



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Università degli Studi del Piemonte Orientale

“Amedeo Avogadro”

Dipartimento di Scienze del Farmaco

DOTTORATO DI RICERCA IN

“SCIENZA DELLE SOSTANZE BIOATTIVE”

XXVII Ciclo

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Luigi Panza

***SISTEMI BIOPOLIMERICI MULTIUNITÀ
PREPARATI PER GELAZIONE IONOTROPICA***

Tutor

Chiar.mo Prof. Franco Pattarino

Candidato

Dott. Paolo Mannina

Anni accademici 2011-2014

INDICE

INTRODUZIONE	1
ALGINATO - CARATTERISTICHE GENERALI	2
PRODUZIONE INDUSTRIALE	3
CARATTERISTICHE CHIMICHE	5
Solubilità	6
MECCANISMI DI GELIFICAZIONE DELL'ALGINATO	7
Gelazione ionotropica	7
Gelazione covalente	10
Gelazione termica	11
Gelazione mediata da ligandi cellulari	12
APPLICAZIONI INDUSTRIALI E ALIMENTARI	13
Applicazioni industriali	13
Applicazioni alimentari	14
APPLICAZIONI BIOMEDICHE E FARMACEUTICHE	15
Applicazioni odontoiatriche	15
Applicazioni topiche	16
Studi biologici	17
Rigenerazione di tessuti	17
Rigenerazione vascolare	18
Rigenerazione ossea	18
Rigenerazione delle cartilagini	19
Rigenerazione neuronale	20
Rigenerazione muscolare	20
Rigenerazione di organi	21
Applicazioni oftalmiche	21
Applicazioni parenterali	22
Applicazioni orali	22

Sistemi polielettrolitici	26
Geli alginato-pectina	28
Geli alginato-cellulosa	30
MATERIALI	35
CELECOXIB	37
INTRODUZIONE	38
SCOPO DEL LAVORO	39
FORMULAZIONE E PRODUZIONE DEI PELLETS	40
Sviluppo formulativo	40
Produzione dei pellets (CLX-A)	41
Studio di ulteriori variabili (CLX-B)	41
CARATTERIZZAZIONE DEI PELLETS	44
Analisi morfologica	44
Contenuto di principio attivo nei pellets	44
Contenuto di Labrasol nei pellets	45
Calorimetria differenziale a scansione	45
Studi di rigonfiamento in fluidi acquosi: valutazione della percentuale di fluido assorbito	46
Studi di rigonfiamento in fluidi acquosi: valutazione della variazione di diametro	46
Studi di rilascio <i>in vitro</i>	47
RISULTATI E DISCUSSIONE PELLETS CLX-A	49
RISULTATI E DISCUSSIONE PELLETS CLX-B	58
CONCLUSIONI	71
IBUPROFENE	72
INTRODUZIONE	73

SCOPO DEL LAVORO	74
FORMULAZIONE E PRODUZIONE DEI PELLETS	75
Sviluppo formulativo	75
Produzione dei pellets	77
CARATTERIZZAZIONE DEI PELLETS	77
Analisi morfologica	77
Contenuto di principio attivo nei pellets	78
Contenuto di Labrasol nei pellets	78
Calorimetria differenziale a scansione	78
Studi di rigonfiamento in fluidi acquosi: valutazione della percentuale di fluido assorbito	78
Studi di rigonfiamento in fluidi acquosi: valutazione della variazione di diametro	79
Studi di rilascio <i>in vitro</i>	79
RISULTATI E DISCUSSIONE	80
CONCLUSIONI	92
RANOLAZINA	93
INTRODUZIONE	94
SCOPO DEL LAVORO	95
FORMULAZIONE E PRODUZIONE DEI PELLETS	96
Sviluppo formulativo e produzione dei pellets (Novara)	96
Rivestimento dei pellets in bassina	98
Sviluppo formulativo e produzione dei pellets (Lille)	99
Rivestimento dei pellets	100
CARATTERIZZAZIONE DEI PELLETS	102
Analisi morfologica	102
Contenuto in principio attivo dei pellets	102
Studi di rigonfiamento in fluidi acquosi: valutazione della percentuale di fluido assorbito	103

Studi di rigonfiamento in fluidi acquosi: valutazione della variazione di diametro	103
Studi di rilascio <i>in vitro</i>	103
RISULTATI E DISCUSSIONE PELLETS RNZ-N	104
RISULTATI E DISCUSSIONE PELLETS RNZ-L	124
CONCLUSIONI	144
CONCLUSIONI	145
BIBLIOGRAFIA	148

INTRODUZIONE

ALGINATO - CARATTERISTICHE GENERALI

Gli alginati sono una famiglia di polisaccaridi lineari costituiti da due epimeri: l'acido α -L guluronico (G) e l'acido β -D mannuronico (M). La sua struttura è formata da sequenze omopolimeriche (MM o GG) tra le quali si vengono a trovare sequenze eteropolimeriche (MG) (Pandey et al. 2005). La composizione monomerica dell'alginato, il peso molecolare e l'estensione delle sequenze guluroniche e mannuroniche influenzano le sue proprietà (George et al. 2006). L'alginato è un importante componente presente nelle alghe brune nonché un esopolisaccaride di differenti batteri. Le caratteristiche degli alginati, composizione, peso molecolare, tipo e frequenza delle sequenze di residui, sono determinate dalla specie di alga o batterio che li produce (Draget et al. 2000); nel caso delle alghe le sequenze di residui presenti nella catena polimerica variano a seconda della parte di alga dalla quale viene estratto l'alginato, dall'età e dalla profondità alla quale l'alga è cresciuta. La differenza principale fra gli alginati di origine batterica e gli alginati di origine algale è la presenza nei primi di gruppi O-acetile in posizione C2 e C3 (Skjak-Braek et al. 1986). Nelle alghe l'alginato è presente sotto forma di gel a livello della matrice intercellulare; questo gel di alginato contiene differenti contro-ioni (sodio, calcio, magnesio, bario e stronzio) la cui concentrazione è determinata dall'equilibrio di scambio ionico tra il gel e l'acqua marina. Questi gel hanno una funzione strutturante e donano resistenza meccanica e flessibilità all'alga in modo simile alla cellulosa nelle piante terrestri (Andresen et al. 1977).

Lo studio della struttura chimica dell'alginato è cominciata negli anni sessanta del 1900. Tramite idrolisi parziale dell'alginato seguita da frazionamento, è stato possibile isolare porzioni idrolizzabili e porzioni non idrolizzabili del polimero e osservare che il rapporto tra queste porzioni varia a seconda della fonte dell'alginato (Haug et al. 1966). In un primo momento è stato ipotizzato che le porzioni non idrolizzabili fossero composte principalmente da omopolimeri (MM o GG) e le porzioni idrolizzabili principalmente da eteropolimeri (MG). L'utilizzo di tecniche

di elettroforesi a fase libera per l'analisi delle frazioni isolate di polimero ha permesso di confermare la presenza di blocchi MM e GG intercalati da gruppi più solubili MG (Haug et al. 1967). Una definitiva comprensione della struttura della catena alginica è, però, stata raggiunta solamente con l'analisi spettroscopica a risonanza magnetica nucleare (NMR) ^1H e ^{13}C (Penman et al. 1972).

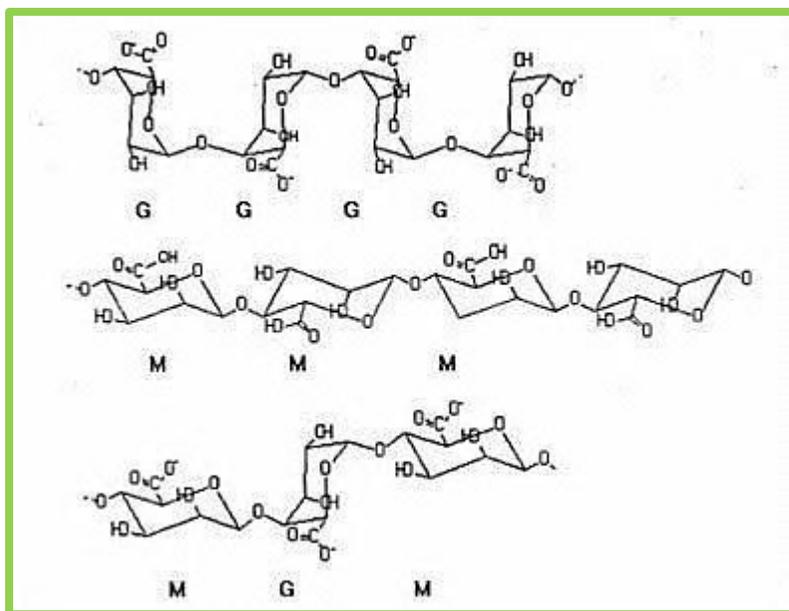


Fig. 1: Differenti conformazioni delle catene di alginato (GG, MM, MG).

PRODUZIONE INDUSTRIALE

Attualmente nel campo commerciale ed industriale vengono utilizzati alginati provenienti solamente da alghe per via dell'abbondanza di polimero prodotto naturalmente da questa specie. Industrialmente sono annualmente prodotte 30000 tonnellate di questo biopolimero, quantità che rappresenta meno del 10% del totale biosintetizzato (Draget et al. 2009). Le principali fonti per la produzione industriale sono le specie di alghe brune *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria*

japonica, *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum*, *Eclonia maxima*, *Lessonia nigrescens*, *Durvillea antarctica* e *Sargassum* (Draget et al. 2005). L'estrazione degli alginati dalla matrice delle alghe è un processo industriale in differenti step (Figura 2). In primo luogo avviene l'estrazione dei contro-ioni presenti nel gel tramite scambio protonico utilizzando acidi inorganici. Successivamente l'acido alginico ottenuto, insolubile in acqua, viene solubilizzato neutralizzandolo mediante basi come carbonato di sodio o sodio idrossido. Il sodio alginato così ottenuto viene separato dal particolato presente in sospensione per flottazione, centrifugazione e filtrazione. Lo step finale consiste nella precipitazione del sodio alginato isolato con alcool, calcio cloruro o acidi organici e nel suo essiccamento e macinazione (Siddhesh et al. 2012). L'alginato così ottenuto contiene, però, mitogeni e impurità citotossiche che limitano o impediscono l'utilizzo del polimero in diverse applicazioni, in particolare in quelle biomediche. Nell'alginato ottenuto da alghe, le impurità presenti più comuni sono metalli pesanti, endotossine, residui polifenolici e residui proteici. È possibile ottenere alginati contenenti minori impurità mediante protocolli di purificazione. In letteratura sono state presentate differenti tecniche di purificazione: elettroforesi a flusso continuo (Zimmermann et al. 1992), estrazione chimica (Jork et al. 2000, Wandrei et al. 2001) e ultrafiltrazione (Susanto et al. 2008). Nonostante i processi di purificazione diminuiscano considerevolmente la concentrazione di impurità, gli alginati purificati contengono ancora quantità relativamente elevate di contaminanti, in particolare proteine. La presenza di queste proteine residuali può causare immunogenicità nelle applicazioni biomediche (Dusseault et al. 2005).

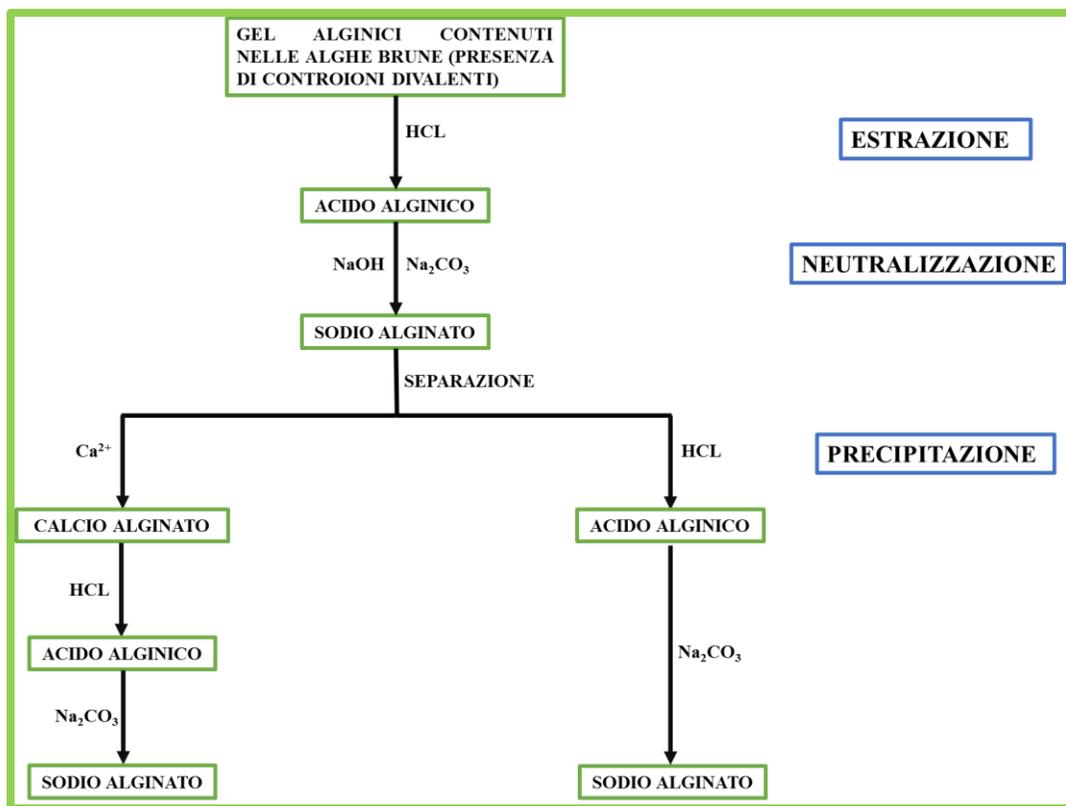


Fig. 2: Processo produttivo del sodio alginato a partire da gel alginici di alghe.

CARATTERISTICHE CHIMICHE

L'alginato presente in commercio ha un peso molecolare che varia tra 32000 e 400000 g/mol; i parametri della relazione Mark-Houwink ($[\eta] = KM^va$) per il sodio alginato in soluzione 0,1 M di NaCl a 25 °C sono $K = 2 \times 10^{-3}$ e $a = 0,97$ dove $[\eta]$ è la viscosità intrinseca (mL/g) e Mv è il peso molecolare corrispondente alla viscosità media (g/mol) (Rinaudo 1992). Il peso molecolare dell'alginato, in modo simile a quanto osservato nei polisaccaridi, è variabile: il peso molecolare risulta essere, quindi, una media che tiene conto dell'intero intervallo dei pesi molecolari (Draget et al. 2005). La viscosità delle soluzioni di alginato aumenta al diminuire del pH e raggiunge il valore massimo intorno a pH 3-3,5 dal momento che i gruppi

carbossilici dell'alginato, a questi valori di pH, risultano protonati e formano legami a idrogeno.

Solubilità

La solubilità degli alginati è influenzata da differenti fattori: il pH e la forza ionica del solvente e la presenza in soluzione di ioni divalenti. L'alginato si può solubilizzare solamente se i gruppi carbossilici presenti sulla catena polimerica sono deprotonati; il polimero risulta quindi insolubile se il pH del solvente risulta più basso del valore critico. La forza ionica del solvente influenza la conformazione e disposizione delle catene polimeriche nonché la viscosità della dispersione e, quindi, la capacità dell'alginato di solubilizzarsi. Gli ioni divalenti sono responsabili della gelificazione dell'alginato: limitate concentrazioni di questi ioni sono sufficienti a impedire la solubilizzazione del polisaccaride (Draget et al. 2005). Le costanti di dissociazione dei monomeri di acido guluronico e mannuronico sono rispettivamente 3,65 e 3,68; la pK_a degli alginati non varia considerevolmente rispetto ai valori di pK_a dei singoli monomeri (Haug et al 1964). Una veloce diminuzione del pH a valori inferiori alla pK_a dell'alginato porta alla precipitazione di molecole di acido alginico mentre una diminuzione lenta e controllata del pH porta alla formazione di geli alginici acidi. I geli alginici acidi sono stabilizzati dalla formazione di un network di legami idrogeno intermolecolari (Draget et al. 1994). Il range di pH in cui avviene la precipitazione dell'alginato dipende dal suo peso molecolare e dalla sequenza dei monomeri presenti in catena. Una maggior quantità di porzioni MM e GG nella catena induce la precipitazione dell'alginato a valori di pH più elevati rispetto a quello di catene di alginato in cui sono presenti quantità più elevate di sequenze MG (Draget et al, 2005). I due principali metodi per produrre geli alginici acidi sono l'aggiunta a una soluzione di sodio alginato di lattoni a idrolizzazione lenta e la

trasformazione di geli di calcio alginato in geli acidi mediante scambio ionico (Siddhesh et al. 2012).

MECCANISMI DI GELIFICAZIONE DELL'ALGINATO

La caratteristica più interessante degli alginati è la loro capacità di formare idrogeli, ovvero reticoli tridimensionali contenenti una elevata quantità di acqua; gli idrogeli presentano differenti caratteristiche vantaggiose: la principale è la loro biocompatibilità in quanto hanno una struttura simile alle macromolecole biologiche. Gli idrogeli di alginato si possono formare in seguito a reazioni di reticolazione di tipo chimico o fisico e le proprietà fisico-chimiche del sistema risultante dipendono dal tipo di reticolazione che è alla base della sua formazione, dalla densità di legami crociati presenti nella sua struttura, dal peso molecolare e dalla natura chimica del polimero che lo costituisce. Le proprietà meccaniche del gelo dipendono dalla struttura chimica dell'alginato: differenti rapporti tra i residui M e i residui G permettono di ottenere reticoli più o meno resistenti e compatti (Drury et al. 2004). Alginati contenenti un'elevata quantità di residui G sono preferiti quando è necessario ottenere delle strutture rigide (Ponce et al. 2006). Alginati contenenti elevate quantità di residui M sono, invece, preferiti quando si vogliono ottenere strutture flessibili (Uludag et al. 2000).

Gelazione ionotropica

La reticolazione ionica avviene quando una soluzione di alginato è messa a contatto con una soluzione contenente cationi divalenti; i gruppi carbossilici dei residui glicuronici chelano gli ioni divalenti portando alla formazione di legami tra i gruppi G di differenti catene di alginato (Tønnesen et al. 2002). La struttura è descritta dal modello "egg-box" in cui un catione divalente interagisce con quattro gruppi

carbossilici, appartenenti due a due a catene di alginato differenti (Braccini et al. 2001). La formazione dei legami tra ioni calcio e residui guluronici dell'alginato avviene seguendo un processo formato da tre fasi distinte e successive. Nella prima fase avviene l'interazione di un singolo ione Ca^{2+} con un singolo residuo guluronico a formare un monocomplesso. Questo step rappresenta la fase di nucleazione indispensabile per la formazione dei dimeri *egg-box*. Nella seconda fase avviene la formazione di dimeri composti da uno ione Ca^{2+} e due residui guluronici per accoppiamento dei monocomplessi. Nella terza e ultima fase avviene l'associazione laterale di più dimeri *egg-box* e la formazione di multimeri (Fang et al. 2007).

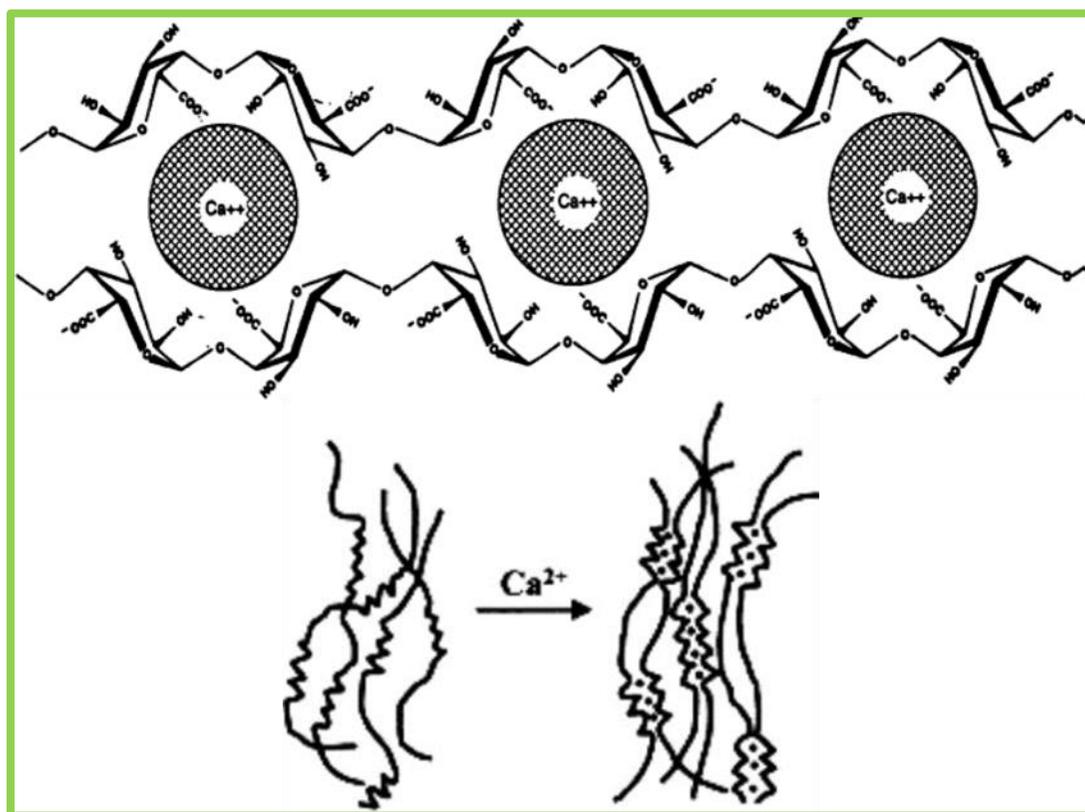


Fig. 3: Struttura “*egg-box*” dell'alginato.

Disposizioni steriche più complesse e avanzate della struttura dei geli sono state osservate mediante diffrazione a raggi X (Mackie et al. 1983) e spettroscopia NMR (Steginsky et al. 1992); nonostante queste osservazioni, la struttura a *egg-box* rimane il modello più accettato per descrivere la struttura dei geli di alginato per via della sua semplicità e sostanziale correttezza nello spiegare le interazioni fra cationi divalenti e catene di alginato. La più alta concentrazione di legami del reticolo polimerico è riscontrabile a livello delle sequenze GG delle catene; a livello delle sequenze MG sono invece osservabili legami più deboli, aventi un minor influenza sulla robustezza dell'idrogelo (Donati et al. 2005). L'affinità per i cationi divalenti dei residui guluronici decresce secondo l'ordine: $Pb > Cu > Cd > Ba > Sr > Ca > Co, Ni, Zn > Mn$ (Morch et al. 2006); i cationi calcio sono i più utilizzati per indurre la gelificazione degli alginati per via della loro bassa tossicità. Il processo di gelificazione avviene velocemente e la velocità di formazione della struttura *egg-box* influenza l'omogeneità e la resistenza meccanica del prodotto. Rallentando il processo di gelificazione è possibile ottenere geli aventi resistenza meccanica più alta e di struttura più omogenea (Kuo et al. 2001). La gelazione ionotropica può essere fatta avvenire utilizzando due differenti metodologie: una "esterna", per diffusione degli ioni divalenti da una fonte esterna alla soluzione di alginato e una "interna" in cui la fonte di cationi si trova all'interno della soluzione di alginato. Generalmente i geli ottenuti per diffusione sono ottenuti erogando gocce di soluzione di alginato in un bagno gelificante contenente cationi divalenti. Alternativamente il rilascio degli ioni può essere attivato da un innesco controllato, generalmente un cambio di pH o la solubilizzazione della fonte dei cationi; ad esempio possono essere utilizzati sali di calcio insolubili, come il carbonato di calcio, i quali solubilizzano in seguito ad una diminuzione del pH, liberando i cationi. Nei geli ottenuti per via esterna si può generalmente osservare che la concentrazione ionica diminuisce all'aumentare della distanza dalla superficie del gelo; i geli ottenuti per via interna si presentano invece più omogenei (Skjåk-Bræk et al. 1989). Principale caratteristica negativa dei geli di alginato ottenuti mediante gelazione ionotropica è la loro non

elevata stabilità in condizioni fisiologiche: i fluidi biologici, in particolare quelli presenti nell'apparato digerente, sono in grado di eroderli, disgregarli e solubilizzarli. I geli di alginato sono particolarmente sensibili ai fluidi contenenti cationi monovalenti, tipicamente il sodio. Questi ioni possono dare scambio ionico con i cationi divalenti presenti nel reticolo alginico e causare un progressivo rilassamento e sfaldamento del network con conseguente dissoluzione dell'alginato (Bajpai et al. 2004).

