirale o ad anello.

Si parla più esattamente di chitosani che differiscono tra loro per il diverso peso molecolare, e in particolare si distinguono:

High Molecular Weight Chitosan (**HC**) con PM 2.000.000; Medium Molecular Weight Chitosan (**MC**) con PM 750.000; Low Molecular Weight Chitosan (**LC**) con PM 70.000. con grado di deacetilazione intorno all'85%.

1.1.2 L'Alginato di sodio

L'**Alginato di sodio** (SA) è il sale sodico dell'acido alginico o Acido polimannuronico, un polisaccaride naturale che si trova nelle Alghe brune marine (Phaeophyceae) appartenenti ai generi *Laminaria* (*Laminaria digitata* Lam.), *Fucaceae* (come Quercia marina o *Fucus vesiculosus* L.), *Macrocystis* e *Ascophyllum*^[14] (figura 1.1.2.1).

L'acido alginico costituisce il componente principale della parete cellulare e si estrae sottoforma di alginato di sodio per trattamento con una soluzione acquosa alcalina. Studiato per la prima volta alla fine del XIX secolo dal chimico C.E. Stanford, che lo chiamò "Algin".

Queste alghe contengono tra il 20% e il 30% di alginato sul peso secco.



Fig. 1.1.2.1. *Fucus ascophyllum*

La composizione chimica dell'acido alginico influenza notevolmente le proprietà e la funzionalità dei polimeri risultanti.

Esso risulta essere una complessa miscela di oligopolimeri: l'acido polimannuronico (MM) (unità di acido β -D-mannuronico), l'acido poliguluronico (GG) (unità di acido α -L-guluronico) e di un polimero misto (MG) dove sono presenti anche le sequenze GGM e MMG (figura 1.1.2.2)^[15].

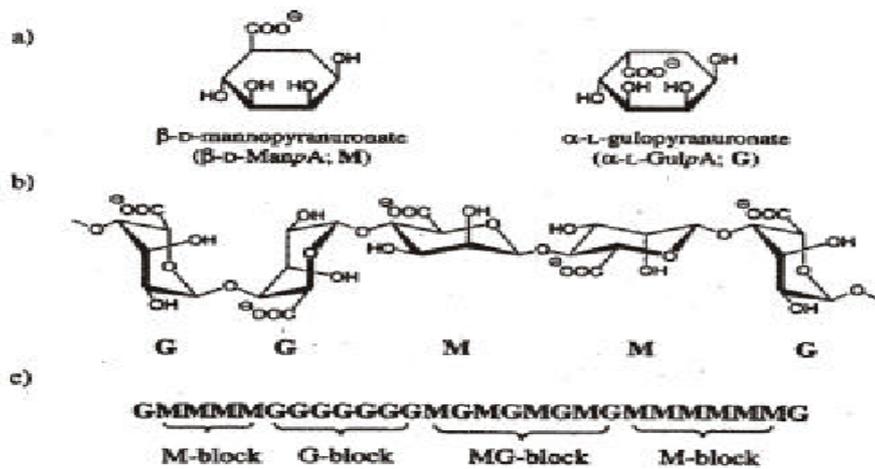


Fig. 1.1.2.2. *Struttura chimica del Sodio alginato*

Infatti inizialmente l'Acido alginico estratto dalle alghe fu definito come un polimero di acido mannuronico, ma successivamente si evidenziò la presenza di unità guluroniche oltre che mannuroniche grazie a una tecnica di "epimerizzazione enzimatica". Il prodotto finale contiene zone formate da guluroniche, aree composte da mannuronico e guluroniche e aree di mannuronico. Zone di acido mannuronico si presentano quasi "appiattite", con una struttura simile ad un nastro, in cui le unità di acido guluroniche si trovano alle due estremità. Il contenuto relativo di ciascuno di questi blocchi dipende dal tipo di alghe e, in misura minore, è influenzato dalle condizioni di crescita, mentre la sequenza di guluroniche alternata a mannuronico è sempre circa $\frac{1}{3}$ di quella di poliguluroniche ed eventualmente polimannuronico. (tabella 1).

	GGGG....	GMGM....	MMMM....
<i>Macrocystis pirifera</i>	16%	36%	48%
<i>Laminara Hyperborea</i>	57%	38%	17%

Tab. 1. *Composizione % dei costituenti l'acido alginico estratto da due tipologie di alghe*

La composizione di alginato dipende dal grado di sviluppo delle alghe.

Le giovani alghe contengono minori quantità di alginato, con minore viscosità e capacità di gelificazione. L'alginato può avere un peso molecolare fino a 100.000, a seconda del tipo di alga; la più lunga è quella del *Laminaria japonica*. L'alginato si degrada rapidamente in presenza di ossigeno sia durante la conservazione delle alghe secche prima della lavorazione, sia quando questo è stato ridotto in polvere, riducendo notevolmente la sua viscosità. La forma acida è meno stabile mentre il sale di sodio è più stabile. In soluzione è stabile tra pH 5,5 e pH 10.

1.1.2.1 Proprietà dell'alginato.

L'Alginato in forma sale di sodio, potassio o magnesio è solubile in soluzione acquosa a pH superiore a 3.5. E' anche solubile in miscele di acqua e solventi organici miscibili con essa, come l'alcool, ma insolubile nel latte, e in presenza di ioni calcio. La viscosità delle soluzioni di alginato è influenzata dalla concentrazione: a partire dal 2%, e riducendo la temperatura, la viscosità aumenta. Le soluzioni di alginato hanno un comportamento non-newtoniano, con una viscosità che diminuisce notevolmente all'aumentare della velocità di scorrimento.

La capacità di realizzare strutture tridimensionali, stabili in ambiente acquoso (*gel*), e termoirreversibili, insieme all'abilità di realizzare legami intermolecolari crociati mediante chelazione di cationi bivalenti ^[16], spiegano l'enorme interesse che il polimero esercita dal punto di vista applicativo.

Più specificamente, la formazione di gel insolubili in acqua avviene in seguito all'interazione specifica tra lo ione calcio (Ca^{2+}) ed i gruppi COO^- ed OH^- del residuo basico dell'acido poliguluronico che, avendo una struttura ripiegata su se stessa, è in grado di intrappolare lo ione in un reticolo tridimensionale stabile, continuo e termoirreversibile: non appena il sale sodico dell'alginato è posto a contatto con una soluzione contenente calcio, lo ione sodio, legato ad un gruppo carico negativamente, (COO^-) viene sostituito dallo ione calcio che a sua volta è in grado di coordinare gruppi carichi negativamente appartenenti a due catene diverse dell'omopolimero.

Si ottiene così un gel rigido dove le zone di giunzione tra le molecole danno luogo ad una particolare conformazione detta a *scatola d'uovo* (figura **Fig. 1.1.2.3**).

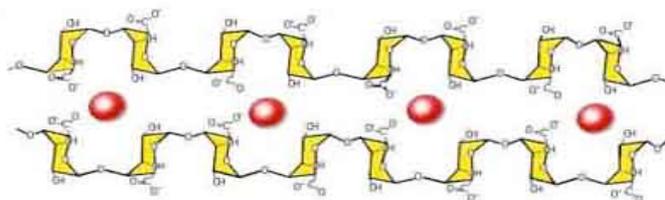


Fig. 1.1.2.3. *Rappresentazione schematica della conformazione a scatola d'uovo*

In questa rappresentazione, la parte superiore e inferiore del cartone rappresentano le catene di polisaccaridi, mentre le uova rappresentano gli ioni calcio.

Le aree guluroniche possono essere considerate come siti di legame, preferibilmente tra le catene (Figura 1.1.2.4), mentre le aree di mannuronico rappresentano l'interazione preferenziale con l'acqua.

Le catene di alginato si possono associare, a seconda della quantità di calcio, formando un gel più rigido. Per la formazione di queste strutture in modo ordinato è importante che il calcio sia incorporato lentamente, mediante un controllo della diffusione del calcio dall'esterno.

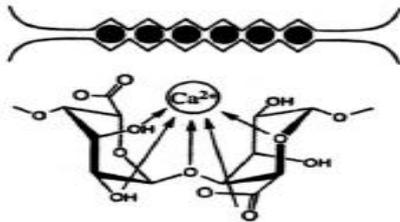


Fig. 1.1.2.4. Rappresentazione dell'interazione dello ione Ca^{++} con le catene polimeriche

1.1.3 Il Boswellin®

Il Boswellin® è un composto naturale di tipo fitoterapico e rappresenta l'estratto secco titolato della gommoresina della *Boswellia serrata* (nota come incenso) caratterizzato da notevoli proprietà antiinfiammatorie delle quali si è parlato per la prima volta nel 1996 ad opera della Nutriscience, Incorporated editore^[17].

La gommoresina della *Boswellia serrata* (figura 1.1.2.5) ha la seguente composizione:

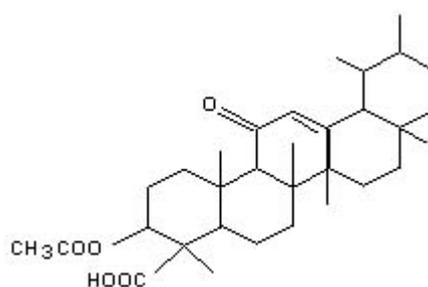
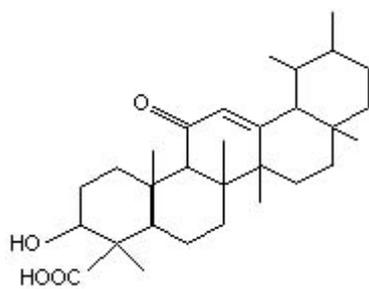
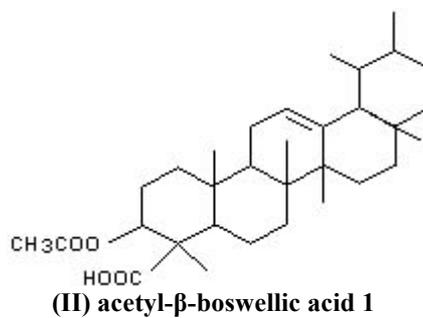
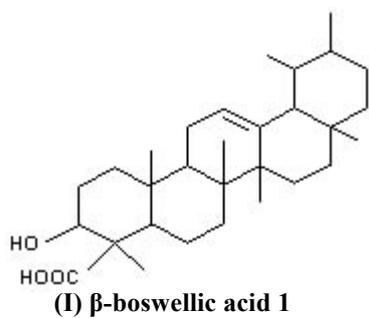
- 8-12% olii essenziali sesquiterpenici
- 45-60% polisaccaridi
- 25-35% terpenoidi più complessi , inclusi gli acidi boswellici.



Fig. 1.1.2.5. Gommoresina di *Boswellia serrata*

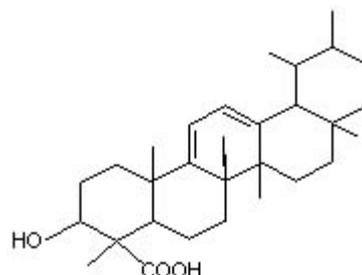
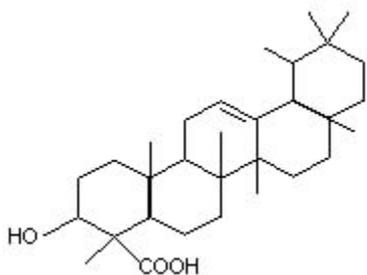
Sono stati individuati sei **Acidi Boswellici**^[18,19] di cui il β -boswellico è il maggiore costituente della miscela (figura 1.1.2.6).

Sono stati pubblicati diversi studi e brevetti, che spiegano il meccanismo attraverso il quale gli acidi boswellici inibiscono i processi d'inflammazione^[20,21].



(III) 11-keto- β -boswellic acid (KBA) 1

(IV) acetyl-11-keto- β -boswellic acid (AKBA)



(V) α -boswellic acid 1

(VI) γ -boswellic acid 1

Fig 1.1.2.6. *Struttura e composizione chimica degli acidi Boswellici*

1.1.3.1 Meccanismo dell'azione anti-infiammatoria.

L'infiammazione è un processo complesso che coinvolge una serie di azioni e /o di reazioni e una vasta gamma di sostanze biologicamente attive (ad esempio bradichinine, istamine, prostaglandine, trombossani, idrossi-acidi grassi, leucotrieni, enzimi lisosomiali e linfocine) attivate da cellule immunologiche del tessuto danneggiato^[22].

I leucotrieni ,importanti mediatori nei processi infiammatori e allergici, sono prodotti dall' acido arachidonico, un acido grasso essenziale sintetizzato nell'organismo, in seguito all'azione dell'enzima chiave 5-lipossigenasi (5-LO)^[23, 24].

In un lavoro precedente^[25], gli acidi boswellici (BA) sono stati identificati come inibitori non reversibili della 5-LO, inibendo in particolare la produzione di leucotrieni infiammatori.

Le determinazioni delle IC50 hanno mostrato che i due derivati *11-cheto*, acetilato e non (III e IV), possiedono una potente azione inibitoria dovuta alla loro struttura ottimale^[26] e risultano più potenti dello stesso acido *β-boswellico* e del suo derivato acetilato.

È stato ipotizzato che gli acidi boswellici inibiscono la 5-LO secondo due modalità differenti :

- interagiscono direttamente con 5-LO
- interagiscono con la proteina attivata dalla 5-LO.

La ricerca attuale fornisce ulteriori informazioni e dimostra che questi composti hanno un meccanismo peculiare e unico nell'inibire la 5-LO e lo stesso dicasi anche per un altro enzima pro-infiammatorio, l' elastasi leucocitaria umana (HLE)^[27,28,29].

Gli estratti di *Boswellia serrata* possono perciò essere prescritti nella terapia di numerose patologie dell'apparato osteoarticolare e non: dolori artrici, artrosi, artrite reumatoide, fibromialgie, miositi, tendiniti, periartriti, flogosi delle parti molli, reazioni allergiche bronchiali o rinosinusalì, malattie infiammatorie croniche o allergiche della

pelle. In certi casi è possibile giungere anche alla riduzione di farmaci antinfiammatori, cortisonici e non, abitualmente utilizzati.

Il nostro interesse si è rivolto in particolare all'azione terapeutica degli estratti di *Boswellia serrata* nei confronti della colite ulcerosa e Morbo di Crohn.

La colite ulcerosa è una malattia infiammatoria cronica che colpisce la mucosa rettale, colon sinistro, e in alcuni casi tutto il colon, ed è caratterizzata da sanguinamento rettale e diarrea.

In uno studio clinico^[30] 34 pazienti che soffrono di colite ulcerosa di grado II e III sono stati trattati con 350 mg di un preparato in gomma resina di *Boswellia serrata*, tre volte al giorno per 6 settimane.

Per confronto 8 pazienti con le stesse condizioni sono stati trattati con la medicina convenzionale, sulfasalazina, in dosi da 3 g al giorno.

L'efficacia del trattamento è stata determinata valutando le proprietà di *stool*, istopatologia e microscopia a scansione di biopsie rettali, e dei parametri del sangue dei pazienti (Hb, siero, ferro, calcio, fosforo, proteine, leucociti totali ed eosinofili).

Tutti i parametri testati sono migliorati dopo il trattamento con la gomma resina.

Rispetto al gruppo trattato con sulfasalazina, l'82% dei pazienti trattati con *Boswellia serrata* è andato in remissione, mentre la sulfasalazina ha dato un tasso di remissione del 75%.

1.4 Il *targeting* al colon

La veicolazione sito specifica al colon è non solo vantaggiosa per il *delivery* orale di proteine e farmaci peptidici (degradati dagli enzimi digestivi nello stomaco e nell'intestino crasso), ma anche per il rilascio di composti a basso peso molecolare, associati al trattamento di disturbi legato al Colon e intestino Crasso, quali colite ulcerosa, Morbo di Crohn, diarrea e tumori al Colon. Il Colon ha un lungo tempo di ritenzione e risulta essere sensibile agli agenti che favoriscono l'assorbimento di molecole poco biodisponibili. D'altra parte, questo può rappresentare un notevole svantaggio laddove sia necessario un *delivery* mirato del principio attivo oppure la protezione dello stesso dall'ambiente ostile del tratto gastrointestinale superiore.

Diversi sono i fattori che influiscono sul rilascio mirato di un farmaco in questo sito: a)il tipo di muco presente e inoltre più viscoso, b)la microflora residente, b)il pH, c)un'area superficiale più piccola e relativa riduzione delle *tight junctions* che possono limitare il trasporto del farmaco attraverso la mucosa e quindi alla circolazione sistemica.

Le varie strategie per la somministrazione orale di farmaci colon-sitospecifici prevedono il rivestimento del farmaco con polimeri pH-sensibili, la formulazione di sistemi a rilascio prolungato, l'utilizzo di carriers che possono essere degradati dalla microflora residente nel colon e quindi liberare il farmaco, sistemi bioadesivi. Tutti gli approcci sono mirati al trattamento locale dei disturbi associati al colon o all'assorbimento di farmaci poco biodisponibili.

Perché un sistema di rilascio colon- sito mirato abbia successo è necessario che protegga il farmaco dall'assorbimento o dalla degradazione nel tratto gastrointestinale superiore e che lo conduca al colon prossimale, che è considerato il sito ottimale per il *delivery* dei farmaci al colon ^[31].

1.5 Le beads

Le *beads* sono dei sistemi a matrice polimerica di forma sferica che differiscono dagli altri sistemi microincapsulati innanzitutto per le loro dimensioni che vanno da $\approx 400 \mu\text{m}$ a $2000 \mu\text{m}$ (le dimensioni delle microsfele vanno da $\approx 1 \mu\text{m}$ a $100 \mu\text{m}$) e poi dalla metodica di preparazione. Esse presentano una elevata area superficiale molto spesso porosa che conferisce loro notevoli proprietà adsorbenti.

Una delle caratteristiche delle *beads* è quella di rigonfiarsi nel veicolo in cui il polimero è compatibile (*swollen beads*), capacità che può essere controllata utilizzando agenti reticolanti che ne stabilizzano la superficie (figura 1.5.1).

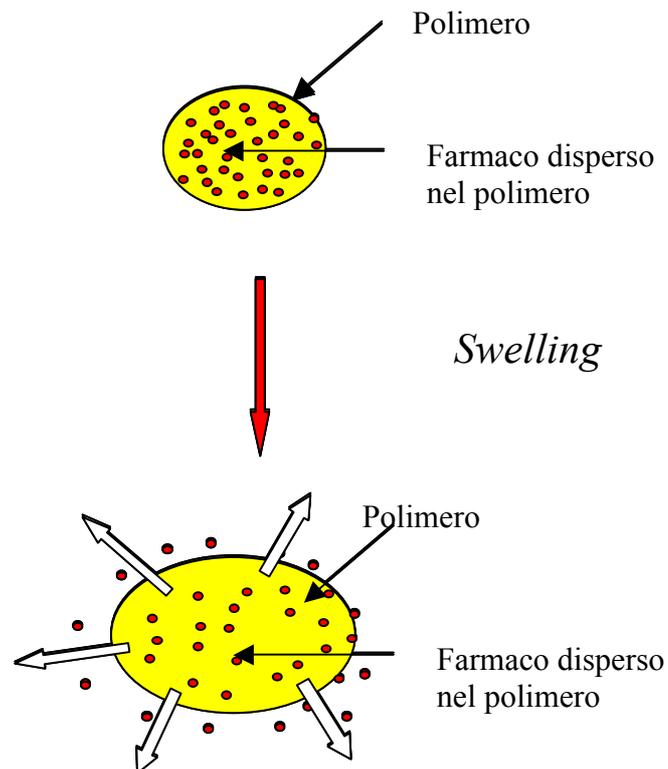


Fig. 1.5.1. Schema dello *swollen beads*

1.5.1 Metodo di preparazione

La preparazione delle *beads* si basa sulle capacità del polimero, nel nostro caso il chitosano, di interagire in diversi modi una volta solubilizzato in soluzione acida, quali:

- **Reticolazione o cross-linking covalente**

Formazione di legami-crociati attraverso interazioni chimiche come ad esempio con la glutaraldeide o altre sostanze in grado di interagire chimicamente con i gruppi amminici (-NH₂) od ossidrilici (-OH) presenti nel polimero (Figura 1.5.2);

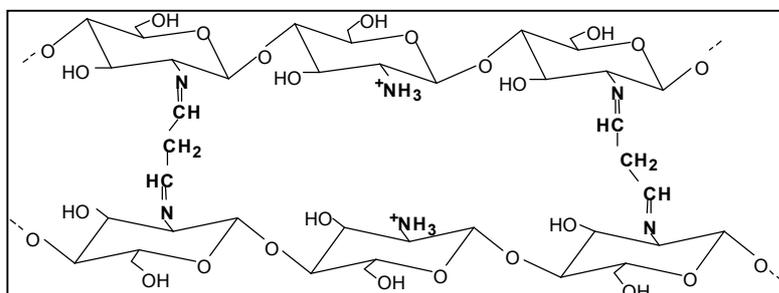


Fig. 1.5.2 Rappresentazione schematica del cross-linking covalente

- **Reticolazione o cross-linking ionica**

Formazione di legami-crociati mediante interazioni fisiche reversibili di tipo elettrostatico dovute alla presenza di cariche positive (-NH₃⁺) in grado di interagire con polianioni, quali tripolifosfato di sodio (4 cariche negative) o il pirofosfato di sodio (3 cariche negative) ecc. (Figura 1.5.3);

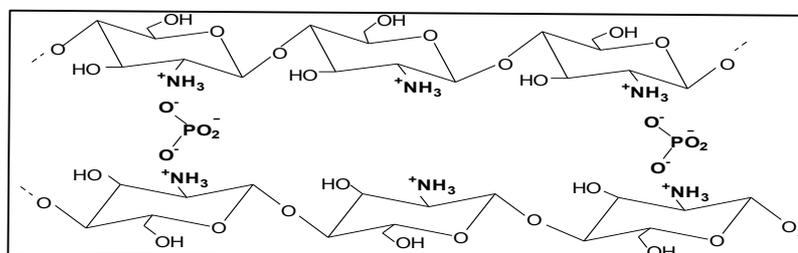


Fig. 1.5.3. Rappresentazione schematica del cross-linking ionico

- **Coacervazione**

Disidratazione e perdita dell'acqua bloccata dalle maglie del polimero, che da origine al processo di *salting-out* caratterizzato dalla formazione di un precipitato meglio definito coacervato (Figura 1.5.4.). Questo fenomeno si verifica quando la soluzione di chitosano si trova a contatto:

- con solventi in cui è poco solubile, quali l'alcool etilico o l'acetone,
- in soluzioni ad elevati valori di pH. In questo caso molto utilizzata è la soluzione di NaOH in concentrazione da 0,1M a 1 M.
- variazioni repentine di temperatura

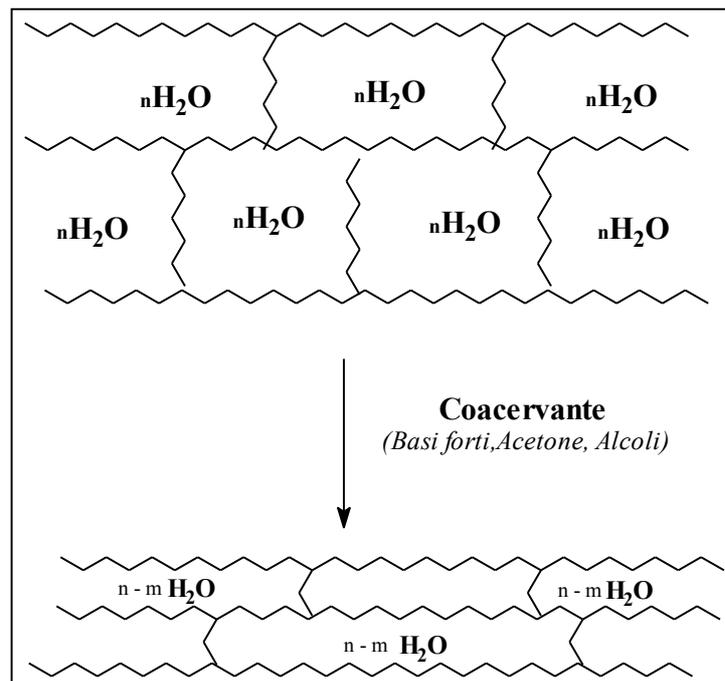


Fig. 1.5.4. Rappresentazione del processo di coacervazione

I sistemi sopra descritti possono essere utilizzati singolarmente o associati tra loro (ad esempio *cross-linking* ionico seguito da un processo di coacervazione) per far variare le proprietà delle *beads* realizzate ^[32].

In questo studio, le *beads* a base di Chitosano sono state realizzate mediante una soluzione di TPP al 5% che funziona da agente reticolante ionico con la successiva aggiunta di acetone che funziona da agente coacervante.

La formazione delle *beads* a base di Alginato di sodio è dovuta alla gelazione ionotropica per gocciolamento del polimero in un medium con presenza di ioni M^{n+} .

Sicuramente la metodica riguardante la realizzazione delle *beads* risulta quella più semplice e più versatile, in quanto si può eseguire a temperatura controllata in mezzo acquoso usando reattivi chimici fisiologicamente accettabili.

2 Beads a base di Chitosano e Alginati

2.1 Scopo del lavoro

Il primo obiettivo di questo lavoro, svolto nel Laboratorio di Tecnologia Farmaceutica e Cosmetica del Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico, è stato quello di realizzare delle dispersioni a base di due polimeri naturali, il chitosano e l'alginato di sodio, allo scopo di poter confrontare le proprietà chimico-fisiche delle stesse.

Il secondo obiettivo è stato quello di utilizzare tali dispersioni per la realizzazione delle *beads* e studiarne le loro caratteristiche quali morfologia, dimensioni, proprietà di rigonfiamento (*swelling*) in diversi veicoli, capacità incapsulante e rilascio del farmaco.

Come farmaco modello è stato utilizzato il *Boswellin*[®], estratto secco titolato di *Boswellia serrata* cortesemente fornito dalla Sabinsa Corporation, costituito da una miscela purificata di acidi boswellici (20% di *Acido-β-boswellico*) con contenuto totale di acidi organici del 70%^[19].

L'obiettivo finale è stato quello di ottenere un sistema polimerico in grado di veicolare l'agente fitoterapico in studio nei diversi tratti del sistema gastrointestinale con particolare attenzione rivolta al *targeting* colon specifico.

2.2. Parte sperimentale

2.2.1 Materiali

I materiali utilizzati sono stati: Chitosano M (Medio peso molecolare), Acido glicolico 99%, Etanolo al 96%, Sodiotripolifosfato 85%, Acido citrico, Calcio Cloruro e Bario Cloruro forniti dalla Sigma Aldrich (Germania); Polyvinyl Alcohol 72'000 è stato fornito dalla Fluka; Sodio alginato fornito dalla Galeno (Italia); Potassio Fosfato monobasico, Sodio Fosfato Bibasico Biidrato, Sodio idrogenocarbonato, Calcio cloruro Secco Granulare, Acido Acetico Glaciale forniti dalla Carlo Erba; Acetone fornito dalla J.T.Baker; Boswellin® ovvero un estratto purificato di *Boswellia Serrata* è stato gentilmente offerto dalla Sabinsa Corporation.

2.2.2 Strumenti Utilizzati

Gli strumenti utilizzati per la preparazione e la caratterizzazione delle *beads* sono riportati nella tabella 2.

Strumento	Azienda
Bilancia analitica Basic	Sartorius
Agitatore magnetico	Falc
Microprocessor pHmeter pH 211	Hanna Instruments
Viscosimetro Programmable DV-II+	Brookfield
Spettrofotometro UV U-2000	Hitachi
Microscopio Ottico Axiostar Plus	Karl Zeiss
Sonicator HD 2070	Bandelin Sonopuls
Centrifuga 4226	Vismara

Tab. 2. *Elenco degli strumenti utilizzati*

2.2.3 Metodo generale per la preparazione della dispersione di Chitosano M (1)

1) Preparazione della dispersione (1)

a	Chitosano M	0,3 g
b	Ac. Glicolico	0,3 g
c	PVA soluzione al 11,16 %	3,350 g
d	Acqua depurata q.b. a	30 g

Metodica:

Si pongono in un becker precedentemente tarato il componente **a** ed il componente **b**, si umetta il tutto con la soluzione del componente **c** ed infine si porta al peso richiesto con l'acqua depurata. La miscela risultante viene sottoposta ad agitazione magnetica per circa 40 minuti a temperatura ambiente. La dispersione così ottenuta viene conservata alla temperatura di 4 °C e lasciata a riposo per 24 ore.

2.2.4 Metodo generale per la preparazione della dispersione di Alginato di Sodio (2)

1) Preparazione delle dispersione (2)

a	Alginato di Sodio	0,75g (2,5 % p/p)
b	Acqua q.b. a	30g

Metodica:

Viene dapprima riscaldato il componente **b** e successivamente, quando questo ha raggiunto una temperatura di ~ 40°C, si disperde a porzioni la quantità del componente **a** e si lascia in agitazione fino a completa dissoluzione. Si lascia raffreddare il tutto e si riporta al peso richiesto (per compensare la quantità d'acqua persa per evaporazione).

Successivamente il *becker* viene posto in frigo alla temperatura di 4°C per 24 h.

2.2.5 Metodo generale per la preparazione delle soluzioni di BaCl₂ e CaCl₂.

1) Preparazione delle soluzioni

a	BaCl ₂ o CaCl ₂	0,6 g (2% p/p)
b	Acqua q.b. a	30g

Metodica:

Al componente **a** posto in un *becker* precedentemente tarato viene aggiunto a filo il componente **b**. Si sottopone quindi ad agitazione fino a completa dissoluzione.

2.2.6 Metodo generale per la preparazione delle *beads* di controllo di Chitosano (A)

a	Dispersione di Chitosano M (1)	5g
b	Soluzione di TPP al 5%	30 g
c	Acetone	7 ml

Metodica:

La dispersione **a** preparata secondo la metodica descritta precedentemente (dispersione **1**), viene posta all'interno dell'imbuto sgocciolatore precedentemente tarato.

Si gocciola la dispersione ottenuta nella soluzione gelificante costituita da TPP al 5% (**b**). Contemporaneamente si versano goccia a goccia 7 ml di acetone (**c**).

Terminata l'aggiunta della dispersione per gocciolamento, si pesa l'imbuto sgocciolatore, per valutare esattamente la quantità di dispersione sottoposta a gelificazione. Il tutto viene lasciato sotto blanda agitazione (50 rpm) per 45 minuti a temperatura ambiente. Passato questo tempo si lasciano, senza agitazione, a contatto con la soluzione gelificante per 24 ore.

Le *beads* così ottenute vengono filtrate e lavate con acqua distillata.

Eseguita questa operazione le *beads* vengono sgocciolate, poste per un brevissimo tempo in un disco di carta da filtro, in modo da eliminare per quanto possibile tutta l'acqua di superficie, e successivamente pesate per valutarne la resa (Wu).

2.2.7 Metodo generale per la preparazione delle *beads* di controllo di Alginato di Sodio/Cloruro di Bario(B) e Alginato di sodio/Cloruro di calcio (C)

a	Dispersione di Alginato di Sodio (2)	5g
b	Soluzione di BaCl ₂ o CaCl ₂ al 2%	30 g

Metodica:

La dispersione **a** preparata secondo la metodica descritta precedentemente (dispersione **2**) viene posta all'interno dell'imbuto sgocciolatore precedentemente tarato.

Si gocciola la dispersione ottenuta nella soluzione costituita da BaCl₂ al 2 % o da CaCl₂ al 2% (**b**). Terminata l'aggiunta della dispersione per gocciolamento, si pesa l'imbuto sgocciolatore, per valutare esattamente la quantità di dispersione sottoposta a gelificazione.

Il tutto viene lasciato sotto blanda agitazione (50 rpm) per 45 minuti a temperatura ambiente. Passato questo tempo si lasciano, senza agitazione, a contatto con la soluzione gelificante per 24 ore.

Le *beads* così ottenuti vengono filtrate e lavate con acqua distillata.

Eseguita questa operazione le *beads* vengono sgocciolati, posti per un brevissimo tempo in un disco di carta da filtro, in modo da eliminare per quanto possibile tutta l'acqua di superficie, e successivamente pesati per valutarne la resa (Wu).

2.2.8 Preparazione della soluzione etanolica di Boswellin® al 10%

a	<u>Boswellin®</u>	5g
b	Etanolo 96° q.b. a	50 g

Metodica:

Al componente **a** posto in un *becker* precedentemente tarato viene aggiunto a filo il componente **b**. Si sottopone quindi ad agitazione fino a completa dissoluzione.

2.2.9 Determinazione del pH della soluzione etanolica di Boswellin®

La determinazione del pH della soluzione etanolica di Boswellin® al 10 % è stata eseguita utilizzando il pH metro "HANNA pH 211" alla temperatura di 25° C.

Le analisi sono state eseguite in triplicato. Il valore di pH risultante è pari a $4,81 \pm 0,1$.

2.2.10 Determinazione del pH delle dispersioni con e senza Boswellin®

La determinazione del pH è stata eseguita direttamente sulle dispersioni utilizzando il pH metro "HANNA pH 211" alla temperatura di 25° C. Le analisi sono state eseguite in triplicato, e i risultati ottenuti sono riportati nella tabella 3.

DISPERSIONE	pH	pH con <u>Boswellin®</u>
1. (Chitosano M)	$3,39 \pm 0,1$	$3,45 \pm 0,1$
2. (Alginato di Sodio)	$6,86 \pm 0,1$	$6,48 \pm 0,1$

Tab.3. Valori di pH delle dispersioni polimeriche realizzate senza e con Boswellin®

2.2.11 Metodo generale per la preparazione dei beads a base di Chitosano contenenti Boswellin® (A1)

a	Soluzione etanolica di <i>Boswellin</i> ® al 10%	0,5g
b	Dispersione di Chiosano M	5g
c	Soluzione di TPP al 5%	30g
d	Acetone	3,5 ml

Metodica:

Con l'aiuto di una spatola si miscela bene la dispersione di Chitosano (**b**) con una quantità perfettamente pesata della soluzione etanolica di *Boswellin*® (**a**).

Successivamente si versano ~5 g della dispersione così preparata all'interno dell'imbuto sgocciolatore precedentemente tarato.

Si gocciola la dispersione ottenuta nella soluzione gelificante costituita da TPP al 5% (**c**). Contemporaneamente si versano goccia a goccia 3,5 ml di acetone (**d**). Terminata l'aggiunta della dispersione per gocciolamento, si pesa l'imbuto sgocciolatore, per valutare esattamente la quantità di dispersione sottoposta a gelificazione.

Il tutto viene lasciato sotto blanda agitazione (50 rpm) per 45 minuti a temperatura ambiente. Passato questo tempo si lasciano, senza agitazione, a contatto con la soluzione gelificante per 24 ore.

Le *beads* così ottenute vengono filtrate e lavate con acqua distillata.

Eseguita questa operazione le *beads* vengono sgocciolate, poste per un brevissimo tempo in un disco di carta da filtro, in modo da eliminare per quanto possibile tutta l'acqua di superficie e successivamente pesate per valutarne la resa (Wu).

2.2.12 Metodo generale per la preparazione delle *beads* a base di Alginato/Ba⁺⁺ e Alginato/Ca⁺⁺ contenenti Boswellin® (B1 e C1)

a	Soluzione etanolica di <i>Boswellin</i> ® al 10%	0,5g
b	Dispersione di Alginato di Sodio	5g
c	Soluzione di BaCl ₂ o CaCl ₂ al 2%	30g

Metodica:

Una quantità perfettamente pesata della soluzione etanolica di *Boswellin*® (**a**) si miscela omogeneamente alla dispersione (**b**).

Con l'aiuto di una spatola si versano ~5 g della dispersione così preparata all'interno dell'imbuto sgocciolatore precedentemente tarato.

Si gocciola la dispersione ottenuta nella soluzione gelificante costituita dalla soluzione di BaCl₂ o CaCl₂(**c**).

Terminata l'aggiunta della dispersione per gocciolamento, si pesa l'imbuto sgocciolatore, per valutare esattamente la quantità di dispersione sottoposta a gelificazione.

Il tutto viene lasciato sotto blanda agitazione (50 rpm) per 45 minuti a temperatura ambiente. Passato questo tempo si lasciano, senza agitazione, a contatto con la soluzione gelificante per 24 ore.

Le *beads* così ottenute vengono filtrate e lavate con acqua distillata.

Eseguita questa operazione le *beads* vengono sgocciolate, poste per un brevissimo tempo in un disco di carta da filtro, in modo da eliminare per quanto possibile tutta l'acqua di superficie e successivamente pesati per valutarne la resa (Wu).

Si sono così ottenuti *sei* diversi **campioni delle beads** (vedi tabella 4), ciascuno dei quali realizzato per ben cinque volte, per verificare la ripetibilità e la precisione delle analisi eseguite successivamente.

Campioni beads	Dispersione	Soluzione etanolica di Boswellin® al 10%
A	Chitosano M	-
A1	Chitosano M	0,99 %
B	Alginato di Bario	-
B1	Alginato di Bario	0,99 %
C	Alginato di Calcio	-
C1	Alginato di Calcio	0,99 %

Tab. 4. *Elenco dei campioni preparati*

2.2.13 Misure di viscosità delle dispersioni di Chitosano M e Alginato di sodio

Le misurazioni di viscosità sono state condotte mediante il viscosimetro rotazionale programmabile **Brookfield modello LVDV-II+** e utilizzando lo "*small sample adapter*" con il girante 25.

Questo adattatore è risultato essere ideale per le nostre determinazioni in quanto consente di misurare la viscosità anche di piccole quantità di campione nell'ambito dei range di *shear rate* e cP ottenuti operando con velocità operazionali comprese tra 0,1 e 200 rpm, uno *shear rate* compreso tra 0-264 s⁻¹ e viscosità comprese tra 1,5 e 30000 centipoise.

La temperatura nelle diverse determinazioni è stata mantenuta costante a 25°C per mezzo di un bagno termostatico modello HAAKE*FE2-ENCO collegato allo *small sample adapter*.

Inoltre, si è scelto di utilizzare la funzione del viscosimetro "time to stop" che permette di effettuare la misura della viscosità ad un tempo prestabilito dall'inizio della misurazione.

Per ogni dispersione è stato scelto un tempo ottimale determinato in seguito ad una serie di prove preliminari (durata media: 30s).

2.2.14 Valutazione della resa del campione A1 (Chitosano M)

La resa del campione è stata valutata sul peso ad umido (W_u) dei *beads* appena fatti e sgocciolati su un sottile strato di carta da filtro e sul loro peso a secco (W_s), ottenuto ponendoli in essiccatore per 24 h.

Per il calcolo della resa si è tenuto conto di diversi passaggi critici nel corso della preparazione. Uno di questi è costituito dal residuo della dispersione rimasto adeso nell'imbuto sgocciolatore dopo la realizzazione delle *beads*. I valori in peso considerati sono riportati nello schema successivo.

Peso teorico componenti della dispersione	W_{tot}
Peso perso al passaggio critico	W_c
Peso finale della dispersione realmente utilizzata	W_f
Peso dei componenti iniziali esclusa l'acqua*	W_e
Peso teorico del campione decurtando il 60% di acqua	W_t
Peso ottenuto dopo sgocciolamento dei beads nella carta	W_u
Peso ottenuto dopo essiccamento	W_s

*[chitosano + Ac Glicolico + PVA + Boswellin®]

* $W_t = [(W_f - W_e) - 60\% \text{ Acqua}] + W_e$

La Resa % (**R%**) sarà pertanto calcolata secondo la seguente equazione

$$R\% = \frac{W_u}{W_t} \times 100$$

2.2.15 Valutazione della resa del campione B1 (Alginato di Bario) e del campione C1 (Alginato di Calcio).

La resa del campione è stata valutata sul **peso ad umido** (W_u) dei *beads* appena fatti e sgocciolati su un sottile strato di carta da filtro e sul loro **peso a secco** (W_s), ottenuto ponendoli in essiccatore per 24 h.

Per il calcolo della resa si è tenuto conto di un passaggio critico costituito dal residuo della dispersione nell'imbuto sgocciolatore dopo il suo inserimento nel *becker* contenente la soluzione gelificante come illustrato nello schema successivo.

Peso teorico componenti della dispersione	W_{tot}
Peso perso al passaggio critico	W_c
Peso finale della dispersione realmente utilizzata	W_f
Peso dei componenti iniziali esclusa l'acqua*	W_e
Peso teorico del campione decurtando il 30% di acqua*	W_t
Peso ottenuto dopo sgocciolamento dei <i>beads</i> nella carta	W_u
Peso ottenuto dopo essiccamento	W_s

*[Alginato di Bario o Alginato di Calcio + Boswellin®]

* $W_t = [(W_f - W_e) - 30\% \text{ Acqua}] + W_e$

La Resa % (**R%**) sarà pertanto calcolata secondo la seguente equazione

$$R\% = \frac{W_u}{W_t} \times 100$$

2.2.16 Valutazione delle dimensioni (ad umido e a secco)

Le *beads* (ottenute da un campione di dispersione pari a circa 5g) dopo essere stati sgocciolate e risciacquate con acqua distillata, vengono disposte su carta da filtro e divise in aliquote di 20 *beads* ciascuno. Vengono quindi pesate (W_u) e conservate in essiccatore.

Il peso e le dimensioni delle *beads* essiccate sono state rilevate dopo 24 h di trattamento in essiccatore (W_s).

Le dimensioni delle *beads* essiccate sono state valutate mediante un microscopio ottico Carl Zeiss *AXIOSTAR PLUS* (transmitted-light) ad ingrandimento 5x, dotato di fotocamera SONY DSC-575/585, collegata ad un programma computerizzato.

2.2.17 Saggio di STRESS alla centrifuga

Il saggio è stato condotto sottoponendo un campione di 20 *beads*, in acqua distillata, a 3 cicli successivi di centrifuga per un periodo di 15 minuti ed ad una velocità di 3000 rpm.

2.2.18 Saggio di STRESS agli ultrasuoni

Il saggio è stato condotto sottoponendo un campione di 20 *beads*, in acqua distillata, a 3 cicli successivi di ultrasuoni mediante il Sonicatore Bandelin secondo la modalità di: 10 minuti, Ciclo continuo, ampiezza d'onda 50%.

2.2.19 Swelling- ratio in diversi medium (NaCl 0,9% p/v, HCl 0,1N – pH 1, tampone (Na₂HPO₄/KH₂PO₄) – pH 7,4)

Vengono sottoposte al saggio le *beads* essiccate. Per ogni campione realizzato vengono prelevate tre aliquote da 10 *beads*, ed introdotte in 100 ml di una delle soluzioni di swelling sopra riportate.

A tempi ben stabiliti (30 minuti, 1 ora e 24 ore) si verificano le variazioni di peso e di dimensione delle *beads* sottoposte al saggio.

Si determina perciò il rapporto

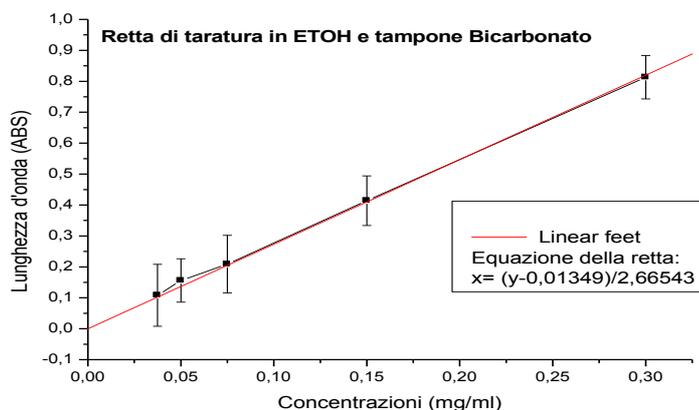
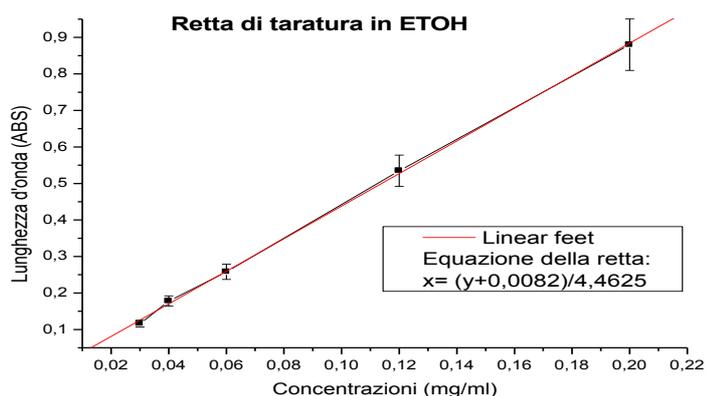
$$\text{Swelling ratio} = W_{st}/W_{s0}$$

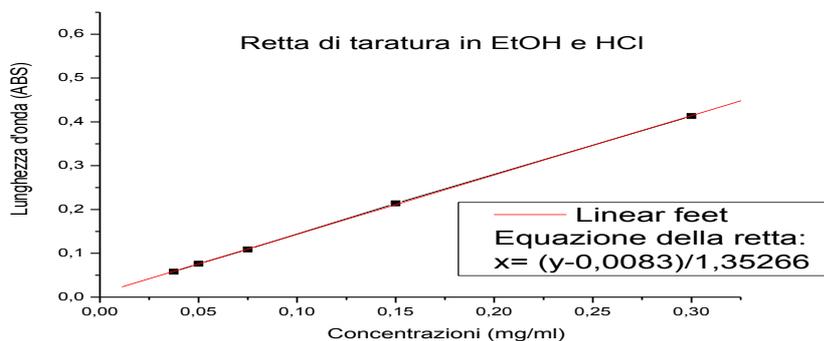
dove: W_{st} = il peso delle *beads* ad un tempo t prestabilito

W_{s0} = il peso delle *beads* al tempo 0

2.2.20 Analisi spettrofotometrica

Per poter determinare le proprietà delle *beads* realizzate in funzione delle concentrazioni di Boswellin[®], è stato necessario determinare i valori di lunghezza d'onda alla massima assorbanza ($\lambda = 249 \text{ nm}$) relativi a soluzioni costituite da Boswellin[®] in EtOH, EtOH e tampone carbonato, EtOH e HCl 0,1 N. Si sono perciò costruite tre diverse rette di taratura utilizzando diverse concentrazioni di Boswellin[®].





Determinata la retta di taratura del Boswellin® nelle diverse soluzioni si sono potuti determinare :

1. Capacità incapsulante delle *beads*
2. Titolo di Boswellin® nelle *beads*
3. Proprietà di rilascio del Boswellin® dalle *beads*

2.2.21 Capacità incapsulante delle *beads*

Per valutare la capacità di incapsulare la soluzione etanolica di Boswellin® da parte dei campioni delle *beads* realizzate, è stato importante determinare la resa % sia dei campioni a umido che dei campioni a secco, considerando che alcune quantità della dispersione di partenza viene persa durante i vari passaggi relativi alla fase di preparazione, quali:

- Residuo nel becker
- Residuo nel sistema sgocciolatore

In più bisogna considerare che una parte di acqua della dispersione di partenza viene ceduta al mezzo durante la fase di gelificazione delle *beads*, per cui il peso di partenza si deve ridurre dal 30 al 60%.

La determinazione del contenuto di Boswellin® nelle *beads* realizzate viene eseguita analizzando una soluzione etanolica ottenuta da un campione di *beads*, di peso noto, sottoposto ad una metodica di distruzione consistente in un trattamento ad ultrasuoni.

L'analisi della soluzione è stata eseguita utilizzando uno spettrofotometro UV alla lunghezza d'onda (λ) di **249 nm**, dove il Boswellin® presenta il suo massimo assorbimento.

Si pesano circa 10 *beads* e vengono poste in una provetta contenente 5 ml di acqua distillata. La provetta viene sottoposta a un processo di ultrasuoni e lasciata sonicare per 10 minuti con un Ciclo continuo e un'ampiezza del 50%.

Si ripetono in totale 3 cicli e alla fine di ogni ciclo si filtra la soluzione, la quale verrà successivamente analizzata allo spettrofotometro UV "U-200 Spectrophotometer Hitachi".

2.2.22 Calcolo della % Incapsulante

Per determinare la % incapsulante (E%) dei campioni delle *beads* realizzate si utilizzano due espressioni matematiche da noi elaborate nelle quali si rapportano i seguenti valori:

- Quantità in peso del farmaco utilizzato nella dispersione (**Q**).
- Quantità in peso delle *beads* teoricamente ottenibili (W_t).*¹
- Quantità in peso dei *beads* umidi effettivamente ottenuti (**W_u**).
- Quantità teorica in peso del farmaco sulla W_u (**Za**).
- Quantità di farmaco effettivamente presente sul W_u in base alla metodica di rottura (**D**) e analisi allo Spettrofotometro UV.

¹ Il valore di (W_t) si calcola come riportato nella tabella relativa al calcolo della resa

Da cui:

$$Z_a = Q \frac{W_u}{W_t} \quad (1)$$

$$E\% = \frac{D}{Z_a} \cdot 100 \quad (2)$$

2.2.23 Calcolo del Titolo % in Boswellin® nei campioni di beads

Il valore del Titolo % in *Boswellin*® nei campioni di *beads* si ottiene mettendo in rapporto la quantità di *Boswellin*® ottenuta dalla metodica della distruzione (**D**) con il peso dei campioni di *beads* ottenuti a secco (**W_s**) (vedi valori riportati nella tabella della resa relativa ad ogni campione).

Da cui:

$$\text{Titolo \%} = \frac{D}{W_{rs}} \cdot 100$$

2.2.24 Metodica di Rilascio

Gli studi di rilascio sono stati eseguiti utilizzando l'apparecchio di dissoluzione ERWEKA DT munito di cestello rotante, termostato e sistema di controllo per il numero di giri, seguendo la metodica riportata nella F.U. XII.^[33]

Una quantità nota di *beads* per ogni serie realizzata, tali da contenere la stessa quantità nota di *Boswellin*®, viene inserita nel cestello rotante.

Come mezzo di rilascio sono state utilizzate due soluzioni a diversi valori di pH:

✓ una soluzione di tampone fisiologico di Bicarbonato di sodio a pH 7,4, alla temperatura di 37°C;

✓ una soluzione di HCl 0,1 N a pH 1, alla temperatura di 37°C

Si procede quindi effettuando dei prelievi a intervalli di tempo stabiliti fino ad un tempo massimo di 24 ore, ripristinando il volume prelevato con un uguale quantità della soluzione di rilascio.

Lo stesso studio viene eseguito su un corrispondente campione di *beads* senza Boswellin®, allo scopo di verificare che non vi siano interferenze nella lettura allo spettrofotometro UV alla stessa lunghezza d'onda d'esercizio (**λ 249 nm**).

I tempi scelti per i prelievi sono i seguenti: 10-20- 40-60-120 180 1440 minuti.

2.3 Risultati e discussione

2.3. 1 Misure di Viscosità apparente delle dispersioni di chitosano e di alginato di sodio.

Le proprietà reologiche delle dispersioni polimeriche sono di primaria importanza quando il loro impiego riguarda la realizzazione di forme farmaceutiche per le quali il comportamento di flusso risulta determinante per la loro corretta formulazione.

E' noto, infatti, il loro utilizzo nelle preparazioni bifasiche nelle quali, anche se termodinamicamente instabili, la presenza di veicoli strutturati permette di renderle cinematicamente stabili per il periodo di validità richiesto.

Nella realizzazione di sistemi particellari le proprietà reologiche delle dispersioni polimeriche possono giocare un ruolo fondamentale nelle loro principali proprietà quali: dimensioni, capacità incapsulante, rilascio del farmaco in essi incorporato, ecc.

Mediante l'utilizzo di un viscosimetro a corpo rotante [**Brookfield modello LVDV-II+**] che permette di eseguire delle analisi su piccoli volumi di campione, si può risalire alle principali caratteristiche reologiche delle dispersioni ottenute a base di Chitosano M e Alginato di sodio.

Sono state inizialmente condotte una serie di prove preliminari volte a stabilire la concentrazione ottimale di Alginato di sodio da utilizzare per avere valori di viscosità paragonabile a quello del Chitosano M all'1%, la quale è risultata la concentrazione ottimale per questo tipo di studio.

La figura 2.3.1 riporta i diversi valori di viscosità apparente ottenuti a 140 rpm, mettendo a confronto le dispersioni a base di Alginato di sodio e la dispersione di Chitosano presa come punto di riferimento.

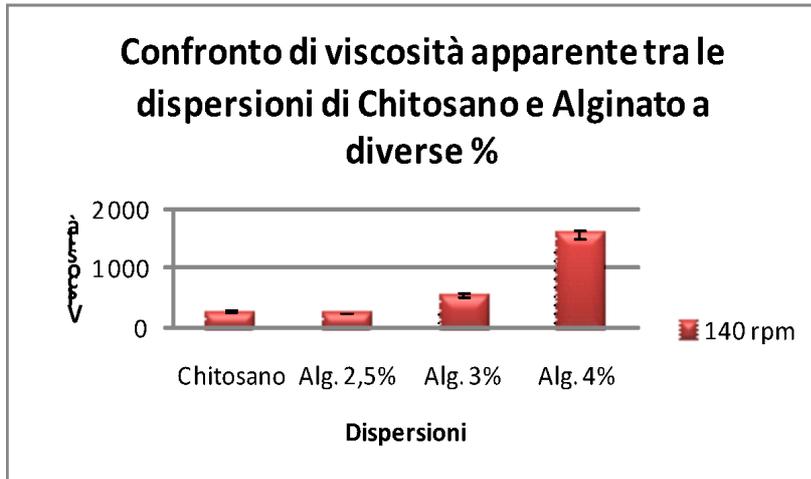


Fig. 2.3.1 Confronto della viscosità apparente a 140 rpm delle dispersioni realizzate.

Si può evidenziare che la dispersione **2** (Alginato di sodio al 2,5%) è quella che presenta il valore di viscosità apparente più simile a quella di chitosano e perciò gli studi successivi verranno indirizzati su questa dispersione.

Di seguito si riporta un grafico (figura 2.3.2) che mette in relazione il valore di viscosità apparente in *centiPoise* – *cP*, rilevato a diversi valori di *rpm*, delle due dispersioni messe a confronto.

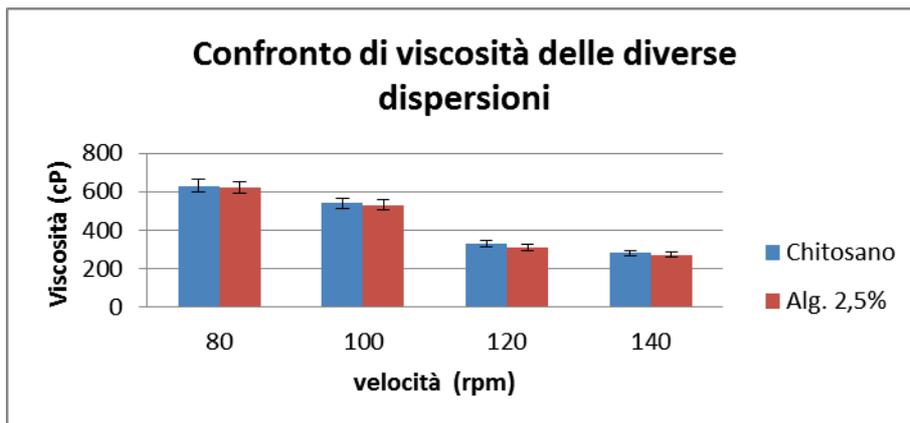


Fig. 2.3.2. Confronto viscosità apparente a diversi rpm delle dispersioni realizzate.

Si osserva come anche a diversi valori di *rpm* la differenza di viscosità apparente tra le due dispersioni non subisce particolari variazioni di comportamento.

Altri studi reologici riguardano la valutazione del comportamento di flusso rilevato sia all'aumentare che e al diminuire dei giri (*rpm*) esercitati dallo *spindle* nella dispersione, allo scopo di verificare la presenza o meno di fenomeni tissotropici (*area d'isteresi*) (figura 2.3.3 e figura 2.3.4).

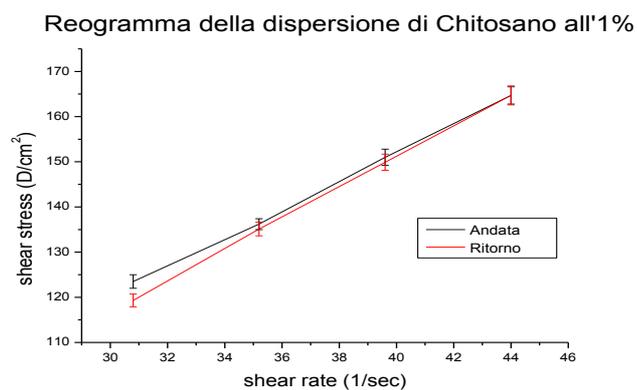


Fig. 2.3.3. Reogramma della dispersione di Chitosano all'1%

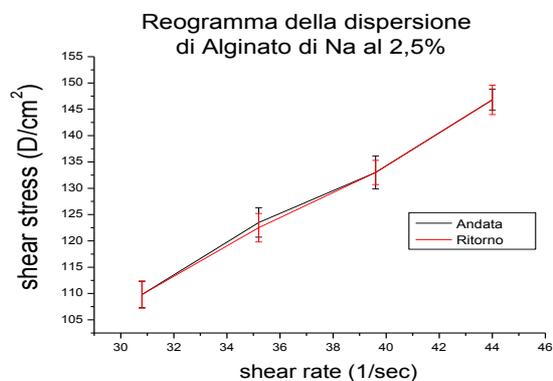


Fig. 2.3.4. Reogramma della dispersione di Alginato di sodio al 2,5%

Anche in questo caso le due dispersioni presentano un comportamento di flusso tra loro paragonabile all'aumentare dello *shear stress*, con la presenza di un'area d'isteresi molto piccola.

Mettendo a confronto i due reogrammi si osserva un comportamento di flusso paragonabile di tipo pseudoplastico (figura 2.3.5).

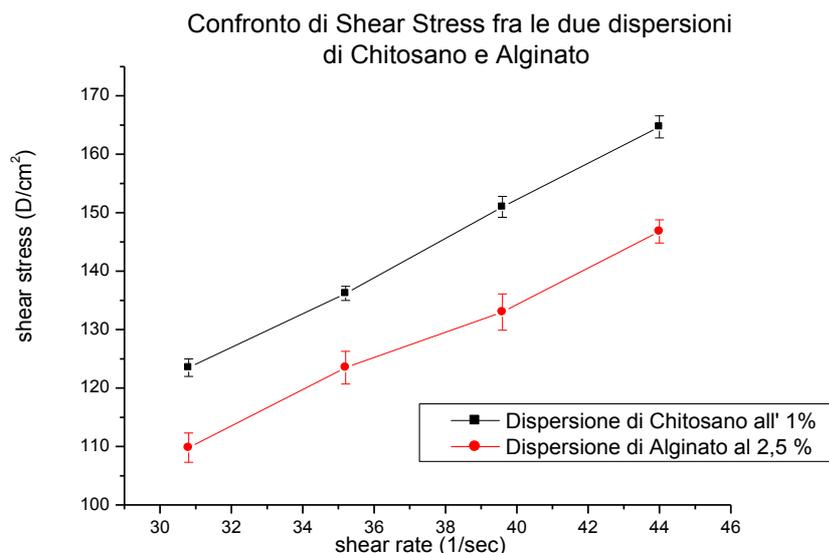


Fig. 2.3.5. Confronto del comportamento di flusso delle dispersioni realizzate

2.3.2 Comportamento all'evaporazione

Questo saggio, eseguito in accordo con il metodo standard UNE 55-902-85 ^[36] per la determinazione di sostanze volatili e del contenuto in acqua, permette di determinare la perdita d'acqua che avviene nelle dispersioni, a temperatura ambiente, nell'arco di un tempo stabilito.

Tale determinazione rende conto della capacità gelificante del polimero nei confronti del veicolo e quindi della densità delle maglie, realizzate dalle catene polimeriche all'interno della struttura del gel. I risultati ottenuti evidenziano la loro importanza per valutare i tempi di formazione delle *beads*, in quanto la metodica di realizzazione passa attraverso un processo di

disidratazione della dispersione dovuta alla reticolazione del polimero da parte della soluzione ionotropica utilizzata e al processo di coacervazione.

La figura 2.3.6 riporta il grafico relativo alla perdita d'acqua manifestata dalle due dispersioni nell'arco di sette giorni mentre la figura 2.3.7 riporta il valore dell'evaporazione finale ottenuta.

Come si può osservare il comportamento all'evaporazione delle dispersioni differisce per lo più al terzo e quarto giorno, nei quali la dispersione di Alginato di sodio manifesta una maggiore perdita d'acqua che comunque si pareggia nel valore finale in quanto risulta praticamente identica a quella manifestata dalla dispersione di chitosano.

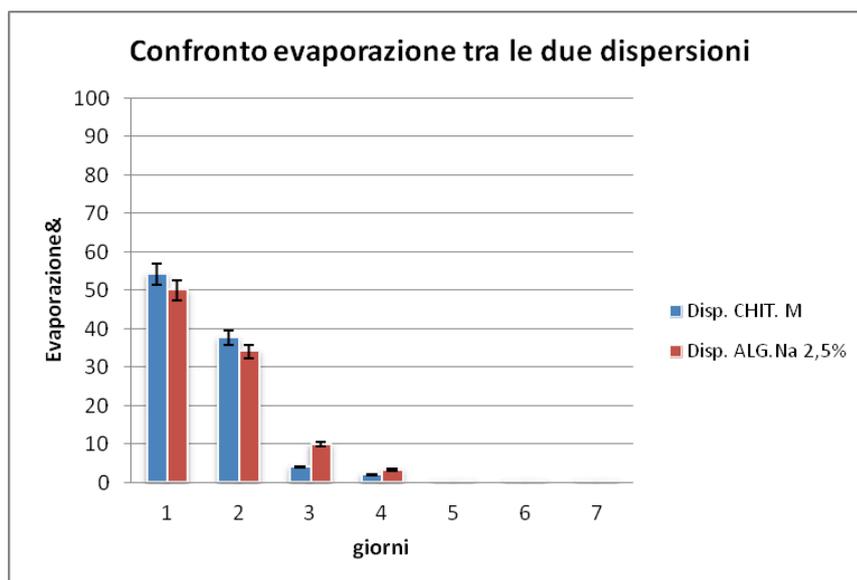


Fig. 2.3.6. *Confronto al saggio di evaporazione delle dispersioni in studio*

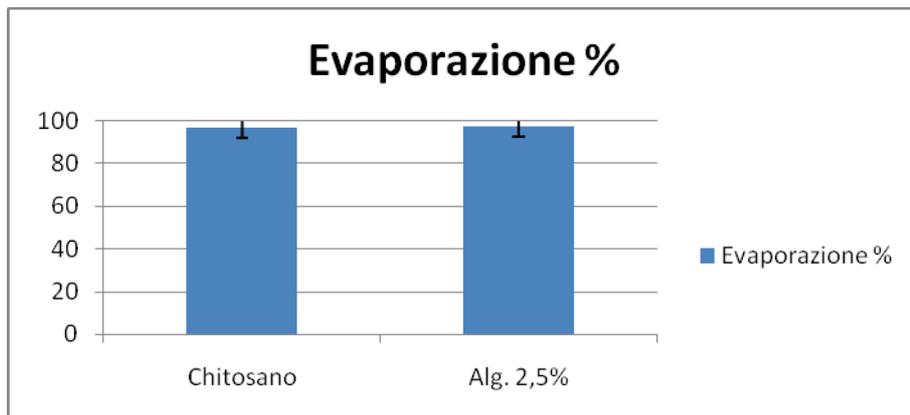


Fig. 2.3.7. Confronto tra la % di evaporazione delle dispersioni in studio

2.3.3 Preparazione delle beads

Nel nostro studio le *beads* a base di chitosano sono state realizzate attraverso l'utilizzo di una soluzione di TPP al 5% che funziona da agente reticolante ionico con la successiva aggiunta di acetone che funziona da agente coacervante.

La formazione delle *beads* a base di Alginato di sodio è dovuta alla gelazione ionotropica delle goccioline di dispersione per mezzo degli ioni M^{n+} .

Le unità di poliguluronato nelle molecole di alginato formano una struttura chelata con gli ioni metallici chiamata *Junction egg-box* (*scatola d'uovo*) con interstizi nei quali i cationi sono impaccati in una struttura chelata e coordinata.^[34]

Le giunzioni tra i canali formati in questo modo sono cineticamente stabili anche nei confronti di processi di dissociazione^[35], mentre le unità di polimannurato mostrano le normali caratteristiche polielettrolitiche dei cationi leganti.

Questi due tipi di interazioni sono illustrate nella figura 2.3.8.

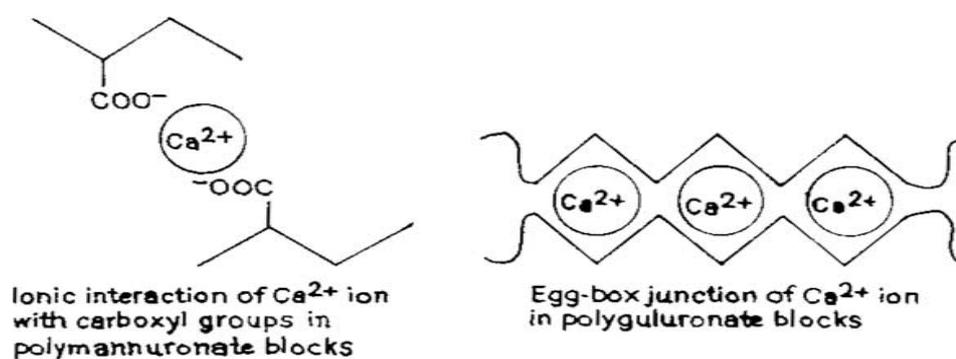


Fig. 2.3.8. Interazioni di legame con gli ioni Calcio e gruppi COO⁻ nelle beads di calcio alginato.

Il meccanismo di gelazione per ottenere le *beads* di alginato di sodio dipende da diversi fattori, primo fra tutti la valenza e le dimensioni dello ione utilizzato per la reticolazione.

Per esempio ioni monovalenti e il magnesio Mg^{++} non danno origine alla gelazione^[34] mentre gli ioni bario Ba^{++} producono *beads* di struttura molto più densa rispetto a quelli ottenuti con gli ioni calcio .

Ciò è dovuto anche alle dimensioni dello ione Ba^{++} che presenta un raggio ionico di 1.74 Å in confronto allo ione Ca^{++} (1.14 Å). Esso occuperà perciò uno spazio molto maggiore tra le molecole di alginato dando origine ad un arrangiamento più compatto con minori spazi vuoti come mostrato nella figura 2.3.9.

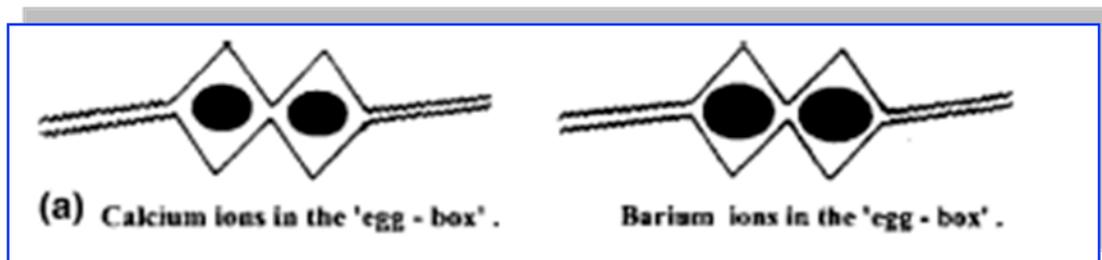


Fig. 2.3.9. Modello “scatola d’uovo” rappresentante le grandi dimensioni degli ioni bario che interagiscono con l’alginato in confronto allo spazio occupato dagli ioni calcio.

Si è perciò proceduto alla realizzazione di due campioni di *beads* a base di alginato di sodio utilizzando in un primo caso una soluzione al 2% di cloruro di calcio e in un secondo caso una soluzione di cloruro di bario al 2%.

2.3.3.1 Metodica per la realizzazione delle *beads*

Una volta scelto il processo di gelificazione per l’ottenimento delle *beads*, la procedura di preparazione consiste nel far gocciolare la dispersione polimerica, attraverso un sistema di gocciolamento del quale si conosce il diametro del foro (0,45

mm), nella soluzione contenente l'agente gelificante, tenuta sotto lenta agitazione magnetica e meccanica (figura 2.3.10).

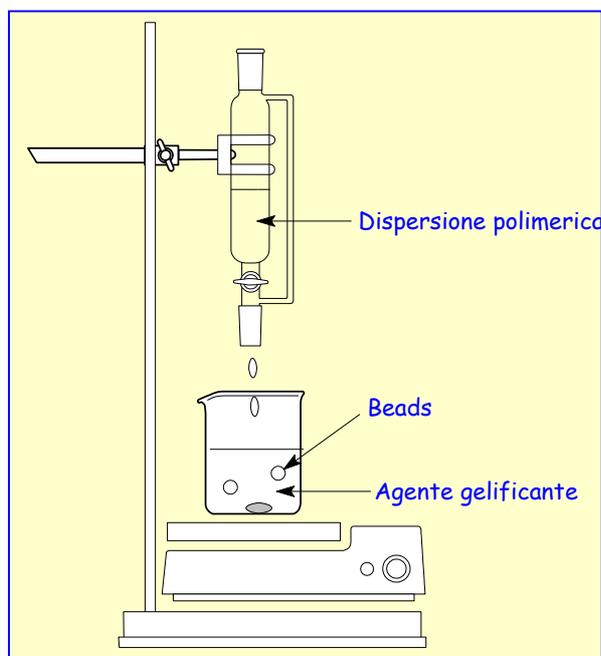


Fig. 2.3.10. *Apparecchio utilizzato per la realizzazione delle beads*

Il tempo di reticolazione può risultare diverso a seconda del tipo di polimero utilizzato per la dispersione polimerica e può quindi variare dai 15 minuti alle 1-2 ore.