Gelazione covalente

La reticolazione dell'alginato con formazione di legami covalenti è una tecnica di preparazione ampiamente studiata: l'obiettivo principale di questi studi è generalmente il miglioramento delle caratteristiche meccaniche degli idrogeli. Questo tipo di processo di gelazione è particolarmente studiato nell'ambito dell'ingegneria tissutale e della produzione di biodispositivi. La differenza più importante tra i gel alginici ionici e quelli covalenti, è il differente comportamento in seguito all'applicazione di uno stress. I gel ionici si deformano plasticamente: lo stress provoca il rilassamento della struttura dovuto alla rottura dei legami ionici seguito immediatamente dalla formazione di nuovi legami in un'altra locazione. A questo fenomeno si associa la fuoriuscita di parte dell'acqua dalla matrice del gel. Differentemente, i gel covalenti si deformano elasticamente: sebbene anche in questo caso si osservi una fuoriuscita d'acqua, i legami non sono in grado di rompersi e riformarsi (Lee et al. 2012). La produzione di reticoli covalenti è un processo più complicato rispetto alla gelazione ionotropica e sono spesso utilizzati reagenti tossici che rendono necessario assicurarsi della loro completa eliminazione dalla matrice del gel finito. I reticoli covalenti di alginato ottenuti con poli(etilenglicol)-diammine sono stati tra i primi ad essere ampiamente investigati; usando questi reagenti sono stati ottenuti geli alginici dotati di proprietà meccaniche ampiamente differenti. È

stato riportato in letteratura che il modulo elastico dei geli aumenta gradualmente all'aumentare della densità di legami e del peso molecolare della frazione polietilenglicolica (PEG) del gel (Eiselt et al. 1999). L'impiego di agenti di legame differenti e a concentrazione differente permette generalmente di ottenere la modulazione delle qualità meccaniche e di rigonfiamento dei geli. La natura chimica stessa delle molecole di legame ha una forte influenza sul rigonfiamento. L'utilizzo di agenti di legami contenenti una porzione idrofila può compensare l'aumento di idrofobicità dovuto alla formazione dei legami covalenti (Lee et al. 2000). L'uso di molecole multifunzionali come leganti permette un controllo più accurato delle caratteristiche degli idrogeli: i geli ottenuti utilizzando polialdeidi guluronate (PAG) e poli(acrilamide-co-idrazide) (legante multifunzionale) si sono dimostrati meccanicamente più rigidi e più resistenti rispetto ai geli ottenuti utilizzando PAG e di-idrazide dell'acido adipico (legante bifunzionale). Queste differenti caratteristiche meccaniche possono essere attribuite al maggior numero di interazioni della molecola multifunzionale con il reticolo del gelo (Lee et al. 2004). Un ulteriore esempio di reticolazione covalente dell'alginato è basata su un processo di ossidazione dei residui guluronici dell'alginato al fine di ottenere aldeidi poliguluronate. Le aldeidi vengono successivamente reticolate con la di-idrazide dell'acido adipico al fine di ottenere idrogeli dotati di buone proprietà meccaniche ed elastiche (Jeon et al. 2009).

Gelazione termica

I geli termosensibili sono stati ampiamente studiati in quanto le loro proprietà di rigonfiamento cambiano in modo notevole per variazioni di temperatura anche piccole (Roy et al. 2010). Gli idrogeli di poli (n-isopropilamide) (PANIPAAm) subiscono una transizione di fase reversibile a temperature prossime a quelle corporee (Szymanski et al. 2014). La temperatura di transizione (32 °C) può essere

modificata, mediante copolimerizzazione all'isopropilamide con monomeri idrofili come acido acrilico o acrilamide (Razaev et al. 2007). Gli idrogeli termosensibili a base di alginato sono a tutt'oggi poco usati in applicazioni biomediche, in quanto l'alginato di per se non è un polimero termosensibile (Lee et al. 2012). Risultati migliori sono stati ottenuti con sistemi interpenetranti. In letteratura sono riportati sistemi costituiti da N-isopropilacrilammide e da un copolimero di polietilenglicole e policaprolattone (PEG-co-PCL) gelificati in presenza di alginato di sodio mediante radiazioni UV. L'alginato presente in queste strutture è responsabile dell'aumento di resistenza meccanica e del miglioramento della capacità dei sistemi di rilasciare albumina (Zhao et al. 2010). Recentemente idrogeli termosensibili contenenti sodio alginato e PANIPAAm hanno mostrato una buona capacità di controllare il rilascio dell'isoniazide (Kajjari et al. 2012). Le proprietà termosensibili della metilcellulosa sono state sfruttate per ottenere formulazioni gelificanti in situ, adatte alla somministrazione in pazienti disfagici. Miscele di alginato e metilcellulosa veicolanti paracetamolo, inizialmente in forma liquida, gelificano a temperature comprese tra quella ambiente e corporea. I geli così ottenuti, una volta somministrati, rilasciano il paracetamolo per diffusione sia a pH 1,2 sia a pH 6,8 (Shimoyama et al. 2012).

Gelazione mediata da ligandi cellulari

Allo scopo di incapsulare e veicolare cellule, sono stati studiati sistemi costituiti da alginato modificato con ligandi d'adesione cellulare. L'aggiunta di cellule ad una soluzione di alginato non modificato porta alla formazione di aggregati di struttura non omogenea in cui prevalgono le interazioni cellula-cellula. Se le cellule vengono, invece, aggiunte a una soluzione di alginato modificato con leganti d'adesione cellulare, si ottiene una dispersione omogenea delle cellule e un reticolo cross linkato a causa delle interazioni ligando-recettore cellulare (Lee et al. 2003). Questo tipo di

gelo è reversibile. Se la struttura del gel si rompe per l'applicazione di uno stress meccanico, al termine dello stress il reticolo si riforma in pochi minuti. Questo comportamento è legato alle deboli interazioni fra ligandi e recettori. Un possibile vantaggio di questo sistema per la veicolazione di cellule è dato dalla possibilità di ottenere un gel che scorre come un liquido quando sollecitato, ad esempio durante un'iniezione, ma che solidifica una volta arrivato in uno stato di riposo, ad esempio nel sito di iniezione. La presenza di cellule all'interno di alginati modificati gelificati mediante scambio ionico con ioni calcio sembra donare maggiore resistenza a questi network. La formazione di legami addizionali ligandi-recettore tra cellule e catena di polimero, in aggiunta ai legami ionici tra le catene di alginato, è responsabile della maggior robustezza (Drury et al. 2005). Recentemente è stato riportato in letteratura una struttura reticolata ottenuta miscelando alginato, modificato con la sequenza arginina-glicina-acido aspartico, con cellule. Tramite l'interazione recettore cellulare-ligando si viene a formare una struttura tridimensionale resistente. (Sun et al. 2013).

APPLICAZIONI INDUSTRIALI E ALIMENTARI

L'alginato è utilizzato in ambiti molto diversi: cosmetico, medico, alimentare e farmaceutico.

Applicazioni industriali

Tra le numerose applicazioni industriali degli alginati si può citare quello tessile in cui vengono impiegati come substrati nei processi di colorazione; in particolare il polimero è indispensabile per la colorazione di cotone, iuta e rayon. Gli alginati vengono utilizzati anche come materiale di rivestimento di carta, come agenti di

legame per la produzione dei filamenti da saldatura e nel trattamento di acque reflue. L'ammonio alginato è utilizzato per la sigillatura delle lattine.

Applicazioni alimentari

In ambito alimentare, gli alginati sono utilizzati come additivi per modificare e stabilizzare la consistenza dei cibi. Vengono utilizzati per modificare la viscosità, per formare geli e stabilizzare soluzioni acquose, dispersioni ed emulsioni. L'alginato è, quindi, utilizzato per modificare la reologia degli alimenti e nello specifico la viscosità e le caratteristiche meccaniche. Queste modifiche sono utilizzate per alterare le proprietà organolettiche degli alimenti (Saha et al. 2010). Questa capacità di influenzare le caratteristiche degli alimenti è dovuta sia alle proprietà intrinseche dell'alginato sia all'interazione tra il polimero e i componenti dell'alimento come proteine, fibre e grassi. Gli alginati sono anche utilizzati ampiamente in numerosi prodotti per evitare che subiscano un deterioramento durante la loro vita commerciale (Draget et al. 2006) Particolare attenzione è stata data all'utilizzo di calcio alginato in alimenti ricostituiti, in particolare carni. Con il termine alimento ricostituito si intende un prodotto parzialmente o completamente disassemblato e ricostituito nella stessa o in una differente forma (Sudheer et al. 2011). Il calcio alginato grazie alla sua semplicità di utilizzo, all'indipendenza del processo di gelazione dalla temperatura, ed alla sua economicità, è presente in numerosi alimenti ricostituiti: carni, cipolle e ripieni per olive. Nelle marmellate sono ampiamente utilizzati geli composti da alginati ricchi in residui glicuronici e pectine esterificate. Questi geli alginato-pectina sono termoreversibili a differenza dei geli di solo alginato e sono quasi completamente insensibili alla presenza di zuccheri, a differenza dei geli composti di sole pectine; risultano, quindi, utili per preparare prodotti privi di zucchero. Un impiego particolare degli alginati è come base per alimenti ipocalorici. L'alginato diminuisce il senso di fame, gonfiandosi

come una spugna in presenza di acqua, assicurando, così, un senso di pienezza e impedendo l'assorbimento di nutrienti (Georg Jensen et al. 2013). L'alginato è considerato un polimero sicuro e non sono state applicate particolari restrizioni al suo utilizzo da parte degli enti regolatori. La commissione congiunta FAO/WHO sugli additivi alimentari non ha assegnato un valore all'assunzione giornaliera accettabile (ADI) dell'alginato. Negli Stati Uniti i sali di ammonio, calcio, potassio e sodio dell'alginato sono considerati generalmente sicuri (GRAS). In Europa i sali di alginato propilenglicole sono stati approvati nell'uso alimentare industriale come additivi non coloranti e dolcificanti (Draget et al. 2005).

APPLICAZIONI BIOMEDICHE E FARMACEUTICHE

In ambito biomedico e farmaceutico i geli di alginato sono utilizzati da più di tre decenni per incapsulare una ampia selezione di principi attivi (Reis et al. 2007; Goh et al. 2012), proteine (George et al. 2006; Gombotz et al 2012) e cellule (Orive et al. 2002; Vos et al. 2006).

Applicazioni odontoiatriche

L'alginato viene utilizzato per produrre calchi dentali nel campo odontoiatrico. Per la produzione di calchi le tecniche utilizzate sono due, tradizionalmente la prima è caratterizzata da due fasi successive: viene dapprima effettuato un pre-calco utilizzando alginato e successivamente viene preparato il calco definitivo utilizzando altri materiali, ad esempio resina acrilica o polietere. Più recente è l'utilizzo della tecnica one-step in cui il calco definitivo è ottenuto direttamente utilizzando l'alginato (Carlsson et al. 2013).

Applicazioni topiche

Bendaggi a base di alginato sono stati ampiamente studiati al fine di promuovere la guarigione di lesioni acute o croniche. I bendaggi tradizionali svolgono principalmente una funzione di barriera: mantengono la ferita secca permettendo l'evaporazione dell'essudato e impediscono la penetrazione di patogeni nella lesione (Queen et al 2004). I bendaggi moderni invece formano in corrispondenza della lesioni un ambiente umido e promuovono i processi di guarigione della ferita. I bendaggi a base di alginato sono prodotti per gelazione ionotropica con calcio: mediante liofilizzazione, si ottengono fogli porosi e fibrosi di alginato utilizzati per assemblare i bendaggi. Il gel secco applicato sulla lesione assorbe l'essudato della ferita e favorisce la ricostruzione del tessuto cutaneo. I bendaggi a base di alginato sono utilizzati per ferite essudative: ulcere, ferite infette, ferite croniche profonde e ferite granulative. I bendaggi sono adattabili alle cavità, promuovono l'emostasi e sono poco allergenici (Skórkowska-Telichowska et al. 2013). Possono veicolare molecole promuoventi la guarigione, anestetici locali o anti batterici. Sono stati approntati bendaggi capaci rilasciare in modo controllato dibutiril cicloadenosina monofosfato, un regolatore della proliferazione dei cheratinociti che accelera il processo di guarigione (Balakrishnan et al. 2005). Il rilascio, da parte di geli d'alginato, di ioni argento aumenta l'attività antimicrobica e antiossidante dei bendaggi. L'aggiunta di argento aumenta anche l'affinità di legame delle elastasi e delle citochine proinfiammatorie (Wiegand et al. 2009). La gelazione di un reticolo alginico con ioni zinco porta ad un aumento degli effetti antibiotici ed immunomodulatori, nonché un aumento dei fattori di crescita endogeni (Agren et al. 1999).

Studi biologici

I geli di alginato sono ampiamente utilizzati come modelli 2D o 3D di colture cellulari fisiologicamente rilevanti. L'alginato, grazie al suo basso adsorbimento di proteine e alla mancanza di recettori specifici per questo polimero nelle cellule di mammifero, rappresenta un ottimo terreno di coltura. Alginati modificati con acidi arginilglicilaspartici (RGD) sono frequentemente utilizzati come substrato per colture cellulari *in vitro* (Lee et al. 2012). L'adesione e proliferazione dei mioblasti in coltura vengono fortemente aumentate dalla presenza dell'alginato-RGD rispetto a quanto avviene con geli alginici non modificati. Il numero di cellule che interagiscono col gel dipende dalla concentrazione di RGD presente nella matrice di alginato (Rowley et al. 1999). Il numero di peptidi RGD per catena di alginato e la distanza tra i blocchi di RGD ha un impatto sulla risposta delle cellule (Lee et al. 2004; Komisar et al. 2006). L'affinità dei peptidi di adesione cellulare per i recettori cellulari influenza la risposta cellulare: gli RGD ciclici mostrano generalmente affinità più elevata rispetto ai RGD lineari (Hsiong et al. 2009). L'utilizzo di geli alginici come substrati tridimensionali per la coltivazione cellulare può, potenzialmente, essere utile per comprendere la biologia di cellule staminali e cancerose. Geli di alginato sono stati utilizzati per esaminare l'influenza del microambiente sulle attività di segnalazione e vascolarizzazione di cellule tumorali (Fishback et al. 2009).

Rigenerazione di tessuti

L'incapsulazione di proteine e cellule in geli alginici è stata ampiamente sfruttata per la rigenerazione o l'ingegnerizzazione di differenti tessuti e organi del corpo umano. Per queste applicazioni è stata sfruttata l'ampia gamma di proprietà fisiche, gelificazione, adesione cellulare e degradazione degli alginati. Le proteine di piccole dimensioni possono, generalmente, essere rilasciate velocemente dai geli anche in

assenza di degradazione della matrice alginica (Silva et al. 2010). Proteine di dimensioni più elevate possono essere rilasciate in seguito a degradazione della matrice (Kong et al. 2009). In caso di incapsulazione di cellule nei geli, si assiste a fenomeni di migrazione delle cellule o ad un loro rilascio controllato dalla degradazione dell'idrogelo (Hashimoto et al. 2002).

Rigenerazione vascolare

La formazione di nuovi vasi sanguigni è fondamentale per l'ingegneria tissutale; una distanza di poche centinaia di micron dai vasi causa ipossia e carenza di nutriente per le cellule. La neovascolarizzazione può essere ottenuta mediante l'impianto di cellule, la veicolazione di farmaci angiogenici (proteine o geni) o entrambi. I geli di alginato permettono un controllo spaziotemporale nella somministrazione di questi farmaci (Cao et al. 2007). L'applicazione più studiata è la somministrazione di geli alginici contenenti eparina legata a fattori di crescita (Jay et al. 2009). L'iniezione di questi geli in tessuti muscolari colpiti da ischemia ha portato ad un rilascio prolungato dei fattori di crescita e ad un'accelerata formazione di nuovi capillari e conseguente diminuzione della gravità dell'ischemia (Lee et al. 2003). Le differenti forze di legame tra l'alginato e i fattori di crescita vengono sfruttate per ottenere il rilascio sequenziale delle molecole terapeutiche: il rilascio sequenziale migliora la maturazione e funzionalità di nuovi vasi cardiaci nel tessuto colpito da infarto miocardico (Hao et al. 2007).

Rigenerazione ossea

Il trattamento di lesioni ossee è spesso limitato da processi di guarigione lenti e imperfetti; i geli di alginato hanno un uso potenziale come veicoli di fattori osteoinduttivi. Gli alginati, rispetto ad altri materiali utilizzati nella rigenerazione di

tessuti ossei e cartilagini, possono essere introdotti all'interno del corpo in maniera minimamente invasiva, possono essere utilizzati su difetti ossei di forma irregolare, facilitano l'adesione di ligandi e controllano il rilascio di fattori di induzione tissutale (Park et al. 2005). Geli di alginati contenenti DNA codificante proteine morfogenetiche ossee hanno mostrato la capacità di rigenerare il tessuto osseo (Krebs et al. 2010). Anche nel caso della rigenerazione ossea è stato utilizzato il rilascio sequenziale di differenti fattori; questa tecnica ha permesso di riparare e rigenerare difetti ossei (Kanczler et al. 2010). L'alginato è stato combinato con materiali inorganici al fine di migliorare la formazione di tessuto osseo. *Scaffold* a base di alginato e idrossiapatite, aventi una struttura interconnessa porosa, hanno mostrato un aumento di adesione a cellule di osteosarcoma (Lin et al. 2004).

Rigenerazione delle cartilagini

La riparazione dei tessuti cartilaginei danneggiati o degradati rappresenta una delle maggiori sfide in campo ortopedico. Studi condotti su animali hanno mostrato che i geli alginici contenenti cellule condrogeniche sono potenzialmente utili per la riparazione della cartilagine danneggiata (Chang et al. 2003). L'uso di *scaffold* macroporosi a base di alginato aventi geometrie predefinite permette la formazione di cartilagini che conservano la struttura geometrica dell'alginato (Thornton et al. 2004). L'aggiunta di acido arginilglicilaspartico (RGD) ai geli aumenta le interazioni di adesione con i condrociti permettendo il controllo del fenotipo cellulare. Questi gel sono non invasivi e si sono dimostrati efficaci nel promuovere la crescita di cartilagine (Park et al. 2009).

Rigenerazione neuronale

I geli di alginato sono stati utilizzati per riparare il sistema nervoso e centrale. L'alginato soddisfa i requisiti richiesti ad un materiale per rigenerazione neuronale: eccellente biocompatibilità, bassa tossicità e reazione a corpo estraneo, formazione di un microambiente che favorisce l'elongazione assonale e la migrazione delle cellule di Schwann, inibizione dell'invasione dei fibroblasti e della formazione di tessuto cicatriziale. Il calcio alginato, a causa dell'elevata quantità di ioni calcio al suo interno, presenta però citotossicità relativamente elevata sul tessuto nervoso e può dare origine a reazioni da corpo estraneo; vengono quindi utilizzati geli alginici reticolati covalentemente. Allo scopo di promuovere la rigenerazione dei nervi periferici il gruppo di ricerca di Hashimoto ha proposto l'uso di un materiale a base di alginato reticolato con etilendiammina (formazione di legami covalenti tra le catene di alginato). Questi geli sono pratici da utilizzare e possiedono una buona capacità di promozione della rigenerazione dei nervi periferici (Hashimoto et al. 2005). Geli reticolati con etilendiammina hanno promosso la rigenerazione di assoni e astrociti in ratti (Kataoka et al 2004). L'alginato viene anche usato come colla per riparare interruzioni non suturabili di nervi periferici (Suzuki et al. 2000).

Rigenerazione muscolare

Geli di alginato veicolanti cellule, fattori di crescita o entrambi si sono dimostrati utili a promuovere la rigenerazione di tessuti muscolari scheletrici (Levenberg et al. 2005). Il rilascio sostenuto del fattore di crescita degli epatociti e del fattore di crescita dei fibroblasti da gel alginici aumenta in modo rilevante la sopravvivenza a lungo termine e la migrazione di mioblasti primari nel tessuto muscolare danneggiato (Hill et al. 2006a); si è osservata conseguentemente un'augmentata rigenerazione delle fibre muscolari a livello della ferita (Hill et al. 2006b).

Rigenerazione di organi

I geli di alginato sono stati studiati anche al fine di ottenere la rigenerazione e l'ingegnerizzazione di differenti organi come pancreas e fegato. Epatociti incapsulati nei geli di alginato possono rappresentare una piattaforma per la ricostruzione di tessuti epatici danneggiati (Koizumi et al. 2007). Siffatti geli idrofilici e porosi di alginato sono in grado di incorporare un numero elevato di epatociti mantenendone attive le funzioni peculiari (Zmora et al. 2002). I geli alginici sono anche largamente impiegati per l'incapsulazione di isole pancreatiche nella cura del diabete di tipo I in quanto proteggono le cellule trapiantate dal sistema immunitario dell'ospite evitando la reazione di rigetto (Lim et al. 1980; Calafiore et al. 2003).

Applicazioni oftalmiche

La somministrazione oculare di farmaci deve tener conto della particolare anatomia e fisiologia dell'occhio, la necessità di superare le barriere protettive dell'apparato senza causare danni ai tessuti o aumentare il rischio di effetti indesiderati sistemici (Rupenthal et al. 2011). La via oculare è generalmente poco efficiente: la biodisponibilità dei farmaci somministrati è di circa l'1-3% a causa della diluizione e della rapida rimozione della forma di dosaggio ad opera del fluido lacrimale (Tonnesen et al. 2002). Per aumentare il tempo di contatto del farmaco con la cornea e quindi la biodisponibilità possono essere usate macromolecole che aumentano la viscosità e la mucoadesione. Il sodio alginato gelifica *in situ* nell'occhio senza necessitare dell'aggiunta di ioni divalenti. Alginati con un contenuto di residui glicuronici superiore al 65% gelificano immediatamente. Sfruttando questa proprietà sono state prodotte gocce oftalmiche veicolanti pilocarpina capaci di prolungare significativamente il tempo di effetto del farmaco (Shapiro et al. 1997). Un differente sistema autogelificante ha permesso di ottenere tempi di ritenzione maggiori a livello oculare di alcaloidi; questi sistemi non presentano, inoltre, proprietà irritanti (Liu et

al. 2010). L'uso di alginato miscelato con idrossipropilmetilcellulosa come addensante ha permesso di ottenere gocce oculari autogelificanti contenenti moxifloxacina idrocloruro (Mandal et al. 2014). Nanoparticelle di alginato contenenti 5-fluorouracile sono state rivestite con chitosano; la carica positiva del chitosano permette di ottenere un tempo di permanenza più elevato delle nanoparticelle sulla superficie corneale carica negativamente. Queste particelle testate su cornee di coniglio hanno mostrato una buona capacità di veicolare il 5-fluorouracile (Nagarwal et al. 2012).

Applicazioni parenterali

Al momento non sono presenti in commercio formulazioni parenterali contenenti alginato. L'immunogenicità dell'alginato è ancora soggetta a controversie. In letteratura sono riportati differenti risultati di studi di immunogenicità, probabilmente a causa dell'utilizzo di alginati di qualità e grado di purezza differenti (Lee et al. 2012). L'iniezione intramuscolare di alginati ultrapurificati in modelli animali non ha indotto reazioni da corpo estraneo (Sun et al. 2010). Questi risultati supportano la teoria che gli effetti avversi dell'alginato siano causati dalla presenza di impurezze piuttosto che dalla natura intrinseca del polimero (Sosnik 2014). Lo sviluppo commerciale di alginati ultrapuri potrebbe aprire la strada a sistemi che richiedono una biocompatibilità più elevata (Igarashi et al. 2012).

Applicazioni orali

In campo farmaceutico l'alginato è ampiamente utilizzato per la produzione di sistemi di dosaggio orali. La via orale presenta diversi vantaggi: è ben accettata dal paziente, è sicura ed economica. L'utilizzo diffuso dell'alginato per via orale è dovuto alle numerose caratteristiche che rendono adatto il polimero per questa via di

somministrazione. Come riportato in precedenza, l'alginato è ampiamente utilizzato nell'industria alimentare e il suo uso orale non ha mai destato preoccupazioni di immunoresponsività a differenza dell'utilizzo intravenoso. Per via orale l'alginato risulta quindi essere non tossico, altamente biocompatibile e biodegradabile (Espevik et al. 1993). L'alginato presenta caratteristiche di mucoadesività che possono favorire la veicolazione di farmaci a livello delle mucose dell'apparato gastrico (Gombotz et al. 2012). L'adesione delle particelle di alginato al tessuto mucosale permette di rallentare il tempo di passaggio dell'attivo veicolato e di indirizzarlo alla superficie del tessuto (George et al. 2006). La carica anionica, conferita all'alginato dai gruppi carbossilici, lo rende un buon candidato per la produzione di forme di dosaggio mucoadesive. Studi comparativi hanno mostrato che l'alginato dispone di proprietà mucoadesive più elevate rispetto a altri polimeri come polistirene, chitosano, acido polilattico e carbossimetilcellulosa (Kwok et al. 1989). L'alginato ha un comportamento pH dipendente: in ambiente acido, come quello gastrico, gli strati esterni di alginato si convertono in acido alginico insolubile ed avviene una contrazione del reticolo polimerico; questo fenomeno può portare ad un rallentamento del rilascio del principio attivo veicolato dal gel (Chen et al. 2004). A pH più elevati, l'alginato si riconverte in un gel viscoso e solubile: questo comportamento permette l'ottenimento di profili di rilascio pH dipendenti. L'incremento di solubilità della matrice alginica a pH più elevati può però causare un effetto *burst* con un rilascio molto veloce del farmaco. Questo effetto è dovuto alla presenza nella matrice di alginato rigonfiata di pori che raggiungono i 5 nm di diametro (Otterlei et al. 1991). Molecole idrofile di piccole dimensioni sono particolarmente suscettibili a questo fenomeno, mentre molecole fortemente idrofobe possono essere rilasciate in modo controllato dalla matrice di alginato senza necessità di effettuare modifiche sul polimero o sulla struttura del gel. Il processo di gelazione dell'alginato può avvenire in condizioni blande senza l'utilizzo di solventi tossici e la gelazione ionotropica è particolarmente adatta a questo scopo. Questa caratteristica permette di adottare processi di produzione di forme di

dosaggio economici ed ecologici, compatibili con l'incapsulazione di proteine o cellule mantenendo la loro struttura tridimensionale (DeVolder et al. 2012). Lo studio di sistemi di dosaggio orali a base di alginato si è concentrato soprattutto sull'obiettivo di ottenere il rilascio a livello intestinale e del colon. Tra i sistemi più promettenti per la veicolazione di principi attivi e proteine figurano nanosfere, microsfele e pellets. L'utilizzo di sistemi ad unità multipla si rivela vantaggioso rispetto all'impiego di sistemi ad unità singola come compresse o capsule. Sono sistemi meno dipendenti dal tempo di svuotamento gastrico e presentano una variabilità ridotta del tempo di transito gastrointestinale. Infine permettono una più omogenea distribuzione del farmaco lungo il tratto gastrointestinale, un miglioramento dell'assorbimento e una ridotta irritazione a livello locale (Gandhi et al. 2013). Questi sistemi sfruttano le numerose unità da cui sono formati, riuscendo a localizzarsi ed agire più efficacemente sull'organo bersaglio, migliorando efficacia e sicurezza e riducendo i rischi di *dose-dumping* rispetto ad un sistema a unità singola soggetto ad un più elevato rischio di rottura o deterioramento durante il transito nel tratto gastrointestinale (Dey et al. 2008). Le differenti forme di dosaggio ad unità multipla possono essere combinate tra di loro: l'incapsulazione di nanoparticelle di Eudragit S100 contenenti indometacina, un antitumorale modello, all'interno di microsfele di alginato ha permesso di ottenere rilascio in fluidi simulanti l'ambiente del colon. Le microsfele di alginato permettono alle nanosfere di arrivare integre al colon ed evitare il manifestarsi di fenomeni di aggregazione (Ma et al. 2014). All'interno dei pellets di alginato è possibile incapsulare nanoparticelle solide lipidiche (SLN): questi sistemi possono essere potenzialmente utilizzati per la veicolazione di principi attivi idrofobi e per la protezione delle SLN in ambiente gastrico (Strasdat et al. 2013).

Sono numerose le variabili che influiscono sulle caratteristiche delle microsfele di alginato: è stato determinato che le proprietà delle sfere di alginato sono influenzate non solo dalle caratteristiche intrinseche del polimero ma anche dal tipo e dalla

concentrazione dei cationi divalenti utilizzati per effettuare la gelificazione, dalla forza ionica e dal pH dell'ambiente in cui viene effettuato il processo produttivo (Velings et al. 1995). In uno studio in cui sono stati utilizzati ioni bario, calcio, magnesio, stronzio e zinco sono stati ottenuti geli con tutti i cationi ad eccezione del Mg^{2+} . I geli ottenuti con Ba^{2+} sono dotati di forza tensile e modulo di Young più elevati, mentre gli ioni Ca^{2+} permettono di ottenere la più alta resistenza alla penetrazione. I geli alginici di zinco e stronzio raggiungono l'elongazione più elevata al punto di rottura (Harper et al. 2014). In uno studio che compara tecniche di produzione di pellets basate su fonti di ioni calcio interne ed esterne, si è osservato un rilascio più veloce di vitamina B_{12} dalla matrice di alginato ottenuto per gelazione interna. L'incapsulazione di $CaCO_3$ all'interno dell'alginato ha portato alla formazione di una struttura più omogenea e dotata di pori più grandi rispetto alla struttura alginica ottenuta mediante erogazione del polimero in bagno gelificante. È stata anche confermata l'importanza della concentrazione del gelificante, delle condizioni di forza ionica e del pH per le cinetiche del processo di gelificazione e per il volume e la stabilità dei pellets ottenuti (Puguan et al. 2014). È stato suggerito che l'utilizzo di ioni bario per la gelificazione dell'alginato possa promuovere l'ottenimento di geli poco rigonfiabili e altamente stabili utili per il direccionamento dell'attivo a livello del colon (Bajpai et al. 2004). Pellets di alginato contenenti papaina hanno permesso di ottenere un rilascio sito specifico a livello dell'intestino tenue e di migliorare la stabilità del farmaco. In questo studio, l'aumento di concentrazione del bagno gelificante di calcio cloruro ha portato ad un aumento di concentrazione dei legami di reticolo (Sankalia et al. 2005). La concentrazione di agente gelificante e il tempo di gelificazione adottato influenzano il rilascio di aceclofenac dalla matrice di pellets alginici. Valori più elevati di queste due variabili portano ad un rallentamento del rilascio. L'aumento del tempo di gelificazione oltre ad un certo limite (due ore) non causa cambi significativi del profilo di rilascio: il reticolo del gelo ha raggiunto la massima concentrazione possibile di legami ionici (Manjanna et al. 2010). Nel lavoro di Ghosh la concentrazione di alginato, usato per

produrre sfere contenenti furosemide, risulta essere il fattore determinante sulle caratteristiche meccaniche dell'idrogel. La presenza in quantità variabili di Acrycoat ED30 non ha un'influenza percepibile. Utilizzando concentrazioni di alginato comprese tra il 2 e il 4% è possibile ottenere un rilascio controllato del farmaco fino a dieci ore (Ghosh et al. 2013). I sistemi di dosaggio composti di solo alginato presentano però alcuni inconvenienti: l'incapsulazione di principi attivi idrosolubili è poco efficiente in particolare per i sistemi preparati mediante gelazione ionotropica. Percentuali anche elevate di farmaco vengono perse all'interno del bagno gelificante durante il processo di gelificazione. Un altro inconveniente di questi sistemi è la loro relativamente bassa resistenza meccanica nei fluidi biologici, caratteristica che può impedire il controllo del rilascio del principio attivo veicolato. In letteratura sono riportati numerosi studi volti al superamento di queste problematiche. Una prima serie di interventi prevede la modificazione della struttura chimica dell'alginato. La formazione di legami covalenti fra le catene di alginato e molecole tioliche, come la L-cisteina, permette di ottenere geli con migliori capacità di veicolare l'attivo sulle membrane bersaglio (George et al. 2006). La presenza della L-cisteina sull'alginato permette di ottenere geli dotati di una più alta mucoadesività e migliori caratteristiche meccaniche; queste caratteristiche conferiscono alla forma farmaceutica una stabilità più elevata e un tempo di permanenza sulle mucose più elevato (Bernkop-Schnürch et al. 2001). L'introduzione di modifiche idrofobiche sulle catene di alginato provoca cambiamenti significativi nel comportamento di questo polimero (Leonard et al. 2004).

Sistemi polielettrolitici

La miscelazione dell'alginato con polimeri policationici come il chitosano permette di ottenere dei complessi polielettrolitici. I polielettroliti sono macromolecole contenenti un elevato numero di gruppi funzionali carichi o che possono essere

carichi. La miscelazione di polielettroliti dotati di carica opposta porta alla formazione di complessi polielettrolitici, i quali per formarsi non necessitano quindi dell'aggiunta di leganti (Sæther et al. 2008). I complessi polielettrolitici sono generalmente ben tollerati e biocompatibili. Il chitosano è un polimero cationico presente principalmente nell'esoscheletro dei crostacei e, dopo la cellulosa, rappresenta il polimero naturale più abbondante (Roberts et al. 1992). Industrialmente il chitosano è ottenuto sotto forma di α -chitosano a partire dagli scarti di produzione ottenuti durante la lavorazione di granchi e gamberi (Sheperd et al. 1997). Chimicamente il chitosano è un copolimero lineare di D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina unite da legame β -(1,4)-glucosidico.

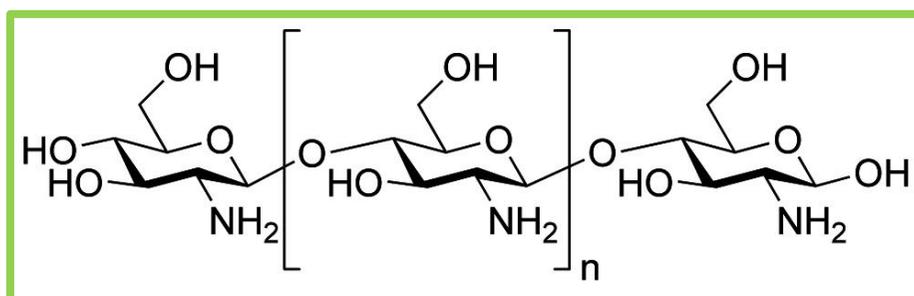


Fig. 4: Struttura chimica del chitosano.

Al fine di ottenere geli di alginato-chitosano è possibile seguire due protocolli di preparazione differenti. È possibile far gelificare l'alginato in un bagno gelificante al cui interno è solubilizzato il chitosano oppure i sistemi alginici gelificati in precedenza possono essere immersi in un bagno di chitosano (Pasparakis et al. 2006). I primi sistemi contengono una quantità di chitosano decisamente inferiore rispetto ai secondi; l'immediata formazione dello strato di calcio alginato all'interno del bagno gelificante ostacola la penetrazione delle molecole di chitosano nella matrice. Differentemente, se i pellets sono messi a contatto col chitosano in un secondo

tempo, la struttura del reticolo di alginato rimane invariata e permette una più elevata penetrazione del polimero cationico (Gaserod et al, 1999). Nonostante i sistemi poliettrolitici alginato-chitosano siano stati ampiamente studiati e proposti per veicolare un'ampia gamma di principi attivi, non è ancora possibile generalizzare l'influenza di differenti variabili di produzione su questi sistemi (Luo et al. 2014). I complessi poliettrolitici alginato-chitosano hanno mostrato la capacità di controllare il rilascio della sulfalazina a livello del colon. In questo studio è stato evidenziato l'effetto di differenti processi di essiccamento sulle caratteristiche di pellets alginato-chitosano: la liofilizzazione porta ad una perdita di sfericità, mentre l'essiccamento ad aria non danneggia la struttura dei sistemi (Tavakol et al. 2009). Pellets di alginato-chitosano hanno permesso di ottenere un rilascio controllato e localizzato di teofillina. Questo risultato è stato attribuito all'aumento del controllo del rilascio, della mucoadesività e della resistenza meccanica dei pellets conferiti dallo strato di rivestimento di chitosano (Elzatahry et al. 2009). La presenza di chitosano tende a rallentare il principio del processo di rilascio del farmaco da pellets idratati (Pasparakis et al. 2006). Buoni risultati sono stati ottenuti con la veicolazione di farmaci antitubercolari. Il rilascio di rifampicina, isoniazide e pirazinamide da sistemi alginato-chitosano è risultato essere prolungato; studi effettuati su cavie hanno evidenziato un aumento di biodisponibilità dei farmaci in seguito alla somministrazione di queste forme di dosaggio (Pandey et al. 2004).

Geli alginato-pectina

La pectina è un polimero lineare; la catena polimerica è polidispersa e polimolecolare e varia a seconda della fonte da cui è stata ottenuta e dal processo applicato per l'estrazione. Si ritiene che la struttura principale della pectina sia costituita da acido D-guluronico (Mukhiddinov et al. 2000). I polimeri di pectina contengono da

qualche centinaia a circa 1000 saccaridi, con peso molecolare che varia tra 50000 e 150000 daltons.

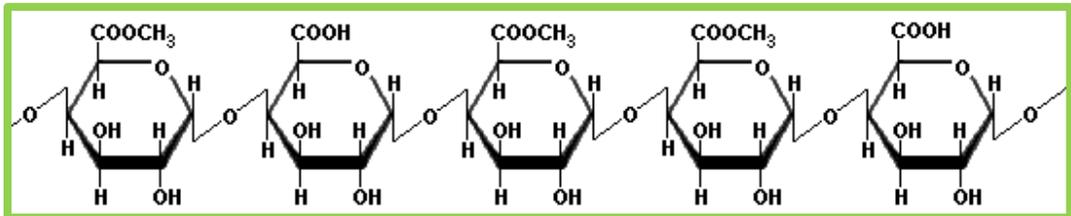


Fig.5: Struttura chimica della catena galatturonica della pectina.

La pectina possiede un meccanismo di gelificazione simile a quello dell'alginato: questo meccanismo dipende principalmente dalla capacità dei gruppi carbossilici dei residui guluronici di coordinare legami con cationi divalenti. La struttura che si forma è simile all'*egg-box* dell'alginato. I geli pectinici sono fortemente influenzati dal tipo di pectina utilizzata, dalla concentrazione dello ione gelificante e dalle condizioni di gelificazione (Sriamornsak et al. 1998). La miscelazione di pectina e alginato porta in seguito a gelazione ionotropica alla formazione di una struttura ibrida in cui i gruppi carbossilici dei residui galatturonici formano dimeri con i gruppi carbossilici dei residui guluronici. I geli costituiti da pectina e alginato presentano generalmente pori di diametro di alcuni micron (Walkenstrom et al. 2003); queste dimensioni sono decisamente maggiori di quelle dei pori di geli di soli alginato o solo pectina (in entrambi i casi pochi nanometri). Questa caratteristica ha probabilmente una forte influenza sul rilascio degli attivi veicolati nei geli alginato-pectina. Il rivestimento di gel microsferici di alginato-pectina con un polimero gastroresistente ha permesso di ottenere un rilascio controllato di cisplatino a livello del colon, minimizzando il rilascio a livello gastrico (Hsu et al. 2012). Un aspetto investigato di questi sistemi è la possibilità di utilizzare processi di gelificazione

successivi per ottenere strutture gelificate dotate di caratteristiche differenti. Una miscela di pectina e sodio alginato aggraffato con poliacrilammide è stata sottoposta a gelazione ionotropica in calcio cloruro e successivamente a gelazione covalente mediante gluteraldeide. Il rilascio del diclofenac sodico veicolato è stato influenzato dall'entità del processo di gelificazione adottato (Giri et al. 2013). Uno sviluppo recente è l'utilizzo di tecniche di *prilling* coassiale per ottenere particelle dotate di una struttura *core-shell*. Un nucleo di pectina contenente piroxicam è stato rivestito con uno strato esterno di alginato e gelificato. Un parametro importante per la buona riuscita del processo è il rapporto di viscosità tra la soluzione pectinica interna e la soluzione alginica esterna. La formulazione ottimizzata ha permesso di ritardare di due ore il rilascio del farmaco (Del Gaudio et al. 2014).

Geli alginato-cellulosa

Un'ultima famiglia di polisaccaridi ampiamente studiata e utilizzata in sinergia con i geli di alginato sono le cellulose. La cellulosa è un omopolimero lineare formato da unità di D-glucopiranosio unite tra loro da un legame $\beta(1\rightarrow4)$ glicosidico. Le singole unità si dispongono spazialmente andando a formare una struttura altamente ordinata. Ciascuno dei tre gruppi ossidrilici presenti su ciascuna unità di glucosio permette di formare legami idrogeno intra- ed extra-molecolari (Oh et al. 2005). La cellulosa è il biopolimero più abbondante sul pianeta (Klemm et al. 2005) e si trova in natura principalmente all'interno delle pareti cellulari primarie delle piante e delle alghe; alcune specie di batteri sono capaci di biosintetizzare film di questo polimero.

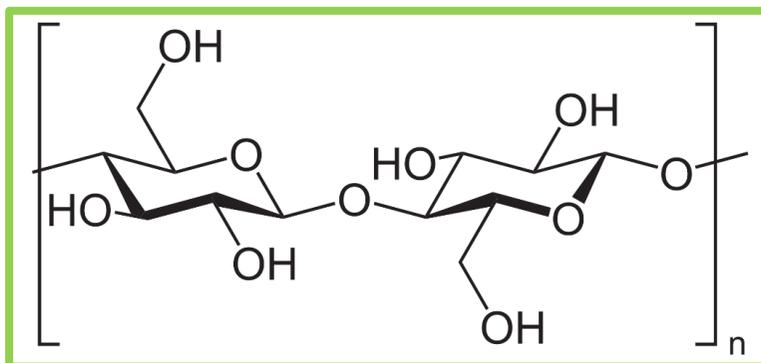


Fig. 6: Struttura chimica della cellulosa.

La cellulosa è ampiamente impiegata in svariati ambiti industriali e farmaceutici. I gruppi ossidrilici presenti sulla catena del polimero sono sfruttati per esterificare o eterificare la cellulosa. L'uso di derivati della cellulosa insieme all'alginato è interessante perché permette l'ottenimento di strutture interpenstrate o semi-interpenstrate. Un polimero interpenetrato (IPN) è definito come un polimero composto da due o più reticoli almeno in parte intrecciati su scala molecolare ma non legati covalentemente l'uno all'altro e che non possono essere separati senza rompere i legami chimici dei singoli reticoli. Una miscela di due o più reticoli polimerici non è un IPN. Se un solo componente è reticolato il network risultante viene chiamato polimero semi-interpenetrato (sIPN). Un sIPN è definito come un polimero composto da uno o più reticoli e uno o più polimeri lineari o ramificati, caratterizzato dalla penetrazione su scala molecolare di almeno un reticolo da parte di almeno una macromolecola lineare o ramificata. A livello teorico è possibile separare i componenti di un sIPN senza dover rompere i legami del reticolo polimerico. La preparazione di sistemi IPN può essere effettuata principalmente con due differenti procedure: nella prima i due polimeri non ancora gelificati sono miscelati tra di loro e in seguito reticolati, contemporaneamente o successivamente (Jenkins et al. 1996). È necessario che i meccanismi di gelificazione dei due polimeri siano differenti, altrimenti non si otterrà la formazione di una struttura IPN ma di un

copolimero (Chick et al. 2011). La seconda procedura prevede la reticolazione di uno dei polimeri, il caricamento del secondo polimero all'interno del reticolo e infine la reticolazione del secondo polimero. Questo tipo di processo rischia di essere incompleto in quanto non è sempre possibile assicurare la totale compenetrazione dell'intero materiale durante la fase di caricamento del secondo polimero (Lipatov et al. 2007). Gli IPN rappresentano materiali promettenti per la veicolazione di principi attivi in quanto le caratteristiche positive dei singoli polimeri portano alla formazione di sistemi dotati di proprietà migliorate e differenti da quelle dei polimeri originali. È stato osservato un effetto sinergico delle proprietà dei componenti degli IPN che può essere sfruttato per soddisfare necessità particolari (Robeson et al. 2007; Brigham et al. 2009; Weng et al. 2008). Gli studi di sistemi IPN e sIPN si sono concentrati sulla produzione di idrogel aventi migliori capacità di rispondere a stimoli, di bioadesione, di biocompatibilità, di controllo del rilascio e migliori caratteristiche meccaniche (Matricardi et al. 2013). I numerosi vantaggi potenziali offerti da questi sistemi hanno portato alla produzione di una folta e ricca letteratura scientifica.

Sistemi sIPN di alginato e derivati eteri della cellulosa, idrossietilcellulosa (HPC) e idrossipropilmetilcellulosa (HPMC), hanno permesso di controllare con successo il rilascio di sieralbumina bovina (BSA) e di eparina. Questi sIPN, essendo totalmente composti da polisaccaridi, si sono dimostrati non tossici e biodegradabili. L'ottenimento di sIPN di alginato e HPMC veicolanti BSA ha permesso di ottenere pellets che rigonfiano maggiormente e capaci di essere caricati con una quantità più elevata di farmaco rispetto a pellets di solo alginato. Questi sistemi permettono di ottenere un rilascio controllato del BSA in soluzione fisiologica salina (Nochos et al. 2008). L'utilizzo di cellulose assieme all'alginato permette di ottenere sistemi *smart*: microsfele di HPC e alginato hanno mostrato un comportamento termodipendente. L'eparina caricata in questi sistemi ha mostrato un profilo di rilascio in tre fasi dovuto alla presenza di pori nella matrice sIPN, aventi un diametro compreso tra 30

e 60 nm. Variando il rapporto dei due polimeri costituenti le microsfere e la temperatura è possibile modulare il rilascio di eparina (Karewicz et al. 2010). Uno studio ha confrontato l'impatto della produzione di sIPN a base di alginato con polimeri differenti: metilcellulosa (MC), sodiocarbossimetilcellulosa, polivinilpirrolidone e gomma xantana. I sIPN sono stati utilizzati per microincapsulare il verapamil cloridrato. Il rilascio del farmaco è risultato essere influenzato dal rapporto tra nucleo e rivestimento e dalla natura dei polimeri utilizzati. I geli algini contenenti MC sono stati in grado di rallentare il rilascio in maniera maggiore rispetto agli altri polimeri (Farhana et al. 2010). Risultati simili sono stati ottenuti in studi di ottimizzazione effettuati su sistemi composti da calcio alginato e MC veicolanti gliclazide. L'aumento di concentrazione dell'agente gelificante e l'aumento del rapporto MC:alginato hanno, entrambi, l'effetto di prolungare il rilascio del farmaco. Le microsfere ottimizzate sono state successivamente testate su ratti: i risultati ottenuti hanno mostrato un effetto ipoglicemizzante significativo e prolungato (circa 12 ore) (Pal et al. 2011). L'introduzione di componenti meno densi dell'acqua all'interno degli idrogeli sIPN permette di ottenere sistemi potenzialmente gastro-flottanti. Un gelato di alginato e HPMC veicolante claritromicina è stato addizionato di olio di paraffina. Il sistema risultante era caratterizzato da buone capacità di flottazione e mucoadesione che lo hanno reso potenzialmente utile per il trattamento delle infezioni da *Helicobacter Pylori* (Gattani et al. 2010). La somministrazione di proteine a scopo terapeutico è un campo di ricerca su cui si stanno concentrando notevoli sforzi. Le proteine soffrono però di una limitata stabilità e biodisponibilità. I sistemi sIPN si sono dimostrati adatti anche per veicolare proteine: sistemi sIPN formati da alginato e sodio acrilato carbossimetilcellulosa e ottenuti per gelazione ionotropica sono stati testati in ambiente acido e leggermente basico. L'alginato presente nella matrice è stato in grado di proteggere la BSA a pH acidi e la sinergia dei due polimeri costituenti ha permesso di ottenere un rilascio controllato a pH più elevati (El-sherbiny et al. 2011). La fosfatasi alcalina (ALP) è stata incapsulata con successo in

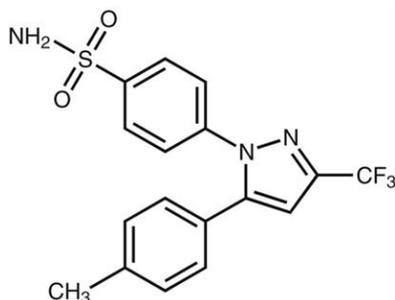
microsfere formate da un reticolo polimerico di alginato e HPC. Le proprietà delle microsfere sono modificabili variando la temperatura o aggiungendo un rivestimento polielettrolitico. Le microsfere rivestite di chitosano rilasciano l'ALP in modo lento e controllato senza effetti *burst* iniziali a pH 7,4. Le proteine rilasciate hanno mantenuto la loro attività come dimostrato dalla formazione di un network di idrossiapatite a partire dalla superficie delle microsfere (Karewicz et al. 2014).

MATERIALI

Il celecoxib (CLX) è stato gentilmente donato da Chemos GmbH; l'ibuprofene è stato acquistato da ACEF; la ranolazina è stata gentilmente donata da Procos; l'alginato di sodio (peso molecolare 120000-190000g/mg, rapporto residui mannuronici/guluronici 1,56) è stato acquistato da Sigma-Aldrich; il Labrasol (gliceridi PEG-8 di acido caprico e caprilico, HLB 14) è stato gentilmente donato da Gattafossé; il D- α -tocoferol polietilen glicole 1000 (TPGS) è stato gentilmente donato da Isochem; il Klucel MF Pharm (idrossipropilcellulosa, peso molecolare 850000 g/mol, viscosità di una soluzione in acqua al 2% di 4000-6500 mPas) è stata acquistata da Ashland; la pectina (ottenuta da buccia di agrumi, contenuto di acido galatturonico $\geq 74,0\%$, contenuto di gruppi metossilici $\geq 6,7\%$) è stato acquistato da Sigma-Aldrich; il chitosano (peso molecolare 50-100 KDa, grado di acetilazione $> 95\%$) è stato acquistato da Fluka. Il PVP K30 (polivinilpirrolidone, peso molecolare 44000-54000 KDa) è stato acquistato da ACEF. Tutti gli altri materiali utilizzati sono di grado analitico e utilizzati come ricevuti.

CELECOXIB

INTRODUZIONE



Il celecoxib (CLX) è un acido debole (pKa: 11.1) classificato come appartenente alla classe II BCS a causa della sua scarsa solubilità in acqua (inferiore a 5 µg/mL) e alla sua buona permeabilità (Amidon et al. 1995; Seedher et al. 2003, Graham et al. 2005). Il celecoxib appartiene alla categoria degli anti-infiammatori non steroidei (FANS) ed è utilizzato nella terapia dell'osteoartrite, dell'artrite reumatoide e del dolore acuto. Il suo meccanismo d'azione è legato all'inibizione della sintesi delle prostaglandine. Questa molecola, a differenza dei FANS tradizionali, i quali inibiscono sia la ciclo-ossigenasi 1 sia la ciclo-ossigenasi 2 (COX-1, COX-2), è un inibitore non competitivo della COX-2. Recentemente, è stata indagata l'attività antitumorale di questo farmaco in vari modelli *in vitro* e *in vivo* (Hsiao et al. 2007; Bijman et al. 2008; Ghorab et al. 2011; Lee et al. 2012). Studi preclinici effettuati sul celecoxib hanno indicato un'attività antitumorale contro il carcinoma a cellule squamose della testa e del collo, la neoplasia del colon, della mammella e del polmone (Hsiao et al. 2007; Bijman et al. 2008). Nonostante l'approvazione da parte della Food and Drug Administration (FDA) nella terapia ausiliaria dei pazienti con poliposi familiare e malattia precancerosa del colon, le forme di dosaggio orali contenenti celecoxib vedono un utilizzo limitato nella terapia antitumorale a causa della scarsa solubilità del principio attivo e dei suoi effetti collaterali (rischi cardiovascolari e tromboembolia) (Mazhar et al. 2006; Mohammed et al. 2006; Auman et al. 2008). In letteratura sono riportati numerosi tentativi volti al superamento di questi svantaggi e al miglioramento della biodisponibilità del

farmaco (Fasinu et al.2011); il celecoxib, è stato ad esempio veicolato in sistemi auto-emulsificanti, in liposomi, in microemulsioni e in microparticelle lipidiche (Gupta et al.2003; Seedher et al. 2003; Verreck et al. 2003; Rawat et al. 2004; Nagarsenker et al. 2005; Garti et al. 2006; Karavas et al. 2006; Guzman et al. 2007; Chakraborty et al.2009; Mohsin et al.2009; Lima et al. 2011).

SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo del progetto di ricerca di dottorato concernente il celecoxib è stato lo sviluppo di un sistema di dosaggio adatto all'utilizzo per l'indicazione terapeutica della poliposi familiare e della malattia precancerosa del colon. Si è, quindi, sviluppata una forma di dosaggio ad unità multipla a base di calcio alginato capace di direzionare il principio attivo a livello del colon e di mantenerlo in soluzione una volta rilasciato.

FORMULAZIONE E PRODUZIONE DEI PELLETS

Sviluppo formulativo

Data la scarsa solubilità del celecoxib, fattore limitante l'assorbimento di questa molecola, l'utilizzo del principio attivo in forma solida cristallina può presentare difficoltà difficilmente risolvibili; per favorire il passaggio in soluzione del CLX veicolato in una forma di dosaggio solida, si è pensato di sfruttare la sua compatibilità e solubilità in un eccipiente liquido, il Labrasol (una miscela di esteri gliceridi di acido caprico e caprilico), in grado di formare sistemi auto-emulsificanti (FAE). La FAE, arricchita con α -tocoferil polietilenglicole 1000 succinato (TPGS), un eccipiente dotato di attività co-emulsionante e promuovente dell'assorbimento, è stata miscelata (in opportuno rapporto) con una fase acquosa (FA) contenente il sodio alginato solubilizzato.