Passato questo tempo le *beads* vengono filtrate e lavate più volte con acqua distillata fino a soluzione neutra, asciugate in carta da filtro per eliminare l'acqua residua di superficie e quindi utilizzate così come tali o essiccate, attraverso l'utilizzo di un essiccatore, fino a peso costante per eseguire le analisi successive (figura 2.3.11).



Fig. 2.3.11. *Beads di alginato di calcio appena filtrate*

Allo scopo di mettere a confronto le diverse proprietà, sono state così realizzate tre tipologie di *beads*:

- ✓ *Beads* di Chitosano
- ✓ *Beads* di Alginato di Calcio
- ✓ *Beads* Alginato di Bario

In particolare si sono ottenuti sei campioni di *beads* dei quali tre incapsulanti *Boswellin*[®] (Tabella 5), che a loro volta sono stati realizzati cinque volte per verificare la ripetibilità e la precisione delle analisi eseguite per caratterizzare il prodotto.

Campioni beads	Dispersione	<i>Boswellin</i>[®] al 10% in EtOH	Resa%
A	Chitosano M	-	
A1	Chitosano M	0,99 %	54,16
B	Alginato di Bario	-	
B1	Alginato di Bario	0.99 %	68,74
C	Alginato di Calcio	-	
C1	Alginato di Calcio	0.99 %	79.77

Tab. 5. *Elenco dei campioni preparati*

Ogni campione viene suddiviso in diverse parti per eseguire i seguenti saggi:

1. Morfologia e dimensioni (ad umido e a secco)
2. Comportamento allo swelling valutato in:
 - ✓ soluzione di NaCl 0,9%
 - ✓ soluzione di HCl 0,1N
 - ✓ Soluzione tampone fosfato a pH 7,4

-
3. Saggi di stabilità
 4. Valutazione della resa sul peso ad umido.
 5. Capacità incapsulante e titolo in *Boswellin*[®]
 6. Rilascio del farmaco a pH 1 e in tampone bicarbonato a pH 7.4 nell'arco delle 24 h

2.3.3.2 Morfologia e dimensioni

Le dimensioni e la morfologia delle *beads* allo stato secco (nel caso delle *beads* a base di chitosano anche allo stato umido) sono state determinate utilizzando un microscopio ottico Carl Zeiss AXIOSTAR PLUS (transmitted light) a tre ingrandimenti, dotato di telecamera , collegato ad un programma computerizzato in grado di valutare le dimensioni esatte dei *beads*.

Il confronto delle dimensioni delle diverse tipologie di *beads* ad umido e a secco (eseguito su un campione di 20 *beads*), espresso in valori di riduzione delle dimensioni (calcolato come diametro medio \emptyset %), è stato messo in relazione anche alla perdita % in peso (**P** %) dopo essiccamento come riportato nel grafico (figura 2.3.12).

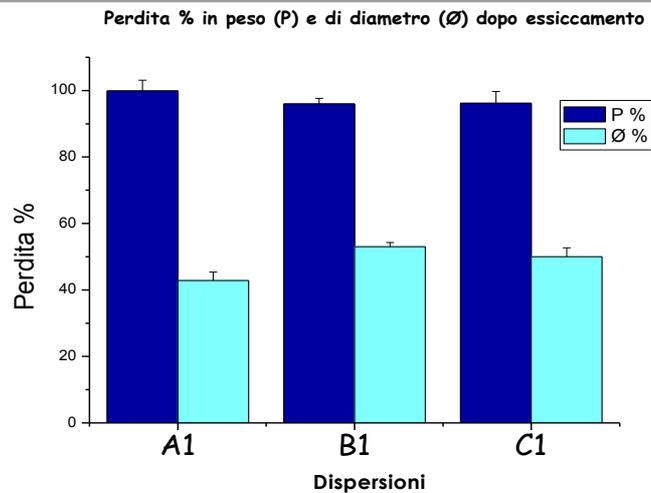


Fig. 2.3.12. Confronto della perdita in peso P% e di diametro medio \emptyset %, passando da beads appena realizzate a beads essiccate di tutti i campioni realizzati.

Come si osserva non ci sono particolari differenze tra le diverse tipologie di *beads* nei valori espressi in %, ma bisogna mettere in evidenza che le *beads* di chitosano sono notevolmente più piccole (\emptyset medio 2,1 mm) rispetto alle *beads* a base di alginato (\emptyset medio 3,0 -3,8 mm).

Da un punto di vista morfologico si osserva un comportamento diverso:

- campione A1 (chitosano): la forma sferica e l'aspetto opalescente caratteristico delle *beads* appena formate viene praticamente perso una volta che queste vengono sottoposte ad essiccamento, presentando una forma irregolare e una massa densa e compatta di colore beige chiaro.
- campioni B1 e C1 (alginato di bario e calcio): mantengono la forma sferica anche dopo essiccamento anche se il colore risulta bianco opalescente.

A titolo d'esempio la figura 2.3.13 riporta le immagini delle diverse tipologie di *beads* appena realizzati.

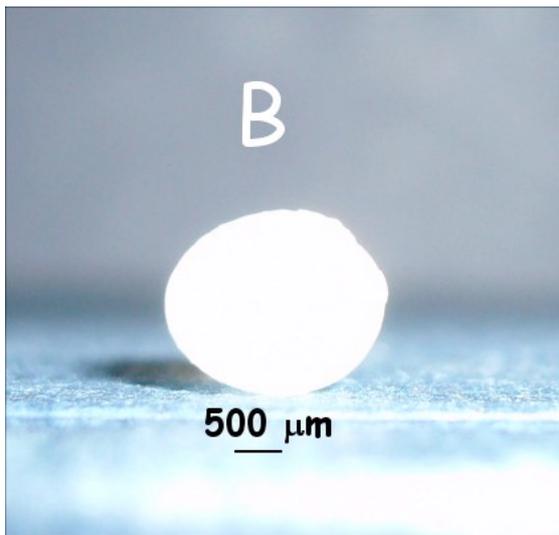
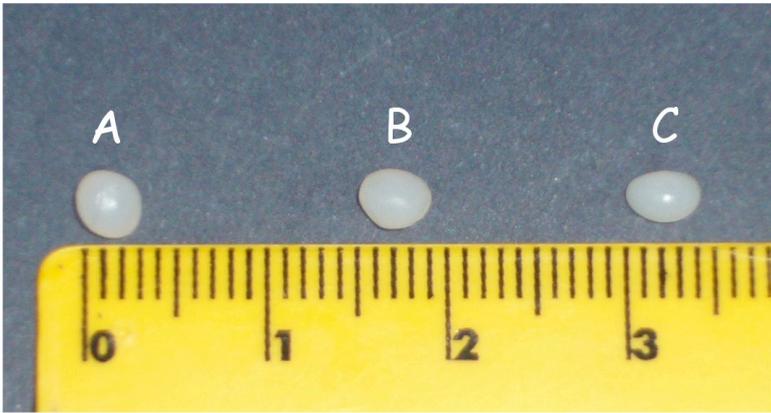


Fig. 2.3.13. *Immagini digitali delle diverse tipologie di beads realizzate*

2.3.3.3 Capacità di rigonfiamento (*swelling-ratio*)

La capacità di rigonfiamento o grado di rigonfiamento viene determinata mettendo una quantità nota di *beads* (~20), sia appena formate che dopo essiccamento, a contatto con soluzioni che presentano diversi valori di pH e diverse caratteristiche osmotiche (quali NaCl 0,9% p/v, HCl 0,1N - pH 1, Na₂HPO₄/KH₂PO₄ - pH 7,4), per osservare il loro comportamento e quindi verificare le variazioni di peso e dimensioni dopo un tempo di 30 minuti, 1 h e 24 h.

Ai valori di tempo stabiliti si determina il rapporto:

$$\text{Swelling ratio} = W_t/W_0$$

dove:

W_t = il peso dei *beads* umidi ad un tempo **t** prestabilito

W₀ = il peso iniziale dei *beads* (al tempo **0** o dopo 24 h di trattamento in essiccatore)

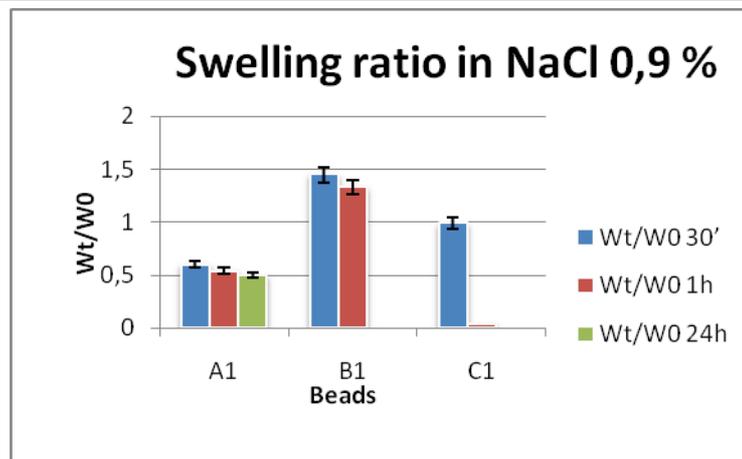
Tale valore può risultare :

W_t/W₀ =1 quando non si riscontra alcuna variazione

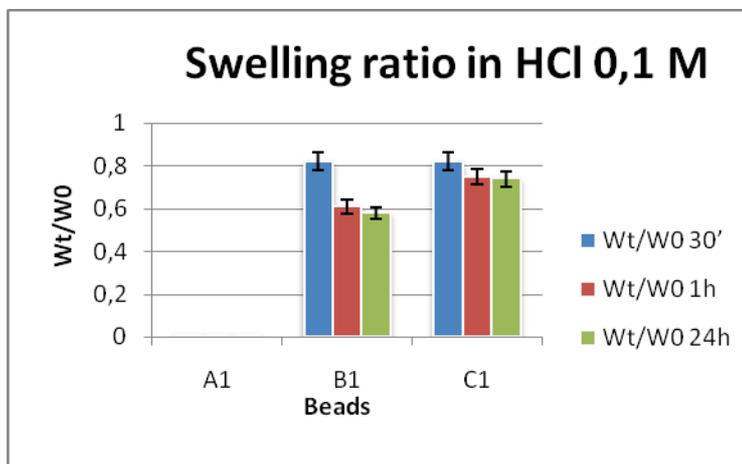
W_t/W₀ >1 quando si osserva un aumento di peso e dimensione

W_t/W₀ <1 quando si osserva una diminuzione di peso e dimensione

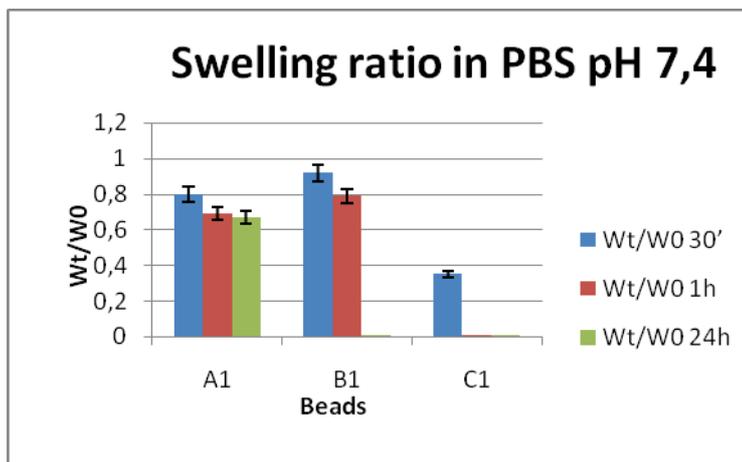
Nelle figura 2.3.14 sono riportati i grafici relativi ai valori di swelling ratio ottenuti per i campioni delle *beads* contenenti *Boswellin*[®] nelle tre soluzioni sopra elencate.



a



b



c

Fig. 2.3.14. a) swelling ratio in NaCl 0,9% ; b) swelling ratio in HCl 0,1N pH 1; c) swelling ratio in PBS pH 7,4;

Dall'osservazione dei grafici si possono estrapolare delle osservazioni interessanti:

- **Soluzione NaCl 0,9%:** le *beads* a base di chitosano, dopo un'iniziale perdita di peso e dimensioni ai 30 minuti, mantengono invariata la loro struttura; le *beads* a base di alginato di bario aumentano di peso e di dimensioni fino ad un tempo di 60 minuti e poi nell'arco delle 24 ore si dissolvono completamente; le *beads* a base di alginato di calcio resistono invariate per i primi 30 minuti e poi vanno incontro ad una completa dissoluzione.

Questo comportamento da parte delle *beads* di alginato di calcio è giustificabile dal fatto che avviene uno scambio tra gli ioni Na^+ e gli ioni Ca^{++} all'interno del reticolo di alginato, facilitando la penetrazione dell'acqua e dando origine al successivo disfacimento.

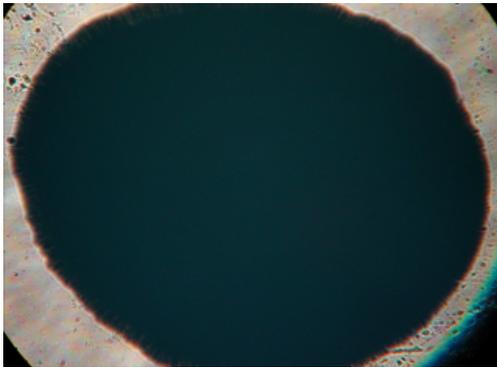
Un comportamento analogo subiscono le *beads* di alginato di bario ma in tempi più lenti, dovuto al fatto che lo scambio tra gli ioni Ba^{++} e gli ioni Na^+ avviene molto più difficilmente in quanto gli spazi creati dalla reticolazione con gli ioni Ba^{++} sono molto più ristretti, impartendo così una maggiore stabilità alla struttura delle *beads*, per cui gli ioni Na^+ trovano maggiore difficoltà ad inserirsi nel reticolo.

- **Soluzione PBS pH 7,4:** per le stesse ragioni discusse sopra si osserva identico comportamento da parte delle *beads* di alginato di calcio e di bario dovuta alla presenza dello ione Na^+ e K^+ nel tampone fosfato; leggermente diverso risulta il comportamento delle *beads* a base di chitosano che in questo caso subiscono lievi variazioni di peso e dimensioni rispetto al tempo 0, e queste vengono mantenute per tutto il tempo del saggio.
- **Soluzione HCl 0,1N pH 1:** in queste condizioni la situazione risulta completamente ribaltata: le *beads* di chitosano subiscono immediatamente un completo disfacimento, situazione prevedibile considerando che il chitosano risulta solubile in soluzione acida, mentre le *beads* di alginato di bario e di

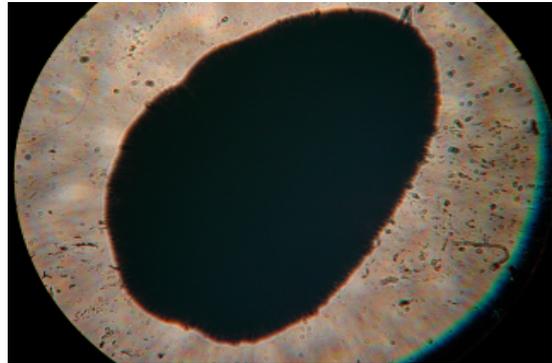
calcio mantengono la loro struttura per tutto il tempo dell'analisi, anche se si osservano riduzioni di peso e di dimensioni rispetto al tempo 0. Si ha anche in questo caso un parziale scambio ionico tra ioni H^+ e ioni Ca^{++} e Ba^{++} che riduce la captazione dell'acqua dovuta alla formazione di acido alginico e riduzione dell'effetto di reticolazione.

Da quanto detto si può affermare che attraverso gli studi di *swelling* si mette in evidenza come il tipo di matrice polimerica giochi un ruolo molto importante nel prevedere il comportamento delle *beads* all'interno del sistema gastroenterico. Il tutto è direttamente correlato alla capacità di questi sistemi, come si vedrà in seguito, di rilasciare il farmaco incorporato nelle modalità e nei tempi previsti.

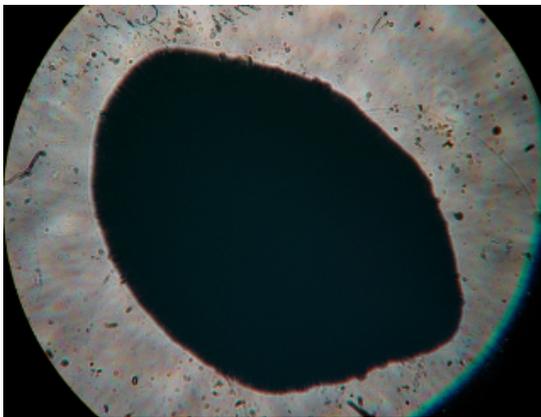
A titolo di esempio si riportano alcune immagini, ottenute al microscopio ottico, del saggio di *swelling* eseguito sul campione **A** ai tempi: 0, 30', 60', 90 minuti e 24 ore (figura 2.3.15).



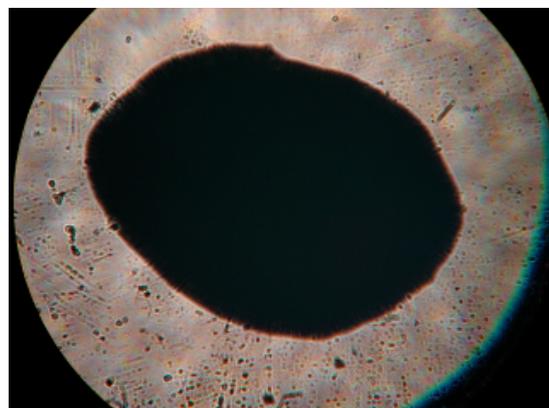
0 minuti



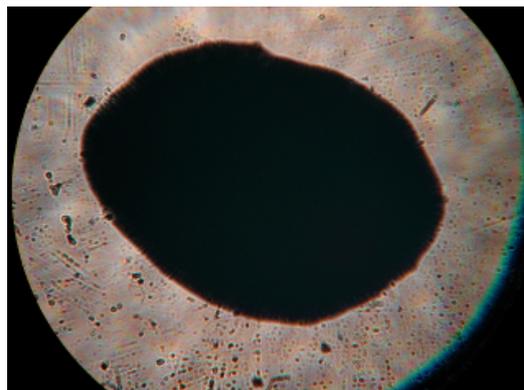
30 minuti



60 minuti



90 minuti



24 ore

Fig. 2.3.15. Immagini digitali del saggio di swelling eseguito sul campione A

2.3.3.4 Capacità incapsulante (E%)

La valutazione della capacità incapsulante dei campioni di *beads* realizzati è stata ottenuta sottoponendo all'analisi allo Spettrofotometro UV le soluzioni derivanti dalla rottura agli ultrasuoni di un numero ben definito di *beads* (≈ 10 beads).

L'analisi è stata eseguita alla lunghezza d'onda(λ) di **249 nm** corrispondente al massimo di assorbimento per l'Acido β -boswellico .I valori di assorbanza sono stati trasformati nei corrispondenti valori di concentrazione in base alla retta di taratura precedentemente realizzata in soluzione etanolica avente un coefficiente di regressione $R = 0,9994$.

Per determinare la % incapsulante dei campioni di *beads* realizzati si utilizzano le espressioni matematiche [1] e [2] elaborate in questo studio, riportate nel capitolo 2.2.21 :

$$Z_a = Q \frac{W_u}{W_t} \quad \boxed{1}$$

$$E\% = \frac{D}{Z_a} \cdot 100 \quad \boxed{2}$$

*[(Q) quantità in peso di farmaco utilizzato nella dispersione; (W_t)*² quantità in peso delle beads teoricamente ottenibili; (W_u) quantità in peso dei beads umidi effettivamente ottenuti; (Z_a) quantità teorica in peso del farmaco sulla W_u; (D) quantità in peso di farmaco effettivamente presente sul W_u in base alla metodica di rottura e analisi allo Spettrofotometro UV.]*

I risultati ottenuti sono riassunti nella Tabella 6.

² Il valore di (W_t) si calcola come riportato nella tabella relativa al calcolo della resa per ciascun campione (valore in rosso).

Beads	(W_t)* g	(W_r)* g	(Q) g	(Za) g	(D) g	E %	Titolo %
A1	2,042 ±0,71	1,106 ±0,32	0,0044 ±0,0002	0,0023 ±0,0001	0,018± 0,001	78,26	9,67
B1	3,1567 ±0,83	2,17 ±0,34	0,0042 ±0,0001	0,0028± 0,0003	0,012± 0,002	42,86	1,27
C1	3,1214 ±0,91	2,49 ±0,35	0,0044 ±0,0003	0,0035± 0,0001	0,013± 0,001	37,14	1,44

*I valori si riferiscono alla media di tre determinazioni

Tab.6. Capacità incapsulante E% e titolo in *Boswellin* dei campioni di beads realizzati

Dai risultati si osserva una buona capacità incapsulante da parte delle *beads* realizzate con chitosano che presentano il maggiore titolo % in *Boswellin*®.

Per quanto riguarda i campioni di *beads* realizzati con alginato questi presentano una capacità incapsulante simile, che risulta comunque inferiore alle *beads* di chitosano, che si traduce in un titolo otto volte minore in *Boswellin*®.

Il maggior contenuto in *Boswellin*® presente nelle *beads* di chitosano mette in evidenza la capacità di questi sistemi d'incorporare il principio attivo ma di essere probabilmente in grado di reticolarlo sulla loro superficie (ipotesi dettata dal colore beige chiaro che manifestano dopo essiccamento).

2.3.3.5 Studi di rilascio

Gli studi di rilascio sono stati eseguiti in due medium a diversi valori di pH per simulare il comportamento nel tragitto gastroenterico:

- ✓ una soluzione di HCl 0,1 N a pH 1, alla temperatura di 37°C
- ✓ una soluzione di tampone bicarbonato a pH 7,4, alla temperatura di 37°C

Le figure 2.3.16 e 2.3.17 riportano i grafici relativi all'andamento del rilascio per ciascuna tipologia di *beads*, rispettivamente a pH 1 e a pH 7,4.

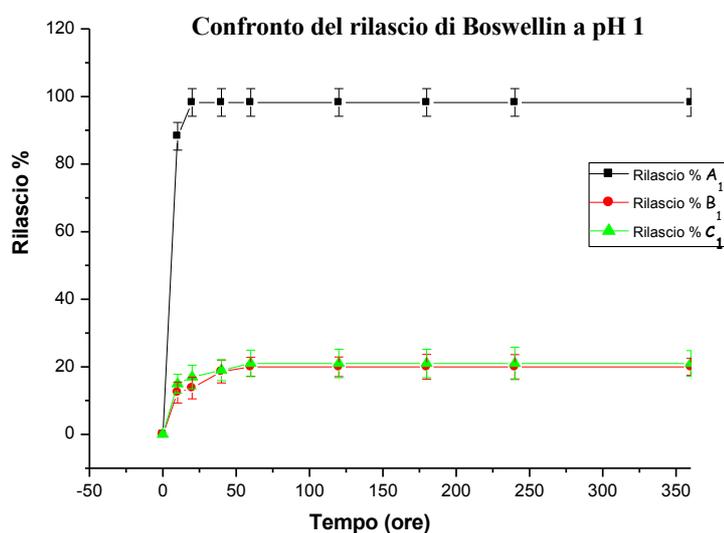


Fig. 2.3.16. Curve di rilascio di Boswellin a pH 1

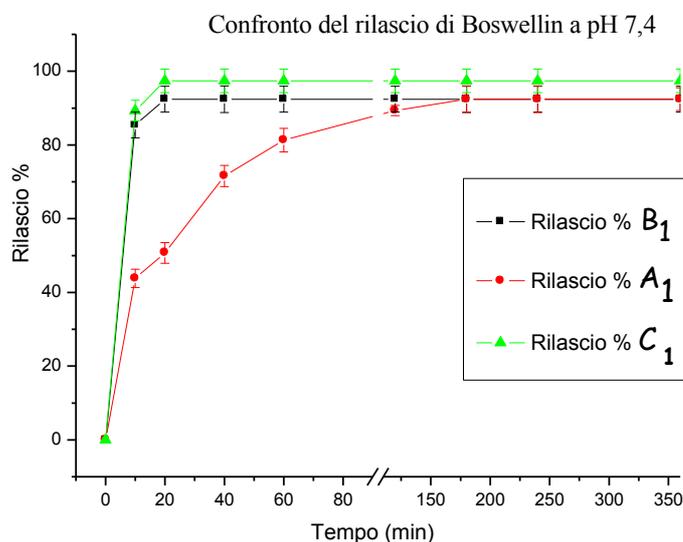


Fig. 2.3.17. Curve di rilascio di Boswellin® a pH 7,4

Come atteso dagli studi eseguiti al saggio di *swelling* si riscontra una corrispondenza di comportamento del rilascio in principio attivo ai diversi valori di pH.

Infatti a pH 7,4 si ha un rilascio lento e graduale del Boswellin® da parte delle *beads* a base di chitosano, a differenza del rilascio immediato (intorno a circa 10 minuti) di Boswellin® dalle *beads* a base di alginato sia di bario che di calcio.

Viceversa nel medium a pH 1 le *beads* di chitosano rilasciano in tempi brevissimi il principio attivo, visto anche il completo disfacimento della struttura polimerica che avviene in queste condizioni.

In questo sistema le *beads* a base di alginato presentano, come ci si attendeva, una percentuale di rilascio molto bassa (~20%) che permane nell'ordine di questi valori anche per periodi di tempo prolungati.

2.3.3.6 Conclusioni

In questa prima parte del lavoro è stata messa a punto la realizzazione di sistemi particellari, le *beads*, a diverse matrici polimeriche in grado di incapsulare un estratto titolato di acidi boswellici, *Boswellin*[®], derivato vegetale di recente utilizzo per le sue notevoli proprietà antinfiammatorie.

Sulla base dei risultati ottenuti si è potuto mettere in evidenza come il tipo di polimero utilizzato per la realizzazione di tali sistemi giochi un ruolo fondamentale nella possibilità che il farmaco prescelto possa distribuirsi nei diversi tratti del sistema gastrointestinale.

In particolare le *beads* ottenute mediante l'utilizzo del Chitosano sono risultate le più adatte alla veicolazione gastrica: a pH 1, in tempi brevissimi, rigonfiano e si disgregano liberando così il farmaco in esse contenuto.

Questo non succede invece per le *beads* a base di Alginato di Bario e Calcio, che nelle stesse condizioni di pH rilasciano in minima quantità il farmaco e proseguono pressoché inalterate verso il tratto intestinale, dove a pH 7,4 rigonfiano e si disgregano liberando così tutto il farmaco.

Valutando nell'insieme le caratteristiche di rilascio dei campioni ottenuti ai diversi valori di pH, si è riscontrata una notevole resistenza delle *beads* a base di Alginato di bario rispetto a quelle di Alginato di calcio, resistenza che è dovuta al tipo di reticolazione che si viene a creare per effetto dello scambio tra ioni sodio e bario nella fase di gelazione.

Per questo motivo il prossimo studio sarà rivolto a realizzare delle *beads* combinando le dispersioni di Chitosano e Sodio Alginato allo scopo di verificare la possibilità di ottenere un *targeting* nelle diverse zone del sistema gastroenterico, migliorando ulteriormente la stabilità e la resistenza nel tempo anche attraverso la funzionalizzazione dei polimeri utilizzati.

3 Beads a base di una combinazione polimerica Chitosano/Alginato

3.1 Scopo del lavoro

Le *beads* possono rientrare nella composizione delle cosiddette *forme di dosaggio a unità multipla*, ossia delle capsule in gelatina rigida, o delle compresse disgreganti che solo dopo somministrazione, rendono disponibili un elevato numero di subunità, ciascuna contenente una frazione della dose di principio attivo.

I principali vantaggi nell'utilizzo delle *beads* sono associati ai miglioramenti in termini di sicurezza ed efficacia del preparato (*performance biofarmaceutica*). Infatti in seguito a somministrazione orale queste forme di dosaggio a unità multipla determinano, in genere, un profilo di assorbimento del farmaco caratterizzato da una maggiore riproducibilità rispetto a quello ottenibile con le corrispondenti forme ad unità singola. Il profilo di assorbimento è infatti influenzato, per i sistemi a rilascio prolungato, dai tempi di transito della forma farmaceutica nei diversi tratti del tubo digerente.

I vantaggi del loro utilizzo sono: a) una distribuzione più omogenea lungo il tratto gastro-intestinale; b) una maggiore riproducibilità del tempo di svuotamento gastrico e del tempo complessivo di transito; c) un miglioramento dell'andamento delle curve CP (CP = Concentrazione plasmatica)/TEMPO.

Un'adeguata scelta della formulazione e del metodo di produzione possono, di fatto, ridurre o eliminare totalmente i rischi di degradazione dei principi attivi labili, nonché agire sul loro tempo di permanenza nel tratto gastrointestinale ed esercitare un controllo della velocità di rilascio dalla formulazione.

Per questo motivo, l'obiettivo di questa seconda parte del lavoro, visti i risultati ottenuti nella precedente, è stato quello di mettere a punto una metodica per la realizzazione di *beads* incapsulanti *Boswellin®*, combinando i due materiali polimerici, Chitosano e Sodio Alginato, allo scopo di ottenere dei sistemi di somministrazione

mirati a proteggere il componente bioattivo all'interno dello stomaco per poi essere liberato a livello intestinale in prossimità del colon.

3.2. Parte Sperimentale

3.2.1 Materiali

I materiali utilizzati sono: Chitosano M (Medio peso molecolare), Acido glicolico 99%, Etanolo al 96%, Sodiotripolifosfato 85%, Acido citrico, Acido acetico forniti dalla Sigma Aldrich (Germania); Polyvinyl Alcohol 72'000 fornito dalla Fluka; Sodio alginato fornito dalla Galeno (Italia); Potassio fosfato monobasico, Sodio fosfato bibasico biidrato, Idrogenocarbonato di sodio, Calcio cloruro Secco Granulare, Acido Acetico Glaciale forniti dalla Carlo Erba; Acetone fornito dalla J.T.Baker. Il *Boswellin*[®] ovvero un estratto di *Boswellia Serrata* è stato gentilmente offerto dalla Sabinsa Corporation.

3.2.2 Strumenti Utilizzati

Gli strumenti utilizzati per la preparazione e la caratterizzazione delle *beads* sono riportati nella tabella 1.

Strumento	Azienda
Bilancia analitica Basic	Sartorius
Agitatore magnetico	Falc
Microprocessor pHmeter pH 211	Hanna Instruments
Viscosimetro Programmable DV-II+	Brookfield
Spettrofotometro UV U-2000	Hitachi
Microscopio Ottico Axiostar Plus	Karl Zeiss
Sonicator HD 2070	Bandelin Sonopuls
Centrifuga 4226	Vismara

Tab. 1. Elenco degli strumenti utilizzati

3.2.3 Preparazione delle soluzioni e dispersioni occorrenti per la preparazione delle *Beads* secondo la METODICA A

Preparazione della dispersione di chitosano M e acido acetico.

Viene preparata una dispersione di Chitosano in ac. acetico al 2% (p/p) secondo la seguente procedura: in un *becker* da 50 ml, si pesa il chitosano e si porta a peso (30g) con la soluzione all' 1% di acido acetico glaciale, precedentemente preparata. La miscela così ottenuta si sottopone ad agitazione magnetica a 100 rpm per 50 minuti circa. Si lascia riposare la dispersione a 4°C per una notte. Trascorso questo tempo, la dispersione si presenta opaca e di consistenza gelatinosa.

Preparazione della dispersione di sodio alginato

Viene preparata una dispersione di alginato di sodio al 2,5 % p/p in acqua secondo la seguente procedura: in un *becker* da 75 ml si pesano 0,75 g di alginato di sodio e si porta a peso con acqua distillata. La miscela così ottenuta si sottopone ad agitazione magnetica alla velocità di circa 100 rpm. Si lascia in agitazione fino a completa dissoluzione. Si lascia riposare a 4°C per una notte. La dispersione si presenta opaca, con leggera colorazione gialla.

Preparazione della soluzione di cloruro di calcio

Viene preparata una soluzione di Cloruro di Calcio al 4 % p/p in acqua secondo la seguente procedura: in un *becker* da 100ml si pesano il cloruro di calcio, si aggiunge acqua distillata sino al peso stabilito. Si porta in soluzione, miscelando con una bacchetta. La soluzione si presenta limpida e incolore. Si lascia riposare per una notte a 4°C.

Preparazione della soluzione di Boswellin® (BSW)

Viene preparata una soluzione di Boswellin® in etanolo al 10 % p/p.

Si dispone il *Boswellin*® opportunamente pesato in un becker da 50 ml e si porta a peso con alcool etilico.

Preparazione della dispersione di sodio alginato e Boswellin®

	Sostanze	Percentuale (%)	Quantità (g)
A	Dispersione di Sodio Alginato	99,01	5
B	Soluzione di BSW	0,99%	0,5

In un becker da 50 ml si pone la dispersione A, a questa viene aggiunta a filo e sotto costante agitazione la soluzione B fino ad ottenere una miscela omogenea.

Preparazione della dispersione di chitosano M e cloruro di calcio

	Sostanze	Percentuale (%)	Quantità (g)
	Dispersione di chitosano M in acido acetico	20	10
	Soluzione di cloruro di calcio 4%	80	40

In un becker da 75 ml si pesano 10 g della dispersione di chitosano M in acido acetico, si aggiungono 40 g della soluzione di cloruro di calcio al 4%. Si miscela con una bacchetta fino ad ottenere una dispersione omogenea.

3.2.3.1 Realizzazione Beads - Campione A

Sostanze	Quantità (g)
Dispersione di sodio alginato	5
Dispersione di chitosano M- cloruro di calcio	30

Si carica la dispersione di alginato di sodio in un apposito sgocciolatore in vetro, e si fa gocciolare all'interno di un *becker* da 100 ml contenente la dispersione di chitosano M-cloruro di calcio sotto continua agitazione magnetica, alla velocità di circa 50 rpm. Si formano circa 70 *beads*. Si lascia in agitazione per circa 50 minuti.

Trascorsi 50 minuti, utilizzando un imbuto Bukner e un opportuno filtro di carta, si filtrano le *beads* ottenute. Si lasciano essiccare in un essiccatore di vetro per una notte.

3.2.3.2 Realizzazione Beads - Campione A1

Sostanze	Quantità (g)
Dispersione di sodio alginato e BSW®	5
Dispersione di chitosano M- cloruro di calcio	30

La dispersione di alginato di sodio e Boswellin® viene versata in un apposito sgocciolatore in vetro e si fa gocciolare all'interno di un *becker* da 100 ml contenente la dispersione di chitosano M- cloruro di calcio sotto continua agitazione magnetica, alla velocità di circa 50 rpm. Si formano circa 70 *beads*. Si lascia in agitazione per 50 minuti, trascorsi i quali, utilizzando un imbuto Buckner e un opportuno filtro di carta, si filtrano le *beads* ottenute. Si lasciano essiccare in un essiccatore di vetro per una notte.

3.2.4 Preparazione delle soluzioni e dispersioni occorrenti per la preparazione delle Beads secondo la METODICA B

Preparazione della dispersione di Chitosano in acido glicolico

Sostanza	Percentuale (%)	Quantità (g)
Chitosano M	2	0,6
Acido glicolico	1	0,3
Acqua distillata q.b. a	100	30

L'Acido glicolico e il chitosano vengono posti in un becker da 50 ml, si aggiunge acqua distillata fino al peso richiesto. Il tutto viene sottoposto ad agitazione magnetica per 60 minuti e a temperatura ambiente. Trascorso questo tempo la dispersione viene posta in frigo per un periodo di 24 ore alla temperatura di 4° C.

Preparazione della dispersione di sodio alginato e Boswellin®

	Sostanze	Percentuale (%)	Quantità (g)
a	Dispersione di Sodio Alginato	99,01	5
b	Soluzione di BSW®	0,99%	0,5

In un *becker* da 50 ml si pone la dispersione **a**, a questa viene aggiunta a filo e sotto costante agitazione la soluzione **b** fino ad ottenere una miscela omogenea.

3.2.4.1 Realizzazione Beads - Campione B

	Sostanze	Quantità (g)
Fase 1	Dispersione di sodio alginato	5
	Soluzione di cloruro di calcio	30
Fase 2	Dispersione di chitosano in acido glicolico	30

Si versa la dispersione di alginato di sodio in un apposito sgocciolatore in vetro, e si fa' gocciolare in un *becker* da 100 ml contenente la soluzione di cloruro di calcio. Il tutto viene sottoposto ad agitazione magnetica, alla velocità di circa 50 rpm per 50 minuti; si formeranno circa 90 *beads*.

Trascorso questo tempo, utilizzando un imbuto Buckner e un opportuno filtro di carta, si filtrano le *beads* ottenute. Si irrorano con abbondante acqua distillata per 2 volte.

Le *beads* così filtrate s'immergono all'interno della dispersione di chitosano in acido glicolico. Il tutto si sottopone ad agitazione magnetica a 100 rpm, alla temperatura di 37°C, per circa 50 minuti.

Trascorso questo tempo, utilizzando un imbuto buckner e un opportuno filtro di carta, si filtrano le *beads* ottenute. Si lasciano in un essiccatore di vetro per una notte.

3.2.4.2 Realizzazione Beads - Campione B1

	Sostanze	Quantità (g)
Fase 1	Dispersione di sodio alginato e BSW®	5
	Soluzione di cloruro di calcio	30
Fase 2	Dispersione di chitosano in acido glicolico	30

Si carica la dispersione di alginato di sodio e Boswellin® in un apposito sgocciolatore in vetro, e si fa' gocciolare in un *becker* da 100 ml contenente la soluzione di cloruro di

calcio. Il tutto viene sottoposto ad agitazione magnetica, alla velocità di circa 50 rpm per 50 minuti. Si formeranno circa 90 *beads*.

Trascorso questo tempo, utilizzando un imbuto Buckner e un opportuno filtro di carta, si filtrano le *beads* ottenute. Si irrorano con abbondante acqua distillata per 2 volte. Le *beads* così filtrate s'immergono all'interno della dispersione di chitosano e acido glicolico. Il tutto si sottopone ad agitazione magnetica a 100 rpm, alla temperatura di 37°C, per circa 50 minuti.

Trascorso questo tempo, utilizzando un imbuto buckner e un opportuno filtro di carta, si filtrano le *beads* ottenute. Si lasciano in un essiccatore di vetro per una notte.

Si sono così ottenuti **4** diversi **campioni di *beads*** (vedi Tabella 2), ciascuno dei quali realizzato per ben cinque volte, per verificare la ripetibilità e la precisione delle analisi eseguite successivamente.

Campioni beads	Dispersione polimerica	Sistema protonante	Boswellin® (sol.etanolica 10%)
A	Alginato di Calcio/ Chitosano M	Acido Acetico	-
A1	Alginato di Calcio/ Chitosano M	Acido Acetico	0,99%
B	Alginato di Calcio + Chitosano M	Acido glicolico	-
B1	Alginato di Calcio + Chitosano M	Acido glicolico	0,99%

Tab.2 Elenco dei campioni realizzati

3.2.5. Misure di viscosità delle dispersioni di Chitosano M e Alginato di sodio

Le analisi reologiche sono state condotte mediante il viscosimetro rotazionale programmabile **Brookfield modello LVDV-II+**, utilizzando lo "*small sample adapter*" con il girante 18.

Questo adattatore è risultato essere ideale per le nostre determinazioni in quanto consente di misurare la viscosità anche di piccole quantità di campione nell'ambito dei range di *shear rate* e cP ottenuti operando con velocità operazionali comprese tra 0,1 e 200 rpm, uno *shear rate* compreso tra 0- 264 s⁻¹ e viscosità comprese tra 1,5 e 30000 cP.

La temperatura nelle diverse determinazioni è stata mantenuta costante a 25°C per mezzo di un bagno termostatico modello HAAKE*FE2-ENCO collegato allo *small sample adapter*.

Inoltre, si è scelto di utilizzare la funzione del viscosimetro "time to stop" che permette di effettuare la misura della viscosità ad un tempo prestabilito dall'inizio della misurazione.

Per ogni dispersione è stato scelto un tempo ottimale determinato in seguito ad una serie di prove preliminari (durata media: 30s).

Le analisi sulle dispersioni sono state eseguite in un primo momento impostando i valori di rpm in senso crescente, arrivando sino ad un valore massimo e di seguito in senso decrescente, ripercorrendo le tappe di andata sino al valore minimo di partenza.

3.2.6. Determinazione della resa del CAMPIONE A1

Per valutare la resa del campione si è tenuto conto di due fattori: il **peso ad umido** (W_u) dei *beads* appena fatti e sgocciolati su un sottile strato di carta da filtro e il loro **peso a secco** (W_s), ottenuto ponendoli in essiccatore per 24 h.

Per il calcolo della resa si è tenuto conto di diversi passaggi critici nel corso della preparazione. Uno di questi è costituito dal residuo della dispersione rimasto adeso nell'imbuto sgocciolatore dopo la realizzazione delle *beads*. I valori in peso considerati sono riportati nello schema successivo.

Peso teorico componenti della dispersione	W_{tot}
Peso perso al passaggio critico	W_c
Peso finale della dispersione realmente utilizzata	W_f
Peso dei componenti iniziali esclusa l'acqua	W_e
Peso dei componenti finali esclusa l'acqua	n.d.
Peso teorico del campione decurtando il 10% di acqua	W_t
Peso ottenuto dopo sgocciolamento dei beads nella carta	W_u
Peso ottenuto dopo essiccamento	W_s

$$R\% = \frac{W_u}{W_t} \times 100$$

3.2.7 Determinazione della resa del CAMPIONE B1

La resa del campione è stata valutata sul **peso ad umido** (W_u) dei *beads* appena fatti e sgocciolati su un sottile strato di carta da filtro e sul loro **peso a secco** (W_s), ottenuto ponendoli in essiccatore per 24 h.

L'aumentata complessità della metodica di preparazione, implica che si debba tener conto di più passaggi critici. Questi sono costituiti dal residuo della dispersione rimasto adeso nell'imbuto sgocciolatore dopo la realizzazione delle *beads* di sodio alginato (1° fase) e dal residuo di chitosano nel *beker* in cui vengono disperse le *beads* precedentemente formate (2° fase).

Peso teorico componenti della dispersione (Alginato)	W_{tot}
Peso perso al passaggio critico	W_c
Peso finale della dispersione di Alginato realmente utilizzata	W_f
Peso dei componenti iniziali (1° fase) esclusa l'acqua	W_e
Peso teorico del campione (1° fase) decurtando il 10% di acqua	W_{t1}
Peso ottenuto dopo sgocciolamento dei <u>beads 1° fase</u> nella carta	W_{u1}
Peso teorico del campione <u>2° fase</u> decurtando il 50% di acqua	W_{t2}
Peso ottenuto dopo sgocciolamento dei <u>beads 2° fase</u> nella carta	W_{u2}
Peso ottenuto dopo essiccamento	W_s

Pertanto avremo due tipi di Resa: Resa % al 1° passaggio e Resa % al 2° passaggio

$$R_1 \% = \frac{W_{u1}}{W_{t1}} \quad (1)$$

$$R_2 \% = \frac{W_{u2}}{W_{t2}} \quad (2)$$

3.2.8 Determinazione delle dimensioni ad umido e a secco

Le *beads* (ottenuti da un campione di dispersione pari a circa 5g) dopo essere state sgocciolate e risciacquate con acqua distillata, vengono disposte su carta da filtro e divise in aliquote di 20 *beads* ciascuno. Vengono quindi pesate (W_u) e conservate in essiccatore.

Il peso e le dimensioni delle *beads* essiccate sono stati rilevati dopo 24 h di trattamento in essiccatore (W_s).

Le dimensioni delle *beads* essiccate sono state valutate mediante un microscopio ottico Carl Zeiss AXIOSTAR PLUS (transmitted-light) ad ingrandimento 5x, dotato di fotocamera SONY DSC-575/585, collegata ad un programma computerizzato.

3.2.9. Saggio di STRESS alla centrifuga

Il saggio è stato condotto sottoponendo un campione di 20 *beads*, in acqua distillata, a 3 cicli successivi di centrifuga per un periodo di 15 minuti ed ad una velocità di 3000 rpm.

3.2.10 Saggio di STRESS agli ultrasuoni

Il saggio è stato condotto sottoponendo un campione di 20 *beads*, in acqua distillata, a 3 cicli successivi di ultrasuoni mediante il Sonicatore Bandelin secondo la modalità di: 10 minuti, Ciclo continuo, ampiezza d'onda 50%.

3.2.11 Swelling- ratio in diversi medium (HCl 0,1N – pH 1, tampone Citrato/NaOH - pH 5, tampone (Na₂HPO₄/KH₂PO₄) – pH 7,4)

Vengono sottoposte al saggio le *beads* essiccate. Per ogni campione realizzato vengono prelevate tre aliquote da 10 *beads*, ed introdotte in 100 ml di una delle soluzioni di *swelling* sopra riportate. A tempi ben stabiliti (30 minuti, 1 ora e 24 ore) si verificano le variazioni di peso e di dimensione delle *beads* sottoposte al saggio.

Si determina perciò il rapporto

$$\text{Swelling ratio} = W_{s_t}/W_{s_0}$$

dove: W_{s_t} = il peso delle *beads* ad un tempo t prestabilito

W_{s_0} = il peso delle *beads* al tempo 0

3.2.12 Analisi spettrofotometrica

Le analisi spettrofotometriche sono state condotte con le stesse modalità del paragrafo 2.2.20. Per poter determinare le proprietà delle *beads* realizzate in funzione delle concentrazioni di *Boswellin*[®], è stato necessario determinare i valori di lunghezza d'onda alla massima assorbanza ($\lambda = 249 \text{ nm}$) relativi a soluzioni costituite da *Boswellin*[®] in EtOH, EtOH e Idrogenocarbonato di sodio, EtOH e HCl 0,1 N. Si sono perciò costruite tre diverse rette di taratura utilizzando diverse concentrazioni di *Boswellin*[®] identiche a quelle riportate nel paragrafo 2.2.20.

Si sono potuti così determinare :

4. Titolo di *Boswellin*[®] nelle *beads*
5. Capacità incapsulante delle *beads*
6. Proprietà di rilascio del *Boswellin*[®] dalle *beads*

3.2.13 Calcolo del Titolo % in *Boswellin*[®] nei campioni di *beads*

Il valore del Titolo % in *Boswellin*[®] nei campioni di *beads* si ottiene mettendo in rapporto la quantità di *Boswellin*[®] ottenuta dalla metodica della distruzione (**D**) con il peso dei campioni di *beads* ottenuti a secco (**Ws**) (vedi valori relative al peso a secco W_s nella tabella della resa relativa ad ogni campione).

Da cui:

$$\text{Titolo \%} = \frac{D}{W_s} \cdot 100$$

3.2.14 Capacità incapsulante

La capacità di incapsulare il *Boswellin*[®] delle *beads* realizzate è stata determinata tenendo conto di diversi fattori:

- Resa % sia dei campioni a umido che dei campioni a secco
- Residuo nel sistema sgocciolatore

In più bisogna considerare che una parte di acqua della dispersione di partenza viene ceduta al mezzo durante la 1° fase di gelificazione delle *beads*, per cui il peso di partenza si deve ridurre del 10 %.

La determinazione del contenuto di *Boswellin*[®] nelle *beads* realizzate viene eseguita analizzando una soluzione acquosa ottenuta da un campione di *beads*, di peso noto ($\approx 1/10$ del campione), sottoposto ad una metodica di distruzione consistente in un trattamento ad ultrasuoni.

L'analisi della soluzione è stata eseguita utilizzando uno spettrofotometro UV, λ **249 nm**, dove il *Boswellin*[®] presenta il suo massimo assorbimento.

Si pesano circa 10 *beads* e vengono posti in una provetta contenente 5 ml di acqua distillata. La provetta viene sottoposta ad ultrasuoni "BANDELIN SONOPLUS HD 2070" e lasciata sonicare per 10 minuti con un Ciclo continuo e un'ampiezza del 50%.

Si ripetono in totale 3 cicli, alla fine di ogni ciclo si filtra la soluzione, la quale verrà successivamente analizzata allo spettrofotometro UV "U-200 Spectrophotometer Hitachi".

3.2.15 Calcolo della % Incapsulante

Per determinare la % incapsulante (E%) dei campioni delle *beads* realizzate si utilizzano due espressioni matematiche da noi elaborate nelle quali si rapportano i seguenti valori:

- Quantità in peso di farmaco utilizzato nella dispersione (**Q**).

-
- Quantità in peso teorico delle *beads* (W_t).³
 - Quantità in peso delle *beads* umide effettivamente ottenute (W_u).
 - Quantità in peso teorico di farmaco sulla W_u (Z_a).
 - Quantità in peso di farmaco effettivamente presente sul W_u in base alla metodica di rottura (D) e analisi allo Spettrofotometro UV.

Da cui:

$$Z_a = Q \frac{W_u}{W_t} \quad (1)$$

$$E\% = \frac{D}{Z_a} \cdot 100 \quad (2)$$

3.2.16 Proprietà di rilascio

Una quantità nota di *beads* per ogni campione (A1,B1) tale da contenere la stessa quantità in mg di *Boswellin*[®] (calcolo eseguito in base al titolo%) è stata posta all'interno dell'apparecchio di dissoluzione ERWEKA DT munito di cestello rotante, termostato e sistema di controllo per il numero di giri ^[27].

Lo stesso studio viene eseguito su un corrispondente campione di *beads* senza *Boswellin*[®], allo scopo di verificare che non vi siano interferenze nella lettura allo spettrofotometro UV alla stessa lunghezza d'onda di determinazione (λ 249nm).

Come mezzo di rilascio sono state utilizzate due soluzioni:

una soluzione a pH 7.4 ottenuta con il Tampone Carbonato, una soluzione a pH 1 per HCl 0,1 N.

³ Il valore di (W_t) si calcola come riportato nella tabella relativa al calcolo della resa per ciascun campione (valore in rosso).

Vengono quindi eseguiti dei prelievi di 2 ml ad intervalli di tempo prestabiliti, ripristinando il volume prelevato con un uguale quantità della soluzione di rilascio.

I tempi scelti per i prelievi sono i seguenti: 10 – 20 – 40 - 60 minuti -120 minuti (2 ore) - 180 minuti (3 ore) - 1440 minuti (24 ore)

Per poter analizzare poi il contenuto all'UV è necessario prelevare 1ml del prelievo che viene diluito con 3ml di Etanolo.

3.3. Risultati e discussione.

3.3.1 Metodi di preparazione

I metodi di preparazione delle *beads* sfruttano i fenomeni d'instabilità a cui va incontro una dispersione polimerica in seguito all'aggiunta di diversi agenti destabilizzanti.

Questi possono essere agenti di reticolazione del tipo *cross-linking* covalente o *cross-linking* ionico oppure agenti coacervanti, i quali possono essere utilizzati da soli o in combinazione fra loro per ottimizzare il processo.

La matrice polimerica utilizzata in questo studio, come detto precedentemente, è la risultante di una combinazione di chitosano e di alginato di sodio. L'ottenimento delle corrispondenti *beads* avviene attraverso una serie di processi che tengono conto delle caratteristiche chimico fisiche dei due polimeri.

Infatti, ricordiamo che la dispersione acquosa di Alginato di sodio subisce una gelazione ionotropica in seguito alla presenza di ioni M^{n+} e che le unità di poliguluronato nelle molecole di alginato formano una struttura chelata con gli ioni metallici chiamata *Junction egg-box* (*scatola d'uovo*) con interstizi nei quali i cationi sono impaccati in una struttura chelata e coordinata.

Il Chitosano invece può dare una dispersione omogenea in soluzione acida, la quale determina la protonazione dei gruppi amminici liberi.

Di conseguenza la struttura risulta caricata positivamente ed è quindi in grado d'interagire con sostanze poli anioniche formando legami crociati mediante interazioni fisiche reversibili di tipo elettrostatico, dando così origine ad una struttura reticolata.

Tale interazione si può esplicitare con i gruppi COO^- liberi delle catene di alginato come mostrato nella figura 3.3.1.

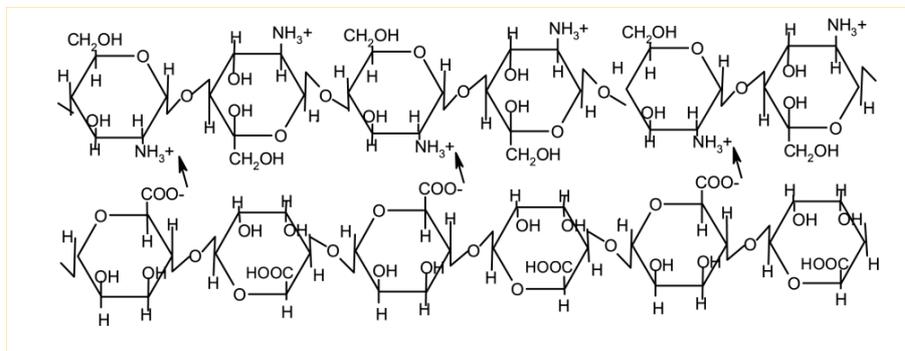


Fig.3.3.1. *Complesso polielettrolitico di Chitosano-Alginato*

Nella parte precedente del lavoro (cap 2.) sono stati realizzati campioni di *beads* a base di *Boswellin*[®] utilizzando le due matrici polimeriche singolarmente. Tale studio ha messo in evidenza come il tipo di polimero utilizzato influenza la diversa distribuzione del farmaco nel tragitto gastro-intestinale.

In particolare le *beads* a base del solo chitosano sono risultate più adatte alla veicolazione gastrica in quanto nel medium acido si disgregano e liberano così il farmaco contenuto.

Di contro le *beads* a base di Alginato di calcio subiscono una leggera degradazione in ambiente acido, liberando parte del farmaco, mentre rigonfiano e si disgregano man mano che si aumenta il valore di pH del medium, fino ad arrivare a valori intorno a pH 7 dove si verifica la completa liberazione del farmaco.

Sulla base di questi risultati in questo lavoro si è voluto sfruttare le proprietà dei due polimeri allo scopo di realizzare *beads* in grado di liberare prevalentemente il *Boswellin*[®] in prossimità del colon, essendo uno dei siti di elezione per la sua attività terapeutica.

Alcuni recenti lavori riportati in letteratura^[37] descrivono una metodica di realizzazione di *beads* a base di chitosano e alginato di sodio partendo da una

dispersione di chitosano in CaCl_2 sulla quale viene fatta gocciolare una dispersione di sodio alginato.

In questo lavoro sono stati realizzati delle *beads* utilizzando sia la metodica descritta in letteratura, che chiameremo METODICA A, che una metodica messa a punto nel nostro laboratorio, che chiameremo METODICA B, mettendo a confronto successivamente le proprietà e le caratteristiche dei campioni realizzati quali: dimensioni, capacità di *swelling* a diversi valori di pH, capacità incapsulante e rilascio del p.a.

3.3.2 Preparazione delle *beads*

La METODICA A consiste nel far gocciolare la dispersione polimerica di Sodio Alginato con o senza la soluzione etanolica di Boswellin[®], attraverso un imbuto sgocciolatore di cui è noto il diametro del foro (0,45 mm), nella soluzione contenente il cloruro di calcio e una dispersione di Chitosano all'1% in acido acetico nel rapporto di 4: 1. Il tutto viene tenuto sotto lenta agitazione magnetica a temperatura di 25 °C per un periodo di 45- 50 minuti (figura 3.3.2).

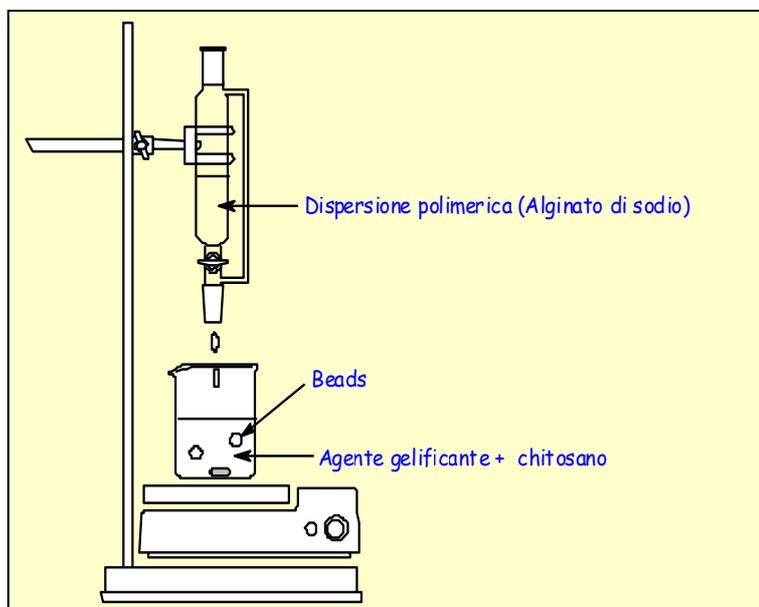


Fig.3.3.2. Rappresentazione schematica del sistema di preparazione delle *beads* (METODICA A)

Infine trascorso tale tempo le *beads* ottenute vengono tolte dal medium, poste in carta da filtro e quindi utilizzate così come tali o essiccate, attraverso l'utilizzo di un essiccatore, fino a peso costante per eseguire le analisi successive [campioni **A**, **A1**].

La METODICA B avviene in due fasi: consiste inizialmente nel far gocciolare la dispersione polimerica di Sodio Alginato con e senza la soluzione etanolica di *Boswellin*[®], attraverso un imbuto sgocciolatore di cui è noto il diametro del foro (0,45 mm), nella soluzione contenente il cloruro di calcio. Il tutto viene tenuto sotto lenta agitazione magnetica a temperatura ambiente per un periodo di 45- 50 minuti (figura 3.3.4).

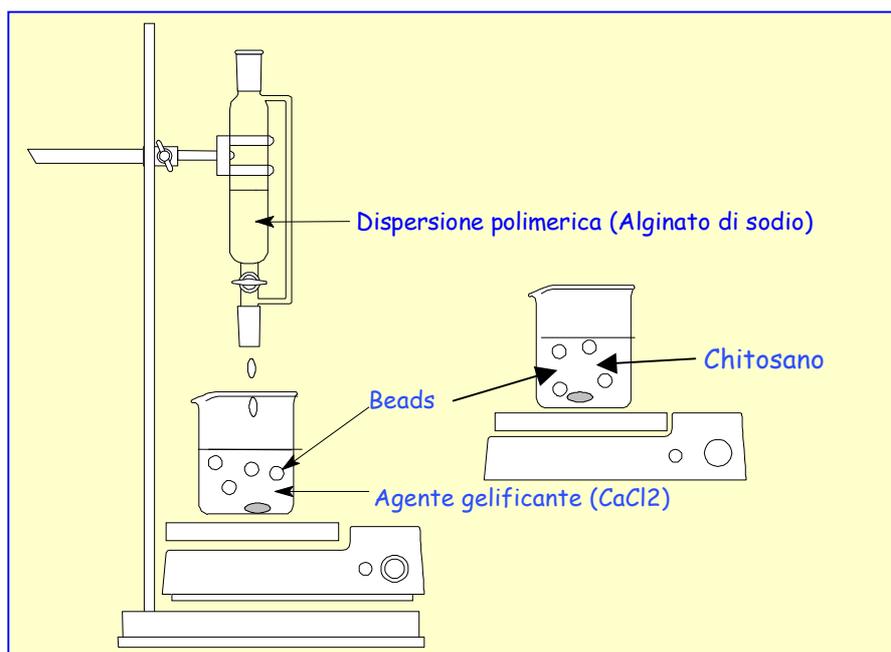


Fig.3.3.4. Rappresentazione schematica del sistema di preparazione delle beads (METODICA B)

Trascorso questo tempo le *beads* vengono filtrate e lavate più volte con acqua distillata fino a soluzione neutra, asciugate in carta da filtro per eliminare l'acqua

residua di superficie e quindi immerse ulteriormente in un *becker* contenente la dispersione di Chitosano all'1% in Acido glicolico.

Il tutto viene sottoposto all'agitazione magnetica alla temperatura di 37 °C per 50 minuti per facilitare la coacervazione del chitosano sulla superficie delle *beads*.

Infine trascorso tale tempo le *beads* rivestite di chitosano vengono tolte dal mezzo, poste in carta da filtro e quindi utilizzate così come tali o essiccate, attraverso l'utilizzo di un essiccatore, fino a peso costante per eseguire le analisi successive [campioni **B**, **B1**] (figura 3.3.5).



Fig.3.3.5 *Beads* ottenute con la METODICA B

In particolare si sono ottenuti 4 campioni di *beads* dei quali due incapsulanti *Boswellin*[®] (Tabella 3). Ogni campione è stato realizzato cinque volte per verificare la ripetibilità e la precisione delle analisi eseguite per caratterizzare il prodotto.

Campioni beads	Dispersione polimerica	Sistema protonante	Boswellin [®] sol.etanolica 10%
A	Alginato di Calcio/ Chitosano M	Acido Acetico	-
A1	Alginato di Calcio/ Chitosano M	Acido Acetico	0,99%
B	Alginato di Calcio + Chitosano M	Acido glicolico	-
B1	Alginato di Calcio + Chitosano M	Acido glicolico	0,99%

Tab. 3. *Elenco delle formulazioni preparate*

3.3.3 Morfologia e dimensioni

Nella figura 3.3.6 viene riportato il grafico relativo alle dimensioni dei quattro campioni delle *beads* sia ad umido che a secco.

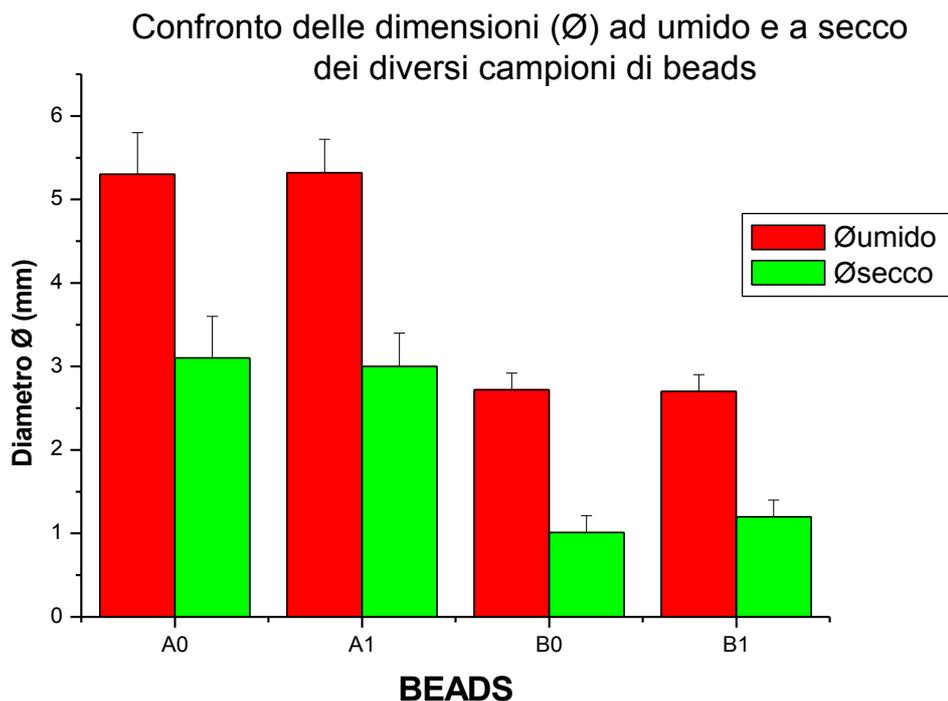


Fig 3.3.6. *Diametro medio ad umido e secco dei campioni di beads*

Già da un primo esame si osserva come le *beads* realizzate con la METODICA B risultano di dimensioni notevolmente inferiori sia ad umido che a secco, mentre non si osservano particolari differenze tra i corrispondenti campioni senza e con il p.a.

Questo è ulteriormente confermato dai valori in peso delle *beads* realizzate, come mostrato nella figura 3.3.7.

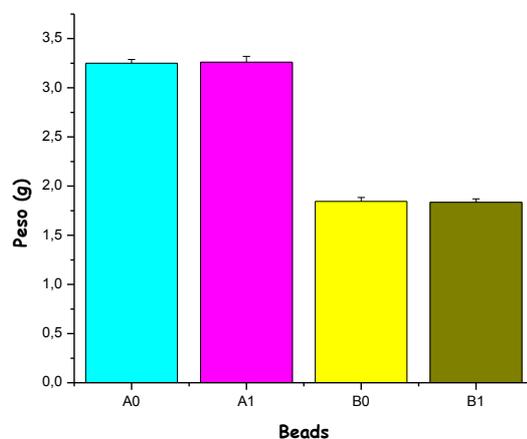


Fig.3.3.7. Dimensioni medie dei diversi campioni

Per questo motivo gli ulteriori confronti verranno eseguiti direttamente per i campioni contenenti il *Boswellin*[®] (**A1** e **B1**).

A questo proposito interessante risulta il confronto tra la riduzione delle dimensioni (perdita in diametro medio \emptyset %) eseguito su un campione di 20 *beads*, e la perdita % in peso (**P** %) dopo essiccamento come riportato nel grafico (figura 3.3.8).

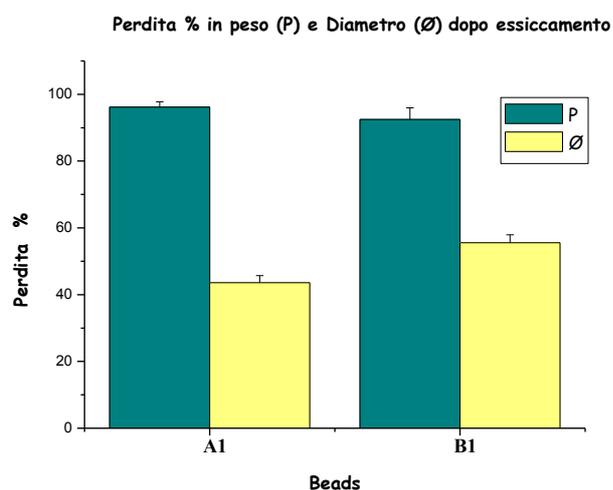


Fig.3.3.8. Perdita % in peso (P) e diametro(\emptyset) dopo essiccamento

Come si osserva non ci sono particolari differenze tra i diversi campioni di *beads* nei valori espressi in %, ma bisogna ricordare, come visto sopra, che le *beads* del campione

B1 sono notevolmente più piccole (\emptyset medio 2,5 mm) rispetto alle *beads* del campione **A1** (\emptyset medio 5,4 mm).

Da un punto di vista morfologico si osserva, che a parte le diverse dimensioni, le *beads* di entrambi i campioni presentano una forma sferica regolare e di aspetto opalescente translucido caratteristico delle *beads* appena formate. Una volta che queste vengono sottoposte ad essiccamento, presentano una forma meno regolare e una massa densa e compatta.

A titolo d'esempio la figura 3.3.9 riporta le immagini delle *beads* dei campioni appena realizzati e dopo averli sottoposti ad essiccamento.

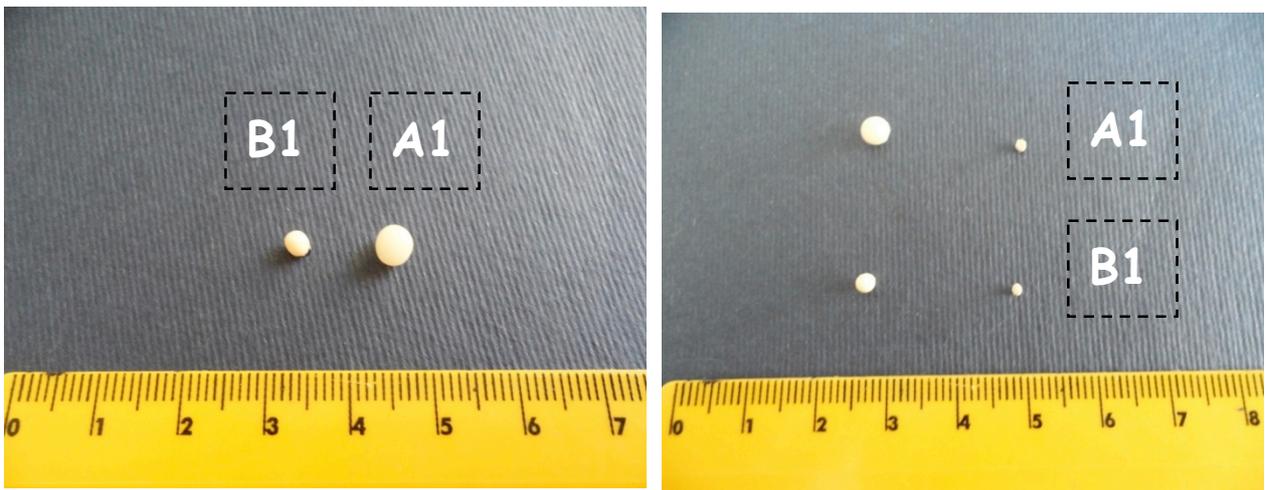


Fig. 3.3.9 Fotografia delle *beads* ad umido e a secco

3.3.4 Capacità di rigonfiamento (*swelling-ratio*)

La capacità di rigonfiamento o grado di rigonfiamento viene determinata mettendo una quantità nota di *beads* (~20), dopo trattamento all' essiccamento, a contatto con soluzioni che presentano diversi valori di pH (HCl 0,1N - pH 1, Citrato di Na/NaOH – pH 5, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ - pH 7,4), per osservare il loro comportamento e quindi verificare le variazioni di peso e dimensioni dopo un tempo di 30 minuti, 1 h e 24 h.

Nella figura 3.3.10 sono riportati in grafico i valori di *swelling* espressi in variazione di peso per le due tipologie di campioni.