La solubilità del farmaco nell'eccipiente auto-emulsificante è stata determinata aggiungendo una quantità accuratamente pesata del principio attivo (dal 5% al 50% p/p) al Labrasol, agitando vigorosamente i campioni per un tempo appropriato e osservando i campioni allo stereomicroscopio (Motic SMZ-168) per verificare la completa solubilizzazione dei cristalli di celecoxib. Il sistema auto-emulsionante risultava composto da Labrasol (68,5% p/p), TPGS (4,1%) e celecoxib (27,4%). La FAE è stata preparata pesando accuratamente il Labrasol e il TPGS e riscaldandoli a 50°C in modo da ottenere la fusione del TPGS. Successivamente è stato aggiunto il celecoxib alla miscela di eccipienti. La FAE è stata mantenuta sotto agitazione fino alla completa solubilizzazione del principio attivo. La fase polimerica acquosa (FA) è stata preparata solubilizzando in acqua il sodio alginato per ottenere una soluzione al 1,5% o 1,0% p/V in polimero. La FA e la FAE sono state miscelate in rapporto 1:1 o 4:1 ad ottenere un'emulsione bianca e stabile. È stata, inoltre, preparato un sistema di riferimento costituito dalla sola fase acquosa e dal farmaco in forma cristallina.

Produzione dei pellets (CLX-A)

I pellets di calcio alginato contenenti CLX sono stati prodotti per gelazione ionotropica usando un bagno gelificante costituito da una soluzione acquosa di calcio cloruro 100 mM, o alternativamente da una soluzione acquosa di calcio cloruro (100 mM) addizionata di chitosano. Il chitosano è stato solubilizzato in acido acetico diluito (1%) ottenendo una concentrazione del 2% p/V; il bagno gelificante è stato preparato diluendo la soluzione di chitosano al 2% p/V con la soluzione acquosa di CaCl_2 fino ad ottenere la concentrazione desiderata. L'emulsione formata dalla soluzione acquosa di sodio alginato e dalla fase auto-emulsificante contenente il farmaco sono state erogate, goccia a goccia, nel bagno gelificante tramite un ago G23 (600 μm di diametro) collegato ad una pompa peristaltica impostata su una velocità di flusso di 5,0 mL/min. I pellets sono stati mantenuti per 15 minuti sotto lenta agitazione nel bagno gelificante in modo da permettere la formazione del reticolo di alginato. Trascorsi 15 minuti, i pellets sono stati recuperati, lavati con acqua per rimuovere l'eccesso di ioni calcio presenti sulla superficie delle sfere ed essiccati in stufa a 40 °C per una notte. In tabella 1 sono riportati la composizione e le condizioni di preparazione delle differenti formulazioni. Al fine di valutare l'impatto di differenti condizioni di produzione sulle caratteristiche meccaniche e di rilascio dei pellets, sono state prese in considerazione come variabili la concentrazione di sodio alginato nella FA (1,5% o 1,0% p/V), il diverso rapporto tra FA e FAE (1:1 o 4:1) e la presenza o meno di chitosano all'interno del bagno gelificante di CaCl_2 100 mM.

Studio di ulteriori variabili (CLX-B)

In seguito alla caratterizzazione completa delle formulazioni CLX-A, è stato possibile individuare la concentrazione del sodio alginato e il rapporto FA/FAE adatti ad ottenere un sistema dotato di buone caratteristiche meccaniche e di rilascio. Il progetto di ricerca è proseguito andando a verificare l'impatto di alcune variabili

di produzione e formulazione sulle caratteristiche dei pellets. In questa seconda fase del progetto, quindi, le variabili considerate sono state il tempo di gelificazione (5, 15, 45 minuti), la concentrazione di CaCl₂ nel bagno gelificante (100 mM, 200 mM, 300 mM) e la percentuale di CLX nella FAE (27,4%, 15%). Nella tabella 2 sono riportati la composizione e le condizioni di preparazione delle formulazioni. I pellets sono stati prodotti mediante gelazione ionotropica secondo il protocollo precedentemente descritto, modificato per quanto attiene il tempo di gelificazione e la concentrazione di CaCl₂ nel bagno gelificante.

Tab 1: Composizione e condizioni di preparazione delle formulazioni CLX-A.

Formulazione	FA Sodio Alginato (%)	Stato fisico CLX	Rapporto FA-FAE	Concentrazione chitosano del bagno gelificante (% p/V)
CLX-A-1	1,5	Cristallino	-	-
CLX-A-2	1,5	Solubilizzato in FAE	1 -1	-
CLX-A-3	1,0	Solubilizzato in FAE	1 -1	-
CLX-A-4	1,5	Solubilizzato in FAE	4 -1	-
CLX-A-5	1,5	Solubilizzato in FAE	1 -1	0,2
CLX-A-6	1,5	Solubilizzato in FAE	1 -1	0,5

Tab 2: Composizione e condizioni di preparazione delle formulazioni CLX-B.

Formulazione	Composizione FAE	Tempo di gelificazione (min)	Concentrazione CaCl₂ (mM)
CLX-B-1	CLX - 27,4% Labrasol - 68,5% TPGS - 4,1%	5	100
CLX-B-2	CLX - 27,4% Labrasol - 68,5% TPGS - 4,1%	15	100
CLX-B-3	CLX - 27,4% Labrasol - 68,5% TPGS - 4,1%	45	100
CLX-B-4	CLX - 27,4% Labrasol - 68,5% TPGS - 4,1%	15	200
CLX-B-5	CLX - 27,4% Labrasol - 68,5% TPGS - 4,1%	15	300
CLX-B-6	CLX - 15,0% Labrasol - 80,9% TPGS - 4,1%	5	100
CLX-B-7	CLX - 15,0% Labrasol - 80,9% TPGS - 4,1%	15	100
CLX-B-8	CLX - 15,0% Labrasol - 80,9% TPGS - 4,1%	45	100

CARATTERIZZAZIONE DEI PELLETS

Analisi morfologica

Informazioni relative a forma, aspetto della superficie e dimensione dei pellets sono state raccolte per tutte le formulazioni allestite mediante microscopia ottica. Foto dei pellets appena preparati e dopo essiccamento sono state acquisite usando una telecamera (Moticam 2500 USB) montata su uno stereomicroscopio (Motic SMZ168) e collegata ad un personal computer. Diametri, perimetri e aree di superficie dei pellets sono stati determinati usando il software Motic Image Plus 2.0. Per valutare la sfericità dei pellets di alginato, il valore di *shape factor* è stato calcolato impiegando la seguente equazione:

$$Sf = \frac{4\pi A}{P^2}$$

dove A è l'area superficiale e P è il perimetro del pellet. Sf può assumere valori compresi tra 0 e 1 e il valore di Sf = 1 è associato ad una sfera perfetta (Almeida-Prieto et al. 2004). Informazioni più dettagliate sulla struttura superficiale e sulla struttura interna dei pellets sono state ottenute mediante microscopia elettronica a scansione (E-SEM FEI Quanta 200) analizzando i pellets come tali, senza trattamento metallizzante.

Contenuto di principio attivo nei pellets

Una quantità accuratamente pesata di ciascuna formulazione è stata unita a 100 mL di tampone fosfato a pH 6,8 addizionato di sodio laurilsolfato 0,75% (SLS). Il sistema è stato mantenuto sotto agitazione a 70 °C per 2 ore in modo da assicurare la completa estrazione e solubilizzazione del CLX. Dopo raffreddamento, la porzione liquida è stata filtrata con filtri in fibra di vetro (diametro dei pori 0,7µm)

e analizzata con uno spettrofotometro UV/Vis (Perkin Elmer Lambda 35) alla lunghezza d'onda di 255 nm. I risultati presentati sono la media di tre determinazioni.

Contenuto di Labrasol nei pellets

Una quantità accuratamente pesata di ciascuna formulazione è stata unita a 5 mL di tampone fosfato a pH 6,8. Il sistema è stato mantenuto sotto agitazione per 6 ore in modo da assicurare la completa estrazione del Labrasol ed è stato successivamente addizionato di un eccesso di metilato sodico: la miscela è stata mantenuta a 30 °C per un'ora in modo da permettere la formazione degli esteri metilici degli acidi caprico e caprilico. Alla miscela di reazione è stato aggiunto dietil-etero (rapporto acqua/etero 40/60) per ottenere la ripartizione degli esteri metilici nella fase organica. La fase organica è stata, in seguito, tirata a secco e gli esteri ripresi in diclorometano. I campioni di diclorometano sono stati analizzati utilizzando un gas cromatografo (GC 17A Shimadzu) con detector FID e una colonna DB23 (lunghezza 30m, \varnothing 250 μ m, film 150 μ m) J&W Scientific (Folsom, CA, USA). L'iniettore split/splitless (rapporto split 20:1) è stato mantenuto ad una temperatura di 250 °C e l'analisi è stata effettuata con un detector FID mantenuto a 350 °C. Come gas carrier è stato utilizzato idrogeno a flusso costante (1,5 mL/min). Il programma d'analisi ha previsto un primo step di 1 minuto a 80 °C seguito da un graduale aumento di temperatura (10 °C/min) fino al raggiungimento di 220 °C, temperatura che è stata mantenuta per 5 minuti. In queste condizioni analitiche, il tempo di ritenzione dell'estere metilico dell'acido caprico è risultato essere di 4,7 minuti.

Calorimetria differenziale a scansione

I termogrammi DSC del celecoxib, di miscele fisiche di pellets placebo e CLX e di pellets contenenti il farmaco sono stati ottenuti utilizzando un calorimetro differenziale a scansione (Pyris 1, Perkin Elmer). Una quantità esattamente pesata e pari a 5 mg di ciascuna formulazione è stata sigillata in un paniero di alluminio e

analizzata sotto flusso di azoto. L'analisi è stata condotta nell'intervallo di temperatura 25-250 °C con una velocità di scansione di 10 °C/min.

Studi di rigonfiamento in fluidi acquosi: valutazione della percentuale di fluido assorbito

Quantità accuratamente pesate di pellets sono state trasferite in vial in cui sono stati aggiunti 5 mL di liquido di rigonfiamento (HCl 0,1N, tampone fosfato a pH 6,8 o tampone fosfato a pH 7,4) precedentemente riscaldato a 37 °C. Dopo intervalli di tempo predefiniti (5, 15, 30, 60 e 120 minuti), i pellets sono stati recuperati, asciugati con carta (Remunan-Lopez et al. 1997) e nuovamente pesati. La capacità di rigonfiamento dei sistemi è stata espressa come percentuale di fluido assorbito utilizzando la seguente equazione sotto riportata che valuta il cambio di peso dei pellets in funzione del tempo:

$$\text{Water uptake (\%)} = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100$$

dove W_t è il peso dei pellets dopo il tempo di contatto t con il fluido e W_0 è il peso iniziale dei pellets. I risultati presentati sono la media di tre determinazioni.

Studi di rigonfiamento in fluidi acquosi: valutazione della variazione di diametro

Il rigonfiamento dei pellets posti a contatto con fluidi acquosi è stato anche valutato in termini di variazione dimensionale: a questo scopo è stato usato uno stereomicroscopio (Motic SMZ-168) collegato ad un computer dotato di software per analisi di immagine (Motic Image Plus 2.0). Un singolo pellet è stato posto in una capsula Petri e ricoperto completamente con una piccola quantità di fluido di rigonfiamento (HCl 0,1N, tampone fosfato a pH 6,8 o tampone fosfato a pH 7,4). Ad intervalli di tempo predeterminati (ogni minuto per i primi 10 minuti, e

successivamente dopo 15, 30 e 60 minuti), è stata acquisita un'immagine del pellet di cui è stato misurato il diametro. L'entità di rigonfiamento è stata calcolata usando la seguente equazione:

$$\text{Swelling ratio} = \frac{D_t - D_0}{D_t} \times 100$$

dove D_t è il diametro del pellet al tempo t e D_0 è il diametro iniziale. I risultati sono la media di tre determinazioni.

Inoltre, mettendo in relazione lo *Swelling ratio* con la radice quadrata del tempo, è stato possibile calcolare la velocità di rigonfiamento rappresentata dalla pendenza della retta ottenuta (Lee et al. 1987; Puttipatkhachorn et al. 2005).

Studi di rilascio *in vitro*

Gli studi *in vitro* di rilascio del celecoxib dalle formulazioni sono stati effettuati usando un dissolutore Sotax AT7 Smart equipaggiato con un sistema di agitazione a paletta (apparatus 2, European Pharmacopoeia) impostato ad una velocità rotazionale di 100 RPM. I test di rilascio sono stati condotti su una quantità di formulazione contenente 10 mg di CLX. Come fluidi di rilascio (500 mL) sono stati utilizzati HCl a pH 1,0, tampone fosfato a pH 6,8 e tampone fosfato a pH 7,4 addizionati di sodio lauril solfato 0,75%; la temperatura è stata impostata a 37 °C. Campioni di soluzione sono stati prelevati a intervalli di tempo predeterminati e analizzati usando uno spettrofotometro UV/vis impostato alla lunghezza d'onda di 255 nm, nel caso di campioni in HCl 0,1N o in tampone fosfato a pH 6,8, o di 256 nm nel caso di campioni in tampone fosfato a pH 7,4. I risultati sono la media di tre determinazioni.

I profili di rilascio di CLX dalle diverse formulazioni sono stati confrontati mediante il fattore di similarità f_2 (FDA guidelines 1997; Costa et al. 2001):

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right.$$

dove R_t e T_t sono le percentuali di principio attivo dissolto ad ogni tempo di prelievo t , rispettivamente per il sistema di riferimento e per quello oggetto di studio; n è il numero totale di prelievi (Moore et al. 1996). Il fattore di similarità f_2 può assumere valori compresi tra 0 e 100: in generale, due curve sono definite simili quando f_2 è compreso tra 50 e 100, mentre sono considerate diverse se assume valori tra 0 e 50. Infine, la cinetica di liberazione del celecoxib è stata valutata applicando l'equazione di Peppas (Ritger et al. 1987) ai dati sperimentali di concentrazione di CLX in funzione del tempo:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n$$

dove M_t/M_∞ è la frazione di farmaco rilasciato al tempo t , t è il tempo di rilascio; K è una costante che incorpora le caratteristiche della formulazione, mentre n è l'esponente il cui valore identifica il meccanismo con cui avviene il rilascio del farmaco. Quando il processo di rilascio del farmaco è governato dalla diffusione, n assume il valore di 0,50, valori di n compresi tra 0,50 e 1,00 indicano un meccanismo di rilascio anomalo (non-Fickian), mentre valori di $n = 1,00$ indicano cinetiche di trasporto di caso II.

RISULTATI E DISCUSSIONE PELLETS CLX-A

Sei differenti tipologie di pellets di calcio alginato veicolanti celecoxib sono state preparate mediante gelazione ionotropica, tecnica di preparazione veloce e che non richiede l'uso di solventi organici. I pellets sono stati preparati a partire da un'emulsione A/O costituita da una soluzione acquosa di sodio alginato e da una fase auto-emulsificante in cui è stato solubilizzato il farmaco; come riferimento è stata usata una formulazione costituita dalla sospensione di farmaco nella soluzione di sodio alginato. Nella fase auto-emulsificante, il rapporto tra Labrasol e celecoxib era 2,5:1, rapporto che ha permesso di ottenere pellets contenenti un elevato carico di farmaco. Le emulsioni e la sospensione di riferimento possedevano una buona siringabilità, che ne ha permesso la facile erogazione attraverso un ago G23.

Durante il processo di gelificazione avviene uno scambio ionico a livello dei gruppi carbossilici dei residui guluronici dell'alginato con sostituzioni degli ioni Na^+ con gli ioni Ca^{2+} presenti nel bagno. La presenza degli ioni divalenti porta alla formazione di legami di reticolazione tra i gruppi carbossilici dei residui guluronici di catene di polimero differenti con conseguente gelificazione del sistema e formazione di una struttura avente disposizione caratteristica definita "egg-box" avente gli ioni calcio nei punti di legame.

I pellets ottenuti sono stati osservati sotto ingrandimento mediante stereomicroscopio (Figura 7).

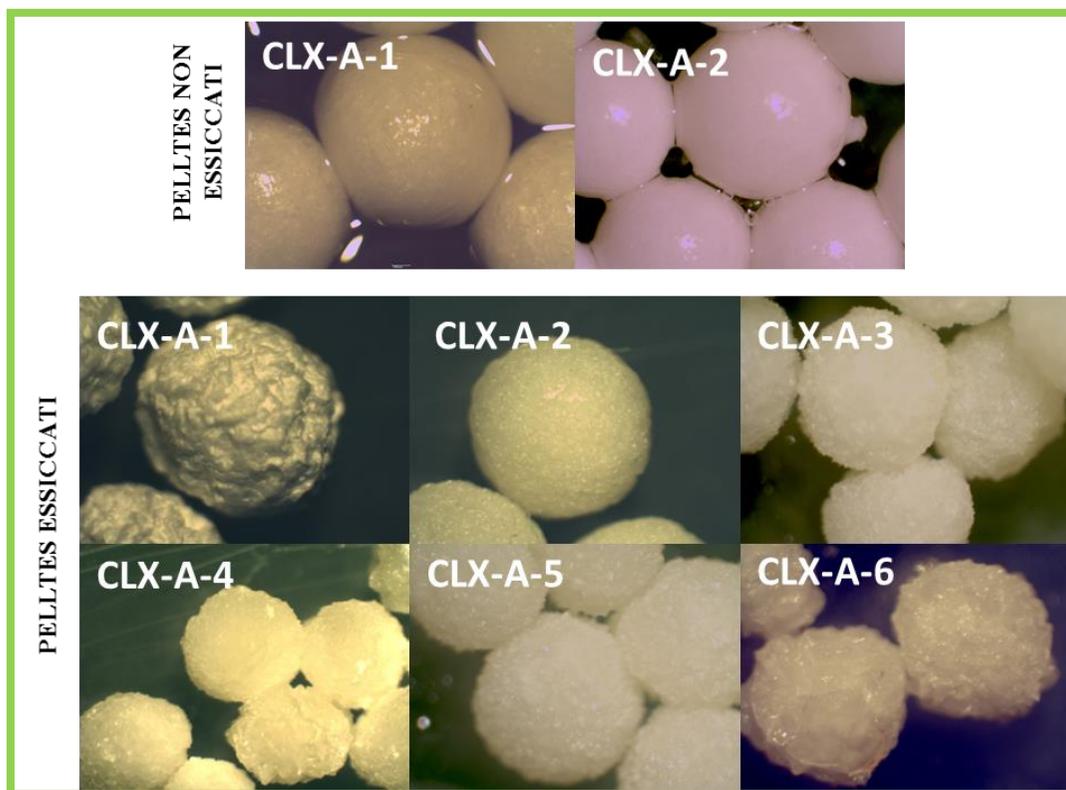


Fig. 7: Stereomicrofotografie di pellets non essiccati (CLX-A-1, CLX-A-2) ed essiccati. Ingrandimento 3x.

I pellets non essiccati presentano forma sferica, colore bianco e una superficie liscia e omogenea. In seguito ad essiccamento, mantengono inalterata la loro forma regolare, ma il diametro diminuisce e la superficie diventa rugosa: questi fenomeni sono dovuti alla contrazione della struttura del reticolo polimerico conseguente all'essiccamento del pellet. In seguito all'evaporazione dell'acqua, i segmenti dei residui guluronici dell'alginato o i blocchi misti di residui guluronici e mannuronici si avvicinano promuovendo un maggior impacchettamento delle catene polimeriche e determinando la riduzione della dimensione del pellet.

La presenza di chitosano nel bagno gelificante porta alla formazione, sulla superficie dei pellets, di un complesso polielettrolitico alginato-chitosano, che, a seguito

dell'essiccamento, determina l'aspetto rugoso e la forma irregolare dei pellets CLX-A-5 e CLX-A-6. Ciò risulta particolarmente evidente nel caso della formulazione CLX-A-6, preparata usando un bagno gelificante contenente una percentuale di chitosano pari allo 0,5.

Il sistema di riferimento CLX-A-1, che veicola celecoxib in forma cristallina, dopo essiccamento, presenta una superficie molto irregolare e i pellets CLX-A-4 (FA:FAE 4:1) forma leggermente meno sferica e superficie più irregolare rispetto ai pellets in cui il rapporto FA:FAE è 1:1, cioè costituite da una minore quantità di alginato.

Il diametro dei pellets essiccati varia tra 900 μm e 1700 μm circa (Tab. 3). L'eliminazione dell'acqua induce un maggior impaccamento delle catene polimeriche, associabile ad un avvicinamento delle giunzioni "egg-box" e al conseguente aumento della densità del reticolo. La dimensione dei pellets è influenzata dallo stato fisico del principio attivo e dal rapporto tra FA e FAE.

Tab. 3: Diametri e titoli delle formulazioni contenenti celecoxib.

FORMULAZIONE	DIAMETRI (μm)	TITOLO (%)
CLX-A-1	1677 \pm 149	85,76 \pm 1,61
CLX-A-2	1269 \pm 42	41,96 \pm 1,80
CLX-A-3	1139 \pm 69	44,78 \pm 2,48
CLX-A-4	896 \pm 64	42,10 \pm 1,30
CLX-A-5	1149 \pm 54	42,29 \pm 3,06
CLX-A-6	1210 \pm 89	41,77 \pm 2,17

Il diametro dei pellets contenenti il farmaco in forma cristallina risulta essere maggiore di quello dei sistemi contenenti la fase auto-emulsificante: l'avvicinamento

delle catene di alginato è ostacolato dai cristalli di celecoxib incorporati nella matrice polimerica, con conseguente minor capacità di impaccamento da parte del reticolo polimerico.

I pellets ottenuti miscelando FA e FAE in rapporto 4:1 hanno dimensioni minori rispetto a quelle dei sistemi ottenuti usando le due fasi in rapporto 1:1. Con un rapporto 4:1 tra fase acquosa e fase auto-emulsificante, si ottiene un'emulsione di bassa viscosità che porta alla formazione di gocce di piccola dimensione durante la fase di gocciolamento e, di conseguenza, all'ottenimento di pellets con dimensioni finali minori rispetto a quelle dei sistemi CLX-A-2, CLX-A-3, CLX-A-5 e CLX-A-6 (rapporto FA:FAE = 1:1).

Il contenuto in celecoxib dei pellets è elevato (leggermente superiore al 40%); fa eccezione la formulazione di riferimento CLX-A-1, la quale essendo composta esclusivamente da alginato e principio attivo, ha un contenuto percentuale di attivo decisamente più elevato (circa 86%) delle altre.

I pellets di alginato essiccati, quando messi a contatto con fluidi acquosi, assorbono questi fluidi e rigonfiano. L'imbibizione e il conseguente rigonfiamento dei pellets sono determinati dalle caratteristiche del polimero strutturante (sono infatti disponibili alginati contenenti proporzioni diverse di residui mannuronici e guluronici), dalle caratteristiche degli eventuali altri polimeri costituenti la matrice e dalle caratteristiche dei fluidi con cui i pellets vengono messi a contatto. I risultati dei test di rigonfiamento espressi come variazione di peso dei pellets in funzione del tempo ed condotti con HCl a pH 1,0, tampone fosfato a pH 6,8 e a pH 7,4 sono illustrati in figura 8.

Nel sistema Clx-A-1 non avviene un rigonfiamento. I pellets assorbono fluido e disgregano velocemente.

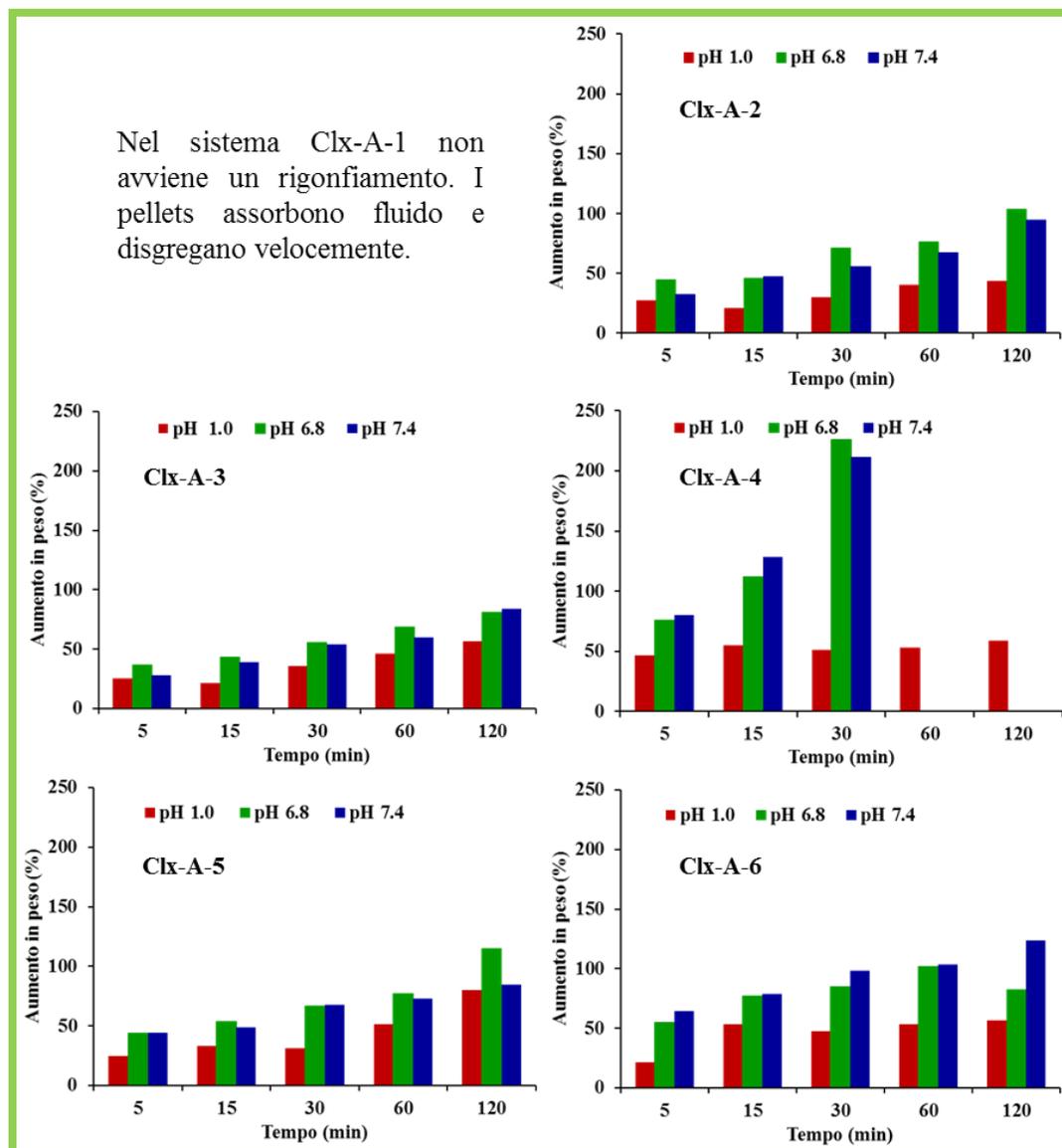


Fig. 8: Assorbimento di fluidi acquosi dei pellets contenenti celecoxib.