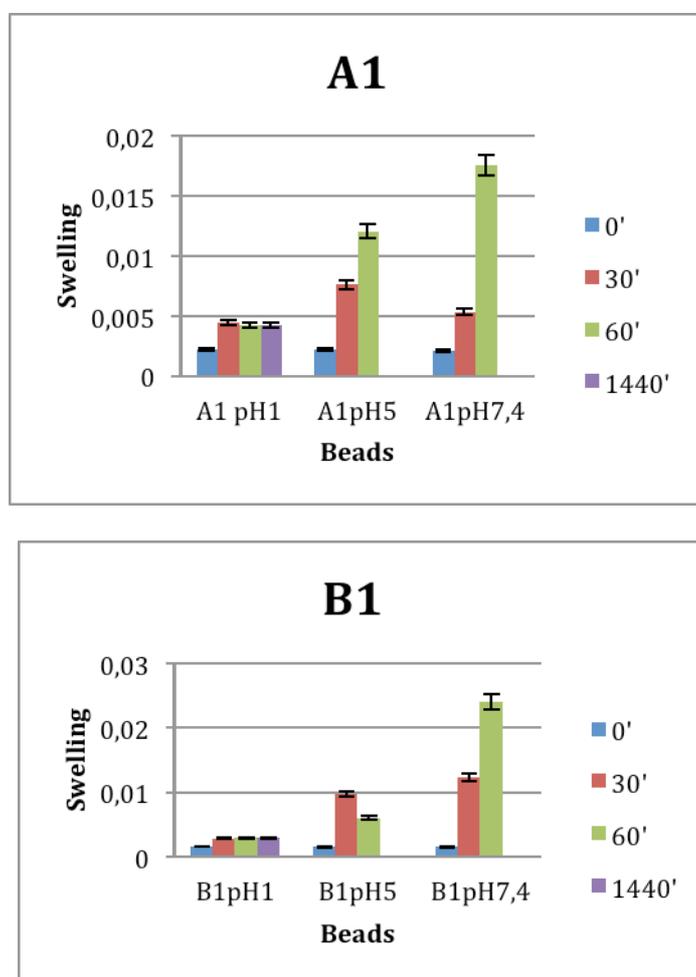


Fig. 3.3.10. Grafici relativi alle proprietà di Swelling dei campioni A1 e B1 nei diversi medium

Dall'osservazione dei due grafici si possono evidenziare i seguenti comportamenti:

- **Soluzione HCl 0,1 N -pH1**

Entrambi i campioni non mostrano particolari cambiamenti, a parte un leggero aumento di peso e dimensione, ma rimangono inalterati per tutto il tempo dell'analisi (figura 3.3.10 A1-B1). Questo comportamento risulta notevolmente positivo se si mette a confronto con quanto ottenuto nel capitolo precedente, nella quale erano stati realizzati dei campioni di *beads* costituiti dai polimeri in esame da soli e non in miscela (ossia a base di Chitosano M e a base di Alginato di calcio) (vedi figura 3.3.11).

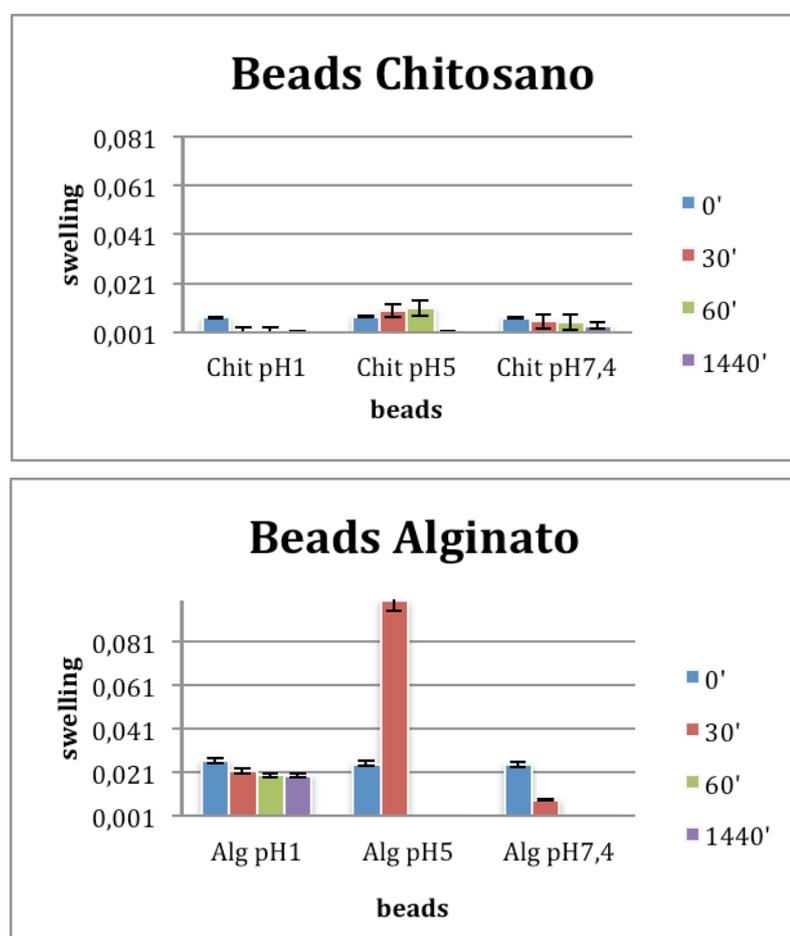


Fig.3.3.11. Grafici relativi alle proprietà di Swelling delle dispersioni polimeriche non in combinazione

Infatti i campioni di *beads* a base di chitosano, già dopo 30 minuti subivano il completo disfacimento, dovuto essenzialmente all'elevata solubilità del chitosano in soluzione acida. Le *beads* di alginato di calcio mantenevano la loro struttura, anche se ridotta di peso e dimensione rispetto al tempo 0.

- **Soluzione Citrato di sodio/NaOH – pH 5**

In questo medium il comportamento dei campioni delle *beads* non è sovrapponibile.

Infatti i campioni **A1** mostrano una variazione costante delle dimensioni fino a 1 ora; successivamente dopo circa 90' subiscono il completo disfacimento (figura 3.3.11 A1). Ciò è probabilmente dovuto al fatto che in questi campioni la struttura polimerica è costituita da una miscela omogenea dei due polimeri e parte dell'alginato di calcio si trova anch'esso a contatto con il medium.

Di conseguenza avviene uno scambio tra gli ioni Na^+ del tampone e gli ioni Ca^{++} all'interno del reticolo di alginato, facilitando la penetrazione dell'acqua e dando origine al graduale disfacimento.

Questo accade molto più lentamente con i campioni **B1** nei quali verosimilmente la superficie risulta rivestita di chitosano (figura 3.3.11 B1). Inizialmente infatti subiscono un aumento di peso, che tende a ridursi mantenendo maggiormente la struttura compatta, la quale va incontro comunque a disfacimento dopo circa 2 ore.

In ogni caso si osserva un aumento della tenuta della struttura rispetto a quanto riscontrato nelle *beads* realizzate con i singoli polimeri.

- **Soluzione per Tampone Bicarbonato- pH 7,4**

In questa soluzione il comportamento di entrambi i campioni di *beads* è praticamente sovrapponibile. Si ha infatti un ingrossamento costante fino ai 60' per poi subire il completo disfacimento dopo circa 90' (figura 3.3.11 A1-B1)

Si ha comunque un risultato di notevole miglioramento se raffrontato a quanto ottenuto con i campioni di *beads* costituiti da solo chitosano e Alginato di Calcio.

Infatti questi ultimi, in questo medium, mostravano un immediato disfacimento subito dopo i 30', mentre quelli a base di chitosano subivano delle lievi variazioni di peso e dimensioni rispetto al tempo 0, rimanendo comunque intatte per tutto il tempo dell'analisi [vedi figura 3.3.11].

Ulteriori confronti possono essere eseguiti valutando ai tempi stabiliti il rapporto:

$$\text{Swelling ratio} = W_t/W_0$$

dove:

W_t = il peso delle *beads* ad un tempo t prestabilito

W_0 = il peso iniziale delle *beads* (dopo 24 h di trattamento in essiccatore)

Tale valore può risultare :

$W_t/W_0 = 1$ quando non si riscontra alcuna variazione

$W_t/W_0 > 1$ quando si osserva un aumento di peso e dimensione

$W_t/W_0 < 1$ quando si osserva una diminuzione di peso e dimensione

Nelle figure 3.3.12 (a,b,c) sono riportati i grafici relativi ai valori di *swelling ratio* ottenuti per i campioni delle *beads* contenenti *Boswellin*[®] nelle tre soluzioni sopra elencate.

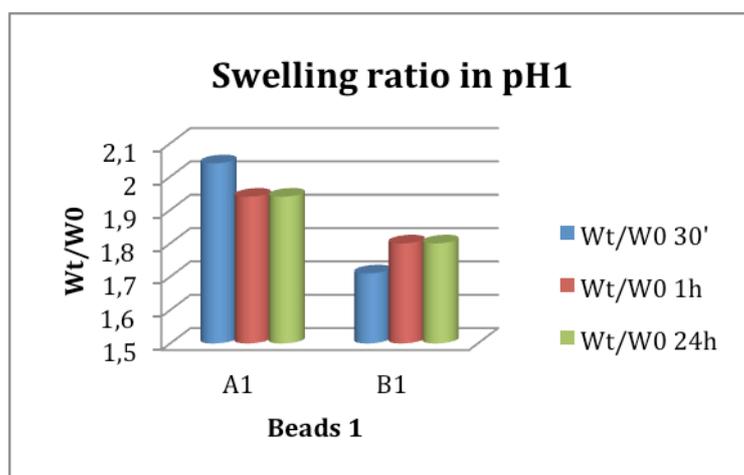


Fig. 3.3.12. a) *Swelling ratio a pH1*

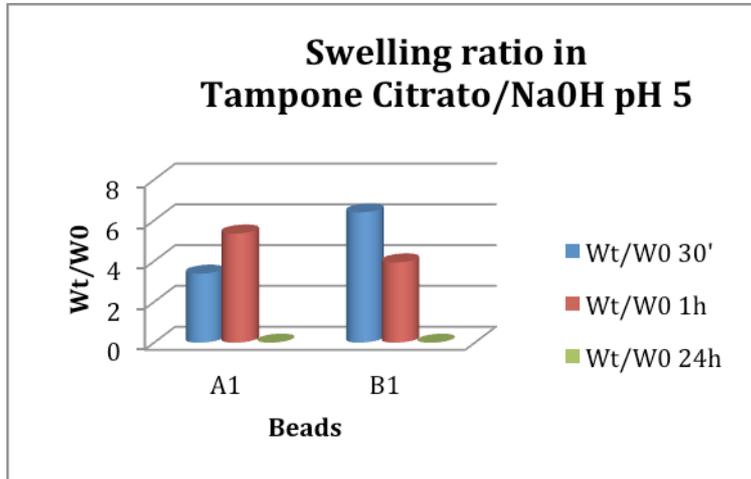


Fig.3.3.12.b) *Swelling ratio a pH 5*

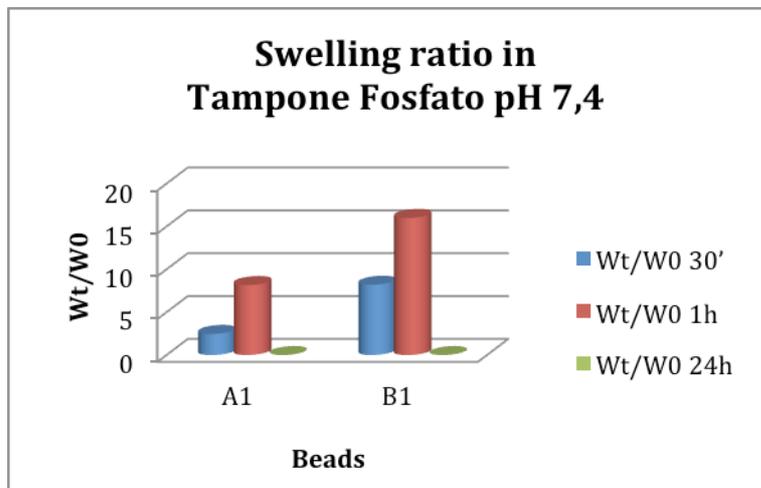


Fig.3.3.12.c) *Swelling ratio a pH7,4*

Da quanto detto si può affermare che attraverso gli studi di *swelling* si mette in evidenza come il tipo di matrice polimerica giochi un ruolo molto importante nel prevedere il comportamento delle *beads* all'interno del sistema gastroenterico.

A questo scopo è stata eseguita un'analisi per evidenziare il comportamento allo *swelling* nel tempo, ai diversi valori di pH, simulando il tragitto gastroenterico.

Nella figura 3.3.11 viene riportato il grafico relativo ai risultati ottenuti nell'analisi di *swelling* ai diversi valori di pH, valutando il tempo fisiologico nei diversi tratti del sistema gastroenterico: 2 ore a pH 1; 1 ora a pH 5; 1 ora a pH 7.

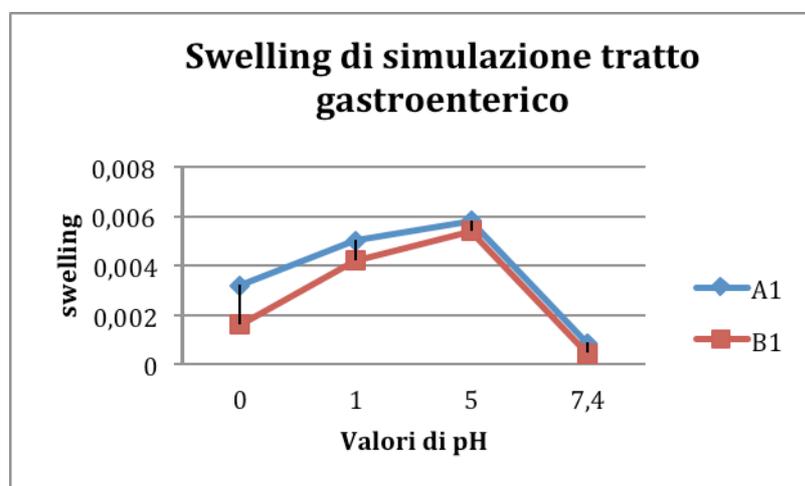


Fig.3.3.13. *Swelling nel tempo a diversi valori di pH*

Da quanto evidenziato l'andamento fa presupporre un comportamento ottimale delle *beads* nei confronti dei diversi medium che s'incontrano nel tratto gastroenterico. Il tutto è direttamente correlato alla capacità di questi sistemi, come vedremo in seguito, di rilasciare il farmaco incorporato nelle modalità e nei tempi previsti.

3.3.5 Capacità incapsulante (E%)

La valutazione della capacità incapsulante dei campioni di *beads* realizzati è stata ottenuta sottoponendo all'analisi allo Spettrofotometro UV le soluzioni derivanti dalla rottura agli ultrasuoni di un numero ben definito di *beads* (≈ 10 beads).

L'analisi è stata eseguita alla lunghezza d'onda(λ) di **249 nm** corrispondente al massimo di assorbimento per l'Acido β -boswellico conforme a quanto riportato in letteratura ^[28].

I valori di assorbanza sono stati trasformati nei corrispondenti valori di concentrazione in base alla retta di taratura precedentemente realizzata in soluzione etanolica avente un coefficiente di regressione $R = 0,9994$.

Per determinare la % incapsulante dei campioni di *beads* realizzati si utilizzano le espressioni matematiche [1] e [2] elaborate in questo studio, riportate nel capitolo 2.2.21 :

$$Z_a = Q \frac{W_u}{W_t} \quad \boxed{1}$$

$$E\% = \frac{D}{Z_a} \cdot 100 \quad \boxed{2}$$

*[(Q) quantità in peso di farmaco utilizzato nella dispersione; (W_t)^{*4} quantità in peso delle beads teoricamente ottenibili; (W_u) quantità in peso dei beads umidi effettivamente ottenuti; (Z_a) quantità teorica in peso del farmaco sulla W_u; (D) quantità in peso di farmaco effettivamente presente sul W_u in base alla metodica di rottura e analisi allo Spettrofotometro UV.]*

⁴ Il valore di (W_t) si calcola come riportato nella tabella relativa al calcolo della resa per ciascun campione (valore in rosso).

I risultati ottenuti sono riassunti nella Tabella 4.

<i>Beads</i>	(W _T)* g	(W _R)* g	(Q) g	(Za) g	(D) g	% Incapsulata	Titolo %
A1	3,652 ± 0,91	3,261 ± 0,54	0,040 ± 0,0033	0,0357± 0,001	0,01842 ±0,009	52,68	14,85
B1 1a fase	3,960 ±0,87	2,9289 ±0,35	0,043 ± 0,0041	0,0318± 0,001	-	-	-
B1 2a fase	2,214 ±0,85	1,835 ± 0,35	0.043 ±0,0034	0,0356± 0,002	0,028197 ±0,0015	79,20	20,99

*I valori si riferiscono alla media di tre determinazioni

Tab.4. Capacità incapsulante E% e titolo in Boswellin dei campioni di beads realizzati

Dai risultati si osserva una maggiore capacità incapsulante da parte delle *beads* realizzate con la **METODICA B**, le quali presentano il maggiore titolo % in Boswellin®.

Il maggior contenuto in Boswellin® presente nelle *beads* **B1** può essere spiegato col fatto che la metodica di preparazione gioca un ruolo importante nella capacità di trattenere il p.a. nella struttura polimerica.

Infatti nella **METODICA B** si sfrutta la gelazione immediata dell'Alginato di sodio con CaCl₂, e a questo punto le *beads* formate vengono successivamente disposte in una dispersione di chitosano, il quale coacerva sulla superficie, proteggendole dall'eventuale rilascio del farmaco nel medium di gelificazione.

Nella **METODICA A** questi passaggi avvengono in contemporanea e probabilmente, prima che l'Alginato di sodio gelifichi ad Alginato di calcio, si verifica una certa perdita del p.a. nel medium di gelificazione costituito in questo caso da chitosano e CaCl₂.

Da questi risultati si può ipotizzare una diversa conformazione delle *beads* realizzate come mostrato nella figura 3.3.15.

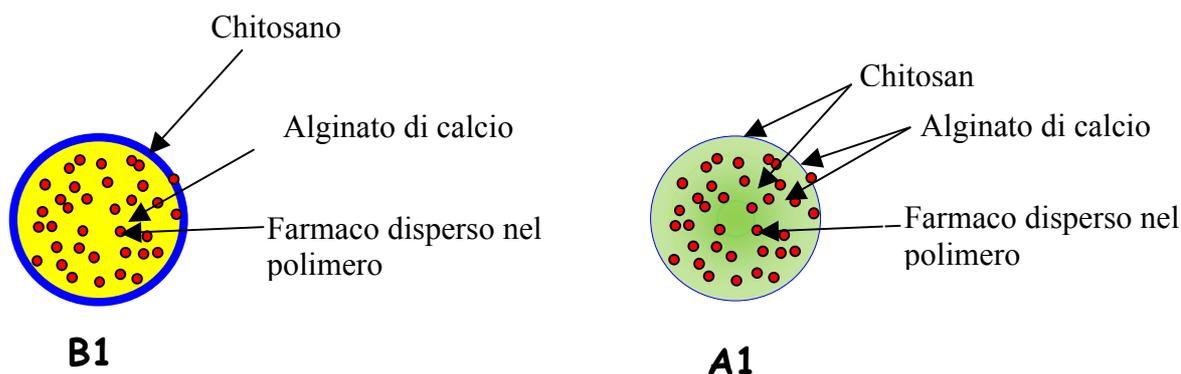


Fig.3.3.15. Rappresentazione schematica della formazione delle *beads* con le due metodiche.

3.3.6 Proprietà di rilascio

Gli studi di rilascio sono stati eseguiti in due medium a diversi valori di pH per simulare il comportamento nel tragitto gastroenterico:

- ✓ una soluzione di HCl 0,1 N a pH 1, alla temperatura di 37°C
- ✓ una soluzione di tampone bicarbonato a pH 7,4, alla temperatura di 37°C

Le figure 3.3.16 e 3.3.17 riportano i grafici relativi all'andamento del rilascio per ciascuna tipologia di *beads*, rispettivamente a pH 1 e a pH 7,4.

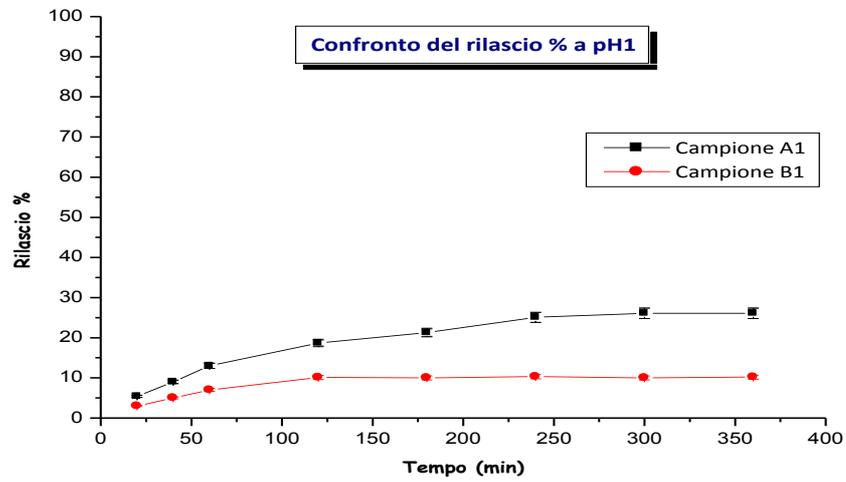


Fig. 3.3.16. Curve di rilascio di Boswellin[®] a pH 1

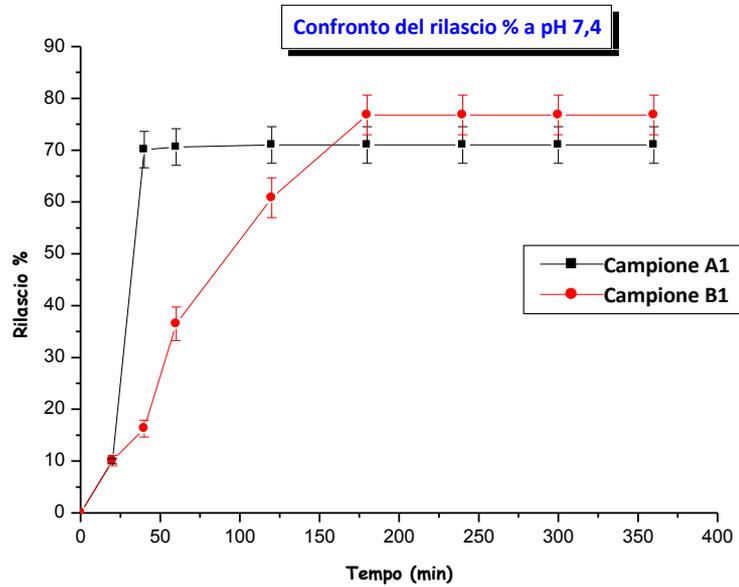


Fig. 3.3.17. Curve di rilascio di Boswellin[®] a pH 7,4

Come atteso dagli studi eseguiti al saggio di *swelling*, si riscontra una corrispondenza di comportamento da parte dei campioni **A1** e **B1** del rilascio in *Boswellin*[®] ai diversi valori di pH.

In particolare a pH 1, come ci si aspettava, entrambi i campioni presentano una percentuale di rilascio di *Boswellin*[®] molto bassa ($\approx 10\%$ per il campione **B1** e $\approx 20\%$ per il campione **A1**) che permane nell'ordine di questi valori per tutto il tempo dell'analisi.

Questo sta a dimostrare che nell'ipotetica somministrazione orale, le *beads*, e maggiormente i campioni **B1**, sono in grado di superare quasi inalterati l'ambiente gastrico, e questo era uno degli obiettivi principali del nostro studio.

Infatti confrontando il rilascio ottenuto con campioni di *beads* costituiti da solo chitosano (**Ch**) e solo alginato di calcio (**Alg**), abbiamo un comportamento simile a quello ottenuto con questi ultimi (figura 3.3.18), a differenza di quelli costituiti da solo chitosano che rilasciavano immediatamente il farmaco.

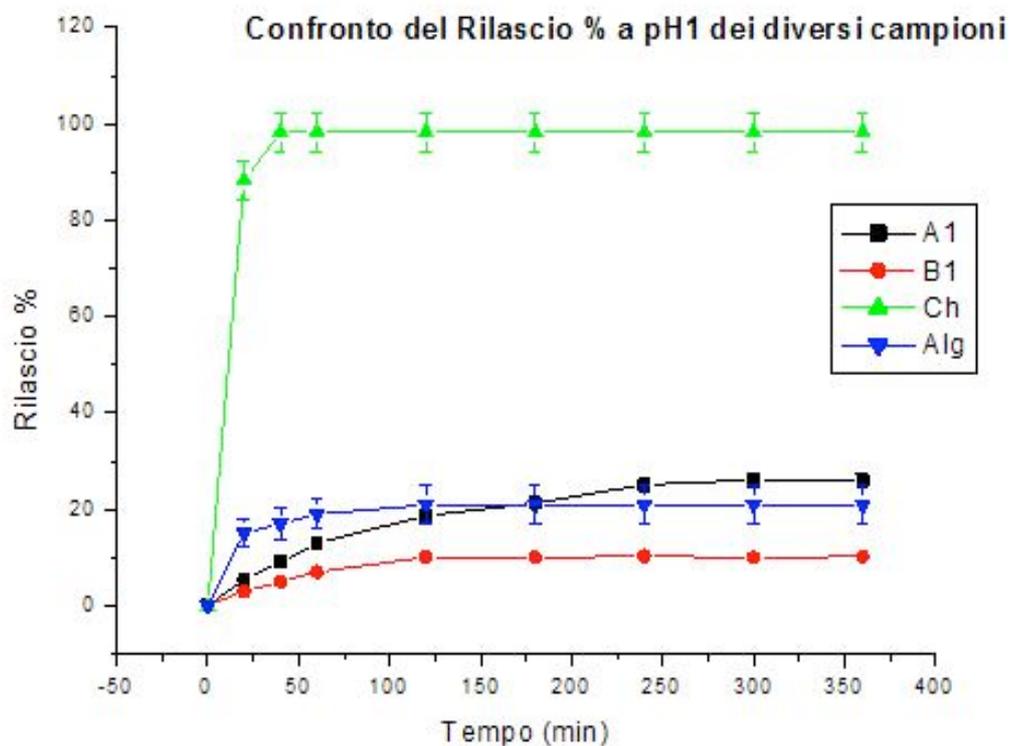


Fig.3.3.18. Confronto tra le curve di rilascio ottenute a pH 1 dalle diverse formulazioni di beads realizzate

Di contro nel medium a pH 7,4 si ha un miglioramento del rilascio graduale di Boswellin® in particolare da parte del campione **B1** che raggiunge il massimo di rilascio alle 2 ore, mentre il campione **A1** lo raggiunge già ai 30 minuti.

Anche in questo caso il confronto con i campioni **Ch** e **Alg** mette in evidenza come con il campione **B1** si è migliorato notevolmente il rilascio graduale in questo medium, già riscontrato con le *beads Ch*, ma a differenza di queste ultime il campione **B1** è in grado di resistere alla degradazione gastrica.

Non ci sono d'altra parte variazioni per il risultato ottenuto con il campione **A1** rispetto alle *beads Alg* (figura 3.3.19).

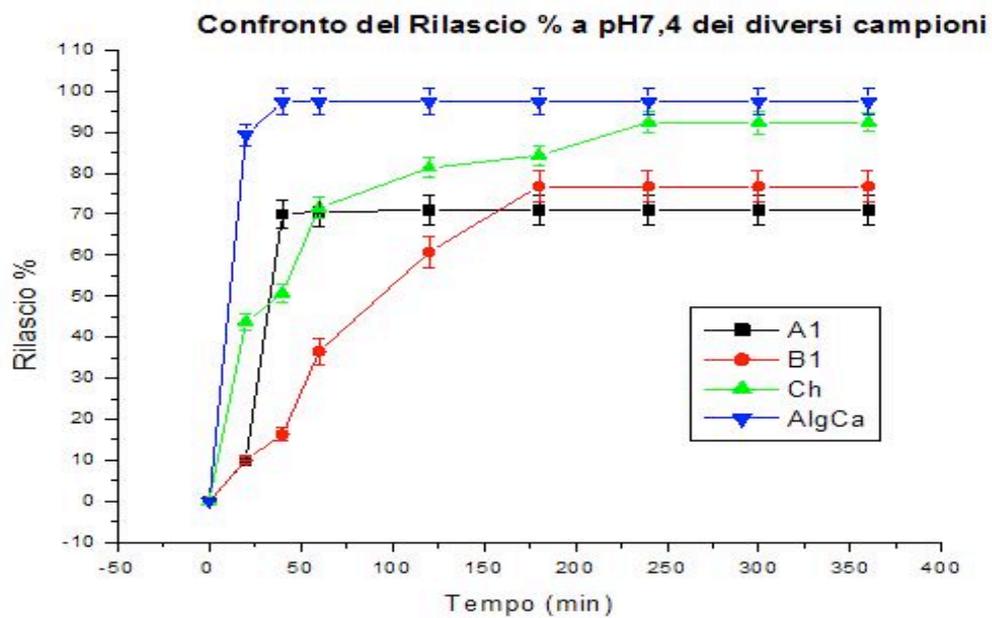


Fig.3.3.19. Confronto tra le curve di rilascio ottenute a pH 1 dalle diverse formulazioni di beads realizzate

Questi risultati mettono in evidenza come la metodica di preparazione gioca un ruolo fondamentale per poter raggiungere l'obiettivo preposto riguardante il rilascio di *Boswellin*[®] mirato al colon.

3.4 Conclusioni

In questo lavoro sperimentale è stata messa a punto una metodica per la realizzazione di sistemi particellari, le *beads*, di composizione polimerica alginato di calcio/chitosano in grado di incapsulare un estratto titolato di acidi boswellici, *Boswellin*[®], derivato vegetale di recente utilizzo per le sue notevoli proprietà antinfiammatorie particolarmente mirate nella terapia delle infiammazioni a livello del Colon.

Sulla base dei risultati ottenuti, messi a confronto con i dati riscontrati nella prima parte del lavoro sperimentale, dove venivano realizzati *beads* utilizzando alginato di sodio e chitosano singolarmente, si è potuto mettere in evidenza come il tipo di polimero utilizzato per la realizzazione di tali sistemi giochi un ruolo fondamentale nella possibilità che il farmaco prescelto possa distribuirsi nei diversi tratti del sistema gastrointestinale.

Infatti la combinazione dei due polimeri ha permesso di ottenere delle *beads* in grado di attraversare quasi inalterate l'ambiente gastrico a pH 1 e di rilasciare il p.a. in modo graduale man mano che il pH raggiunge valori intorno a pH 7,4, valore caratteristico dell'intestino a livello del colon. Ciò costituisce uno degli obiettivi che ci si era proposti di raggiungere all'inizio di questo studio.

In aggiunta la metodica utilizzata per la realizzazione delle *beads* in questo lavoro, ha permesso di ottenere, riguardo questo aspetto, risultati migliori rispetto alla metodica descritta in letteratura.

Questo è probabilmente da attribuirsi alla ulteriore gelazione ionotropica che si verifica tra i gruppi NH_3^+ del chitosano e i gruppi COO^- dell'Alginato di calcio, la quale nella METODICA B avviene in maniera più evidente, creando presumibilmente un guscio di chitosano intorno alle *beads* di alginato di calcio, meccanicamente più compatto rispetto a quello che si viene a creare con la METODICA A.

Ulteriori studi eseguiti attraverso le analisi TEM (Transmission Electron Microscopy) e SEM (Scanning Electron Microscope) permetteranno di chiarire quest'aspetto che

potrà inoltre essere ulteriormente migliorato affinando alcuni parametri della metodica utilizzata.

Bibliografia

1. Farmacopea Italiana XII Edizione – 2008 pag. 885
2. Colombo P, Catellani P L, Gazzaniga A, Menegatti E, Vidale E. *Principi di Tecnologie Farmaceutiche*, C. Editrice Ambrosiana, 2002, cap 10.1.
3. Colombo P, Catellani P L, Gazzaniga A, Menegatti E, Vidale E. *Principi di Tecnologie Farmaceutiche*, C. Editrice Ambrosiana, 2002, cap 10.2.
4. Paños I, Acosta N, Heras A. *New drug delivery systems based on chitosan*. *Curr Drug Discov Technol*. 2008 Dec; 5(4):333-41.
5. Barbosa MA, Granja PL, Barrias CC, Amaral IF. *Polysaccharides as scaffolds for bone regeneration*, *ITBM-RBM* 26 (2005) 212–217
6. Zhang J, Xia W, Liu P, Cheng Q, Tahirou T, Gu W, Li B. *Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications*. *Mar Drugs*. 2010 Jun 25;8(7):1962-87. Review
7. Matricardi P, Meo CD, Coviello T, Alhaique F. *Recent advances and perspectives on coated alginate microspheres for modified drug delivery*. *Expert Opin Drug Deliv*. 2008 Apr;5(4):417-25.
8. Reis CP, Neufeld RJ, Vilela S, Ribeiro AJ, Veiga F. *Review and current status of emulsion/dispersion technology using an internal gelation process for the design of alginate particles*. *J Microencapsul*. 2006 May;23(3):245-57.
9. Muzzarelli R A A. *Stereochemistry and physical characterization*. In: *Chitin*, (Ed.). Pergamon Press, Oxford, 1977, pp. 45-86.
10. Roberts GAF. *Chitin chemistry*. Houndmills: The Macmillan Press; 1992.
11. Hirano S, Seino H, Akiyama Y, Nonaka I, *Progress in Biomedical Polymers*, C.G. Jebelein and R.L. Dunn, eds., 1990, p.283.
12. Struszczyk H, Wawro D, Niekraszewicz A. *Advances in Chitin and Chitosan*, (C.J. Brine, P.A. Sandford, J.P. Zikakis, eds.), Elsevier Applied Science, London, 1991, p. 580.
13. Knapczyk J, Kròwczynski L, Pawlik B, Liber Z. *Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical properties and applications* (G. Skjak-Braik, T. Anthonsen, P. Sandford, eds.), 1984 Elsevier Applied Science, London, p. 665.
14. <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucares/alginato.html>
15. Mahmood Bi F, Arman S J, Taj M, Iqbal N, S. *Physicochemical Characterization and ionic studies of sodium alginate from Sargassum terrarium (brown algae)*. *Phys. Chem. Liq*. 2007, 45 (4), 453, Taylor and Francis.

-
16. Blandino A, Macias M, Centro D,. *Immobilization of glucose oxidase within calcium alginate gel capsule*. Prep. Biochem. 2001,36, 601.and Francis.
 17. Majeed M. et. al. *Boswellin® The Anti-inflammatory Phytonutrient*. Nutriscience Publishers, NJ,1996.
 18. Safayhi H. et. al. *Inhibition by boswellic acids of human leukocyte elastase*. J. Pharmacol. Exp. Ther.1997, 281:460-463.
 19. Majeed M. et. al. *Redefining our standards Boswellin® The only natural leukotriene and HLE inhibitor™* 1999Information brochure from Sabinsa Corporation.
 20. Safayhim H. et. al. *Boswellic acids: novel, specific, non-redox, inhibitors of lipoxygenase*. J.Pharmacol. Exp. Ther. 1992. 261: 1143-6.
 21. Majeed, M., Badmaev, V., Gopinathan, S., Rajendran, R., Norton, T., and Braly, J. *Boswellin® The Anti-inflammatory Phytonutrient*. 1996Nutriscience Publishers Inc., Piscataway, NJ.
 22. Henderson, W.R. *The role of leukotrienes in inflammation*. Ann. Intern. Med. 1994, 121, 684-697
 23. Ford Hutchinson AW, Gresser M, and Young R.N. *5-Lipoxygenase*. Ann. Rev. Biochem. 1993, 63, 383-417.
 24. Safayhi, H., Mack, T., Sabieraj, J., Anazodo, M.I., Subramanian, L.R., and Ammon, H.P.T. 1992 *Boswellic acids: Novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 261(3), 1143-1146.
 25. Sailer, E-R., Subramanian, L.R., Rall, B., Hoernlein, R.F., Ammon, H.P.T., and Safayhi, H. (1996) *Acetyl-11-keto-b-boswellic acid (AKBA): structure requirements for binding and 5-lipoxygenase inhibitory activity*. Br. J. Pharmacol. 117, 615-618.
 26. Sailer, E-R.; Schweizer, S., Boden, S.E., Ammon, H.P.T., and Safayhi, H. (1998) *Characterization of acetyl-11-keto-b-boswellic acid and arachidonate-binding regulatory site of 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling*. Eur. J. Biochem. 256, 364-368.
 27. Werz, O., Szellas, D., Henseler, M., and Steinhilber, D. (1998) *Nonredox 5-Lipoxygenase inhibitors require glutathione peroxidase for efficient inhibition of 5-lipoxygenase activity*.Molecular Pharmacology 54, 445-451.
 28. Safayhi, H., Rall, B., Salier, E-R., and Ammon, H.P.T.*Inhibition by boswellic acids of human leukocyte elastase*. (1997) J. Pharmacol. Exp. Ther. 281, 460-463.
-

-
29. Gupta, I., Parihar, A., Malhotra, P., Singh, G.B., L..udtke, R., Safayhi, H., and Ammon, H.P. *Effects of Boswellia serrata gum resin in patients with ulcerative colitis*. Eur. J. Med. Res. (1997) 2(1), 37-43.
 30. Shao Y et al *Inhibitory activity of boswellic acid from Boswellia serrata against human leukaemia HL-60 cells in culture*, (1998), *Planta medica*, 64 (1) 328-331.
 31. Vinay KV, Sivakumar T. Tamizh Mani T, *Colon targeting delivery system. A review on recent aptaches*, *Int. J.Pharm Biomed Sci* 2011, 2(1) 11-19
 32. Shu XZ, Zhu KJ, *The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2002,54, 235-243
 33. *Farmacopea Italiana XII Edizione – 2008 Saggio di dissoluzione per le forme farmaceutiche solide*, cap.2.9.2.
 34. Kim C-K, Lee E-J. *The controlled release of blue dextran from alginate beads*. *Int J Pharm.* 1992; 79:pag 11–19
 35. Kulkarni AR, Soppimath KS, Aminabhavi TMh, Dave AM, *Polymeric sodium alginate IPN beads for the controlled release of chlorpyrifos* *J. Appl. Polym. Sci.* 2002, 85, 911.
 36. Norma UNE 55-902-85, Agentes de superficie. CDU 661.187:543.71 (1985).
 37. Sevgi Takka and Aybige Gürel, *Evaluation of Chitosan/Alginate Beads Using Experimental Design: Formulation and In Vitro Characterization*. Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, University of Gazi, 06330 Etiler, Ankara, Turkey. General Directorate Pharmaceuticals and Pharmacy, November 10, 2009; Accepted February 19, 2010.

4. Le nanoparticelle di trimetilchitosano

4.1 Sistemi nanoparticellari

Da diverso tempo, nell'ambito della tecnica farmaceutica, i sistemi nanoparticellari sono studiati e proposti come potenziali vettori per il direccionamento sito-specifico di farmaci, vaccini, plasmidi, proteine e oligonucleotidi.

I sistemi nanoparticellari, inoltre sono visti con molto interesse, soprattutto per l'evoluzione in quella branca che oggi viene chiamata comunemente nanomedicina.

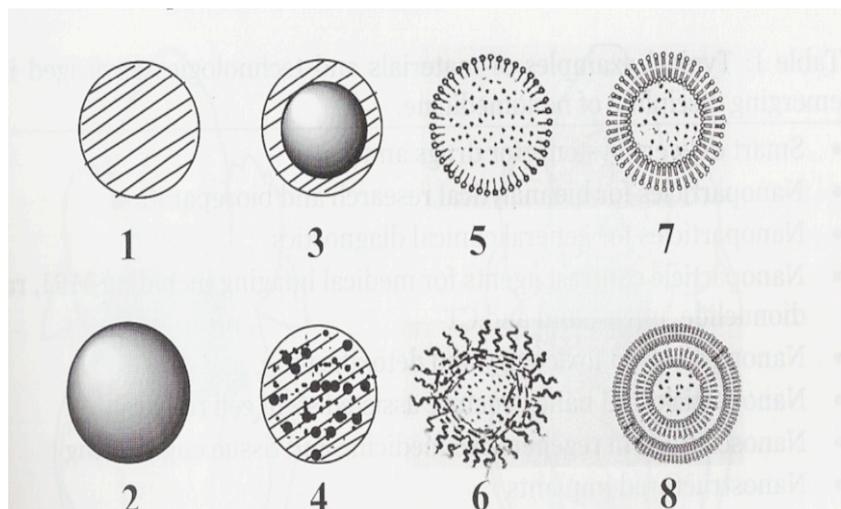
Ci sono diversi esempi di nanotecnologia nella pratica clinica, come per esempio le preparazioni a base di farmaci radionuclidi, utilizzate in medicina come sorgente di radiazioni per radioterapia o per uso diagnostico o la preparazione di nanoparticelle utilizzate nella Risonanza magnetica nucleare.

La nanomedicina pertanto può essere definita come *l'applicazione di nanomateriali e nanotecnologie in medicina, ossia l'applicazione della tecnologia di nano sistemi nella medicina diagnostica e terapeutica.*

I vettori utilizzati in nanomedicina pertanto possono essere descritti in base alla morfologia, alle dimensioni e al modo in cui questi sistemi incapsulano o trasportano il principio attivo e pertanto analogamente ai microsistemi possono essere così classificati^[1]:

Figura 4.1:

Morfologia idealizzata di differenti tipi di sistemi nanoparticellari



1. *Nano-microsfere porose (5 nm - 1000 μ m)*
2. *Nano-microsfere non porose (5 nm - 1000 μ m)*
3. *Nano-microparticelle costituite da un nucleo centrale (50 nm- 1000 μ m)*
4. *Nano-microsfere in cui il farmaco è inglobato nella matrice polimerica (50 nm- 1000 μ m)*
5. *Micelle surfattanti convenzionali (5 -10 nm)*
6. *Micelle polimeriche (10-100 nm)*
7. *Vescicole lipidiche unilamellari (liposomi, di solito 20-100 nm)*
8. *Vescicole multilamellari (di solito 100 – 300 nm)..*

Il primo problema è quello di scegliere i sistemi micro o nano particellari da utilizzare in funzione del campo di applicazione. Le dimensioni giocano quindi un ruolo molto importante a questo scopo.

L'utilizzo infatti di nanoparticelle in nanomedicina o nella tecnologia farmaceutica si deve soprattutto al fatto che le loro dimensioni le rendono adatte per la maggior parte

delle vie di somministrazione, quali la via parenterale, la via orale, ma anche la somministrazione oculare.

Tabella 4.1. Esempi di materiali e tecnologie utilizzate nella disciplina emergente della nanotecnologia

Piccoli sistemi di delivery per i farmaci e geni
Nanoparticelle per la separazione e ricerca bioanalitica
Nanoparticelle per la diagnostica clinica generale
Agenti di contrasto nanoparticellari per la diagnostica medica per immagini quali la Risonanza Magnetica, radionuclidi e altro
Nanoparticelle in tossicologia e detossificazione
Nanoparticelle e nanostrutture associate alla ricerca su cellule staminali
Sistemi nanoparticellari nella medicina e ingegneria rigenerativa tissutale
Impianti nanostrutturati
Biosensori cellulari e biochips
Rivestimenti biocompatibili nanostrutturati
Nanorobots in chirurgia
Tessuti medici
Nanosistemi per la cura del paziente

I vantaggi di tali sistemi rispetto ai sistemi tradizionali sono:

- a) Aumento della stabilità del farmaco (protezione contro l'inattivazione del principio attivo fino al raggiungimento del sito d'azione);
- b) Ottimizzazione dell'efficacia farmacologica (capacità di aumentare la biodisponibilità dei farmaci trasportati attraverso barriere anatomiche inaccessibili e maggiore penetrazione intracellulare realizzata mediante un processo di endocitosi);
- c) Riduzione degli effetti tossici e collaterali del farmaco;

d) Riduzione delle fluttuazioni ematiche del farmaco (minore rischio di concentrazione inefficace o tossica);

e) Rilascio modificato e direzionato di farmaci (es.: nel fegato, nel SNC, nelle cellule tumorali e/o nei tumori solidi) dovuto ad una maggiore affinità del *carrier* per alcuni tessuti;

f) Potenziale ampio spettro di applicazione (esterna, oftalmica, orale, parenterale);

Un altro vantaggio delle nanoparticelle è che la loro natura polimerica permette anche un rilascio sostenuto e controllato del farmaco inglobato.

4.2 Tecniche di preparazione delle nanoparticelle

I metodi di preparazione delle nanoparticelle sono fondamentalmente di due tipi:

- Metodiche che utilizzano materiali polimerici preformati e che possono essere idrofili e lipofili e di origine naturale, sintetica o semisintetica.
- Metodiche che invece impiegano reazioni di polimerizzazione di monomeri sia lipofili che idrofili.

Come sempre l'impiego di un metodo piuttosto che un altro dipende da una serie di fattori che riguardano, in primo luogo, il principio attivo e le sue caratteristiche chimico-fisiche, il tipo di rilascio che si vuole ottenere, il sito d'azione che si vuole raggiungere, la via di somministrazione, la bioadesività/biocompatibilità del materiale polimerico.

Inoltre si deve tener conto della capacità di caricamento del farmaco da parte del polimero e si deve mirare ad un'elevata efficienza di incapsulamento, ad una buona resa teorica e all'aspetto economico del procedimento nell'insieme ^[2].

4.2.1 Metodi che utilizzano polimeri preformati

L'utilizzo di polimeri preformati è vantaggioso rispetto all'uso di monomeri per una serie di motivi :

- Proprietà chimico-fisiche ben determinate
- Standard di sicurezza e accettabilità
- Assenza di possibili reazioni tra farmaco e monomeri.

4.3 La barriera ematoencefalica

La barriera ematoencefalica (BEE) separa il parenchima del cervello dalla circolazione sanguigna e mantiene l'omeostasi del cervello rendendo inaccessibile la maggior parte delle sostanze circolanti nel sangue e i microrganismi^[3].

D'altra parte questo meccanismo di auto protezione può diventare un ostacolo insormontabile quando si voglia veicolare dei farmaci al Sistema Nervoso Centrale (SNC). E' risaputo infatti che il 100% dei farmaci ad alto peso molecolare e più del 98% dei farmaci a basso peso molecolare non passano attraverso la BEE^[4]. Di conseguenza, diversi disturbi neurologici non possono essere curati. Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi sistemi di rilascio mirato al SNC, inoltre molta parte degli studi si sono indirizzati sulla nanotecnologia e in particolare sui *nanocarriers* di tipo polimerico, promettenti candidati perché in grado di aprire le "tight junctions", mascherare efficacemente il farmaco nei confronti dei sistemi di protezione della BEE, prolungarne il rilascio proteggerlo dalla degradazione enzimatica^[5].

4.4 I Prioni

I prioni sono degli agenti infettivi non convenzionali coinvolti in una serie di amiloidosi cerebrali fatali dei mammiferi^[6].

Tali amiloidosi sono generalmente note con il nome di Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (TSE) che colpiscono diverse specie animali, in particolare i mammiferi e tra questi l'uomo.

Tale tipo di patologie sono generalmente caratterizzate da un periodo più o meno lungo di incubazione, durante il quale la malattia è difficilmente dimostrabile poiché allo stato attuale non esistono dei *test* (se non a livello sperimentale) che possano andare a ricercare per esempio l'agente infettivo che non è convenzionale.

Un'altra caratteristica è la lenta e progressiva neuro degenerazione. Le Encefalopatie spongiformi trasmissibili sono tutte letali e responsabili della formazione di grossi vacuoli nella corteccia cerebrale e nel cervelletto, chiaramente evidenziabili *post mortem* nel corso di indagini istopatologiche, dando ai tessuti sopraddetti un aspetto spugnoso (*Status Spongiosu*).

Nessuna di queste patologie induce la febbre nei soggetti che ne sono affetti, né altresì induce segni di alcun processo infiammatorio in atto.

Inoltre, il sistema immunitario non risponde all'agente eziologico e questo non solo è provato da quanto detto prima ma anche dal fatto che se si contano le cellule immunitarie nel liquido cefalorachidiano queste risultano nella norma.

Tuttavia, l'assenza di reazioni infiammatorie ed immunitarie rilevabili, non è più un elemento universalmente riconosciuto ^[7,8].

Le modificazioni anatomo-patologiche sono confinate nel SNC. Si ha un'anomala proliferazione degli astrociti (cellule cerebrali con funzione di sostegno) e una riduzione dei dendriti dei neuroni implicati nella trasmissione degli impulsi nervosi. Inoltre, in molti casi si osservano placche amiloidi, depositi di materiale con struttura fibrillare, i quali, però, non sembrano essere una caratteristica costante o necessaria di detti stati patologici.

Possono essere latenti per anni (o anche per decenni nell'uomo) e sempre caratterizzate dalla presenza di una proteina specifica, il **PRIONE** (Proteinaceous Infectious Particle o entità proteiche infettanti), che svolge un ruolo cruciale nella patogenesi della malattia ed è responsabile dello sviluppo delle lesioni degenerative; si parla infatti di malattie da prioni o amiloidosi cerebrali per definire tali patologie.

Proprio per questo motivo sono stati studiati gli effetti antiprionici per mezzo dell'utilizzo di farmaci comprendenti una duplice combinazione di modulatori degli esteri del colesterolo e una rappresentativa di farmaci inibitori dei prioni a diverso meccanismo d'azione ^[9].

I risultati ottenuti per effetto di questa duplice combinazione sono diversi e vanno dalla sinergia all'effetto nullo a seconda dell'inibitore considerato, della concentrazione usata, della sequenza temporale nell'aggiunta del farmaco.

L'effetto sinergico antiprionico è stato ottenuto per esempio attraverso la combinazione sequenziale dei modulatori degli esteri del colesterolo quali *everolimus*, *pioglitazone*, *progesterone* e *verapamile* seguiti da *clorpromazina*, e da *everolimus* e *pioglitazone* seguiti dalla *quinacrina*.

Tale effetto è giustificato dall'interazione molecolare che interessa i differenti *step* dello stesso processo globale, vale a dire del sistema delle TSE, per stabilire se le combinazioni di farmaco testate nel presente studio possono essere considerate di potenziale attività clinica nel trattamento delle TSE.

Per poter studiare la potenziale attività clinica è necessario veicolare tali farmaci nel SNC, ragion per cui obiettivo primario di questo studio è stato quello di sviluppare e caratterizzare dei sistemi nanoparticellari in grado di veicolare i farmaci in oggetto utilizzando inizialmente come farmaco modello il Progesterone.

4.5 Il trimetilchitosano cloridrato

Il trimetilchitosano (TMC) è un derivato quaternizzato del Chitosano che ha la proprietà di essere carico positivamente in condizioni fisiologiche.

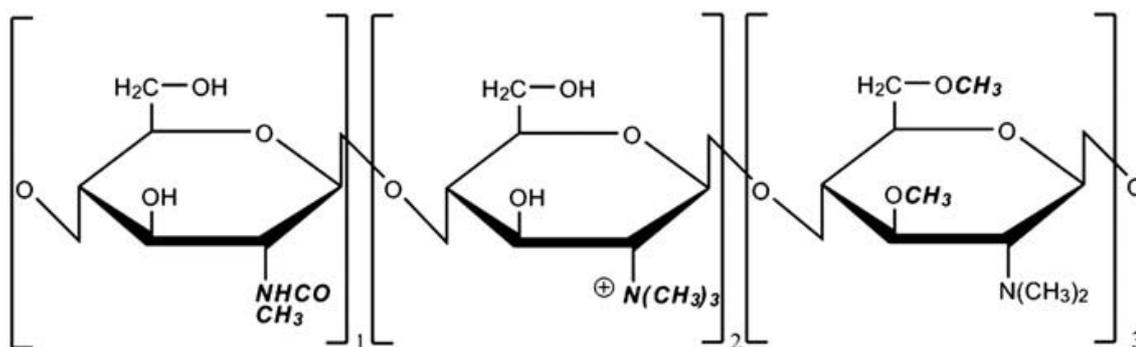


Fig. 4.2. Rappresentazione della Struttura chimica del TMC

Il grado di quaternizzazione del TMC gioca un ruolo fondamentale nella solubilità, nella capacità di promuovere l'assorbimento dei farmaci e nelle proprietà muco adesive di questo polimero^[10].

Il TMC è solubile in acqua, è biocompatibile, biodegradabile, non tossico ed è un attraente alternativa al chitosano, per la preparazione di *carrier* nanoparticellari veicolanti macrosoluti come il DNA e le proteine^[11].

Come ligando cationico può facilitare il trasporto attivo di nanoparticelle, attraverso il meccanismo di assorbimento-mediato di transitosi (AMT) e questo a causa di interazioni elettrostatiche che vengono a crearsi tra le nanoparticelle, cariche positivamente, e le cariche negative presenti sulla membrana plasmatica .

4.6 Scopo del Lavoro

La fase iniziale di questo lavoro sperimentale è stata quella di eseguire una modifica nella sintesi ^[12] di un derivato quaternizzato del Chitosano L, il Trimetil Chitosano Cloridrato (TMC), variando il numero ma soprattutto la durata di alcuni *step* di reazione, al fine di ottenere un derivato quaternizzato, che mostrasse il giusto compromesso tra la solubilità in acqua e il grado di quaternizzazione.

Un passaggio importante è stata la caratterizzazione del TMC, soprattutto mediante la spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR), nonché la caratterizzazione chimico fisica delle dispersioni risultanti in seguito alla solubilizzazione del TMC in acqua.

La fase successiva ha riguardato la realizzazione di sistemi nanoparticellari a base di questo polimero, mediante il metodo della gelazione ionotropica, il tutto avvalendosi degli ultrasuoni per ottenere una fase dispersa di dimensioni nanometriche.

La finalità fondamentale di questo studio è stata quella di ottenere una popolazione omogenea di nanoparticelle di dimensioni ottimali per una potenziale veicolazione di farmaci a livello del Sistema Nervoso Centrale.

Come farmaco modello è stato scelto il Progesterone.

La scelta del progesterone è stata fatta sulla base di una serie di studi di ricerca effettuati nel Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche dell'Università degli Studi di Cagliari, volti a stabilire ed ampliare le correlazioni tra l'alterata omeostasi del colesterolo e la suscettibilità all'infezione/replicazione prionica di diverse cellule cerebrali^[9].

4.7 Parte sperimentale

4.7.1 Materiali

Per la preparazione del trimetilchitosano (TMC) è stato utilizzato il chitosano L (PM 50,000 - 190,000, basato sulla viscosità), ioduro di sodio, ioduro di metile, N-metilpirrolidinone (NMP) forniti dalla Sigma-Aldrich (Germania).

Per la preparazione delle nano particelle sono stati utilizzati il trimetilchitosano sintetizzato, il tripolifosfato di sodio o TPP grado 85% e l'etanolo al 96% della Sigma-Aldrich, il Progesterone F.U. della Galeno (Italia)

4.7.2 Strumenti

Gli strumenti utilizzati sono riportati nella tabella 4.2.

Strumento	Azienda
Bilancia analitica Basic	Sartorius
Agitatore magnetico	Falc
Microprocessor pHmeter pH 211	Hanna Instruments
Viscosimetro Programmable DV-II+	Brookfield
Spettrometro NMR	Varian 500 Inova (500MHz)
pHmetro	Hanna 211
Spettrofotometro UV U-2000	Hitachi
Sonicator HD 2070	Bandelin Sonopuls
Microcentrifuga	Vismara
Diffratometro ai raggi X	Seifert X3000
Zeta sizer- nano ZS	Malvern

Tabella 4.2: *Strumenti utilizzati*

4.7.3 Metodi

4.7.3.1 Preparazione del Chitosano in funzione della sintesi del TMC.

Il Chitosano L non si trova sotto forma di polvere finissima ma estremamente grossolana, ragion per cui è stato necessario procedere dapprima ad una triturazione della polvere su mortaio e quindi si è proceduto alla setacciatura della polvere così ottenuta, attraverso l'utilizzo di un sistema di setacci impilati con granulometrie differenti, in modo da ottenere delle polveri finissime e per quanto possibile di granulometria il più possibile omogenea per facilitare la via sintetica.

4.7.3.2 Preparazione del TMC.

Per la preparazione del TMC abbiamo effettuato delle modifiche alla procedura sintetica riportata in letteratura da Wang et al ^[12].

In particolare la via sintetica si basa sulla reazione del chitosano con lo ioduro di metile in ambiente basico per NaOH (soluzione al 15% p/p), in presenza di ioduro di sodio come catalizzatore, utilizzando N-metilpirrolidinone (NMP) come solvente.

Nel dettaglio abbiamo proceduto utilizzando le quantità riportate nella tabella 4.3

Reagente	Peso	Volume
Chitosano L	2,0 g	
NaI	4.8 g	
NaOH (sol. 15% p/p)		11 ml
NMP		80 ml
CH ₃ I	27.36 g (d=2.28)	12 ml

Tabella 4.3 I reattivi per la sintesi del TMC

4.7.3.3 Sintesi del TMC: 1° variazione della metodica di sintesi.

In un pallone da 250 ml a tre colli , munito di imbuto sgocciolatore, refrigerante a bolle e agitatore magnetico si introduce il chitosano, finemente tritato (secondo la metodica descritta precedentemente) seguito dallo ioduro di sodio e da circa 80 ml di NMP. Si mantiene sotto agitazione a bagno maria a 60°C per circa 20 minuti. A questa miscela si aggiungono, goccia a goccia, 11 ml di soluzione di NaOH al 15% e 12 ml di ioduro di metile, lasciando la miscela sotto agitazione per 60 minuti e avendo cura di mantenere la temperatura a 60°C. Al termine dell'aggiunta si ottiene una soluzione omogenea. A questo punto si effettua uno *step* addizionale, aggiungendo 5 ml di ioduro di metile e 10 ml di soluzione di NaOH. I successivi *step* addizionali (almeno 2) vengono effettuati dopo circa 35 minuti. Si lascia ancora sotto agitazione per altri 60 minuti e poi sotto agitazione a temperatura ambiente per tutta la notte. La miscela al termine della reazione si presenta sotto forma di una sospensione di colore giallo chiaro. Per la purificazione del prodotto si è inizialmente seguita la metodica di isolamento e purificazione del TMC riportata da Wang, consistente nella precipitazione del TMC dal grezzo di reazione per trattamento con una miscela di etere etilico /etanolo e per successivi lavaggi del filtrato con la stessa miscela. Questa metodica non ha dato i risultati sperati, specialmente perché non è stato possibile ottenere la precipitazione del TMC, per cui l'isolamento è stato effettuato mediante diverse centrifugazioni, poco efficaci e che implicano una perdita del prodotto e un dispendio notevole di tempo.

Per questo motivo si è proceduto usando diversi solventi e si è trovato che il solvente migliore per far precipitare il TMC dalla miscela di reazione è l'acetone. In particolare il grezzo di reazione è stato versato direttamente in un *becker* con circa 300 ml di acetone, è stato lasciato sotto agitazione per un'ora e infine si è filtrato, utilizzando un imbuto in vetro sinterizzato. In questo modo si è ottenuto un solido che è stato lavato più volte, sempre con acetone, fino ad ottenere un solido bianco. Il TMC così ottenuto è stato ulteriormente purificato mediante liofilizzazione. La successiva

determinazione della percentuale di quaternizzazione ha messo in evidenza che il prodotto ottenuto ha una percentuale di trimetilazione del 19%.

4.7.3.4 Sintesi del TMC: 2° variazione della metodica di sintesi

Per aumentare la percentuale di quaternizzazione si è operato con gli stessi quantitativi dei reagenti utilizzati nella metodica precedente, ma effettuando delle modifiche che riguardano sostanzialmente l'ordine di introduzione dei reagenti nel pallone di reazione e i tempi di reazione. Infatti l'idrossido di sodio è stato introdotto insieme al chitosano, ioduro di sodio e NMP, in maniera tale che alla successiva aggiunta dell'agente metilante, dopo aver lasciato la miscela per 30 minuti a 60°C, l'ambiente fosse già basico.

Inoltre i tempi di reazione sono stati notevolmente allungati: tra la prima aggiunta addizionale e la seconda, la reazione viene lasciata sotto agitazione a 60°C per circa 2 ore, tra la seconda e la terza per 4 ore a 60°C e poi tutta la notte a temperatura ambiente. In questa metodica è stata eseguita un'ulteriore aggiunta prima della quale la temperatura è stata portata di nuovo a 60°C, mantenuta tale per 4 ore e poi sempre sotto agitazione a temperatura ambiente per tutta la notte. Infine, l'isolamento e la purificazione sono state condotte secondo la metodica descritta precedentemente. La successiva determinazione della percentuale di quaternizzazione ha messo in evidenza che il prodotto ottenuto ha una percentuale di trimetilazione del 28%.

4.7.3.5 Sintesi del TMC: 3° variazione della metodica di sintesi

In questo caso si sono fatte due ulteriori aggiunte addizionali di agente metilante rispetto all'esperienza precedente e si sono aumentati notevolmente i tempi di reazione tra un'aggiunta e l'altra. Nel dettaglio in questo caso dopo ciascuna aggiunta la miscela è stata mantenuta sotto agitazione a 60°C per 5 ore e poi a temperatura ambiente per 12 ore; dopo l'ultima aggiunta la miscela è stata mantenuta sotto agitazione a 60°C per circa 6 ore e poi per 48 ore a temperatura ambiente. Al termine

la miscela di reazione si presenta sotto forma di un gel di colore marron, più scuro rispetto alle preparazioni precedenti, da cui il TMC è stato isolato per trattamento con acetone, filtrazione in imbuto di vetro sinterizzato e successivi lavaggi del filtrato sempre con acetone. La successiva determinazione della percentuale di quaternizzazione ha messo in evidenza che il prodotto ottenuto ha una percentuale di trimetilazione del 65%.

4.7.3.6 Analisi del TMC mediante Spettroscopia NMR.

Gli spettri NMR sono stati effettuati utilizzando un apparecchio Varian 500 Inova (500MHz) alla temperatura di 27°C (se non altrimenti specificato), utilizzando come solvente acqua deuterata e, in alcuni esperimenti, servendoci della soppressione del segnale del solvente. Per effettuare al meglio la caratterizzazione NMR del TMC, è stato necessario dapprima analizzare un campione di Chitosano L. Poiché il Chitosano risulta essere insolubile in soluzioni acquose per pH prossimi alla neutralità, ma risulta essere solubile in soluzioni acide, si è deciso di solubilizzarlo in una soluzione di HCl 0,1 N (1% p/p) per ottenere il sale cloridrato e poi liofilizzarlo.

In questo modo il Chitosano è risultato essere solubile in acqua deuterata, solvente in cui è stato possibile condurre le analisi dei campioni.

Mediante la tecnica NMR, di cui discuteremo dettagliatamente più avanti, è stato possibile caratterizzare il TMC dal punto di vista qualitativo e determinare il grado di quaternizzazione del chitosano ottenuto, che sappiamo essere molto importante perché determina direttamente la solubilità del TMC in mezzo acquoso.

Per questo motivo, proprio per verificare l'incidenza del grado di quaternizzazione sulla solubilità, si è proceduto alla preparazione di campioni con grado di quaternizzazione differente (come esposto precedentemente).

4.7.3.7 Analisi di diffrazione ai raggi X (XRD)

Le analisi XRD sono state eseguite presso l'omonimo laboratorio del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università degli Studi di Cagliari.

Per la caratterizzazione XRD dei campioni di Chitosano e Trimetilchitosano è stato utilizzato il diffrattometro X3000 della Seifert (figura xx) operante a 30 mA x 40 KV, che utilizza la radiazione $\text{CuK}\alpha$ e i cui raggi diffratti vengono monocromatizzati attraverso un cristallo di grafite posto a valle del campione.

In tale diffrattometro il campione è fisso ed in posizione orizzontale ed i dati sono raccolti in modalità *step scan*, ottimizzando le fenditure di collimazione, il passo angolare e la durata di conteggio a ciascuno *step*, al fine di ottimizzare il rapporto segnale/rumore.



Fig. 4.3 *Diffrattometro Seifert X3000.*

La diffrazione a raggi X (XRD) è una tecnica non distruttiva, utilizzata per l'analisi qualitativa e quantitativa dei materiali cristallini.

Ogni atomo del cristallo rappresenta un punto di diffusione e agisce come una sorgente puntiforme di onde sferiche, le quali daranno luogo a fenomeni di interferenza costruttiva per formare un certo numero di onde diffratte.

Bragg fornì un'interpretazione del fenomeno della diffrazione provocato da un reticolo cristallino, interpretandola come se fosse una semplice riflessione.

La *Legge di Bragg* descrive la direzione delle onde diffratte dal reticolo cristallino:

$$n\lambda = 2d\sin\vartheta$$

dove λ è la lunghezza d'onda, d_{hkl} è la distanza tra i piani di hkl del cristallo, ϑ è l'angolo di diffrazione e n è l'ordine di diffrazione (figura 4.4).

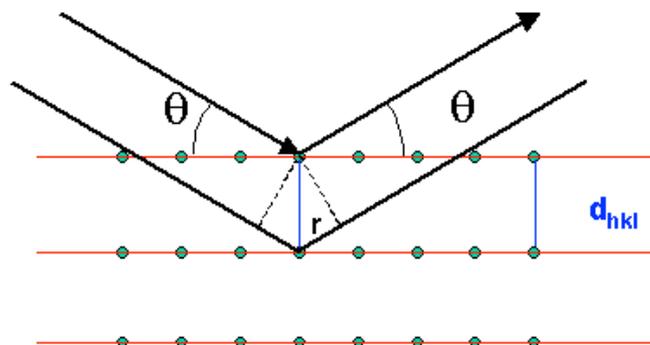


Fig.4.4 Diffrazione nei diversi piani cristallini.

I diagrammi di diffrazione si presentano come una serie di picchi aventi diversa intensità e posizione, la quale viene espressa come valore angolare 2ϑ .

Ogni sostanza cristallina presenta un caratteristico *pattern* di diffrazione, mentre i campioni di solidi amorfi non danno picchi ma aloni.

4.7.3.8 Determinazione della solubilità TMC in funzione del grado di quaternizzazione

Una volta ottenuti i tre diversi campioni di TMC si è proceduto a fare le diverse prove di solubilità, in modo da verificare l'influenza del diverso grado di quaternizzazione e metossilazione sulla stessa.

La metodica utilizzata in questo caso, è stata quella di preparare una dispersione di TMC in acqua, utilizzando le quantità di TMC mediamente riportate in letteratura (Wang et al.)

Il TMC1 e il TMC2 risultano essere più solubili rispetto al TMC3, il quale va in soluzione molto lentamente e con estrema difficoltà (Tabella 4.5).

	DQ(%)	DD(%)	DOM(3) (%)	DOM(6) (%)	Solubilità (mg/ml)
TMC 1	19	0.73	12	10	66 mg/ml
TMC 2	28	3.94	13	12	64 mg/ml
TMC 3	65	1.53	43	35	32 mg/ml

Tabella 4.5. Rappresentazione della solubilità in funzione del grado di quaternizzazione e metossilazione del TMC (DQ % di quaternizzazione; DD % di di-metilazione; DOM(3) % di metossilazione dell'OH in C3; DOM(6)% di metossilazione dell'OH in C6).

4.7.3.9 Preparazione della dispersione di TMC

Le dispersioni di TMC (2mg/ml) vengono preparate secondo la seguente procedura: in un *becker* precedentemente tarato viene pesata una quantità opportuna di TMC e si sottopone ad agitazione magnetica per un tempo di 15 minuti. Trascorso tale tempo la dispersione ottenuta viene posta in frigo alla temperatura di 4 C° per 24 ore.

4.7.3.10 Analisi di Viscosità delle diverse dispersioni di TMC.

Le misurazioni di Viscosità sono state condotte per mezzo del Viscosimetro Brookfield LVDV-II+.

Le misurazioni sono state effettuate a 24 ore dalla preparazione, utilizzando lo “*small sample adapter*” con il girante codice 18 e alla temperatura di 25° C.

4.7.3.11 Determinazione dell'Indice di flusso

Per determinare l'indice di flusso si considera il modello di **Herschel-Bulkley** ^[13]:

$$\tau = \tau_0 + \eta \cdot \dot{\gamma}^n$$

Estrapolando i dati sperimentali della curva *shear stress / shear rate*, utilizzando l'equazione di una retta del tipo **Allometrica 2**:

$$y = a + bx^c$$

si ottengono i valori di:

a = intercetta nell'asse delle *y* = *yeald value*

b = coefficiente angolare = parametro che tiene conto della viscosità del sistema

c = indice di flusso

Utilizzando il programma **Origin 6**, si eseguono i seguenti passaggi:

- Si riportano i dati *shear rate* (colonna X-A) – *shear stress* (colonna Y-B) nella finestra (DATA) e si costruisce il grafico della curva.
- La curva viene quindi estrapolata attraverso il comando *interpolate/estrapolate* nel menù *Analysis* impostando come valore minimo un valore molto vicino allo zero (es.0,001).
- Si copia il primo valore (X e Y) nel tabulato contenuto nella finestra *data interpolate/extrapolate* risultante al di sotto del grafico, relativo alla retta di interpolazione e si riporta, come primo valore, in una nuova coppia di colonne, nella finestra dei dati principali (DATA), impostate sempre come x e y (ad esempio colonna D ed E).
- Si riportano a seguire i valori *shear rate/shear stress* precedenti e si esegue il nuovo grafico.