Il rigonfiamento dei pellets di alginato è pH dipendente. A contatto con HCl 0,1 N, tutti i sistemi sono in grado di assorbire quantità limitate di fluido, l'incremento massimo di peso dopo due ore di contatto col fluido acido è compreso tra il 40% e il 65% circa). In ambiente acido, i protoni in soluzione vengono scambiati con gli ioni

Ca^{2+} legati ai residui carbossilici dell'alginato più esterni: questo scambio porta alla formazione di uno strato superficiale di acido alginico, che limita la penetrazione del fluido all'interno della matrice polimerica e di conseguenza, il suo rigonfiamento. I pellets contenenti alginato e chitosano, assorbono quantità leggermente superiori di liquido e ciò è da ascrivere alla discreta solubilità del chitosano in ambiente acido. Nei tamponi fosfato a pH 6,8 e 7,4, i pellets si dimostrano capaci di assorbire quantità più consistenti di fluido: per i sistemi preparati utilizzando un rapporto FA:FAE di 1:1 si osserva il graduale aumento di peso nell'arco di 120 minuti, con il raggiungimento di percentuali di rigonfiamento pari o prossime al 100%. Il sistema CLX-A-4 (FA:FAE 4:1), invece, rigonfia più velocemente e cospicuamente, tanto che il valore massimo di variazione di peso viene raggiunto dopo 30 minuti e supera il 200%. È interessante osservare che, per questi pellets, il peso cresce fino al raggiungimento del valore massimo, dopo di che decresce repentinamente a causa del collasso del reticolo polimerico e della conseguente disgregazione della matrice polimerica. Il differente comportamento dei sistemi contenenti FAE è da imputare, probabilmente, alle diverse proporzioni dei componenti. I sistemi preparati a partire dall'emulsione costituita da FA e FAE in rapporto 1:1 presentano una più elevata quantità di materiale idrofobo (il Labrasol in cui è solubilizzato il CLX) all'interno delle maglie del reticolo polimerico rispetto ai pellets preparati a partire da un'emulsione ottenuta miscelando le due fasi in rapporto 4:1. Questa maggiore idrofobia dei pellets riduce l'affinità della struttura per i fluidi acquosi e ne rallenta la penetrazione all'interno della matrice. La disgregazione osservata nel caso dei pellets CLX-A-4 è dovuta al fatto che il contatto con i tamponi fosfato è responsabile dell'instaurarsi di un processo di scambio ionico tra gli ioni Na^+ in soluzione e gli ioni Ca^{2+} che legano le catene di alginato. Questo scambio avviene prima a livello dei residui mannuronici dell'alginato provocando un rilassamento del reticolo polimerico, penetrazione abbondante di fluido nella matrice e rigonfiamento, e in seconda battuta, a livello dei residui glicuronici provocando la rottura della struttura *egg-box* con conseguente perdita di integrità del sistema. In questi risultati non sono

inclusi quelli relativi ai pellets CLX-A-1 in quanto, in questo caso, i sistemi non hanno evidenziato alcuna capacità di rigonfiamento ma, una volta a contatto con i fluidi, sono andati incontro semplicemente ad un veloce processo di disgregazione. L'elevata quantità di cristalli di farmaco in questi pellets (titolo in CLX di circa 85%) indebolisce la struttura del reticolo polimerico; in seguito al contatto con i fluidi di rigonfiamento, in particolare i tamponi fosfato a pH 6,8 e 7,4, si ha, inizialmente, erosione dei cristalli superficiali e conseguente veloce apertura di numerosi pori sulla superficie dei pellets, seguita dal rilassamento e collassamento della matrice polimerica e contemporanea erosione dei cristalli interni.

I profili di rilascio dei pellets contenenti celecoxib sono riportati in figura 9. I test di rilascio sono stati effettuati in fluidi caratterizzati da diversi valori di pH, ovvero HCl pH 1,0 e tampone fosfato a pH 6,8 e a pH 7,4. Come il rigonfiamento, anche il processo di rilascio dell'attivo si è dimostrato essere pH dipendente: tutte le formulazioni hanno evidenziato un rilascio di farmaco piuttosto limitato in ambiente acido (inferiore al 20%) e decisamente più elevato a pH prossimi alla neutralità. A pH 1,0, il rilascio del celecoxib avviene per diffusione attraverso il network polimerico ed è limitato e lento. La conversione del sale di calcio dell'alginato in acido alginico forma sulla superficie dei pellets una sorta di barriera che ne ostacola il rigonfiamento, e ne impedisce l'erosione e la disintegrazione (Colinet et al. 2009). Gli unici pellets che cedono una quantità di principio attivo superiore al 10% sono CLX-A-4 e CLX-A-6, comportamento probabilmente attribuibile a due diverse caratteristiche di questi sistemi. Come già sottolineato in precedenza, i pellets CLX-A-4 (FA:FAE 4:1) sono meno idrofobi e permettono una penetrazione leggermente superiore di fluido al loro interno; i pellets CLX-A-6 presentando sulla loro superficie una certa quantità di chitosano, solubile in ambiente acido, subiscono, in questo fluido, una parziale erosione superficiale.

A pH neutri il rilascio del farmaco avviene in modo controllato per diffusione ed erosione della matrice. A pH 6,8 il sistema CLX-A-1 di riferimento rilascia

velocemente il farmaco (50% dopo 15 minuti e 80% dopo 30 minuti) a causa sia dell'aumentata solubilità del farmaco a questi valori di pH sia dell'erosione del network di alginato.

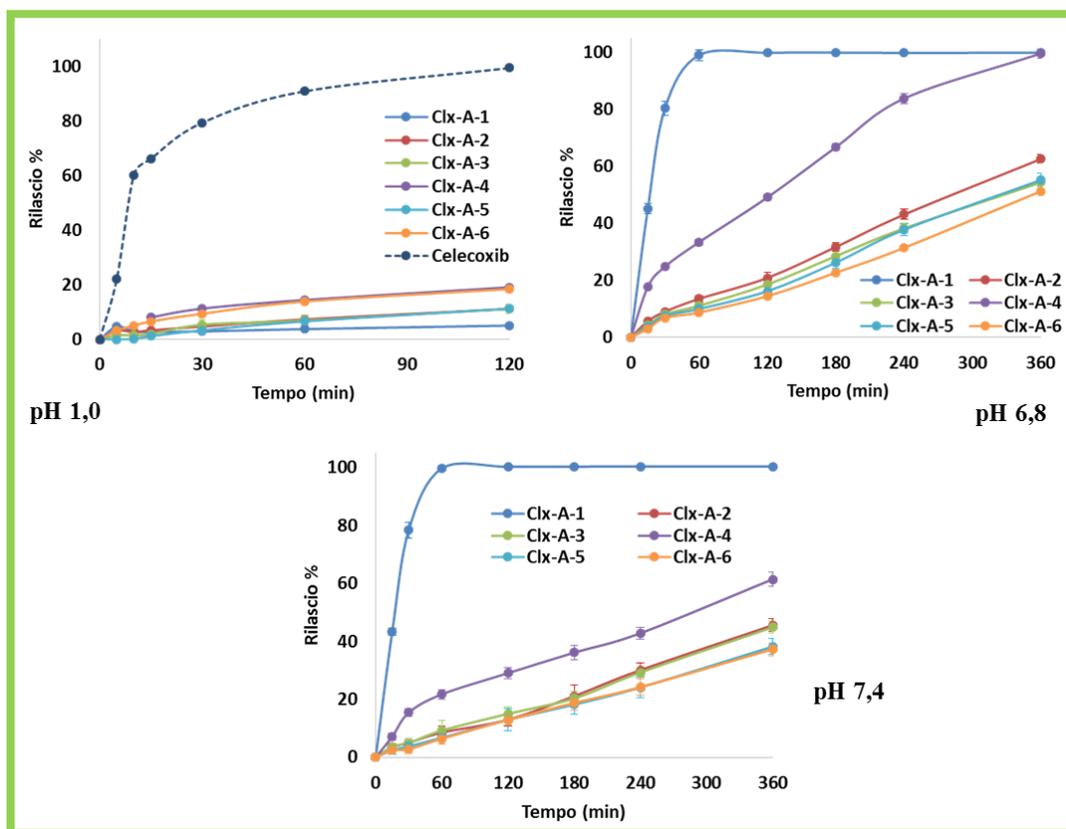


Fig. 9: Profili di rilascio a differenti pH di pellets contenenti celecoxib.

Il sistema CLX-A-4 raggiunge in modo controllato il 100% di rilascio in 6 ore, performance migliore rispetto alle rimanenti formulazioni che rilasciano in questo intervallo di tempo tra il 40% e il 50%. La struttura meno idrofobica di questi pellets è responsabile della penetrazione di una maggiore quantità di fluido all'interno dei pellets con conseguente più veloce diffusione del celecoxib ed erosione dalla matrice

polimerica. I restanti sistemi non mostrano accentuate differenze nei loro profili di rilascio: l'idrofobia conferita al sistema dal celecoxib rappresenta probabilmente il fattore limitante il rilascio. Le differenze di concentrazione dell'alginato nella FA e la presenza o meno di chitosano hanno un'influenza limitata sul processo di liberazione del farmaco. I profili di rilascio a pH 7,4 sono generalmente più controllati e lenti rispetto ai profili a pH 6,8; anche in questo caso la formulazione CLX-A-4 mostra un rilascio più veloce (circa 60% dopo 6 ore) rispetto alle altre formulazioni (20%-35% dopo 6 ore). Per ottenere una valutazione matematica delle similitudini e differenze, i profili di rilascio dei pellets sono stati confrontati tra di loro applicando il fattore di similarità f_2 . In HCl tutti i profili di rilascio dei pellets risultano simili ($f_2 > 50$); nei tamponi fosfato a pH 6,8 e 7,4 i profili di rilascio dei pellets aventi un rapporto FA:FAE 1:1 risultano simili ($f_2 > 50$), mentre nel caso del sistema CLX-A-1 (CLX cristallino) e CLX-A-4 (FA:FAE 4:1) i profili sono differenti ($f_2 < 50$).

Alla luce dei risultati ottenuti dalla caratterizzazione di questi primi lotti di pellets si è scelto di proseguire lo sviluppo di formulazioni preparate utilizzando un'emulsione in rapporto 4:1 in quanto il sistema CLX-A-4 le cui caratteristiche sono un buon compromesso di resistenza meccanica, capacità di rigonfiamento e performance di rilascio. Si è quindi deciso di indagare la possibilità di influenzare le caratteristiche di rilascio dei pellets andando ad introdurre delle variabili nel loro processo di produzione.

RISULTATI E DISCUSSIONE PELLETS CLX-B

Otto formulazioni prodotte a partire da un'emulsione O/A composta da una fase acquosa (contenente alginato alla concentrazione di 1,5%) e da una fase auto-emulsificante (contenente Labrasol e TPGS, in cui è stato solubilizzato il celecoxib) in rapporto 4:1 sono state preparate mediante gelazione ionotropica. I sistemi si distinguono per il tempo di permanenza nel bagno gelificante, per la concentrazione di CaCl_2 nel bagno gelificante e per il titolo di farmaco all'interno della FAE. Le emulsioni sono state facilmente erogate tramite un ago G23. I pellets prima della fase di essiccamento si presentano bianchi, lisci e di forma sferica (figura x).



Fig. 10: Stereomicrofotografie di pellets contenenti CLX non essiccati. Ingrandimento 3x.

I pellets presentano, dopo essiccamento, un colore bianco opaco con l'eccezione dei sistemi CLX-B-6 e CLX-B-7 (minor carico di farmaco e tempo di gelificazione di 5 e 15 minuti); quest'ultime formulazioni sono semitrasparenti e di colore leggermente giallo (figura 11). La colorazione differente di queste formulazioni, tipica del Labrasol, è probabilmente dovuta alla presenza, al loro interno, di un quantitativo maggiore dell'eccipiente.

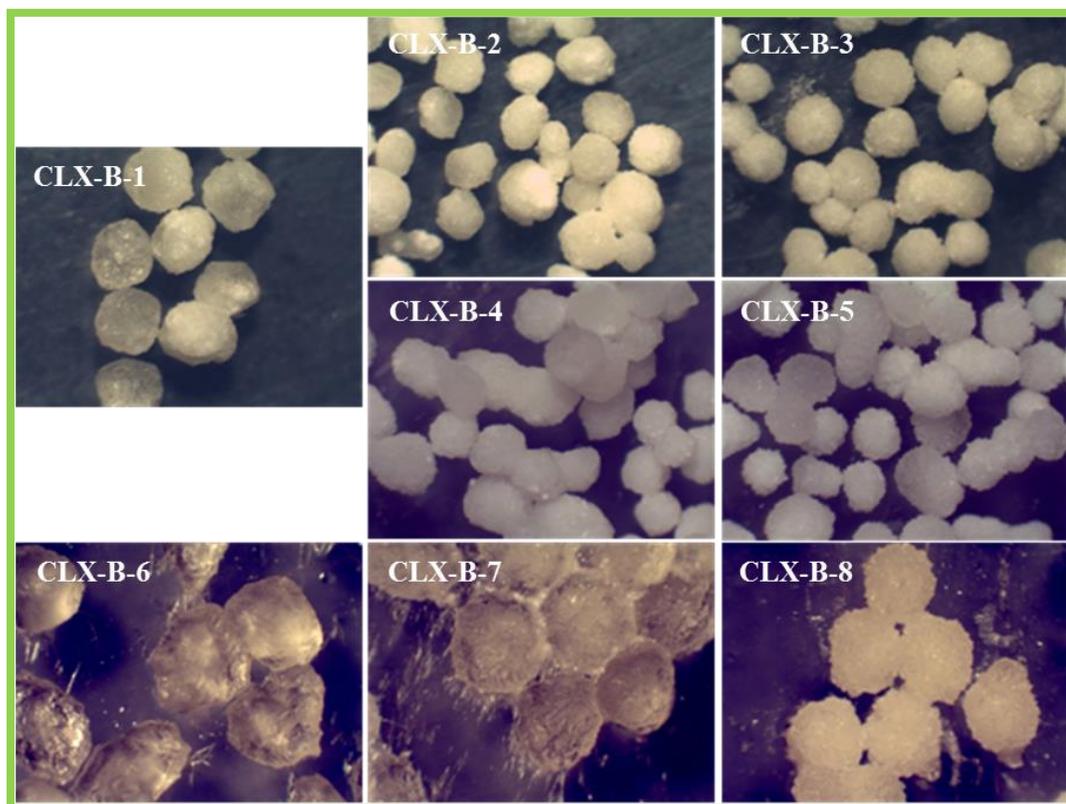


Fig. 11: Stereomicrofotografie di pellets contenenti CLX essiccati. Ingrandimento 3x.

Dopo essiccamento le sfere mostrano una superficie rugosa e irregolare; dalle foto allo stereomicroscopio è possibile osservare come la struttura interna dei pellets sembri costituita da un insieme di micronuclei e non da una matrice compatta ed omogenea. I pellets CLX-B-6 e CLX-B-7 hanno un aspetto differente: la loro superficie si presenta più liscia, meno irregolare e priva di fessure. I pellets essiccati mantengono una forma sferica, anche se dai contorni più irregolari. I valori di *shape factor* calcolati sono relativamente bassi nonostante l'aspetto sferico dei pellets. Per effettuare il calcolo del perimetro e dell'area dei pellets da usare in equazione si è tenuto conto di tutte le irregolarità presenti sul loro contorno con conseguente diminuzione del valore finale calcolato. Le immagini ottenute tramite microscopia

elettronica a scansione hanno confermato la sfericità dei pellets che aumenta all'aumentare del tempo di permanenza nel bagno di CaCl_2 (figura 12). La superficie dei pellets non è liscia ma presenta asperità ed è ripiegata su se stessa a causa dell'impacchettamento delle catene che costituiscono il reticolo polimerico, durante alla fase di essiccamento. L'interno dei pellets si presenta anch'esso irregolare, non omogeneo e compatto ma di aspetto simile a quello di una spugna. Le rugosità delle superfici sia interne che esterne si fanno più marcate più a lungo la formulazione viene lasciata a contatto col bagno gelificante. Non sono stati individuati cristalli di farmaco a prova che il celecoxib si trova omogeneamente distribuito all'interno della matrice.

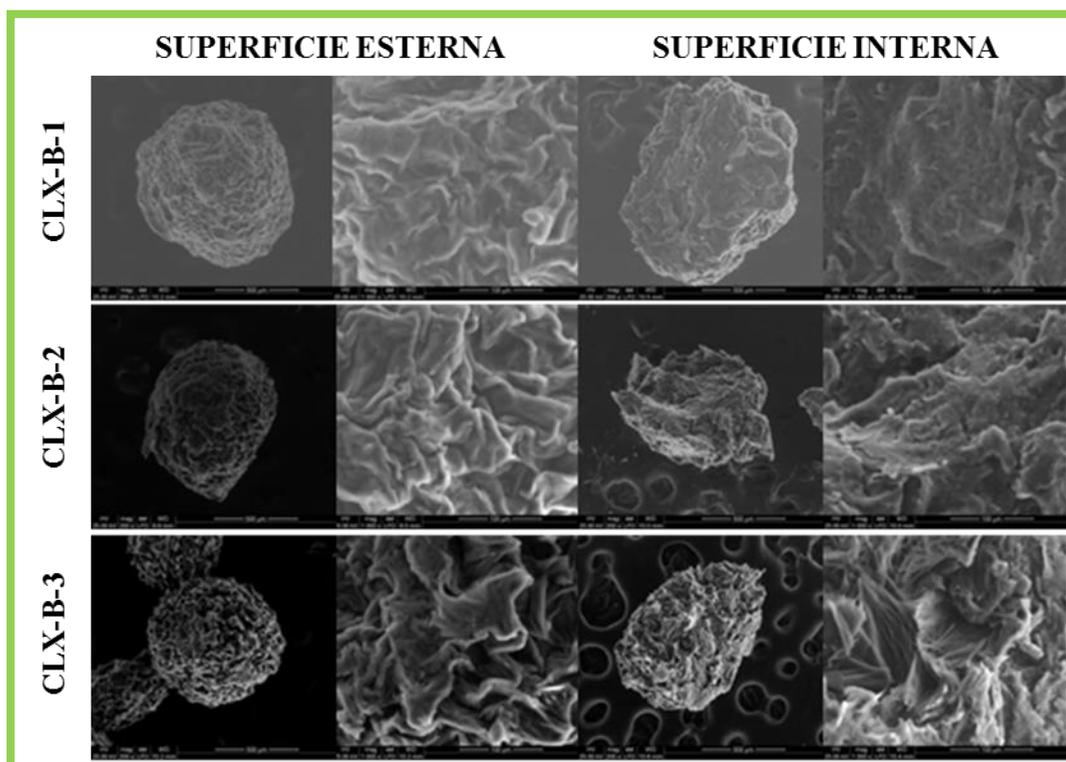


Fig. 12: Immagini SEM di pellets contenenti CLX interi e sezionati. Ingrandimenti 50x e 1000x.

Il diametro medio dei pellets è compreso tra 540 e 1075 μm (tabella 4).

Tab. 4: Titolo, diametri e *shape factor* di pellets contenenti CLX.

FORMULAZIONE	TITOLO CLX (%)	DIAMETRI (μm)	SHAPE FACTOR
CLX-B-1	38,14 \pm 0,30	673,7 \pm 98,4	0,76
CLX-B-2	44,04 \pm 0,44	621,5 \pm 81,1	0,73
CLX-B-3	51,99 \pm 0,87	541,7 \pm 98,0	0,79
CLX-B-4	43,35 \pm 0,74	589,2 \pm 108,9	0,80
CLX-B-5	36,32 \pm 1,06	626,0 \pm 88,2	0,81
CLX-B-6	22,24 \pm 0,24	1074,8 \pm 203,5	0,74
CLX-B-7	26,41 \pm 0,29	1036,8 \pm 119,1	0,76
CLX-B-8	32,76 \pm 1,81	797,2 \pm 138,7	0,78

Una minore quantità di celecoxib nella fase auto-emulsificante è correlata ad un maggior diametro dei pellets; un più lungo tempo di gelificazione porta invece ad una riduzione significativa del diametro. Il fenomeno è probabilmente da imputarsi alla formazione di un maggior numero di reticolazioni all'interno del network polimerico. In seguito ad essiccamento, il reticolo si ripiega su se stesso in maniera più stretta riducendo gli spazi liberi all'interno della matrice e, conseguentemente, le dimensioni finali del pellet. La concentrazione di agente gelificante sembra avere invece un effetto minore e non coerente sulle dimensioni finali dei pellets.

Il titolo in principio attivo è elevato in tutti i sistemi; all'aumentare del tempo di permanenza nel bagno di CaCl_2 si ha un aumento progressivo del titolo che si presenta in tutte le formulazioni più elevato del titolo teorico. Durante il processo di gelificazione, il Labrasol, a causa della sua parziale affinità per la natura acquosa del

bagno, fuoriesce dai sistemi e si ripartisce nel bagno gelificante; conseguentemente avviene la riduzione della sua concentrazione all'interno delle formulazioni e aumento del contenuto percentuale di celecoxib. I test effettuati al gas cromatografo hanno confermato una riduzione progressiva della quantità di Labrasol all'interno dei pellets a seguito di più elevati periodi di gelificazione (la fuoriuscita di Labrasol è quantificata in circa il 25% dopo 5 minuti e circa il 55% dopo 45 minuti di gelificazione) (Tab. 5).

Tab. 5: Titolo del Labrasol di pellets preparati con tempi di gelificazione di 5, 15, 45 minuti.

FORMULAZIONE	TITOLO LABRASOL (%)
CLX-B-1	46,53 ± 0,85
CLX-B-2	38,39 ± 0,35
CLX-B-3	28,11 ± 0,77

I termogrammi del farmaco puro, dei pellets placebo, della miscela fisica di celecoxib e pellets placebo e dei pellets di alginato contenenti il principio attivo sono riportati in figura 13.

Il farmaco tal quale mostra un picco endotermico di fusione a 156 °C; i termogrammi dei pellets placebo si mantengono piatti fino a circa 140 °C. I termogrammi delle miscele placebo mostrano un profilo termico dato dalla combinazione dei profili termici del farmaco tal quale e delle miscele fisiche (segnale di fusione del farmaco a 150 °C). I termogrammi dei pellets carichi di CLX sono comparabili tra di loro: in nessuno di questi è presente il picco di fusione del farmaco: gli unici segnali evidenziabili sono compatibili con le interazioni calcio-alginato. Il celecoxib sembra essere disperso in modo uniforme nella matrice dei pellets in forma amorfa.

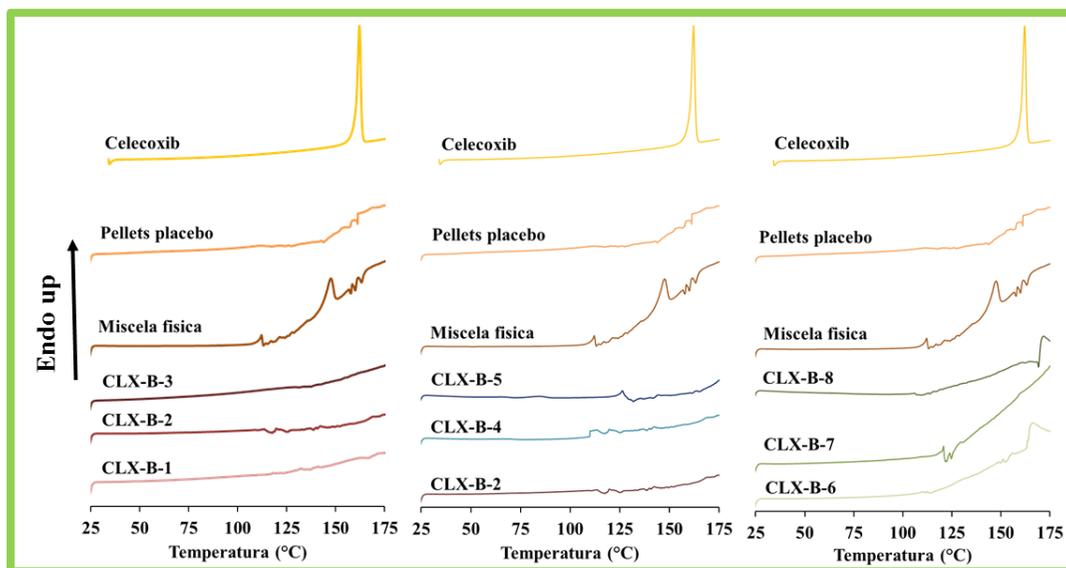


Fig. 13: Termogrammi DSC di CLX, di pellets placebo, di miscele fisiche di CLX e pellets placebo e di pellets di alginato contenenti CLX. (Endo up).

Si è proseguita la caratterizzazione dei sistemi andando a valutare la loro capacità di rigonfiamento in fluidi acquosi (figura 14).