-
- Su questo, dal menù *Analysis*, si sceglie la funzione *Non-linear curve fit* e si seleziona dalla lista delle *categories* la funzione *Power* scegliendo *Allometric 2*.
 - Si va in *Basic Mode* e si clicca il tasto *Select Data Set* e si impostano i dati per i valori di X e di Y sulla base delle lettere delle colonne dati (esempio Y Data E – X Data D) cliccando *assign* per confermare.
 - Quindi si procede allo *Start fitting*, eventualmente cliccando il tasto *10 Iter* fino ad ottenere valori costanti di **a**, **b**, e **c**.
 - A questo punto si va in *More*, al menù *Action* selezionando *Result* e si clicca *Paste Parameters to plot* in modo da ritrovarsi la tabella dei dati nel grafico.
 - Quindi si clicca *Basic Mode* e poi *Close*.

4.7.3.12 Analisi di pH delle dispersioni

Le determinazioni di pH sono state eseguite mediante il pHmetro Hanna 211.

Il pHmetro consente la misurazione del pH di un campione, attraverso l'utilizzo di una scala di valori ad una determinata temperatura. Viene effettuata una retta di calibrazione mediante l'uso di due soluzioni tampone, una a pH 7.00 e l'altra a pH 4.00.

E' stato determinato il pH di tutte le dispersioni di TMC, nonché della sospensione nanoparticellare TMC-NP derivante.

4.7.3.13 Preparazione delle nanoparticelle

Le nanoparticelle vengono preparate mediante il metodo della gelazione ionotropica e utilizzando le proporzioni indicate nel lavoro di Wang et al. e cioè in un rapporto volumetrico TMC/TPP di 4,5:1.

Sulla base dei risultati ottenuti dal calcolo delle percentuali di quaternizzazione del TMC si è deciso di preparare tre campioni utilizzando la dispersione di TMC₂, la quale presenta un valore intermedio di percentuale di quaternizzazione.

4.7.3.14 Metodica

In un *becker* precedentemente tarato viene posta la dispersione di TMC (2mg/ml) in acqua, si mantiene sotto agitazione magnetica e si aggiunge goccia a goccia il TPP (0,8 mg/ml).

La comparsa di una leggera opalescenza indica la formazione delle nanoparticelle. Trascorsi 5 minuti la dispersione viene sottoposta a trattamento con gli ultrasuoni.

Per ottenere le nanoparticelle incorporanti il Progesterone (0,2 mg/ml), questo viene solubilizzato in etanolo e quindi miscelato nel TPP.

Le formulazioni preparate sono rappresentate nella tabella seguente 4.6 :

Formulazione	Concentrazione TMC	Concentrazione TPP	Rapporto TMC/TPP	Progesterone (10 % della quantità di TMC utilizzato)
TMC-NP	2 mg/ml	0,8 mg/ml	4,5 : 1	-
TMC-NPs	2 mg/ml	0,8 mg/ml	4,5 : 1	-
TMC-NPPs	2 mg/ml	0,8 mg/ml	4,5 : 1	0,2 mg/ml

Tab. 4.6. *Tabella delle formulazioni preparate (TMC-NP: nanoparticelle di TM,, TMC-NPs: nanoparticelle di TMC sonicate; TMC-NPPs: nanoparticelle di TMC con Progesterone sonicate).*

4.7.3.15 Trattamento agli ultrasuoni

Il trattamento agli ultrasuoni per ottenere le nanoparticelle, viene effettuato con il **sonicatore omogeneizzatore Bandelin 2070** costituito dal generatore GM 2070, dal convertitore UW 2070, e da una sonda, costituita a sua volta da una punta piatta denominata SH 70 G, e da una micropunta o punta affusolata codificata come MS 73 (diametro 3 mm); lo strumento è così in grado, di sviluppare un'*ampiezza* di 210 μm_s .

L'apparecchio, permette di impostare alcune condizioni: a) il valore di **ampiezza** dell'onda desiderato, espresso in misura percentuale; b) il trattamento del campione in

maniera continuativa o ciclica, attraverso la scelta del numero di **Ciclo**; c) la durata del trattamento espresso in **minuti**.

È possibile tramite i tasti del display selezionare un tempo che va dai **59 secondi** ai **99 minuti**. Lo strumento può eseguire il trattamento di volumi compresi tra i 2 e i 50 ml, i quali sono contenuti all'interno di recipienti, in cui la sonda viene immersa per circa 10 mm; in questo modo l'aria sovrastante all'emulsione viene aspirata e miscelata con il liquido.

L'azione d'inglobamento dell'aria nel campione è possibile solo nel caso in cui l'estremità della sonda sia immersa nell'emulsione per una misura inferiore ai 2 cm.

Pertanto la configurazione del sistema di sonicazione ha una notevole importanza e nel nostro caso è stata stabilita secondo lo schema riportato nella figura seguente:

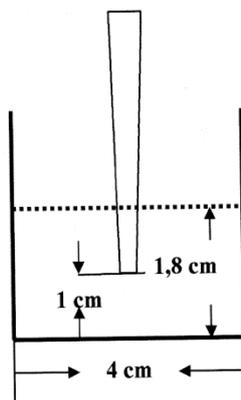


Fig. 4.5. Configurazione del Sistema di sonicazione: il becker utilizzato ha una capacità di 50 ml.

Per studiare le dimensioni dei campioni di nanoparticelle realizzati si è scelto il trattamento agli ultrasuoni rappresentato nella tabella 4.7.

Minuti	Ciclo	Potenza	Numero di cicli
3	10	50	1

Tab. 4.7. Tabella dei parametri di impostazione del Sonicatore Bandelin

4.7.3.16 Determinazione del diametro medio e della distribuzione dimensionale

La metodica utilizzata per la determinazione del diametro medio e della distribuzione dimensionale della nanoparticelle è stata quella della DLLS (Dynamic Light Laser Scattering) mediante lo strumento Zetasizer nano series ZS. Tale strumento consente di determinare anche l'indice di polidispersione (PDI) e il Potenziale Z (ζ) delle nanosospensioni.

Il Potenziale Z viene calcolato attraverso la determinazione della mobilità elettroforetica, da cui è possibile applicare l'equazione di Henry.

Tale potenziale indica la stabilità del sistema colloidale rispetto alla flocculazione.

Le nanoparticelle aventi un elevato Potenziale Z, sia in positivo che in negativo, tenderanno spontaneamente a respingersi e in tal modo non si avrà flocculazione.

Generalmente la linea di divisione tra un sistema instabile ed un sistema stabile è dato dall'intorno + 30mV o - 30mV.

Particelle con valori superiori a questi sono normalmente considerate stabili.

4.7.3.17 Determinazione della Resa %

La determinazione della **Resa %** viene effettuata attraverso la separazione delle nanoparticelle dal medium, per mezzo dell'ultracentrifugazione. Tale trattamento viene eseguito ad una velocità di 40000 rpm, per una durata di 30 minuti e alla temperatura di 10°C. Il prodotto così separato viene successivamente sottoposto a liofilizzazione.

La **Resa %** risultante sarà calcolata mediante la seguente equazione:

$$R\% = \frac{P_{el}}{P_t}$$

P_{el} = peso delle nanoparticelle separate dal medium e sottoposte a liofilizzazione.

P_t = peso teorico delle nanoparticelle calcolato tenendo conto dei pesi iniziali di TMC, TPP e Progesterone.

4.7.3.18 Analisi allo Spettrofotometro UV e Associazione % del Progesterone alle nanoparticelle

La determinazione della Incorporazione % è stata eseguita mediante analisi allo Spettrofotometro UV HITACHI .

Dalla letteratura risulta che il massimo grado di assorbimento all'UV del Progesterone si ha alla lunghezza d'onda (λ) 241 nm, utilizzando come solvente l'etanolo.

Per cui, sono state realizzate soluzioni etanoliche a diverse concentrazioni in Progesterone ($\lambda = 241\text{nm}$) in modo da poter realizzare una retta di taratura, ai fini della determinazione della Incorporazione % del Progesterone alle nanoparticelle.

La retta di taratura risultante viene riportata nella Figura 4.6.

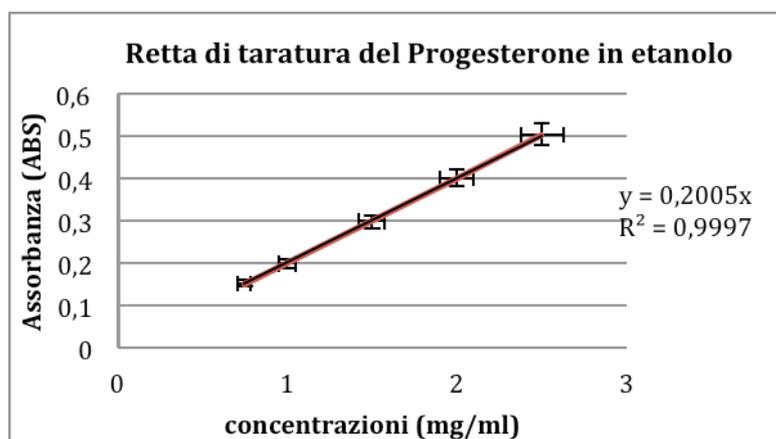


Fig. 4.6. Retta di taratura.

La determinazione della Incorporazione % del farmaco nei campioni nanoparticellari realizzati, è stata eseguita indirettamente, ossia per differenza.

La quantità di Progesterone infatti è stata calcolata attraverso la differenza tra il Progesterone totale presente nell'intera formulazione e la quantità riscontrata nel surnatante dopo centrifugazione, secondo la seguente formula:

$$\text{Incorporazione \%} = \frac{\text{Q. tà totale Progesterone} - \text{Progesterone libero nel surnatante}}{\text{Q. tà totale di Progesterone}} \times 100$$

4.7.3.19 Analisi di Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Una caratterizzazione preliminare SEM (Scan Electron Microscopy) è stata gentilmente offerta dal Laboratorio di Telemicroscopia Industriale di Sardegna Ricerche- Pula, mediante il Microscopio Dual Beam FEI Nova Nanolab600 (SEM/FIB).



Fig. 4.7. Immagine del Microscopio Dual Beam FEI Nova Nanolab600 (SEM/FIB).

Il campione scelto per l'analisi è un campione di nanoparticelle TMC-NPPs sottoposto a liofilizzazione, senza l'aggiunta di alcun crioprotettore.

Inoltre la sua caratterizzazione è stata eseguita senza preventiva metallizzazione.

4.8 Risultati e discussione

4.8.1 Caratterizzazione del TMC mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$

La caratterizzazione strutturale dei campioni di TMC a diversa percentuale di quaternizzazione è stata effettuata attraverso la spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR).

In particolare la spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ è stata utilizzata per caratterizzare il chitosano L e il TMC dal punto di vista qualitativo. Sfruttando la procedura che permette la soppressione del segnale del solvente è stato possibile determinare con precisione la percentuale di quaternizzazione del TMC, utilizzando la metodica riportata da Sieval et al ^[14].

Lo spettro $^1\text{H-NMR}$ del chitosano è riportato nella figura 4.8.

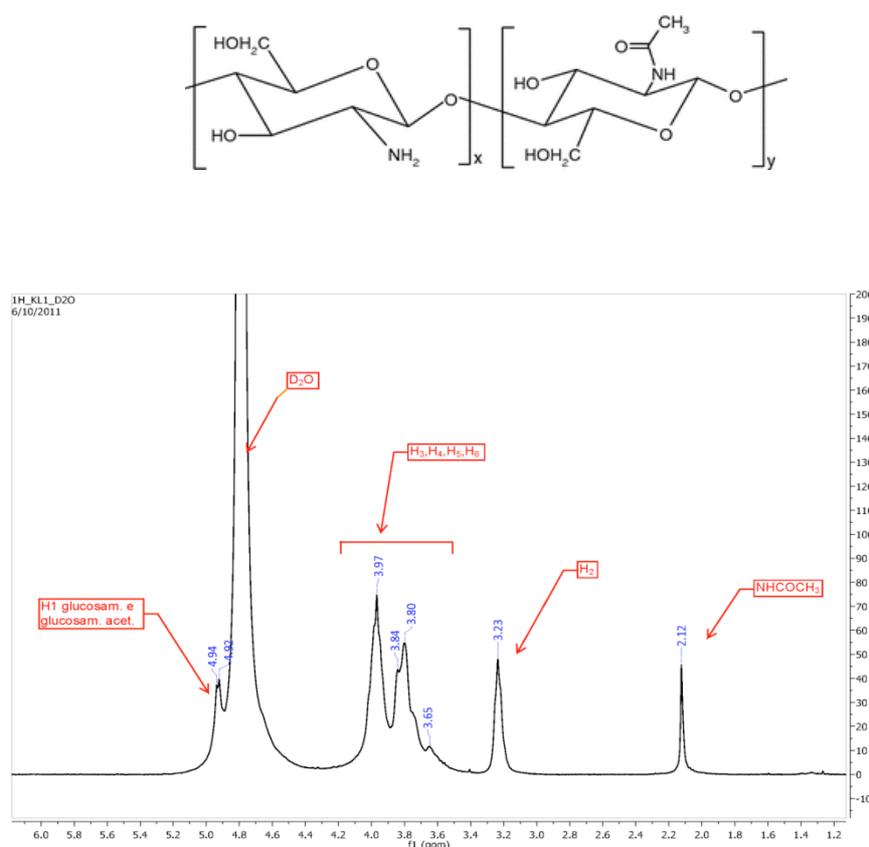


Fig. 4.8. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del chitosano.

La preparazione del campione di TMC per essere sottoposto ad analisi $^1\text{H-NMR}$ non ha richiesto particolari accorgimenti, in quanto il campione ottenuto dopo la liofilizzazione è solubile in D_2O .

Lo spettro del prodotto è riportato nella figura 4.9.

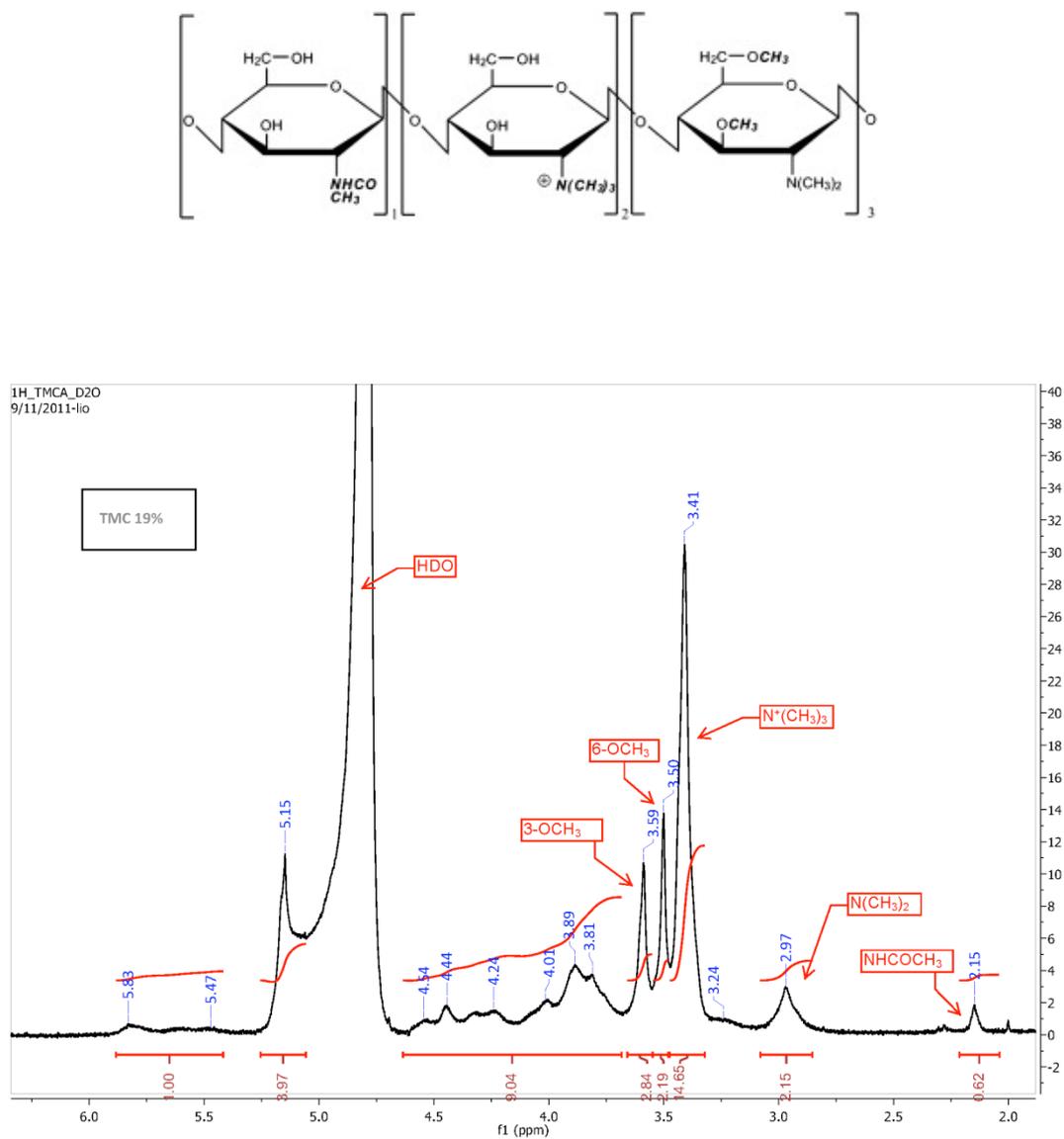


Fig. 4.9. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del TMC quaternizzato al 19% .

Come può essere facilmente rilevato, mettendo a confronto lo spettro del chitosano e del TMC i due campioni sono molto diversi. Nello spettro del TMC sono presenti, nella regione compresa tra 2.97 e 3.60 ppm, quattro picchi che non erano presenti nello spettro del chitosano di partenza. Il picco più intenso presente nello spettro a 3.41 ppm è quello più importante, nel senso che si tratta del segnale relativo all'azoto trimetilato $[(N^+(CH_3)_3)]$ e la sua presenza ci dice che la reazione di metilazione è avvenuta, accanto al picco a 2.97 ppm, attribuibile al segnale dell'azoto dimetilato $[(N-CH_3)_2]$. I picchi presenti rispettivamente a 3.50 e 3.59 ppm sono invece dovuti alla reazione di metossilazione degli ossidrili in posizione 3 e 6 dell'anello glucosaminico, che reagiscono nelle condizioni sperimentali usate per catalizzare la reazione di metilazione sull'azoto (ambiente basico per NaOH). Peraltro questa reazione è indesiderata, in quanto se la percentuale di metossilazione fosse troppo elevata, si potrebbe avere una diminuzione della solubilità del TMC in acqua. Come vedremo più avanti, nel nostro caso tale percentuale è sufficientemente bassa da non compromettere la solubilità del campione. A 2.15 ppm è ancora presente, sebbene con intensità notevolmente ridotta, il picco relativo all'azoto acetilato. Infatti le condizioni sperimentali provocano la quasi completa deacetilazione del TMC.

Secondo quanto riportato in letteratura [note] se lo spettro NMR al protone venisse registrato a 80°C il segnale dell'acqua, benché abbondante, non interferirebbe con il campione in quanto a quella temperatura la conformazione del TMC varia in modo tale da rendere evidenti i segnali dei protoni in posizione 1 (H^1) della glucosamina, altrimenti parzialmente coperti dal segnale dell'acqua. Per questo motivo sono stati registrati i campioni nelle stesse condizioni sperimentali, senza però rilevare un cambiamento nella giacitura dei protoni H^1 , che risultavano sempre in parte sotto il segnale dell'acqua. Come vedremo questi segnali sono fondamentali, in quanto per poter calcolare la percentuale di quaternizzazione del TMC è necessario fare riferimento proprio all'integrale di questi protoni.

Per ovviare a questo inconveniente si è pensato di sfruttare la tecnica NMR che permette la soppressione di un segnale indesiderato (nel nostro caso quello del solvente) “spegnendo” la radiofrequenza relativa al segnale in questione. Lo spettro relativo a tale esperimento, effettuato sullo stesso campione riportato in figura 4.9, è rappresentato nella figura 4.10.

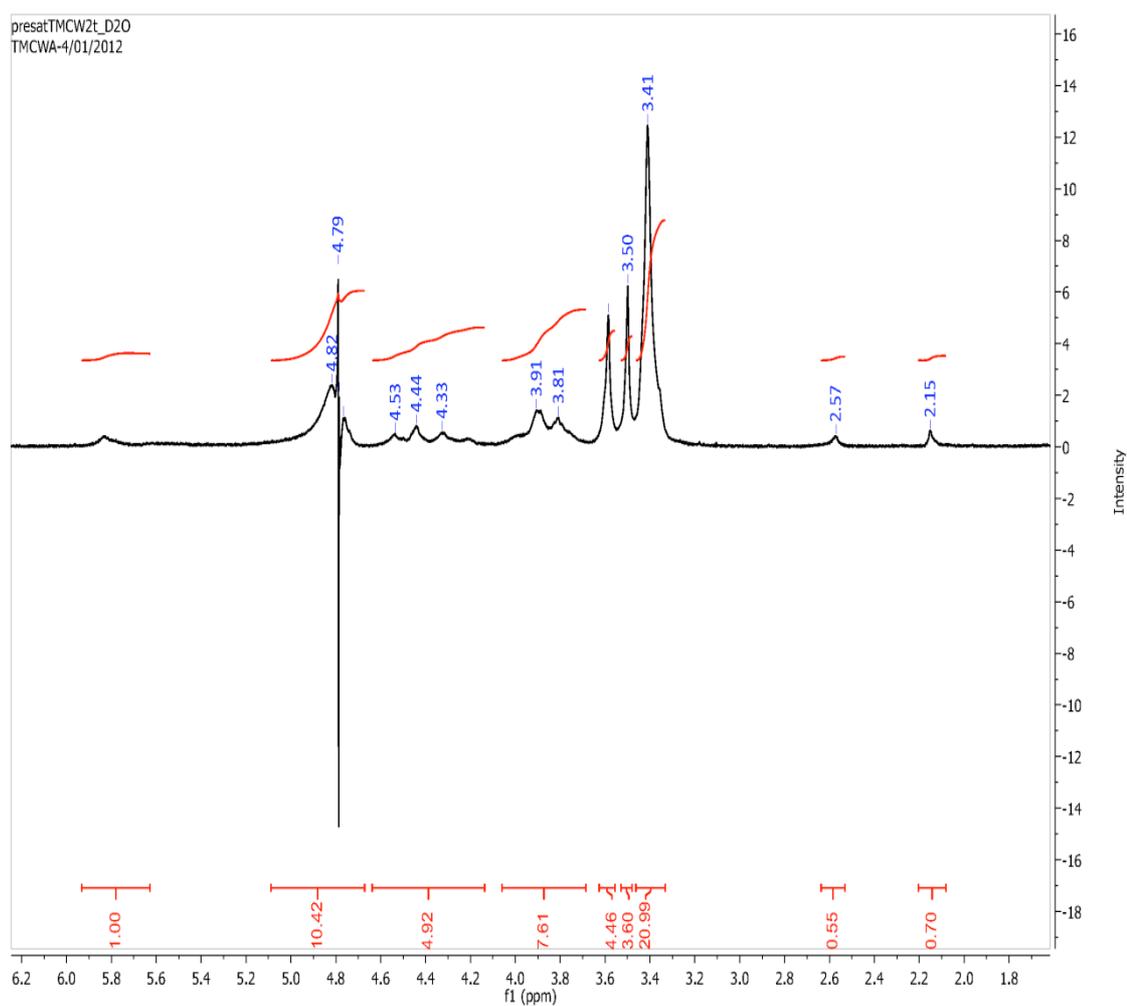


Fig. 4.10. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del TMC quaternizzato al 19% con soppressione del segnale dell'acqua.

Come si può vedere sotto il segnale dell'acqua, al posto del quale è presente un picco in parte negativo, è presente un picco allargato dovuto proprio ai protoni H¹, del quale in questo modo è possibile effettuare agevolmente l'integrazione.

Le stesse considerazioni possono essere applicate agli spettri del TMC quaternizzato al 28%, riportati rispettivamente con il segnale dell'acqua (figura 4.11a) e senza (figura 4.11b) e del TMC al 65%, riportati in figura 4.12a e 4.12b.

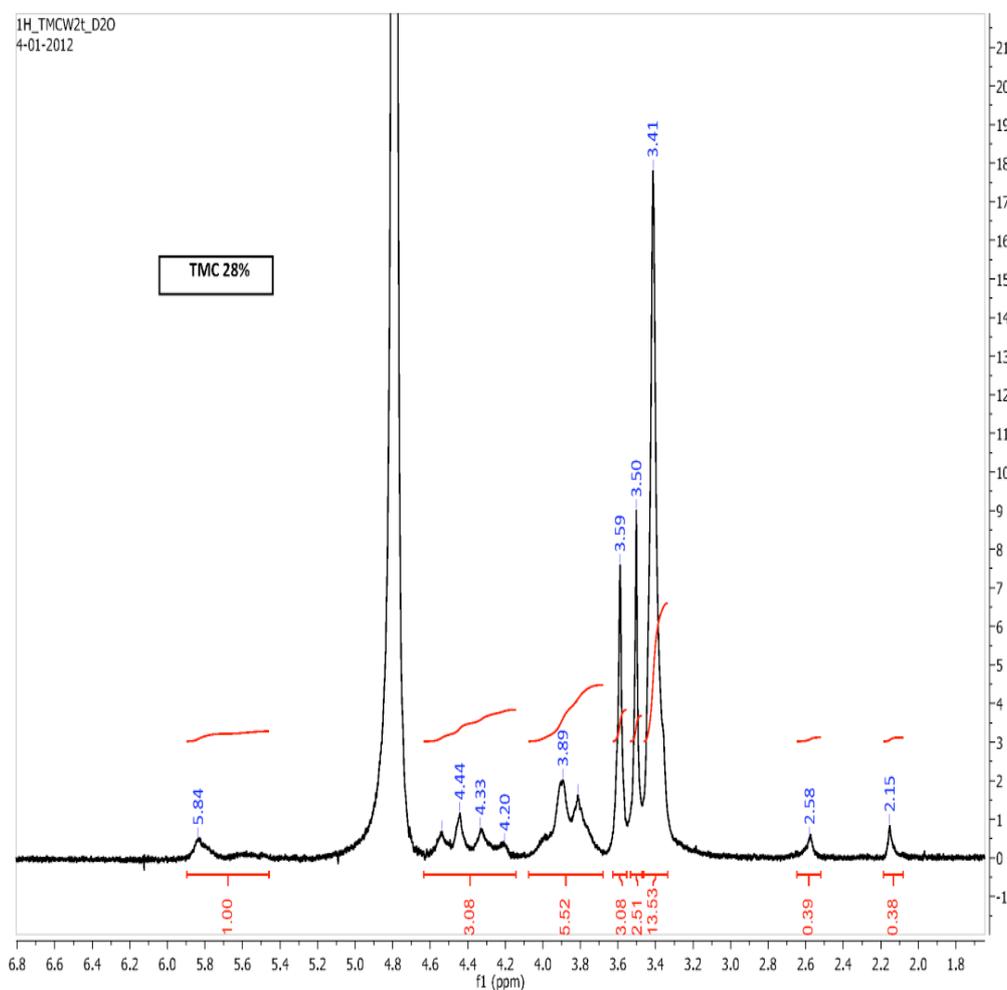


Fig. 4.11a. Spettro ¹H-NMR del TMC quaternizzato al 28%.

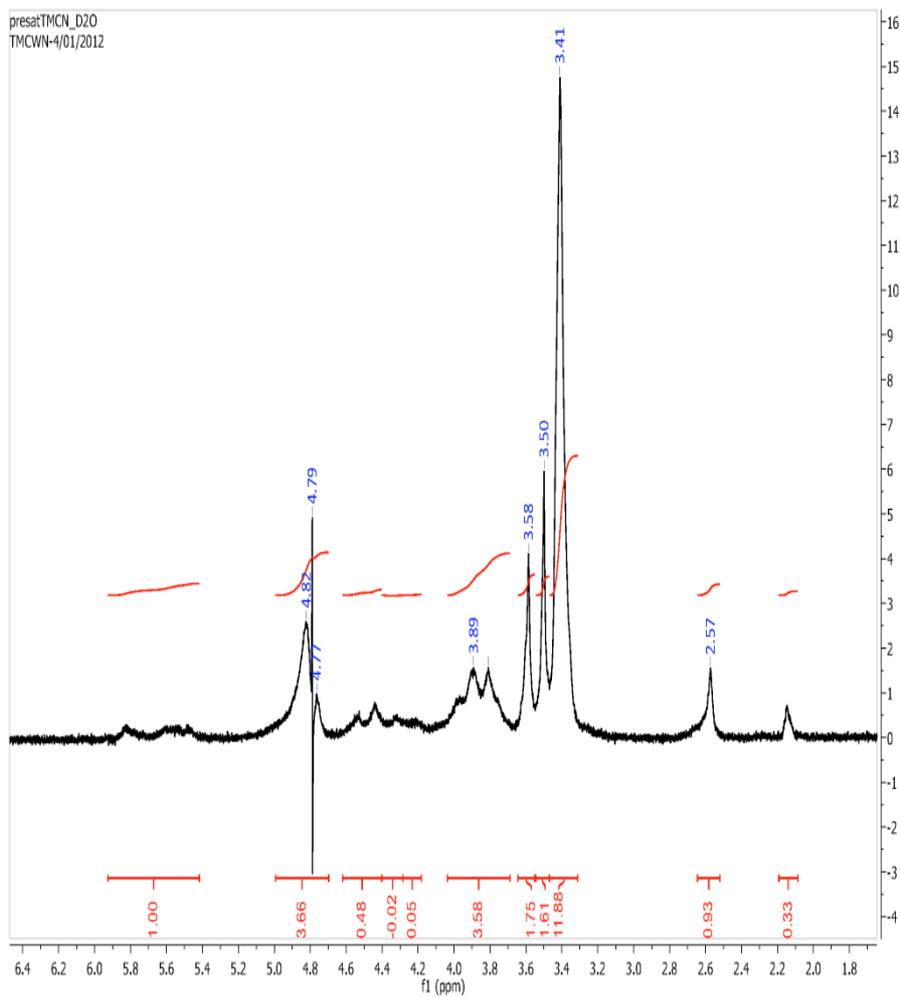


Fig. 4.11b. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del TMC quaternizzato al 28% con soppressione del segnale dell'acqua.

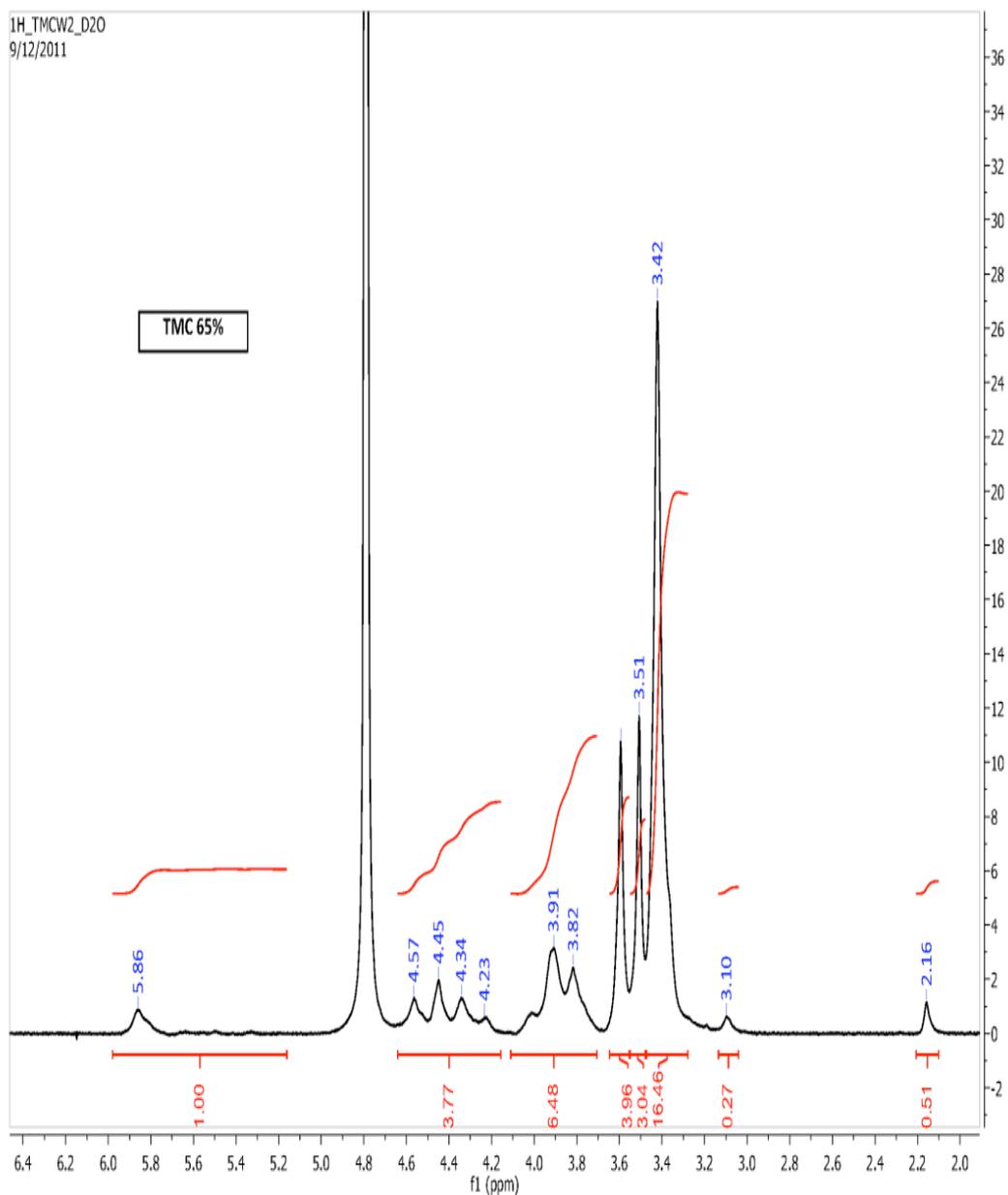


Fig. 4.12a. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del TMC quaternizzato al 65%.

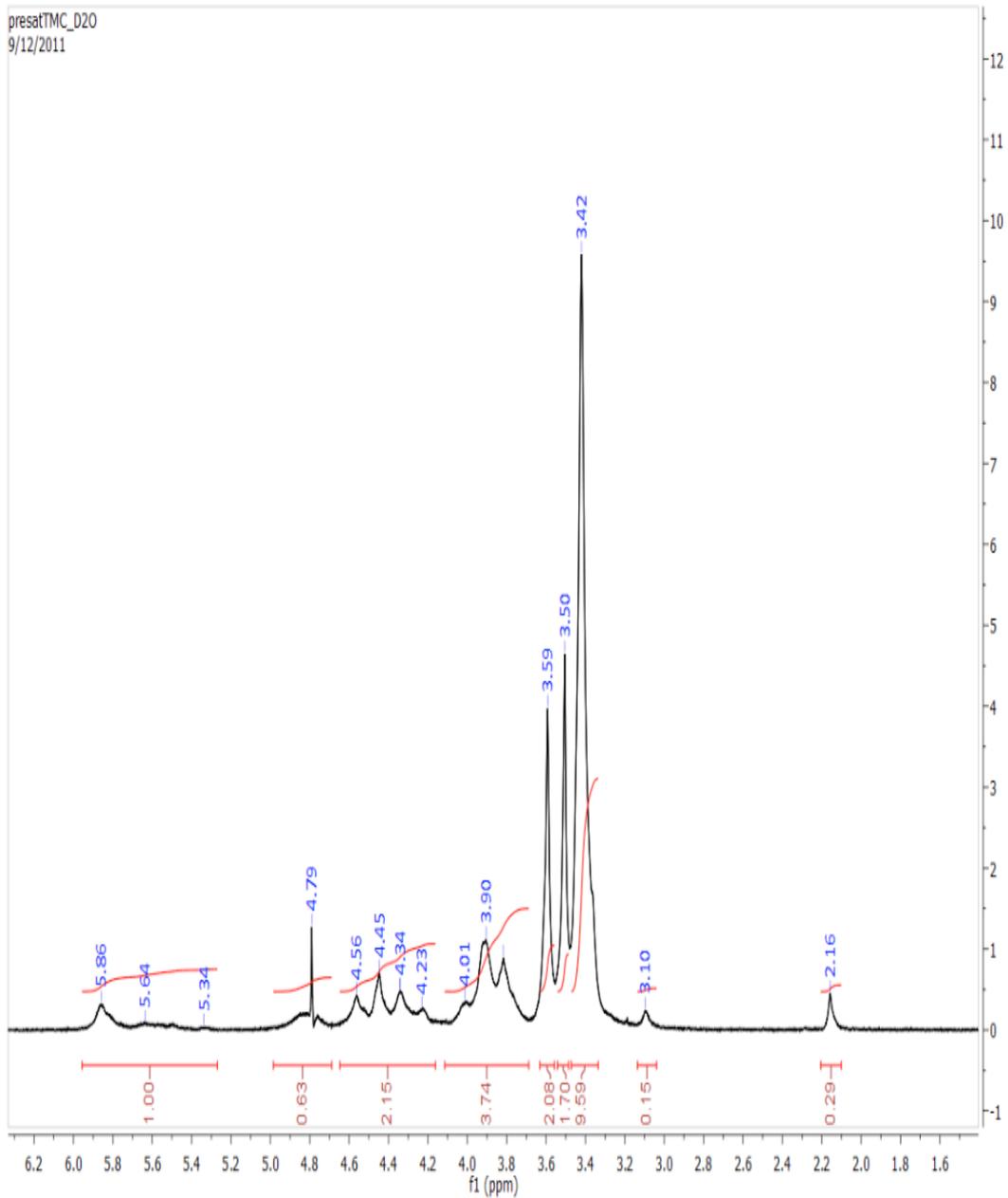


Fig. 4.12b. Spettro $^1\text{H-NMR}$ del TMC quaternizzato al 65% con soppressione del segnale dell'acqua.

4.8.2 Determinazione della percentuale di quaternizzazione

Per determinare la percentuale di quaternizzazione dei campioni sintetizzati e analizzati con la spettroscopia NMR ci siamo serviti della procedura riportata da Sieval et al., che si servono per tale calcolo dell'equazione [1]:

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

dove DQ rappresenta la percentuale di quaternizzazione, $[N^+(CH_3)_3]$ è l'integrale del picco a 3.41 ppm, relativo ai protoni del NCH_3 in cui l'azoto è trimetilato, H^1 è il picco relativo ai protoni sul C^1 dell'anello glucosamminico (tra 4.7 e 5.7 ppm), preso come riferimento.

Il calcolo della percentuale di dimetilazione è stato determinato con l'equazione [2]:

$$DD = \left[\frac{[N(CH_3)_2]}{[H^1]} \times \frac{1}{6} \right] \times 100 \quad \boxed{2}$$

nella quale DD rappresenta la percentuale di dimetilazione, $[N(CH_3)_2]$ è l'integrale del picco a 2.57 ppm nel TMC al 19% e al 28%, mentre nel TMC al 65% lo stesso picco è spostato a 3.10 ppm. H^1 è sempre il picco relativo ai protoni sul C^1 dell'anello glucosamminico.

Il calcolo della percentuale di metossilazione sull'OH in posizione 3 e 6 può essere calcolato con le equazioni [3] e [4], in cui DOM(3) e DOM(6) sono rispettivamente le relative percentuali di metossilazione e $[OCH_3]$ rappresenta l'integrale dei picchi solitamente presenti a 3.5 ppm (6- OCH_3) e 3.6 ppm (3- OCH_3).

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

$$\text{DOM}(6) = \left[\frac{[\text{OCH}_3]}{[\text{H}^1]} \times \frac{1}{3} \right] \times 100 \quad \boxed{4}$$

I dati così ottenuti sono stati riassunti nella tabella 4.8 .

TMC	DQ(%)	DD(%)	DOM(3) (%)	DOM(6) (%)
1° metodica	19	0.73	12	10
2° metodica	28	3.94	13	12
3° metodica	65	1.53	43	35

Tab. 4.8. *Rappresentazione del grado di quaternizzazione e metossilazione del TMC.*

4.8.3 Caratterizzazione XRD

Gli spettri ottenuti tramite caratterizzazione XRD sono riportati nella figura 4.13.

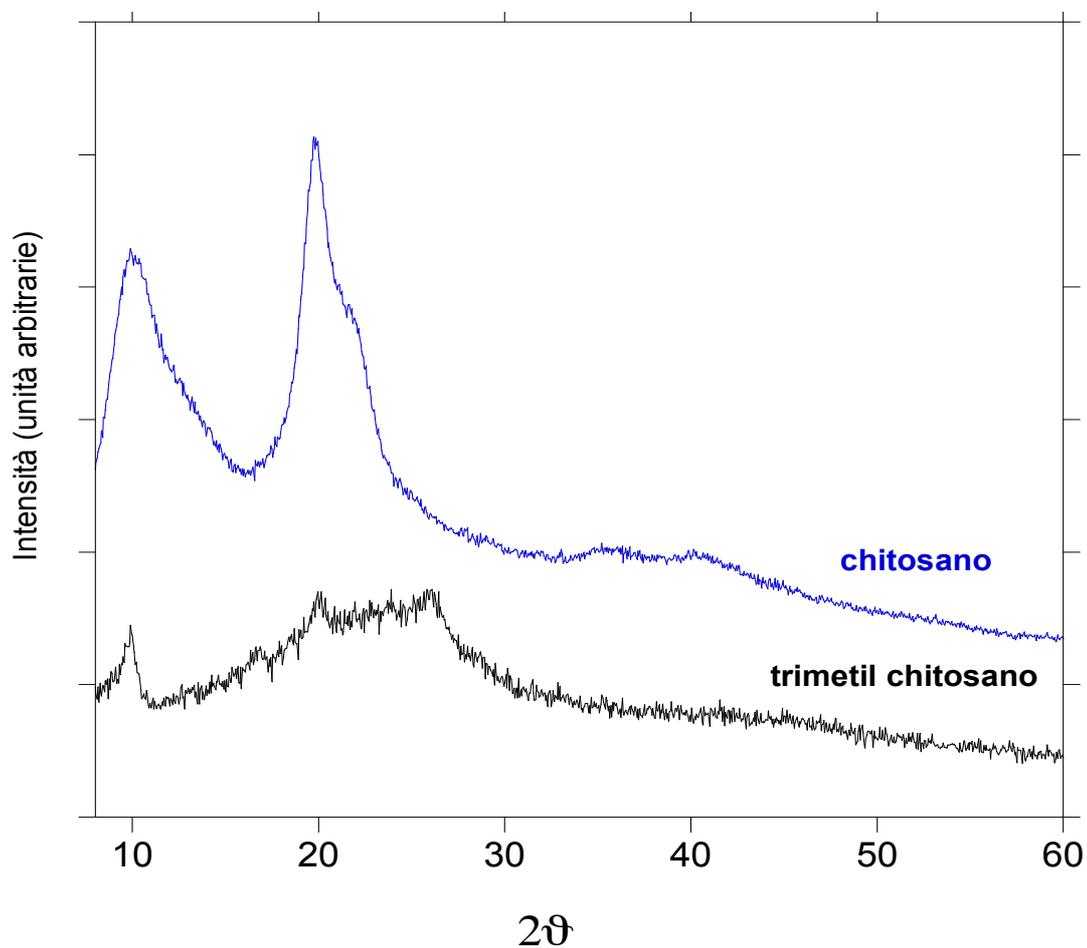


Fig. 4.13. Spettri XRD del Chitosano e TMC.

Gli spettri XRD dei campioni di chitosano e TMC sono caratterizzati da aloni tipici delle sostanze non cristalline.

I due campioni esibiscono spettri differenti: lo spettro del TMC esibisce degli aloni più larghi, indicando un disordine maggiore rispetto al chitosano. In particolare il massimo a circa 26° 2θ, presente nello spettro del TMC, non è presente nel chitosano.

Questi risultati confermano quanto già visto con l'¹HNMR e cioè che la presenza dei gruppi metilici ha fortemente influenzato la struttura cristallografica del campione inducendo un maggior disordine strutturale.

4.8.4 Analisi del pH delle dispersioni di TMC e delle sospensioni nanoparticellari

Le analisi di pH sono state condotte sia sulle dispersioni tal quali che sulla sospensione nanoparticellare TMC2-NP. I risultati son rappresentati nella tabella 4.9.

<i>Dispersione</i>	pH
<i>TMC1</i>	4,99 ± 0,50
<i>TMC2</i>	5,02 ± 0,20
<i>TMC3</i>	5,05 ± 0,40
<i>TMC2-NP</i>	6,93 ± 0,30

Tab. 4. 9. *Tabella dei valori di pH delle dispersioni e della sospensione nano particellare*

Come si può constatare non esistono grandi differenze di pH tra le diverse dispersioni, mentre l'aggiunta di TPP alla dispersione di TMC provoca un innalzamento del pH che porta la sospensione nanoparticellare ad un valore di pH prossimo alla neutralità.

Tale innalzamento del pH rappresenta un vantaggio per il delivery dei farmaci ed elimina l'inconveniente che si veniva a creare con le dispersioni e le nanoparticelle di Chitosano, che essendo insolubili sopra il valore di pH 6, comportano diversi problemi per la somministrazione.

4.8.5 Analisi di viscosità

Le misure reologiche sono state condotte a 24 ore della preparazione e ad una temperatura di 25°C.

Nella figura 4.14 viene riportato il reogramma delle tre diverse dispersioni.

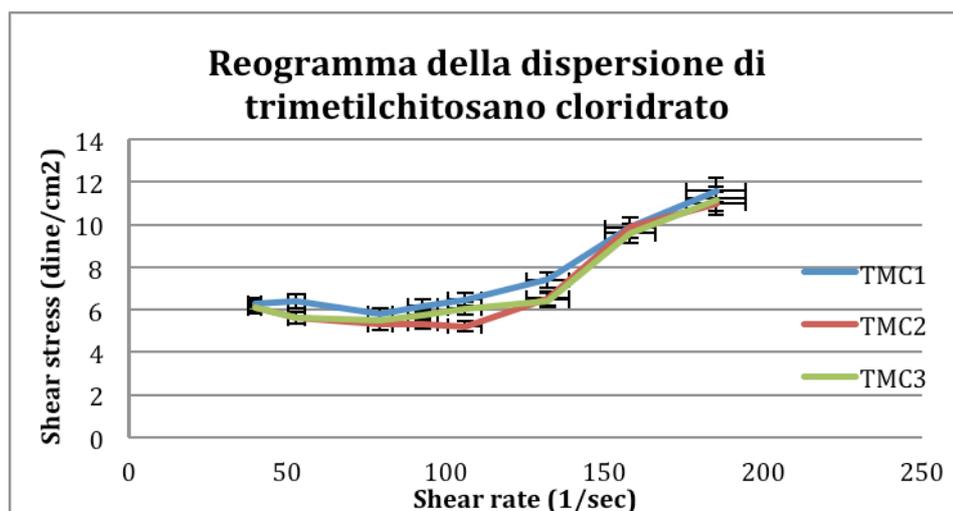


Fig. 4.14. Rappresentazione grafica dell'andamento dello shear stress in funzione dello shear rate.

Indipendentemente dal grado di quaternizzazione le tre dispersioni mostrano un andamento pseudoplastico che era quello che ci si aspettava. Inoltre se si confrontano i valori di viscosità apparente in riferimento ad uno stesso valore di rpm, vediamo come non ci siano differenze significative tra una dispersione e l'altra, anche se si può osservare una certa correlazione tra il grado di quaternizzazione e il relativo aumento di viscosità apparente, come si può vedere dalla figura 4.15.

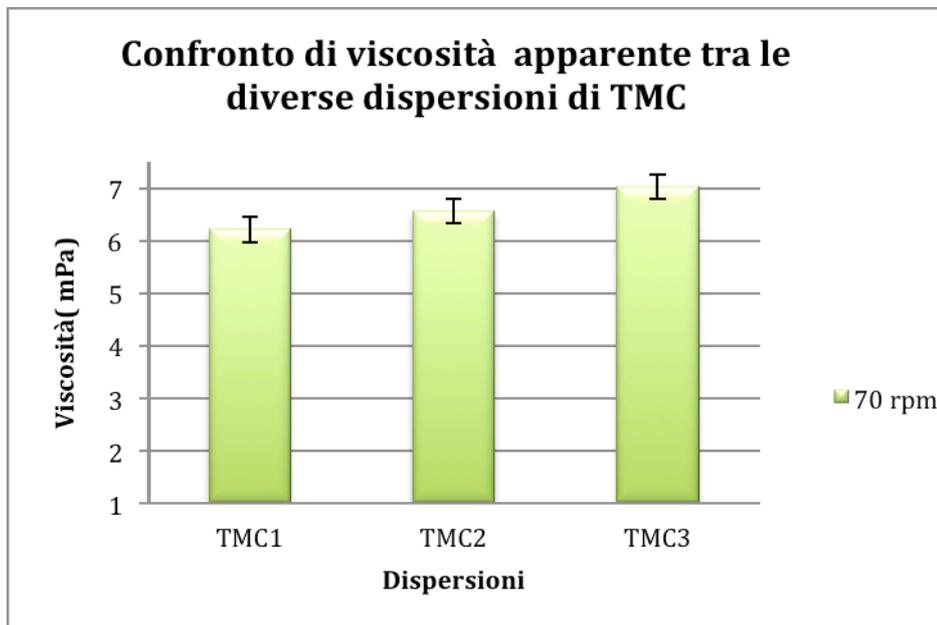


Fig. 4.15. Rappresentazione grafica della viscosità apparente delle tre diverse dispersioni a 70 rpm.

Per la dispersione TMC2 è stato studiato anche il comportamento di flusso.

Si dice **comportamento di flusso** la variazione che subisce la viscosità di un fluido in seguito alle sollecitazioni meccaniche applicate.

Sulla base di questo parametro possiamo individuare diversi tipi di fluidi:

Fluidi newtoniani: nei quali la viscosità, ad una determinata temperatura, assume un valore costante indipendente dalla sollecitazione meccanica applicata.

L'equazione che descrive questo comportamento è la **legge di Newton**:

$$\tau = \eta \cdot \gamma$$

dove τ =(sforzo di taglio o **Shear Stress**; γ = velocità di deformazione o **Shear Rate** ; η = la **viscosità**

Nel sistema internazionale (S.I) τ = Pa (Pascal), γ = s^{-1} da cui η = Pa x s dove 1 mPa = 1 cP (centiPoise) valore che corrisponde alla viscosità dell'acqua misurata a 20°C.

Ad eccezione dell'acqua, di alcuni oli e di soluzioni molto diluite è molto raro incontrare tra i prodotti d'interesse farmaceutico dei fluidi newtoniani.

Fluidi non-Newtoniani: essi rappresentano la stragrande maggioranza dei prodotti, dove *la viscosità* cambia al variare dello *shear rate* che determina a sua volta un preciso valore di *shear stress*.

Disponendo graficamente l'andamento dello *shear stress* in funzione dello *shear rate* si ottengono le **Curve di flusso** (vedi figura 4.16) e *la viscosità* è data dalla pendenza della retta che passa per ogni punto della curva. In questi casi infatti si parla di **viscosità apparente**, in quanto per un *fluido non-newtoniano* non è possibile dare un unico valore di viscosità ma tale valore deve essere accompagnato dal valore di *shear rate* e dal valore di temperatura alla quale è stato determinato.

Pertanto in questo tipo di fluidi *la viscosità* può diminuire o aumentare con lo *shear rate*, presentando rispettivamente così due tipi di comportamento: **pseudoplastico** e **dilatante**.

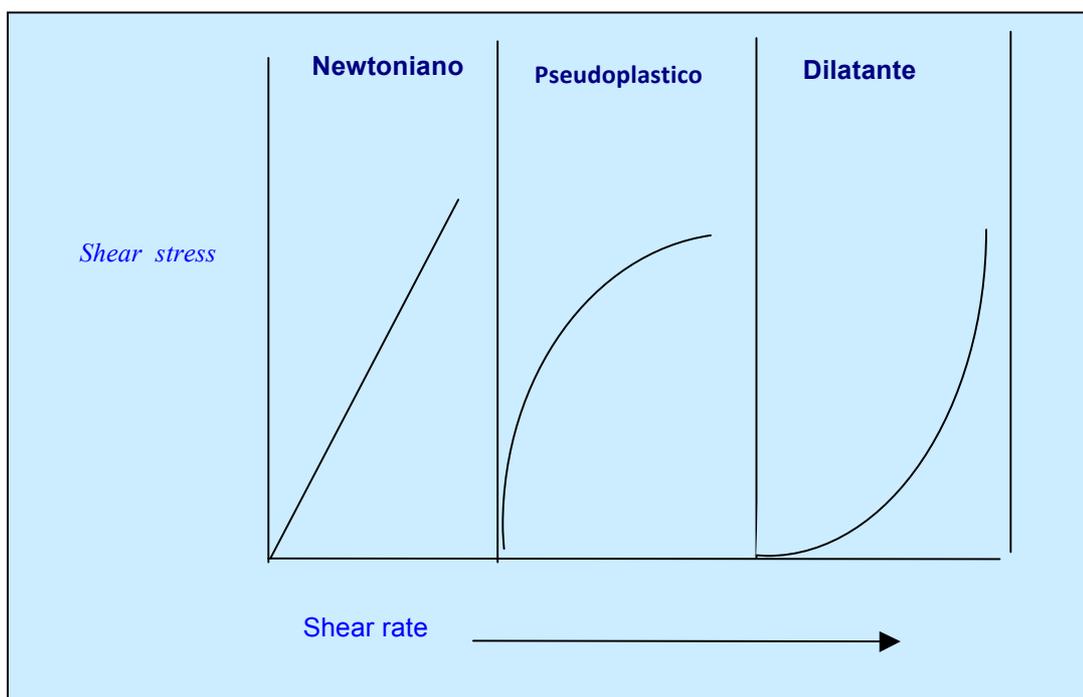


Fig. 4.16. Curve di flusso delle varie tipologie di fluidi

Anche per i *fluidi non-Newtoniani* la dipendenza della *viscosità* dallo *shear rate* può essere espressa da relazioni analitiche (**modelli**) in grado di riprodurre, con maggiore o minore fedeltà a seconda del livello di complessità della funzione, l'andamento dello *shear stress* in funzione della velocità di deformazione (*shear rate*).

Il modello più semplice è la *Legge di potenza* o **Power Law**:

$$\tau = \eta \cdot \gamma^n$$

dove **n** è detto **indice di comportamento di flusso** e in base al suo valore si è in grado di definire il comportamento di flusso del fluido in esame.

Infatti per **n = 1** l'equazione si riduce alla Legge di Newton per cui il fluido è *Newtoniano*, per **n < 1** il fluido è *pseudoplastico*, per **n > 1** il fluido è *dilatante*.

La *legge di potenza* si adatta per interpretare il comportamento di flusso di sistemi i cui diagrammi *shear stress/shear rate* (in scala doppio logaritmica) mostrano un andamento lineare e la curva parte dallo **0** (zero) degli assi cartesiani. La *legge di potenza* non è però sufficiente a descrivere il comportamento di flusso di quei fluidi che presentano un **limite di scorrimento** o *yieldvalue* (τ_0).

Questo viene definito come il valore dello sforzo di taglio o *shear stress* al di sotto del quale non si osserva nessun tipo di scorrimento o fenomeno di flusso. Tale comportamento è definito **Plastico** e sul diagramma *shear stress/shear rate* è rappresentato da una curva che non passa per l'origine.

Dal punto di vista della viscosità significa avere a che fare con dei fluidi che di fatto sono dei "solidi" (viscosità infinita) fino a quando non si raggiungono le condizioni di sforzo applicato necessarie a realizzare il flusso. Una volta che questo avviene, il comportamento di flusso può seguire l'andamento *newtoniano* (plastico-newtoniano), *pseudoplastico* (plastico -pseudoplastico) o *dilatante* (plastico - dilatante).

Uno dei modelli analitici ottimali per rappresentare questo tipo di comportamento è quello di **Herschel-Bulkley** (13) :

$$\tau = \tau_0 + \eta \cdot \dot{\gamma}^n$$

Estrapolando i dati sperimentali della curva *shear stress/shear rate*, utilizzando l'equazione di una retta del tipo **Allometrica 2**,

$$y = a + bx^c$$

si ottengono i valori relativi allo **yield value** (a), all'**indice di flusso** (c) e al coefficiente angolare (b) che è un parametro collegato alla viscosità del sistema.

La figura 4.17 mostra la curva di flusso per la dispersione di TMC2

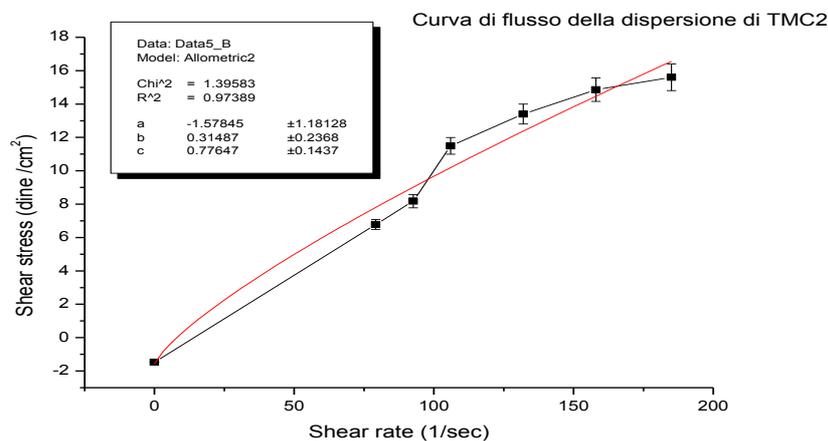


Fig. 4.17. Curva di flusso e Allometrica per la dispersione TMC2

Come si può constatare dalla curva di flusso *shear stress/shear rate* della dispersione TMC2 si ottengono valori relativi allo *yield value* pari a 1,57845, un *indice di flusso* pari a 0,31487 e un coefficiente angolare di 0,77647.

L'andamento reologico così riscontrato risulta positivo nella fase di realizzazione delle nanoparticelle, in quanto un comportamento pseudoplastico e un limite di scorrimento al di sotto dello zero, implica una ulteriore riduzione della viscosità della dispersione quando il fluido viene sottoposto ad uno stress continuo, come ad

esempio l'agitazione magnetica necessaria sia per la reticolazione ionica del TMC che per l'incorporazione del principio attivo.

4.8.6 Diametro medio, Potenziale zeta, PDI e Resa % delle nanoparticelle

L'analisi mediante DLLS è stata effettuata sui campioni diluiti 1: 5 con acqua bidistillata e ultrafiltrata.

I risultati sono rappresentati nella tabella 4.10.

Innanzitutto si è voluto verificare se si potevano preparare le nanoparticelle senza l'ausilio del sonicatore, per cui il campione di TMC-NP è stato sottoposto all'analisi senza preventiva sonicazione.

Come si può evincere dalla tabella, il campione non sottoposto a sonicazione presenta un indice di polidispersione elevato, valore che indica che il campione TMC-NP non è omogeneo e contiene particelle molto grandi o aggregati o impurezze.

Formulazione	Ø medio (nm)	PDI	Potenziale zeta (mV)	Resa%
TMC-NP	277,1 ± 7.522	0.631 ± 0,022	+15,5 ± 2,83	48,50
TMC-NPs	150,1 ± 7.522	0.275 ± 0,022	+17.6 ± 2,86	48,50
TMC-NPPs	191.4 ± 10,06	0.333 ± 0,024	+ 17,2.4 ± 2,86	49,00

Tab.4.10. Risultati ottenuti dall'analisi DLLS e Resa % dei campioni di nanoparticelle.

In effetti se si va a guardare il *Report* del campione TMC-NP (figura 4.18) in funzione del valore di PDI, si può riscontrare come all'interno delle sospensione nanoparticellare siano presenti 3 classi dimensionali delle nanoparticelle, di cui due popolazioni con un intensità di distribuzione sotto i 30 nm.

Se si utilizza il sonicatore, invece il diametro medio decresce e diminuisce l'indice di polidispersione, a conferma che le radiazioni ultrasoniche sono un ottimo artificio per ridurre il diametro medio delle nanoparticelle del campione in esame e aumentare l'omogeneità della distribuzione dimensionale delle nanoparticelle.

Il potenziale zeta risulta in linea con quanto riportato in letteratura per il TMC [nota]. Per aumentare la stabilità della sospensione, in modo da evitare i fenomeni di flocculazione, si prevede l'utilizzo di agenti stabilizzanti. Infatti, in generale la linea di demarcazione dei valori che indicano che un sistema è stabile o instabile è data generalmente a valori di $+30mV$ o $-30mV$. Particelle con *Potenziale zeta* più positivo di $+30mV$ o più negativo di $-30mV$ sono normalmente considerate stabili.

Results

	Size (d.n...	% Intensity	Width (d...
Z-Average (d.nm): 277,1	Peak 1: 272,4	86,1	57,41
Pd: 0,631	Peak 2: 26,11	11,7	5,547
Intercept: 0,800	Peak 3: 12,36	2,2	2,125

Result [Refer to quality report](#)

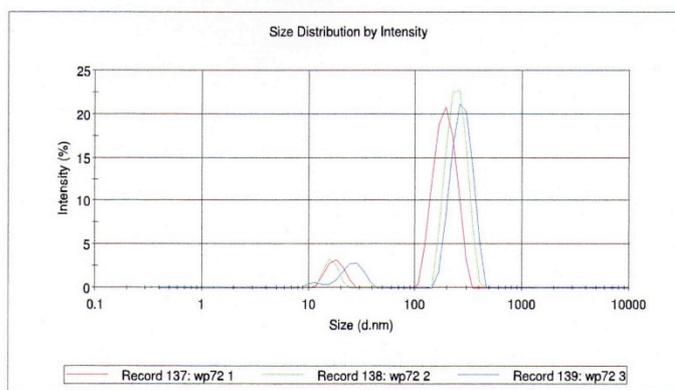


Fig. 4.16. Rappresentazione grafica della distribuzione dimensionale delle popolazioni delle nanoparticelle per mezzo dell'Intensità di distribuzione del campione TMC-NP.

4.8.7 Prove di caricamento del Progesterone

Sono stati infine compiuti degli studi preliminari per verificare la capacità delle nanoparticelle di incorporare il progesterone.

Il primo problema è stato quello della insolubilità del Progesterone sia nel TMC che nel TPP. Si è scelto pertanto di solubilizzare il farmaco nell'etanolo e di aggiungere tale soluzione al TPP. La soluzione finale risultante verrà sgocciolata sulla dispersione di TMC per un concentrazione finale di Progesterone pari a 0,2 mg/ml, ovvero il 10 % della concentrazione del TMC (2mg/ml).

Il campione quindi è stato sottoposto all'ultracentrifuga e il surnatante analizzato allo Spettrofotometro UV.

L' Incorporazione % è risultata essere del 51,40%.

4.8.8 Caratterizzazione preliminare SEM delle nanoparticelle

Come prevedibile, avendo preparato il campione senza l'ausilio di un crioprotettore, le nanoparticelle risultano sempre poggiate su strutture di varia forma.

Inoltre come prevedibile, presentano una quantità di carica elevata, essendo esse stesse dotate di carica propria, per cui per una buona osservazione, sarebbe bene, prima di sottoporle alla caratterizzazione SEM, procedere alla metallizzazione del campione .

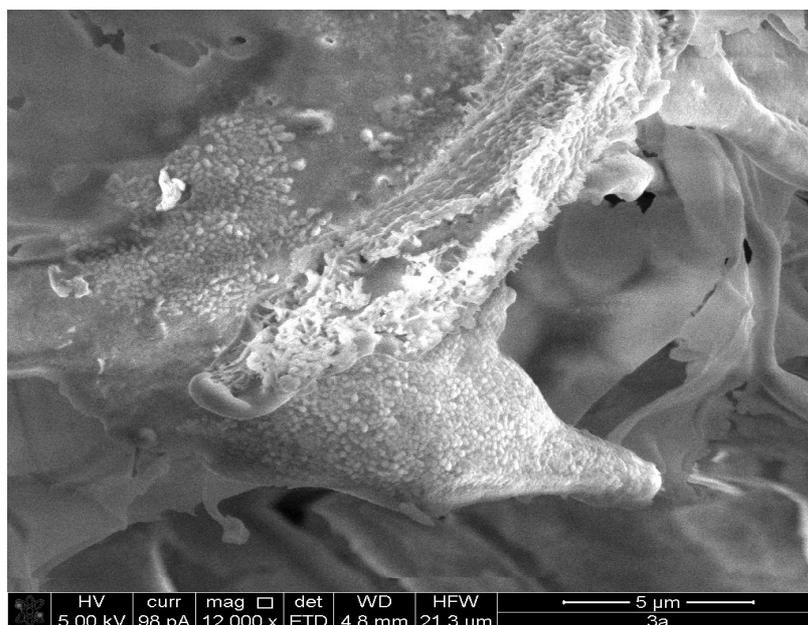


Fig. 4.19. Immagine SEM del campione TMC-NPPs.

4.9 Conclusioni

In questo lavoro di tesi è stato sintetizzato un derivato quaternizzato del Chitosano, il Trimetil Chitosano Cloridrato (TMC).

Su tale derivato è stata fatta una caratterizzazione approfondita mediante la spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR), confermata dall'indagine XRD.

Inoltre, sono state valutate alcune caratteristiche chimico fisiche quali solubilità, pH e misure di viscosità delle dispersioni risultanti.

La fase successiva ha riguardato la realizzazione di sistemi nanoparticellari a base di questo polimero, mediante il metodo della gelazione ionotropica, il tutto avvalendosi degli ultrasuoni per ottenere una popolazione di nanoparticelle omogeneamente dispersa e di dimensioni nanometriche.

Infine, questo obiettivo è stato perseguito tenendo conto anche di un'altra finalità fondamentale che era quella di ottenere una popolazione omogenea di nanoparticelle di dimensioni ottimali per una potenziale veicolazione di farmaci al livello del Sistema Nervoso Centrale.

Come farmaco modello è stato scelto il Progesterone.

La scelta del Progesterone è stata fatta sulla base di una serie di studi di ricerca effettuati nel Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche dell'Università degli Studi di Cagliari, volti a stabilire ed ampliare le correlazioni tra l'alterata omeostasi del colesterolo e la suscettibilità all'infezione/replicazione prionica di diverse cellule cerebrali

Lo studio con lo Zetasizer Nanoseries ha permesso di evidenziare le dimensioni delle particelle dei campioni realizzati e di individuare le classi dimensionali tramite i valori dell'Indice di polidispersione (PDI). Questi risultano promettenti in quanto si sono ottenute dimensioni al di sotto dei 200nm limite al di sotto del quale è possibile la veicolazione al SNC.

Sono stati inoltre determinati i valori di Potenziale Z, parametro importante in quanto dà informazioni sulla carica di superficie delle nanoparticelle e permette di valutare la stabilità dei campioni nei confronti del fenomeno di flocculazione.

Studi successivi saranno mirati a caratterizzare ulteriormente le nanoparticelle mediante le analisi SEM (Microscopia elettronica a scansione) e TEM (microscopia elettronica a trasmissione) per avere conferma ulteriore delle dimensioni nanoparticellari e della distribuzione del principio attivo nel *carrier*. In seguito a queste analisi verrà valutata la possibilità di introdurre ulteriori variazioni dei parametri del sonificatore ai fini di ridurre ulteriormente le dimensioni delle nanoparticelle.

In aggiunta verranno eseguiti studi di citotossicità e studi in vivo, allo scopo di valutare adeguatamente la risposta terapeutica di tali sistemi nei confronti delle patologie attinenti.

Bibliografia

1. Kono K. Arshady R (EDS), *Smart Nano and Microparticles*, the MML series, Vol.7, Kentus Books, London 2006
2. Colombo P, Catellani P L, Gazzaniga A, Menegatti E, Vidale E. *Principi di Tecnologie Farmaceutiche*, C. Editrice Ambrosiana, 2002, cap 10.4
3. Abbott J, *Physiology of the blood-brain barrier and its consequence for drug transport to the brain*. Int Congr. Ser 2005; 1277, 3-18
4. Pardrige WM. *Blood brain barrier delivery*. Drug Discov Today; 2007 129 81-2):5461
5. Zhao H. Wang, Zhan Y. Wang, Chang S. Sun, Chun Y. Wang, Ton Y.Jiang, Si L. Wang, *Trimethylated chitosan- conjugate PLGA nanoparticles for the delivery of drugs to the brain*, *Biomaterials* 2010, 31, 908-915.
6. Stanley B. Prusiner: *I prioni*, Le scienze, dic./1984, pag.36.
7. Stanley B. Prusiner: *Malattie da prioni*, Le scienze, mar./1995, pag.22.
8. Prusiner, Stanley B. *Prions*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Nov 10;95(23):13363–13383.
9. A.Pani, M.D. Cannas, C.D. Orrù, C.Mulas, C.Abete, C.Norfo, M. Putzolu, S. Laconi, P. La Colla, and S.Dessi *“In vitro synergistic anti-prion effect of chlorpromazine and quinacrine in combination with modulators of cholesterol esterification”*, General Microbiology and Virology and Microbial Biotechnologies
10. D. Snyman, j.H.Hamman, J.S. Kotze, J.E. Rollings, A.F. Kotzè, *The relationship between the absolute molecular weight and the degree of quaternisation of N- Trimetyl chitosan chloride*. Carbohidrate Polymers, 2002, 50, 145-150
11. Bickel U, Yoshikawa T., Pardrige WM., *Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier*. Adv Drug Deliv Rev 2001, 46 (1-3), 247-79
12. Wang S., Jiang T., MaM.,Hu Y. Zhang J. Preparation and evaluation of antineuroexcitation peptide (Anep) loaded N-trimetyl chitosan nanoparticles for brain targeting

-
13. Satishkumar Ramachandran, Shirlynn Chen and Frank Etzler, *Rheological Characterization of Hydroxypropylcellulose Gels*, Drug Development and Industrial Pharmacy, **25** (2), 153-161 (1999).

 14. Sieval AB, Thanou M, Kotze AF, et al. *Preparation and NMR characterization of highly substituted N-trimethyl chitosan chloride*. Carbohydr Polym. 1998;36, 157- 165