I pellets mostrano un comportamento pH dipendente simile a quello osservato nel primo lotto di formulazioni. Il rigonfiamento in acido cloridrico è confrontabile per tutte i sistemi: dopo pochi minuti dall'inizio del test si osserva un incremento in peso limitato, che non supera il 100%, causato dall'idratazione dello strato polimerico superficiale. Raggiunto l'equilibrio, non si osservano ulteriori variazioni del peso o disgregazione dei sistemi a causa della bassa solubilità dell'acido alginico formatosi sulla superficie esterna. Questo comportamento è in linea con i risultati ottenuti per le precedenti formulazioni.

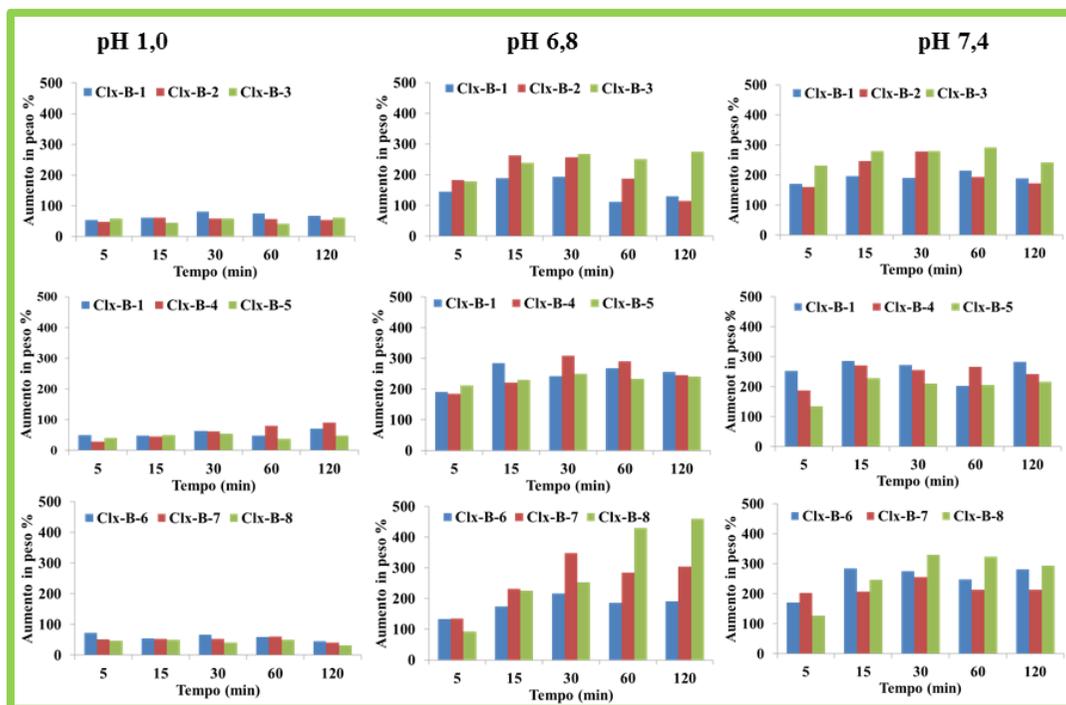


Fig. 14: Assorbimento di fluidi in HCl pH 1,0 e tamponi fosfato a pH 6,8 e 7,4.

In entrambi i tamponi fosfato avviene un maggior assorbimento di fluido; questo fenomeno avviene velocemente ed è seguito da disgregazione dei pellets indotta dallo scambio ionico tra Na^+ e Ca^{2+} . A pH 6,8, i picchi massimi di assorbimento sono compresi tra 192% e 460%. Tutte i sistemi raggiungono l'equilibrio di rigonfiamento dopo circa 15 o 30 minuti, ad eccezione dei pellets CLX-B-8 (basso titolo di CLX nella FAE e 45 minuti di gelificazione) i quali continuano ad assorbire fluido per tutta la durata del test. I pellets preparati con un tempo di gelificazione di 5 minuti, a causa della formazione di una struttura caratterizzata da una bassa densità di reticolazione, non raggiungono livelli di swelling paragonabili a quelli degli altri pellets. A pH 7,4, i picchi massimi di assorbimento vengono raggiunti dopo 15 minuti e in seguito non si osservano decrescite di peso. A questo pH il processo di disgregazione del reticolo polimerico impiega più tempo per attuarsi. Il processo di

rigonfiamento può essere ulteriormente descritto in base all'incremento dimensionale dei pellets in seguito a reidratazione (figura 15).

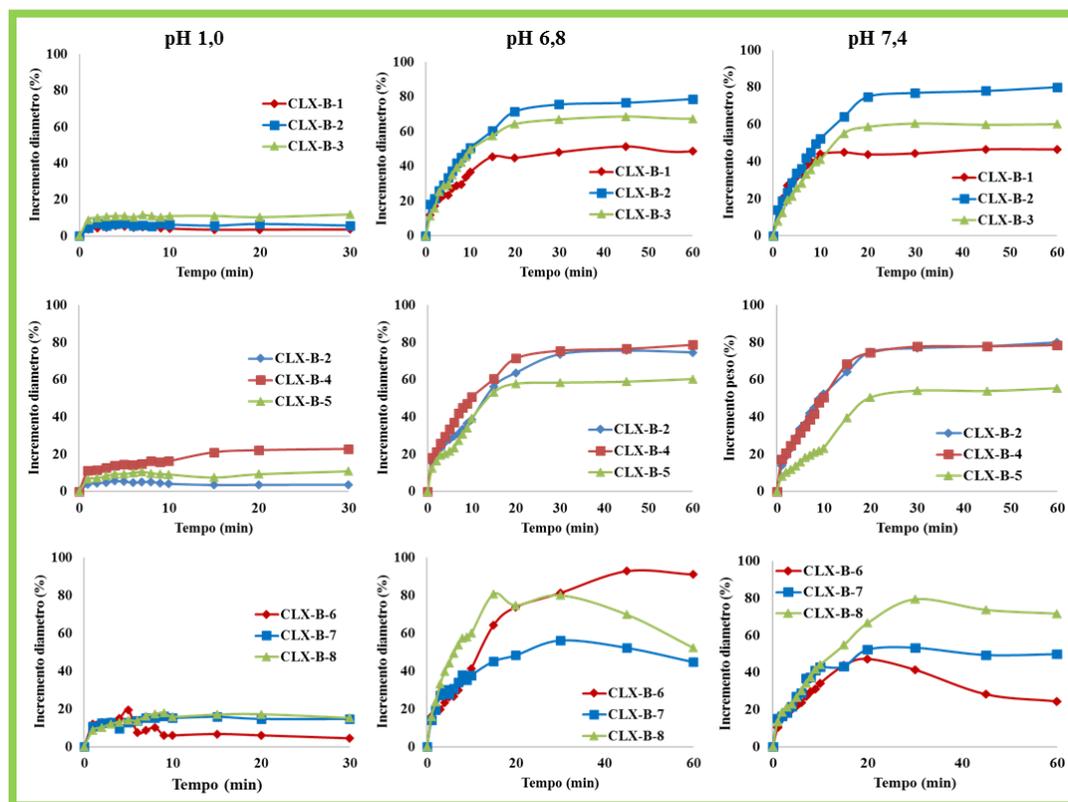


Fig. 15: Profili di rigonfiamento in HCl 0,1N e tamponi fosfato a pH 6,8 e 7,4.

In acido cloridrico l'equilibrio di rigonfiamento viene raggiunto velocemente (5 minuti); dopo un aumento di diametro iniziale, i pellets mantengono dimensioni costanti fino alla fine del test. Nei tamponi fosfato il valore massimo di rigonfiamento viene raggiunto in 20/30 minuti. L'erosione dei pellets è percepibile solo nelle formulazioni aventi un titolo minore in CLX nella FAE (CLX-B-6, CLX-B-7, CLX-B-8): dopo 30 minuti si è registrato una diminuzione del diametro. La velocità di rigonfiamento viene calcolata come la pendenza della curva ottenuta correlando la percentuale di rigonfiamento con la radice quadrata del tempo; questa

analisi non è stata effettuata per i profili ottenuti in HCl 0,1N a cause del rigonfiamento limitato che avviene in questo fluido. In tabella 6 sono riportate le velocità di rigonfiamento dei pellets reidratati con i tamponi a pH 6,8 e pH 7,4.

Tab. 6: Velocità di rigonfiamento dei pellets in tampone fosfato a pH 6,8 e a pH 7,4.

FORMULAZIONE	pH 6,8	R²	pH 7,4	R²
CLX-B-1	10,852	0,993	13,809	0,996
CLX-B-2	18,184	0,992	15,637	0,989
CLX-B-3	15,937	0,991	13,766	0,987
CLX-B-4	15,651	0,996	15,212	0,991
CLX-B-5	11,075	0,978	7,260	0,997
CLX-B-6	11,745	0,982	10,361	0,996
CLX-B-7	11,830	0,979	13,553	0,981
CLX-B-8	20,367	0,995	13,591	0,990

Si può osservare che la concentrazione di CaCl₂ e il titolo di principio attivo nella FAE non sembrano avere un forte impatto sul meccanismo di reidratazione e il conseguente rigonfiamento dei pellets; un impatto più importante sembra essere determinato dal tempo di gelificazione adottato per produrre i sistemi. Le formulazioni CLX-B-1 e CLX-B-6 (ottenute dopo tempi di gelificazione pari a 5 minuti) mostrano una velocità di rigonfiamento inferiore alle loro formulazioni rispettive lasciate a gelificare per 15 o 45 minuti. In tutti i casi è comunque possibile osservare una stretta correlazione tra rigonfiamento e radice quadrata del tempo (R² è sempre superiore allo 0,97).

I profili di rilascio del celecoxib dai pellets sono stati ottenuti effettuando i test in HCl a pH 1,0 e in tamponi fosfato a pH 6,8 e pH 7,4 (figura 16).

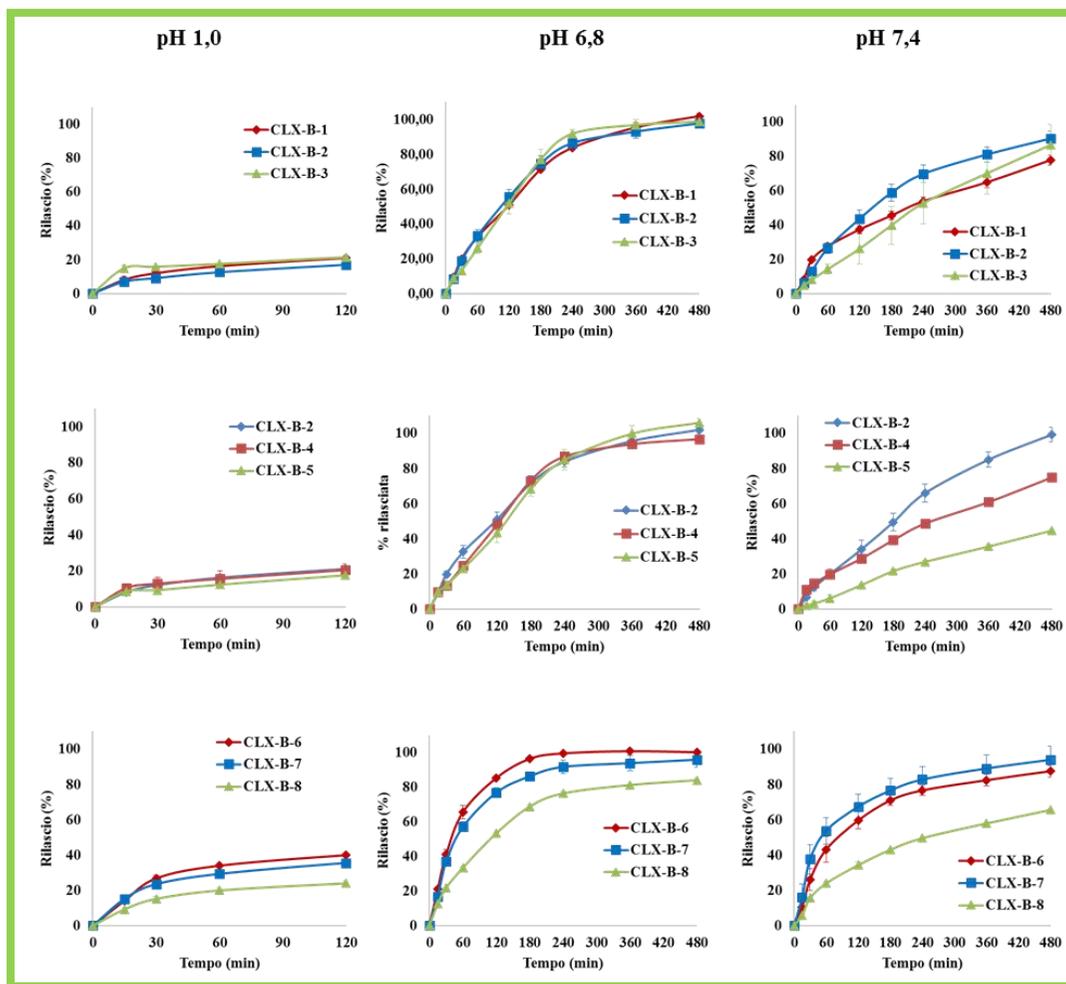


Fig. 16: Profili di rilascio di pellets contenenti CLX a pH 1,0 pH 6,8 pH 7,4.

In ambiente acido si è osservato un rilascio lento e limitato del farmaco a causa della formazione di acido alginico e della ridotta diffusione dell'attivo attraverso la matrice. Il rilascio è limitato anche dalla mancata erosione e disgregazione dei pellets a causa della scarsa solubilità del calcio alginato a bassi pH. Il rilascio di queste formulazioni è generalmente più elevato di quanto osservato nel caso dei pellets aventi rapporto FA:FAE 1:1 preparati in precedenza; trovano invece conferma i valori ottenuti relativi ai pellets CLX-A-4 aventi rapporto FA:FAE 4:1. Dopo due ore dall'inizio del test in HCl meno del 20% del celecoxib si trova in soluzione; unica

eccezione sono i pellets CLX-B-6 e CLX-B-7 che presentano rilasci del 40 e 30% nello stesso intervallo di tempo. La maggior quantità di Labrasol contenuto all'interno di queste due formulazioni favorisce la diffusione dell'attivo attraverso il network polimerico. Le similitudini e le differenze tra i profili di rilascio sono state valutate utilizzando il fattore di similarità f_2 : tutti i profili di rilascio risultano simili ($f_2 > 50$) con l'eccezione, già riportata in precedenza, dei sistemi CLX-B-6 e CLX-B-7 ($f_2 < 50$). A pH neutri il reticolo polimerico viene eroso e avviene un rilascio controllato del farmaco: in circa sei ore, a pH 6,8, il processo di rilascio si completa per tutti i sistemi con l'eccezione dei sistemi CLX-B-7 e CLX-B-8. Il tempo di gelificazione non sembra aver un impatto nel caso dei pellets aventi un più alto titolo di CLX nella FAE; questa osservazione è confermata dai valori di f_2 superiori a 50 ottenuti confrontando tra di loro i profili di rilascio dei pellets CLX-B-1, CLX-B-2 e CLX-B-3 (tempi di gelificazione rispettivamente 5, 15 e 45 minuti). I pellets aventi un titolo più basso in principio attivo nella FAE, CLX-B-6, CLX-B-7 e CLX-B-8, mostrano invece un rilascio progressivamente più lento all'aumentare del tempo di gelificazione. In modo simile a quanto osservato a pH 6,8, le differenze di concentrazione del bagno gelificante non inducono cambiamenti significativi nei profili di rilascio ($f_2 > 50$) a pH 7,4. I profili di rilascio a pH 7,4 evidenziano che in questo fluido il processo di liberazione del farmaco avviene in modo più controllato rispetto a quanto osservato a pH 6,8. In particolare si può osservare una influenza significativa della concentrazione del CaCl_2 sul comportamento di rilascio. All'aumentare della concentrazione dell'agente gelificante corrisponde un più lento rilascio del celecoxib: i pellets CLX-B-1 (100 mM) rilasciano la totalità del farmaco che veicolano in 8 ore, mentre, nello stesso intervallo di tempo i pellets CLX-B-4 (200mM) e CLX-B-5 (300mM) rilasciano solamente il 75% e il 41%. Questo comportamento è causato dalla più elevata densità di legami all'interno delle matrici polimeriche reticolate con concentrazioni più elevate di gelificante; l'elevata densità di legami si traduce in una struttura della matrice più complessa capace di rallentare la diffusione del farmaco al suo interno. Di nuovo l'influenza del tempo di

gelificazione sui profili di rilascio è osservabile solo nei sistemi aventi il titolo in attivo nella FAE minore. A un più elevato tempo di gelificazione corrisponde un più lento rilascio del farmaco. I rilasci delle formulazioni CLX-B-1, CLX-B-2 e CLX-B-3 risultano simili ($f_2 > 50$). Per questi pellets altri fattori sono probabilmente determinanti nel definire il processo di rilascio del farmaco. Attraverso l'equazione di Korsmayer-Peppas, infine, si è cercato di valutare in modo basilare il meccanismo con cui avviene il rilascio del celecoxib dai pellets (tabella 7).

Tab. 7: Equazione di Korsmayer-Peppas. Parametri cinetici ($0,901 < R^2 < 0,998$)

Formulazioni	HCl 0,1N pH 1,0		Tampone fosfato pH 6,8		Tampone fosfato pH 7,4	
	K	n	K	n	K	n
CLX-B-1	0,0235	0,46	0,0148	0,75	0,0308	0,52
CLX-B-2	0,0179	0,47	0,0130	0,78	0,0113	0,76
CLX-B-3	0,0576	0,29	0,0051	0,97	0,0044	0,87
CLX-B-4	0,0253	0,45	0,0075	0,87	0,0180	0,60
CLX-B-5	0,0184	0,48	0,0054	0,93	0,0026	0,84
CLX-B-6	0,0908	0,30	0,0288	0,77	0,0339	0,59
CLX-B-7	0,0738	0,33	0,0452	0,60	0,0557	0,53
CLX-B-8	0,0455	0,34	0,0227	0,66	0,0280	0,52

Per tutte le formulazioni si è ottenuto, nel caso dei profili di rilascio in HCl, un valore di n inferiore a 0,5 indicante un meccanismo di rilascio di tipo diffusivo. Per i profili di rilascio in tampone fosfato a pH 6,8 e 7,4 si sono ottenuti valori di n compresi tra

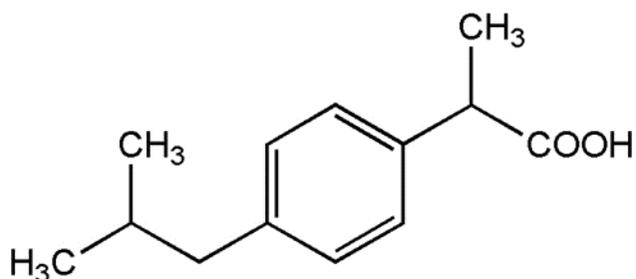
0,5 e 1,0 indicanti un meccanismo di rilascio anomalo che combina un processo di diffusione e un processo di rilassamento del polimero.

CONCLUSIONI

I pellets a base di alginato contenenti celecoxib solubilizzato in una fase auto-emulsificante si sono dimostrati essere un sistema multiparticolato capace di minimizzare il rilascio del farmaco a valori di pH acidi, tipici del compartimento gastrico, e di controllare il rilascio a pH più elevati. Si è osservato che particolari condizioni di preparazione (tempo di gelificazione di 15 minuti, concentrazione del bagno gelificante di CaCl₂ 100 mM e rapporto FA:FAE 4:1) permettono di ottenere pellets dotati di buone caratteristiche meccaniche e alto titolo in principio attivo. Questi pellets sono in grado di controllare in modo appropriato il rilascio del celecoxib nell'ottica di un possibile utilizzo nella terapia della poliposi adenomatosa. Partendo da questi risultati si è quindi voluto verificare la capacità del sistema alginato:soluzione auto-emulsificante, preparato utilizzando le condizioni determinate in questa fase di lavoro, di veicolare una molecola appartenente anch'essa alla categoria dei FANS ma dotata di caratteristiche chimico-fisiche differenti: l'ibuprofene.

IBUPROFENE

INTRODUZIONE



L'ibuprofene (IBU), acido 2-(4-Isobutilfenil)propanoico, è un farmaco classificato come appartenente alla classe II BCS (Potthast et al. 2005). Si tratta di un anti-infiammatorio non steroideo (FANS) utilizzato per il trattamento sintomatico dell'artrite reumatoide, dell'artrite reumatoide giovanile e dell'osteoartrite nonché nel trattamento del dolore lieve o moderato (Brayfield et al. 2014). L'ibuprofene è un inibitore non selettivo delle ciclo-ossigenasi (COX); l'inibizione a livello delle COX-1 è la causa principale degli effetti indesiderati a livello gastrointestinale mentre l'inibizione delle COX-2 è responsabile dell'attività terapeutica della molecola. In seguito a somministrazione orale l'IBU viene ben assorbito, nonostante la sua scarsa solubilità in acqua e raggiunge il picco di concentrazione plasmatica circa 1 o 2 ore dopo l'ingestione (Reis et al. 2013). A causa della sua breve emivita (1,5 – 2,0 ore) il farmaco viene rapidamente eliminato dalla circolazione sistemica. Si rende, quindi, necessaria una somministrazione ripetuta dell'attivo, per via orale o per via parenterale, in modo da ottenere un'attività farmacologica prolungata ed un'efficace copertura terapeutica (Sorgel et al. 2005). L'utilizzo cronico di FANS produce, a livello gastrico, nel 1-4% dei paziente lo sviluppo di ulcerazioni e sanguinamenti clinicamente significanti; le lesioni a livello gastrico avvengono sia a causa di effetti topici di questa categoria di farmaci sull'epitelio gastrico sia a causa della soppressione della sintesi delle prostaglandine (Wallace et al. 2008). Nonostante l'IBU sia meglio tollerato della maggior parte degli altri FANS, il suo utilizzo prolungato è collegato ad un aumento del rischio a lungo termine di reazioni

avverse gastrointestinali specialmente in pazienti anziani (Hippysley-Cox et al. 2005). Al fine di ridurre i danni topici a carico dell'epitelio gastrico causati da FANS sono state indagate differenti soluzioni tra cui lo sviluppo di rivestimenti enterici (Becker et al. 2004) o di forme di dosaggio a rilascio controllato (Devrim et al. 2006; Chandram et al. 2008; Reis et al. 2013); queste ultime sono teoricamente anche in grado di risolvere la problematica delle somministrazioni ripetute dovute alla ridotta emivita del farmaco.

SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo del progetto di ricerca che coinvolge l'ibuprofene è stata la verifica della possibilità di utilizzare il sistema a base di alginato per veicolare una molecola differente. L'ibuprofene, seppur sempre appartenente alla categoria dei FANS, presenta differenti caratteristiche chimico-fisiche e differenti esigenze terapeutiche rispetto al celecoxib. Si è cercato di sviluppare un sistema di dosaggio ad unità multipla a base di calcio alginato prefiggendosi due obiettivi: capacità della forma di dosaggio di impedire la liberazione del principio attivo a livello gastrico in modo da ridurre i rischi di reazioni avverse; capacità di controllare la velocità di rilascio del farmaco nel compartimento intestinale.

FORMULAZIONE E PRODUZIONE DEI PELLETS

Sviluppo formulativo

Lo sviluppo formulativo di questa fase del progetto di dottorato è partito dall'idea di includere l'ibuprofene in un sistema di dosaggio preparato sfruttando la tecnica della gelazione ionotropica; sono state miscelate assieme una fase acquosa contenente il polimero base costituente il sistema e una fase auto-emulsificante veicolante l'attivo.

Durante la prima parte del progetto è stata verificata la compatibilità dell'ibuprofene con la fase auto-emulsificante (FAE), contenente Labrasol e TPGS, sviluppata precedentemente per la veicolazione del celecoxib. Si è, quindi verificata la solubilità del farmaco nel Labrasol andando ad aggiungere una quantità accuratamente pesata dell'attivo (dal 20 al 60% p/p) all'eccipiente, agitando vigorosamente i campioni per un tempo appropriato e osservando i campioni allo stereomicroscopio (Motic SMZ-168) per verificare la completa solubilizzazione dei cristalli di farmaco. Il sistema auto-emulsionante risultava composto da Labrasol (47,95% p/p), TPGS (4,1%) e celecoxib (47,95%). La FAE è stata preparata pesando accuratamente il Labrasol e il TPGS e riscaldandoli a 50°C in modo da ottenere la fusione del TPGS. Successivamente è stato aggiunto l'ibuprofene alla miscela di eccipienti. La FAE è stata mantenuta sotto agitazione fino alla completa solubilizzazione del principio attivo.

In questo progetto si è voluto valutare l'impatto, in particolare sulle caratteristiche di rilascio, della presenza di polimeri secondari all'interno della matrice di alginato; l'attenzione si è concentrata su due polimeri, pectina e idrossipropilcellulosa (HPC) differenti tra loro per caratteristiche fisico-chimiche e meccanismo di gelificazione. Durante la gelazione ionotropica dell'alginato, la presenza di questi polimeri aggiuntivi dovrebbe rendersi responsabile della formazione di sistemi con caratteristiche strutturali differenti. Le catene polimeriche dell'HPC non reticolano

tra di loro ma rimangono intrappolate separatamente all'interno del network alginico portando alla formazione di un sistema semi compenetrato (semi interpenetrating polymeric network: sIPN) (Matricardi, 2013). Nel caso della pectina si ha un meccanismo di gelificazione simile a quello dell'alginato: in presenza di ioni calcio avviene un processo di gelificazione non selettivo per le catene di alginato o pectina. Si ottiene così la formazione di legami tra i residui galatturonici di una catena di pectina e i residui galatturonici di altre catene di pectina o i residui guluronici delle catene di alginato; questi legami sono responsabili della formazione di una struttura simile all'*egg-box* (Walkenstrom et al. 2003). La fase polimerica acquosa (FA) è stata preparata solubilizzando in acqua il sodio alginato per ottenere una soluzione al 1,5% p/V oppure il sodio alginato e la quantità appropriata di HPC o pectina.

Tab. 8: Composizione delle formulazioni.

Formulazione	Fase Acquosa (FA)			2° Fase
	Alginato (%)	HPC (%)	Pectina (%)	
IBU-1	1,5	-	-	Farmaco cristallino
IBU-2	1,5	-	-	FAE
IBU-3	1,5	0,75	-	Farmaco cristallino
IBU-4	1,5	0,75	-	FAE
IBU-5	1,5	-	0,75	Farmaco cristallino
IBU-6	1,5	-	0,75	FAE
IBU-7	1,5	1,25	-	FAE
IBU-8	1,5	-	1,5	FAE

La FA e la FAE sono state miscelate in rapporto 4:1 ad ottenere un'emulsione bianca e stabile. Sono stati, inoltre, preparati dei sistemi di riferimento costituiti dalle

differenti fasi acquose addizionate di farmaco in forma cristallina. Alle FA è stata aggiunto l'ibuprofene in modo da ottenere formulazioni aventi lo stesso carico teorico di farmaco dei sistemi bifasici (9,59%). La composizione delle formulazioni è riportata in tabella 8.

Produzione dei pellets

I pellets di alginato contenenti ibuprofene sono stati preparati mediante gelazione ionotropica seguendo il protocollo descritto in precedenza per i pellets di celecoxib. Come parametri di produzione sono stati utilizzati quelli relativi alla formulazione CLX-B-1 ovvero concentrazione del bagno gelificante di CaCl_2 100mM e tempo di gelificazione di 15 minuti.

CARATTERIZZAZIONE DEI PELLETS

Analisi morfologica

Informazioni relative a forma, aspetto della superficie e dimensione dei pellets sono state raccolte per tutte le formulazioni allestite mediante microscopia ottica. Foto dei pellets appena preparati e dopo essiccamento sono state acquisite usando una telecamera (Moticam 2500 USB) montata su uno stereomicroscopio (Motic SMZ168) e collegata ad un personal computer. Diametri, perimetri e aree di superficie dei pellets sono stati determinati usando il software Motic Image Plus 2.0 ed è stato quindi calcolato il valore di *shape factor* secondo quanto già riportato per il celecoxib.

Contenuto di principio attivo nei pellets

Una quantità accuratamente pesata di ciascuna formulazione è stata unita a 100 mL di tampone fosfato a pH 6,8. Il sistema è stato mantenuto sotto agitazione in modo da assicurare la completa estrazione e solubilizzazione dell'IBU. La porzione liquida è stata filtrata con filtri in fibra di vetro (diametro dei pori 0,7 μ m) e analizzata con uno spettrofotometro UV/Vis (Perkin Elmer Lambda 35) alla lunghezza d'onda di 222 nm. I risultati presentati sono la media di tre determinazioni.

Contenuto di Labrasol nei pellets

Il contenuto in Labrasol dei pellets è stato determinato per via gas cromatografica seguendo il protocollo descritto in precedenza per i pellets contenenti celecoxib.

Calorimetria differenziale a scansione

I termogrammi DSC dell'ibuprofene tal quale e delle differenti formulazioni sono stati ottenuti utilizzando un calorimetro differenziale a scansione (Pyris 1, Perkin Elmer). Una quantità esattamente pesata e pari a 5 mg di ciascuna formulazione è stata sigillata in un paniere di alluminio e analizzata sotto flusso di azoto. L'analisi è stata condotta nell'intervallo di temperature 25-250 °C con una velocità di scansione di 10 °C/min.

Studi di rigonfiamento in fluidi acquosi: valutazione della percentuale di fluido assorbito

La capacità dei pellets di assorbire fluidi acquosi è stata valutata in HCl 0,1N e tampone fosfato pH 6,8. Gli esperimenti sono stati eseguiti seguendo il protocollo descritto in precedenza per i pellets contenenti celecoxib.

Studi di rigonfiamento in fluidi acquosi: valutazione della variazione di diametro

Il rigonfiamento dei pellets posti a contatto con fluidi acquosi è stata valutato in HCl 0,1N e tampone fosfato pH 6,8. Gli esperimenti sono stati eseguiti seguendo il protocollo descritto in precedenza per i pellets contenenti celecoxib.

Studi di rilascio *in vitro*

Gli studi *in vitro* di rilascio dell'ibuprofene dalle formulazioni sono stati effettuati usando un dissolutore Sotax AT7 Smart equipaggiato con un sistema di agitazione a cestello (apparatus 1, European Pharmacopoeia) impostato ad una velocità di rotazione di 100 RPM ed a una temperatura di lavoro di 37 °C. I test di rilascio sono stati condotti su una quantità di formulazione contenenti 10 mg di IBU. I pellets, dopo 120 minuti in 500 mL di HCl pH 1,0, sono stati trasferiti in 500 mL di tampone fosfato a pH 6,8. Aliquote di soluzione sono state prelevate ad intervalli di tempo predeterminati e analizzate per via spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 220 nm, nel caso di campioni in HCl o di 222 nm nel caso di campioni in tampone fosfato. I risultati proposti sono la media di tre determinazioni.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Otto differenti formulazioni di pellets di alginato contenenti ibuprofene sono state preparate mediante gelazione ionotropica. Il principio attivo all'interno delle formulazioni è presente o in forma cristallina o solubilizzato in una fase auto-emulsificante (FAE) contenente Labrasol e TPGS. I pellets di alginato si differenziano tra di loro in base alla presenza, o meno, al loro interno di un polimero secondario, HPC o pectina, a concentrazioni differenti.

I risultati dei test di solubilità dell'ibuprofene in Labrasol hanno mostrato che il rapporto 1:1 tra farmaco e eccipiente auto-emulsificante è il migliore per assicurare sia una completa solubilizzazione dell'attivo sia un elevato titolo in principio attivo nella FAE.

I pellets prima dello step di essiccamento hanno una forma sferica, sono di colore bianco e con superficie liscia; in seguito ad essiccamento mantengono una forma pressoché regolare ma la superficie si presenta rugosa a causa del restringimento del reticolo polimerico. Dopo essiccamento i pellets in cui il principio attivo è stato solubilizzato nella fase auto-emulsificante hanno una superficie più liscia rispetto a quelli contenenti il farmaco in forma cristallina; sulla superficie di quest'ultimi è possibile osservare la presenza di cristalli di ibuprofene. La presenza di un polimero secondario nella formulazione influenza in modo visibile l'aspetto dei pellets contenenti la fase auto-emulsificante: la presenza di HPC conferisce alla superficie dei pellets un aspetto più opaco e compatto, la pectina, invece, un aspetto più trasparente. Le differenti caratteristiche morfologiche riflettono probabilmente la differente struttura del reticolo polimerico assunta in seguito a gelificazione: quando l'alginato è miscelato con l'HPC si ha la formazione di un sistema semi-IPN in cui le catene di HPC sono disperse all'interno della matrice del reticolo di calcio alginato; con la pectina si ha invece la formazione di un reticolo in cui le catene di pectina e alginato sono legate tra loro mediante gli ioni calcio.

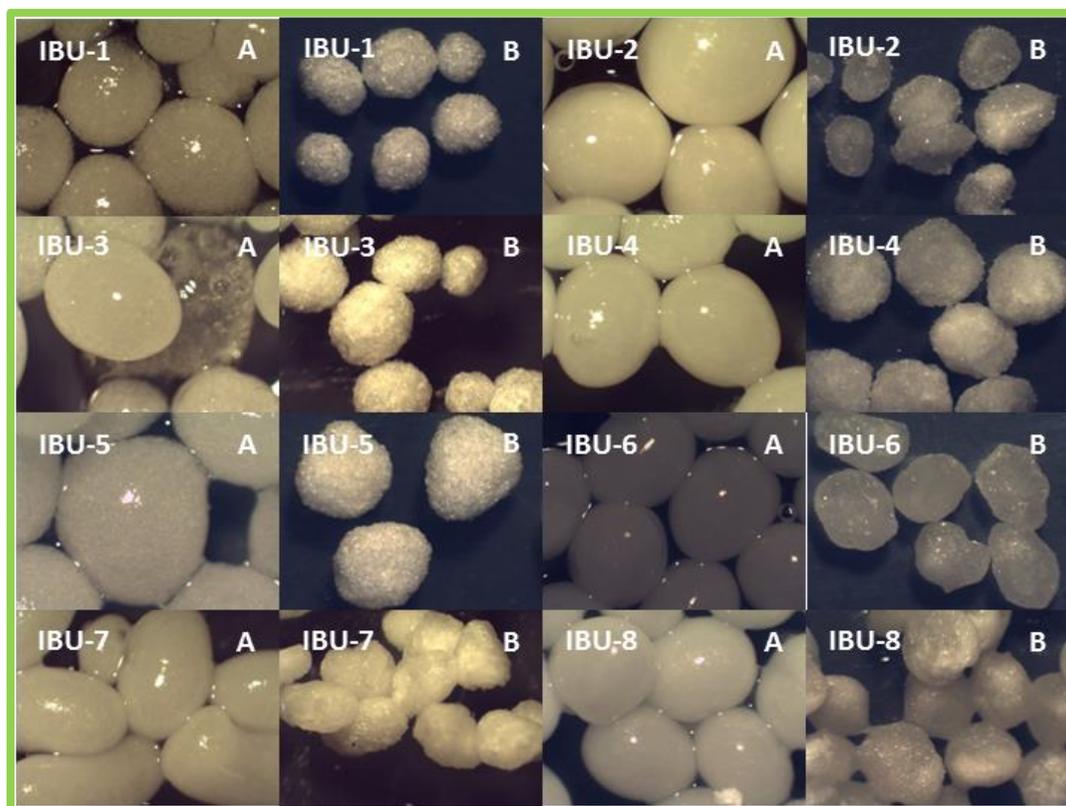


Fig. 17: Stereomicrofotografie di pellets non essiccati (A) ed essiccati (B). Ingrandimento 3x.

Il diametro medio dei pellets è compreso tra 1317 and 2026 μm (tab. 9). In generale, i pellets contenenti il farmaco in forma cristallina hanno un diametro più elevato dei corrispondenti pellets in cui il principio attivo è solubilizzato nella FAE; la presenza di cristalli di farmaco interferisce, durante il processo di essiccamento, con il restringimento delle catene polimeriche dando così un network polimerico meno compatto. Dai risultati si osserva che l'aggiunta di un secondo polimero porta all'incremento delle dimensioni rispetto ai pellets contenenti solo alginato. I valori dello *shape factor* variano tra 0,73 e 0,81. Come nel caso dei pellets contenenti celecoxib, questi valori sono distanti dal valore assunto da una sfera perfetta (1); per determinare perimetro e area dei pellets si è tenuto conto di tutte le irregolarità

presenti sul loro contorno con conseguente sovrastima del valore del perimetro e conseguente diminuzione del valore di *shape factor* calcolato.

Tab. 9: Titolo, diametro e *shape factor* dei pellets essiccati.

Formulazione	Titolo Ibuprofene (%)	Diametro (μm)	Shape Factor
IBU-1	83,63 \pm 2,20	1487,5 \pm 133,3	0,78
IBU-2	51,39 \pm 0,79	1317,3 \pm 189,9	0,78
IBU-3	75,96 \pm 10,45	1546,9 \pm 80,6	0,82
IBU-4	56,60 \pm 0,23	1810,0 \pm 84,2	0,80
IBU-5	84,33 \pm 0,34	2026,5 \pm 160,8	0,75
IBU-6	53,33 \pm 0,53	1488,9 \pm 102,8	0,79
IBU-7	62,52 \pm 0,71	1596,2 \pm 134,0	0,77
IBU-8	51,21 \pm 0,63	1818,4 \pm 185,9	0,78

I pellets presentano un elevato titolo in principio attivo. Le formulazioni contenenti il farmaco cristallino hanno un carico di farmaco più elevato (tra il 76 e l'84%) rispetto a quelle contenenti la FAE (tra il 51 e il 56%) ma mostrano, allo stesso tempo, una minore omogeneità. Il sistema IBU-3, contenente HPC e farmaco cristallino, ha un'omogeneità particolarmente bassa. L'elevata viscosità della sospensione iniziale ha reso difficile l'erogazione di gocce regolari nel bagno gelificante. Come nel caso dei pellets di celecoxib, durante il processo di gelificazione, vi è passaggio di Labrasol dai pellets al bagno gelificante a causa della parziale affinità dell'eccipiente liquido (Labrasol) per la natura acquosa del bagno. Si osserva, conseguentemente, la riduzione della concentrazione dell'eccipiente all'interno delle formulazioni e aumento del contenuto percentuale di ibuprofene. I test effettuati al gas cromatografo hanno confermato la fuoriuscita del Labrasol dai pellets durante il processo di gelificazione; il cui contenuto percentuale finale

dell'eccipiente è del 36,08% con una perdita di circa il 17% del Labrasol rispetto alla quantità iniziale.

Il profilo DSC dell'ibuprofene tal quale mostra un picco di fusione endotermico a 76 °C. I termogrammi dei pellets contenenti il farmaco cristallino mostrano dei segnali, corrispondenti alla fusione dell'ibuprofene, leggermente spostati verso temperature più elevate a causa delle interazioni tra farmaco e matrice polimerica (circa 80 °C); nei termogrammi dei pellets contenenti la FAE non è presente il picco di fusione del farmaco. La formulazione auto-emulsificante è, quindi, capace di mantenere in forma amorfa o solubilizzato il principio attivo all'interno della matrice.

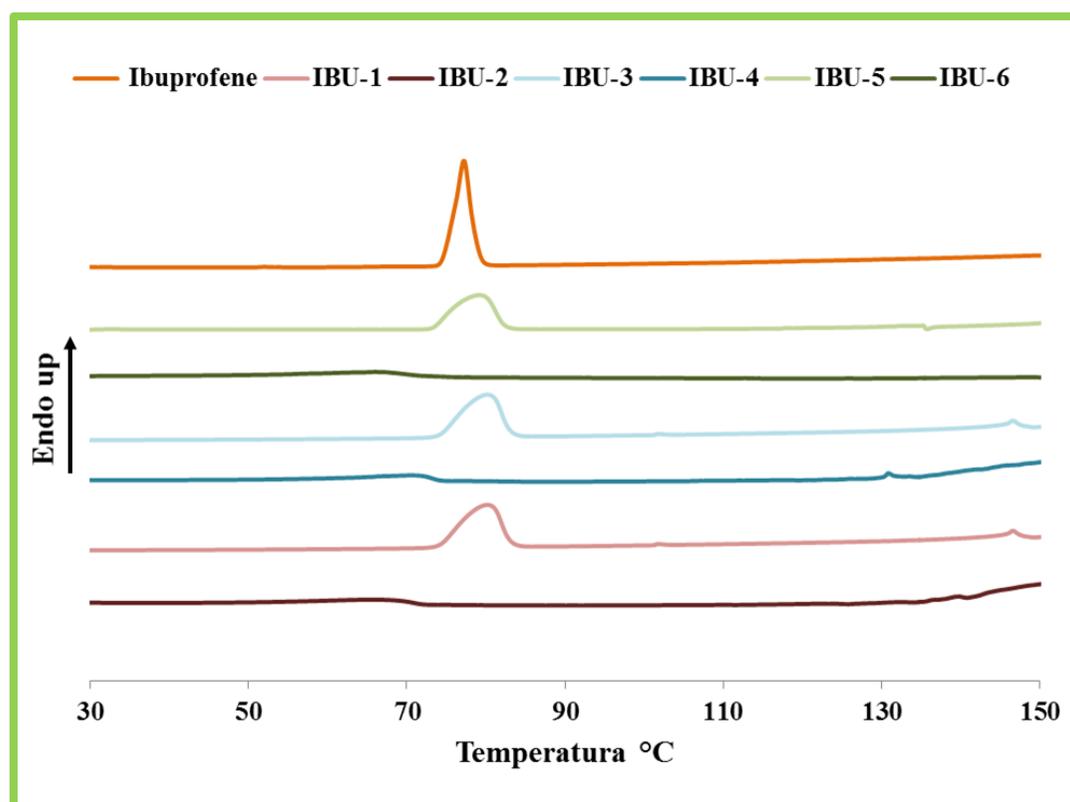


Fig. 18: Termogrammi DSC di ibuprofene tal quale e pellets contenenti il farmaco.

In modo simile ai pellets di alginato veicolanti celecoxib, i pellets contenenti ibuprofene, quando messi a contatto con fluidi acquosi, si reidratano rigonfiandosi. In HCl a pH 1,0, i pellets contenenti ibuprofene cristallino, IBU-1, (fig. 19) assorbono gradualmente il fluido per tutta la durata del test, attestandosi su valori assoluti piuttosto limitati. Le formulazioni aumentano di peso fino al raggiungimento, in tempi differenti (30 minuti IBU-5 contenente pectina, 60 minuti IBU-1 solo alginato, 120 minuti IBU-3 contenente HPC), di un valore massimo. A pH prossimi alla neutralità (pH 6,8), i pellets assorbono il fluido in modo più consistente. IBU-1 e IBU-5 raggiungono il valore massimo di rigonfiamento in pochi minuti. I pellets contenenti HPC (IBU-3) raggiungono il valore massimo, più elevato rispetto alle altre formulazioni, dopo 30 minuti; questo comportamento è probabilmente dovuto alla struttura sIPN dei pellets responsabile del rallentamento della penetrazione del fluido all'interno della matrice. Dopo 60 minuti di permanenza nel fluido, i pellets vanno incontro ad una significativa perdita di peso imputabile alla disgregazione della loro struttura per la rottura della struttura *egg box* del reticolo di alginato e all'aumentata solubilità dell'ibuprofene a questo valore di pH.

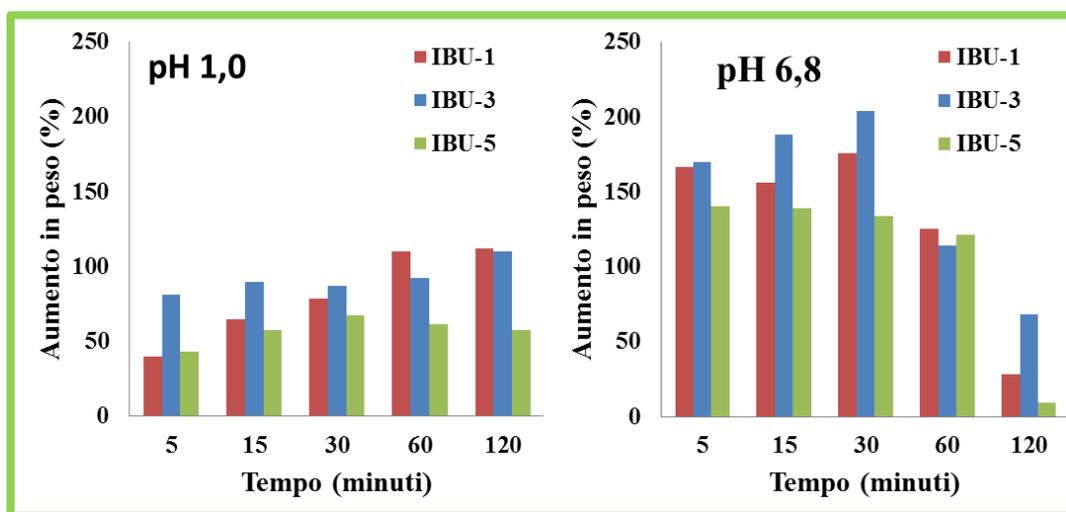


Fig. 19: Assorbimento di fluidi acquosi dei pellets contenenti ibuprofene cristallino.

I pellets contenenti la fase auto-emulsificante mostrano un comportamento simile a quello osservato in precedenza relativo ai pellets veicolanti celecoxib (fig. 20). A pH 1,0 raggiungono il massimo incremento in peso dopo 5-15 minuti, valore limitato e inferiore a quello raggiunto dai pellets contenenti IBU cristallino. Il maggiore assorbimento dei pellets contenenti IBU cristallino in questo fluido può essere spiegato con la presenza, sulla loro superficie, di cristalli di farmaco. In seguito alla limitata erosione dei cristalli di superficie nell'ambiente acido, si aprono dei nuovi pori nella matrice che permettono al fluido di penetrare nei pellets. A pH prossimi alla neutralità si osserva un maggiore uptake di fluido. I pellets IBU-2 (solo alginato) presentano il rigonfiamento più veloce ed elevato: si raggiunge un aumento in peso superiore al 200% in solo 15 minuti seguito dalla disgregazione della matrice. Le formulazioni IBU-4 e IBU-6 (contenenti rispettivamente HPC e pectina) necessitano di tempi più lunghi per raggiungere il valore massimo di rigonfiamento (30 e 60 minuti) e in seguito cominciano a perdere peso. La struttura più complessa della matrice di questi pellets è responsabile sia del più lento assorbimento di fluido sia di una maggiore resistenza dei pellets all'erosione.

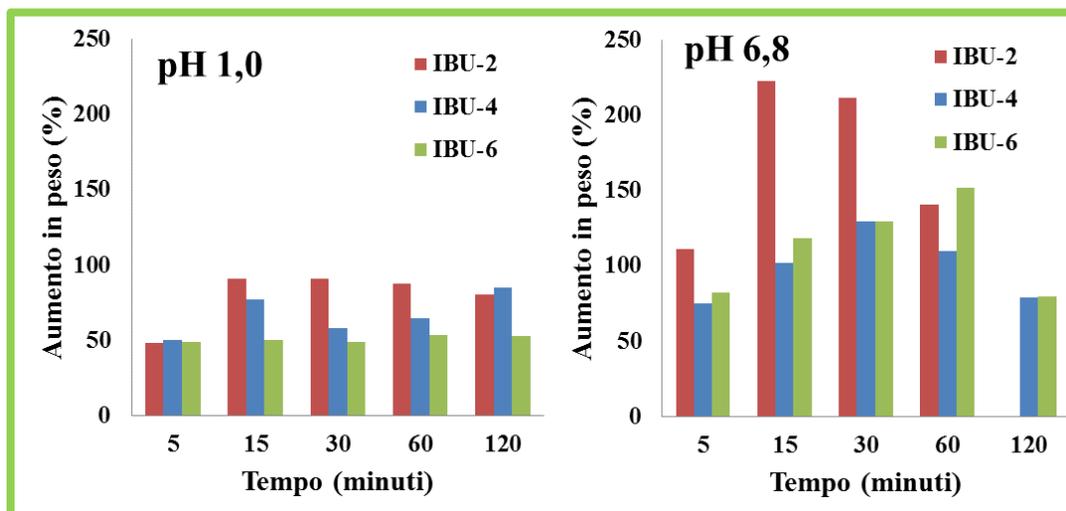


Fig. 20: Assorbimento di fluidi acquosi dei pellets contenenti ibuprofene solubilizzato nella fase auto-emulsificante.

Per verificare l'impatto sul rigonfiamento dell'incremento di concentrazione dei polimeri secondari (fig. 21) sono stati messi a confronto i risultati ottenuti per le formulazioni IBU-4, IBU-6, IBU-7, IBU-8. A pH 1,0 si può notare una differenza di comportamento tra le formulazioni contenenti pectina e quelle contenenti HPC. Nel caso della pectina, un incremento del rapporto tra alginato di sodio e pectina dal 2:1 al 1:1 porta ad un maggior valore assoluto dell'entità di rigonfiamento (50% e 100%) raggiunto dopo un breve intervallo di tempo (5-15 minuti). Gli ioni calcio presenti nella soluzione gelificante possono partecipare nella formazione di legami tra catene di alginato, tra catene di pectina oppure tra catene di alginato e pectina. Queste differenti interazioni tra catene portano alla formazione di strutture di legame aventi caratteristiche dimensionali e di ingombro sterico differenti; sono così ottenuti reticoli polimerici differenti. Le strutture risultanti dall'interazione alginato-alginato e pectina-pectina risultano essere più compatte e organizzate rispetto a quelle risultanti dall'interazione alginato-pectina (Walkenstrom et al. 2003). La presenza di alginato e pectina in rapporto 1:1 è probabilmente responsabile della formazione di un maggior numero di legami alginato-pectina all'interno della matrice; il maggior numero di interazioni alginato-pectina porta alla formazione di un reticolo meno organizzato e compatto, al cui interno è più facile che avvenga la penetrazione del fluido rispetto al rapporto 2:1. In modo opposto l'aumento del rapporto tra alginato di sodio e HPC dal 2:1 all'1,2:1 ha comportato un più lento e meno elevato assorbimento di fluido. La più elevata quantità di HPC all'interno del reticolo semi-compennetrato rallenta l'assorbimento di fluido. A pH 6,8, una più alta quantità di polimero secondario corrisponde ad un più elevato assorbimento di fluido. IBU-7 (HPC in rapporto 1,2:1) mostra una più lenta perdita di peso dopo il raggiungimento del valore massimo in peso; questo fenomeno potrebbe indicare la formazione di un sistema sIPN più robusto.

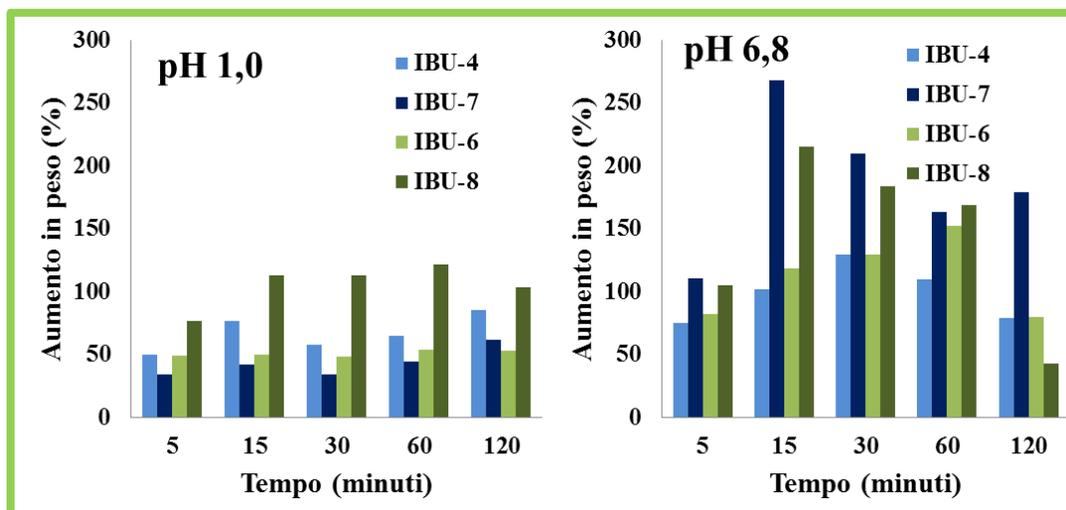


Fig. 21: Assorbimento di fluidi acquosi dei pellets contenenti differenti concentrazioni di polimero secondario.

La capacità di rigonfiamento dei pellets essiccati può essere descritta anche mediante la valutazione dell'aumento del loro diametro. In HCl a pH 1,0 tutti i pellets raggiungono in 10 minuti il massimo incremento del diametro (tra il 10 e il 20%) dopo di che le loro dimensioni rimangono stabili. In tabella 10 sono riportati i valori di rigonfiamento ottenuti mediante reidratazione in tampone fosfato pH 6,8. I pellets contenenti solo alginato raggiungono il diametro massimo in 30 minuti mentre i pellets di alginato-HPC e alginato-pectina continuano ad aumentare di dimensioni fino al termine del test. I pellets IBU-2 (solo alginato, IBU in FAE) sono gli unici a diminuire di dimensioni dopo i primi 30 minuti; questo è causato dalla ridotta resistenza meccanica della matrice di solo alginato unita alla fuoriuscita della fase auto-emulsificante dal reticolo polimerico. Le formulazioni contenenti la FAE mostrano, in generale, un incremento di diametro dopo 60 minuti minore rispetto alle formulazioni contenenti l'IBU cristallino; questo fenomeno si può probabilmente spiegare con la fuoriuscita della FAE dal sistema che compensa l'aumento dimensionale della matrice polimerica. L'unica eccezione di comportamento è

costituita dalla formulazione IBU-2 (solo alginato, FAE); in modo simile a quanto già osservato durante gli studi di assorbimento di fluidi acquosi, i pellets IBU-2, posti a contatto con tampone fosfato a pH 6,8, rigonfiano velocemente raggiungendo valori assoluti elevati (aumento del 38,47% del diametro in 30 minuti) per poi disgregarsi rapidamente. La minore resistenza meccanica di questi pellets unita alla rapida diffusione della fase auto-emulsificante attraverso la matrice alginica provoca la repentina diminuzione del diametro e la perdita di struttura del reticolo polimerico.

Tab 10: Aumento del diametro e velocità di rigonfiamento dei pellets contenenti ibuprofene in tampone fosfato a pH 6,8.

Formulazione	Aumento del diametro (%)				Velocità di rigonfiamento	R ²
	5 min	15 min	30 min	60 min		
IBU-1	9,53	15,13	24,06	24,76	4,635	0,946
IBU-2	22,12	36,62	38,47	1,55	8,594	0,949
IBU-3	14,39	31,51	37,62	51,65	7,691	0,953
IBU-4	6,25	11,56	17,07	21,42	2,731	0,977
IBU-5	11,37	16,80	27,85	42,22	3,828	0,888
IBU-6	10,12	21,25	32,74	36,71	5,163	0,980

I test *in vitro* di rilascio sono stati eseguiti in HCl 0,1N e tampone fosfato pH 6,8 cambiando fluido di rilascio dopo due ore. In fig. 22 sono riportati i profili di rilascio dei pellets contenenti il farmaco cristallino e solubilizzato nella FAE insieme al profilo di rilascio dell'attivo tal quale come riferimento. Tutti i pellets presentano un rilascio di farmaco limitato dopo due ore a pH 1,0. Questo comportamento è spiegabile considerando la bassa solubilità dell'ibuprofene e del reticolo polimerico a base di alginato a questo valore di pH. In generale i pellets contenenti il farmaco cristallino mostrano un più basso rilascio (inferiore al 10%) rispetto ai pellets contenenti la FAE (circa il 10%). Nei pellets contenenti l'IBU solubilizzato nella FAE, il farmaco, probabilmente, si ripartisce in piccola parte dalla fase auto-

emulsificante al gelo acquoso e diffonde attraverso lo strato di acido alginico insolubile; nel caso del farmaco cristallino, il rilascio è mediato dalla limitata solubilità dei cristalli di ibuprofene. Il cambio di pH a valori prossimi alla neutralità (pH 6,8) porta ad un incremento della velocità di rilascio del farmaco attribuibile all'aumentata solubilità dell'ibuprofene e alla progressiva disgregazione del network polimerico in questo fluido. I pellets di alginato e alginato pectina, sia con il farmaco cristallino sia solubilizzato nella FAE, non sono in grado di controllare il rilascio del farmaco: dopo 30 minuti circa il 90% dell'attivo è passato in soluzione. La matrice alginato-pectina presenta al suo interno differenti tipi di legame tra le sue catene (legami, mediati da ioni calcio, tra catene di pectina, tra catene di alginato, tra catene di pectina e di alginato) (Walkenstrom et al. 2003). Questi legami portano alla formazione di un reticolo polimerico avente maglie di dimensioni troppo elevate per rallentare la penetrazione degli ioni sodio nel reticolo polimerico; la veloce sostituzione degli ioni calcio a livello dei legami tra le catene della matrice alginato-pectina è simile a quella osservata per le formulazioni la cui struttura è costituita da solo alginato. I comportamenti differenti di rigonfiamento dei pellets di alginato e dei pellets di alginato-pectina non sembrano avere un effetto sul rilascio dell'attivo: il rapido disgregarsi della struttura di alginato e/o il rapido aumento di solubilità dell'ibuprofene risultano essere i fattori dominanti sul comportamento di rilascio. Diversamente i pellets di alginato-HPC sono capaci di controllare parzialmente il rilascio di ibuprofene; IBU-3 (farmaco cristallino) rilascia il 90% dell'attivo dopo 60 minuti a pH 6,8 e raggiunge il 100% dopo 120 minuti; IBU-4 (IBU in FAE) rilascia il 90% dell'attivo dopo 120 minuti a pH 6,8 e raggiunge il 100% dopo 180 minuti. La matrice sIPN di questi pellets ha un doppio effetto: conferisce più robustezza al reticolo di alginato con conseguente maggior resistenza dei pellets all'erosione e rallenta la diffusione dell'ibuprofene attraverso il reticolo polimerico grazie al processo di rigonfiamento del derivato della cellulosa. Il rilascio di ibuprofene più elevato nei pellets con attivo cristallino è probabilmente dovuto alla solubilizzazione dei cristalli di farmaco superficiali. L'apertura di nuovi punti di ingresso per il fluido

all'interno della matrice provoca un più veloce indebolimento della struttura del reticolo polimerico.

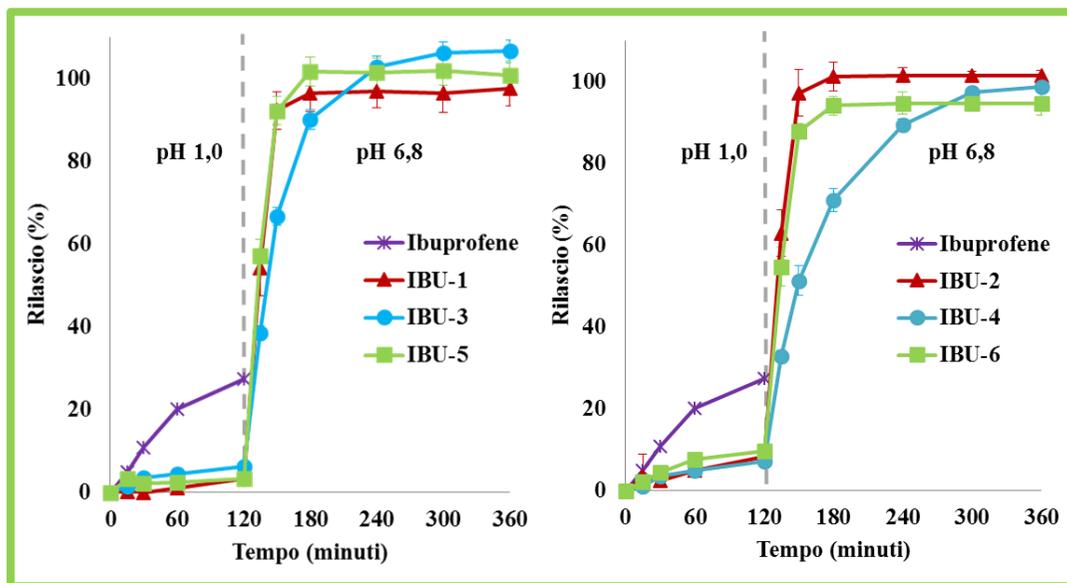


Fig. 22: Profili di rilascio in HCl 0,1 N e tampone fosfato pH 6,8 di ibuprofene tal quale e pellets contenenti ibuprofene.

Per verificare se sia possibile ottenere un controllo del rilascio di ibuprofene più marcato dai sistemi FAE, sono stati prodotti e in seguito testati pellets contenenti maggiori concentrazioni di polimero secondario (rapporto alginato:pectina 1:1 e alginato: HPC 1,2:1). In entrambi i casi, la velocità di rilascio dell'ibuprofene non viene rallentata ulteriormente rispetto a quanto ottenuto in precedenza usando un rapporto alginato:secondo polimero di 2:1. Quantità di polimero secondario più elevate non hanno interferito con il processo di diffusione del farmaco attraverso la matrice polimerica avente differenti proprietà di rigonfiamento..

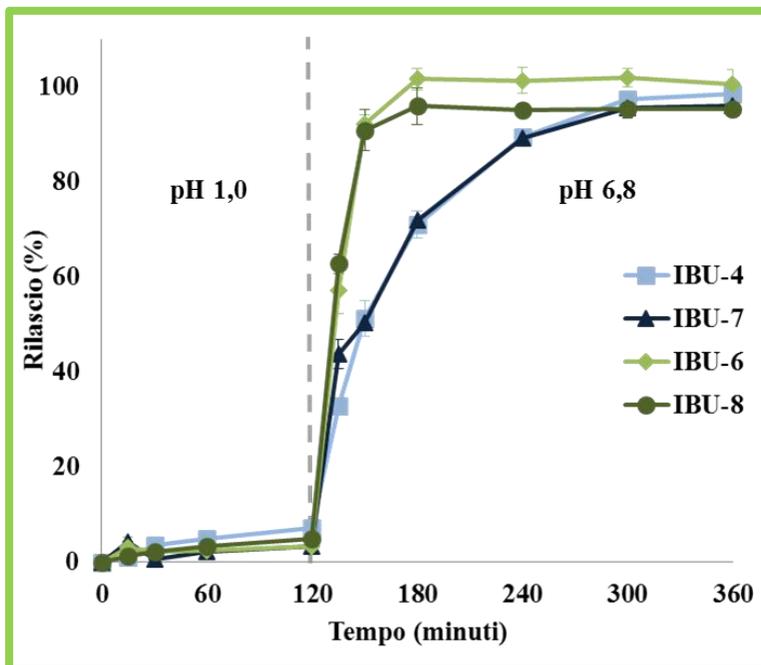


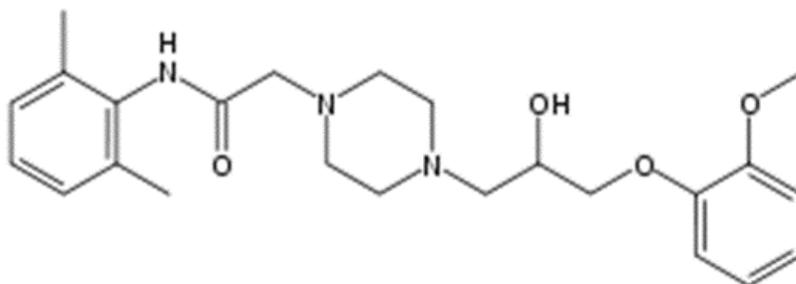
Fig. 23: Profili di rilascio di pellets FAE aventi differenti concentrazioni di polimero secondario.

CONCLUSIONI

I pellets a base di alginato e soluzione auto-emulsificante, preparati per gelazione ionotropica, si sono dimostrati buoni sistemi per la veicolazione di ibuprofene. In particolare le formulazioni messe a punto sono state in grado di limitare il rilascio del farmaco in condizioni di pH simulanti l'ambiente gastrico e di renderlo completamente disponibile in condizioni simili a quelle intestinali. Questi risultati soddisfano uno degli obiettivi del progetto, ovvero la possibilità di ottenere pellets per la somministrazione orale del farmaco nell'ottica di una riduzione degli effetti gastrici avversi. Si è notato, inoltre, che l'uso di idrossipropilcellulosa come polimero secondario permette di ottenere sistemi in grado di controllare in parte la velocità di rilascio dell'ibuprofene a pH 6,8. Sulla base dei risultati fin qui ottenuti, si è deciso di continuare lo studio sui sistemi a base di alginato associato a polimeri secondari. Nuovo scopo è l'adattamento della forma di dosaggio alla veicolazione di ranolazina, un principio attivo differente da quelli già impiegati sia per indicazione terapeutica sia per caratteristiche chimico-fisiche.

RANOLAZINA

INTRODUZIONE



La ranolazina (RNZ) è un derivato della piperazina caratterizzato da una solubilità pH dipendente (la solubilità in ambiente acido è circa 50 volte più elevata della solubilità a pH neutri). La molecola è stata recentemente approvata dalla US Food and Drug Administration (2006) per il trattamento della angina cronica stabile (US FDA). Nei trials, effettuati per ottenere l'autorizzazione all'immissione in commercio del principio attivo, la ranolazina non è sembrata avere effetto sul battito cardiaco o la pressione cardiaca ed è generalmente ben tollerata (Truffa et al. 2011). Il meccanismo d'azione della ranolazina, responsabile della diminuzione del rischio di ischemia nei pazienti affetti da angina stabile, è differente da quello riscontrato per gli antianginici di uso comune (Dobesh et al. 2007). A livello dei ventricoli la molecola inibisce la fase tardiva della corrente di sodio, mentre a livello degli atri vi è anche inibizione del picco della corrente dei canali del sodio; per via degli effetti sui ventricoli la ranolazina sopprime in modo efficace l'aritmia (Paredes-Carbajal et al. 2013) aumentando il tempo che intercorre tra le manifestazioni di angina (Stone et al. 2006). La finestra terapeutica della ranolazina per il trattamento dell'angina è compresa tra 2 e 6 $\mu\text{mol/mL}$ (Chaitman et al. 2004, A); la biodisponibilità orale è del 30-55% e non è influenzata dall'assunzione o meno di cibo; a livello plasmatico la molecola ha un tasso di legame con le proteine del siero di circa il 65% (Chaitman et al. 2004, B). Il farmaco viene rapidamente metabolizzato a livello del fegato, principalmente per azione del citocromo P450 (Reddy et al. 2010); la massima concentrazione plasmatica è raggiunta, tipicamente, dopo 4-6 ore dall'assunzione e

l'emivita della molecola è di circa 7 ore (Dobesh et al. 2007). La breve emivita della ranolazina rappresenta il problema principale della sua somministrazione a scopo terapeutico: per mantenere la concentrazione plasmatica del farmaco entro il range terapeutico è necessario somministrare ripetutamente il farmaco nell'arco della giornata; necessità che può essere poco agevole per i pazienti e che può portare ad una ridotta compliance alla terapia. In letteratura sono riportati alcuni tentativi volti all'ottenimento di forme di dosaggio a rilascio controllato della ranolazina: il principio attivo è stato veicolato in microparticelle (Gowda et al. 2010; Gowda et al. 2011) e compresse (Rahman et al. 2011).

SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo del progetto di ricerca di dottorato sulla ranolazina è stato la verifica della possibilità di utilizzare il sistema a base di alginato per veicolare il principio attivo. La ranolazina si differenzia dai precedenti farmaci per indicazione terapeutica, caratteristiche fisico-chimiche e difetti da migliorare. Si è cercato di sviluppare un sistema multiparticolato a base di calcio alginato capace di impedire il rilascio dell'attivo a livello gastrico, di direzionarlo al sito di maggior assorbimento (l'intestino tenue) e di controllare la velocità del rilascio. Il progetto di ricerca si è articolato in due fasi distinte la prima delle quali è stata svolta presso il Laboratorio di Tecnologia farmaceutica del Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università degli Studi del Piemonte Orientale e la seconda presso l'unità INSERM U1008 della Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques dell'Université Lille 2 Droit et Santé di Lille.

FORMULAZIONE E PRODUZIONE DEI PELLETS

Sviluppo formulativo e produzione dei pellets (Novara)

Lo sviluppo formulativo è partito dall'idea di includere la ranolazina in un sistema di dosaggio preparato sfruttando la tecnica della gelazione ionotropica. Gli idrogeli prodotti sono composti da una miscela di alginato di sodio addizionato di polimeri secondari. Durante la prima fase del progetto è stata verificata la compatibilità della ranolazina con la fase auto-emulsificante (FAE), costituita da Labrasol e TPGS e usata precedentemente per la veicolazione del celecoxib. Si è, quindi verificata la solubilità del farmaco nel Labrasol andando ad aggiungere una quantità accuratamente pesata dell'attivo (dal 5 al 20% p/p) all'eccipiente, agitando vigorosamente i campioni per un tempo appropriato e osservando i campioni allo stereomicroscopio (Motic SMZ-168) per verificare la completa solubilizzazione dei cristalli di ranolazina. In questa fase del progetto di dottorato si è voluto investigare l'impatto di polimeri secondari, aggiunti all'alginato di sodio, sulle caratteristiche di rilascio, di rigonfiamento e di resistenza meccanica dei pellets. A tal proposito è stato valutato l'impiego di idrossipropilcellulosa (HPC), polivinilpirrolidone (PVP K30) e pectina, ovvero di polimeri aventi caratteristiche fisico-chimiche differenti e responsabili, durante il processo di gelazione ionotropica, della formazione di network polimerici con caratteristiche strutturali differenti. L'HPC, essendo un polimero non ionico, durante il processo di gelazione non va incontro a reticolazione né è in grado di formare legami con le catene di alginato; è, invece, responsabile della formazione di una struttura semi-compenetrata (sIPN) in cui le catene di cellulosa sono intrappolate all'interno del reticolo di calcio alginato (Coviello et al. 2007, Matricardi et al. 2013, Alvarez-Lorenzo et al. 2013). In modo simile, l'aggiunta di PVP ad una soluzione di sodio alginato porta alla formazione, in seguito a gelificazione, di una struttura sIPN in cui le catene di PVP sono casualmente distribuite all'interno di un network compatto e continuo di calcio alginato (Doria-Serrano, 2001). La pectina, differentemente, in presenza di ioni

divalenti va incontro a una gelificazione simile a quello dell'alginato. Si possono pertanto ottenere legami di reticolazione mediati dagli ioni calcio tra i residui guluronici di due catene di alginato a formare la tipica struttura a *egg-box* tra i residui galatturonici di due catene di pectina con formazione di una struttura simile a quella a *egg box* dell'alginato, oppure legami tra i gruppi galatturonici della pectina e i gruppi guluronici dall'alginato (Walkenstron et al. 2013).

La fase iniziale di preparazione dei pellets ha previsto la solubilizzazione in acqua di alginato di sodio per ottenere una concentrazione dell'1,5% e in seguito di quantità accuratamente pesate del polimero secondario selezionato; alla soluzione polimerica è stata quindi addizionata la ranolazina cristallina in quantità tale da ottenere una concentrazione del 5% p/p. Dopo aver ottenuto una prima, grossolana, dispersione del farmaco mediante agitazione, la sospensione è stata sonicata in bagno a ultrasuoni per 30 minuti per garantire la formazione di un sistema omogeneo privo di aggregati. La composizione delle formulazioni allestite è riportata in tabella 11.

I pellets di alginato contenenti ranolazina sono stati preparati mediante gelazione ionotropica secondo il protocollo descritto in precedenza per i pellets di celecoxib. Durante il processo di produzione le sospensioni sono state mantenute in agitazione. I pellets sono stati prodotti utilizzando un bagno gelificante di CaCl_2 a concentrazione 100mM o 300mM e un tempo di gelificazione di 15 minuti.

Tab. 11: Composizione delle formulazioni.

FORMULAZIONE	2° POLIMERO	CONCENTRAZIONE	
		2° POLIMERO (%)	CaCl ₂ (mM)
RNZ-N-1	-	-	100
RNZ-N-2	PVP	1,0	100
RNZ-N-3	HPC	1,0	100
RNZ-N-4	HPC	1,5	100
RNZ-N-5	HPC	2,25	100
RNZ-N-6	PECTINA	1,5	100
RNZ-N-7	PECTINA	2,0	100
RNZ-N-8	-	-	300
RNZ-N-9	HPC	1,0	300
RNZ-N-10	HPC	1,5	300
RNZ-N-11	HPC	2,25	300

Rivestimento dei pellets in bassina

Al fine di ottenere formulazioni capaci di limitare il rilascio di principio attivo a pH acidi, sui pellets prodotti è stato applicato un rivestimento gastroresistente costituito da Eudragit L100 (copolimero di acido metacrilico e metil metacrilato 1:1; EU L100), polimero avente solubilità pH dipendente (solubile a pH > 6,0). Come materiale di rivestimento è stata utilizzata una soluzione di EU L100 (5% p/p) e PEG

6000 (1% p/p) in EtOH; il PEG 6000, utilizzato come plasticizzante, è presente in quantità pari al 20% del peso dell'EU L100. Sui pellets, introdotti in bassina riscaldata, è stata spruzzata la soluzione di rivestimento mediante pistola ad aria compressa (pressione di 1,0 bar, velocità di flusso circa 1,5g/min) fino al raggiungimento di un aumento in peso del 20%.

Sviluppo formulativo e produzione dei pellets (Lille)

Presso la Faculté de Pharmacie de Lille sono state messe a punto ulteriori formulazioni di pellets a base di alginato veicolanti ranolazina. La produzione di queste formulazioni è stata effettuata seguendo il protocollo adottato e descritto in precedenza. La composizione delle formulazioni è riportata in tabella 12.

Tab. 12: Composizione delle formulazioni prodotte presso la Faculté de Pharmacie di Lille.

FORMULAZIONE	CONCENTRAZIONE (%)		
	HPC	ALGINATO	RANOLAZINA
RNZ-L-1	-	1,5	5,0
RNZ-L-2	0,5	1,5	5,0
RNZ-L-3	0,65	1,5	5,0
RNZ-L-4	0,75	1,5	5,0
RNZ-L-5	1,0	1,5	5,0

Rivestimento dei pellets

Per il rivestimento dei pellets preparati presso il Laboratorio di Lille sono stati utilizzati due differenti polimeri, Eudragit L100 e Eudragit L30 D-55 (copolimero di acido metacrilico e etil metacrilato 1:1, solubile a $\text{pH} > 5,5$; EU L30 D55). Il rivestimento è stato applicato utilizzando un letto fluido con inserto Wurster (bottom spray) (Aeromatic AG Strea1). EU L30 D-55 si presenta sotto forma di sospensione acquosa al 12,5%. Oltre al polimero gastroresistente, la sospensione contiene talco (50% del peso del polimero) come anti-aderente e trietilcitrato (TEC) (10% del peso del polimero) come plasticizzante. Il materiale di rivestimento contenente EU L100 è stato preparato, invece, solubilizzando il derivato acrilico alla concentrazione del 10% p/p in una miscela di acqua/etanolo 50/50 e aggiungendo alla soluzione TEC (10% del peso del polimero). Entrambe le formulazioni di rivestimento sono state lasciate sotto agitazione per una notte in modo da permettere una completa e uniforme distribuzione delle molecole di plastificante tra le maglie del polimero. Il processo di rivestimento è stato condotto per tempi diversi fino al raggiungimento di un aumento in peso dei pellets del 5, 10, 20 o 30%. Al termine del processo di rivestimento, i pellets sono stati posti in stufa per permettere la formazione di un film omogeneo. I parametri del processo di rivestimento e dello step di curing sono riportati in tabella 13.

Tab. 13: Parametri del processo di rivestimento e di curing dei pellets.

PARAMETRI	EU L30 D-55	EU L100
Ø UGELLO	0,8 mm	0,8 mm
TEMPERATURA ARIA IN ENTRATA	38/42 °C	36/40 °C
TEMPERATURA ARIA IN USCITA	31/33 °C	30/32 °C
TEMPERATURA ARIA INTERNA	36/38 °C	34/36 °C
VELOCITÀ DI FLUSSO ARIA	120 m ³ /h	115 m ³ /h
PRESSIONE	1,2 bar	1,2 bar
VELOCITÀ DI FLUSSO MATERIALE DI RIVESTIMENTO	2 g/min	4 g/min
TEMPERATURA DI ESSICCAMENTO	36/38 °C	34/36 °C
TEMPO DI ESSICCAMENTO	15 min	10 min
CURING	40 °C/2h	60 °C/2h

CARATTERIZZAZIONE DEI PELLETS

Analisi morfologica

Informazioni relative a forma, aspetto della superficie e dimensione dei pellets sono state raccolte per tutte le formulazioni allestite mediante microscopia ottica. Foto dei pellets appena preparati e dopo essiccamento sono state acquisite usando una telecamera montata su uno stereomicroscopio (Moticam 2500 usb e Motic SMZ168, Novara; Zeiss Axiocam ICc1 e Nikon SMZ-U, Lille) e collegata ad un personal computer. Diametri, perimetri e aree di superficie dei pellets sono stati determinati usando il software di analisi dell'immagine ed è stato calcolato il valore di *shape factor* utilizzando l'equazione già riportata. Informazioni dettagliate in merito alla struttura superficiale e struttura interna del batch di pellets prodotto a Lille sono state ottenute mediante microscopia elettronica a scansione (Hitachi S4700) analizzando i campioni sotto vuoto, dopo applicazione di un sottile strato di carbonio.

Contenuto in principio attivo dei pellets

Una quantità accuratamente pesata di pellets, corrispondente a circa 5 mg di principio attivo è stata unita a 25 mL di tampone fosfato a pH 6,8. Il sistema è stato mantenuto sotto agitazione per 2 ore in modo da assicurare la completa estrazione e solubilizzazione della RNZ. La porzione liquida è stata filtrata con filtri in fibra di vetro (diametro dei pori 0,7 μ m) e analizzata con uno spettrofotometro UV/Vis (Perkin Elmer Lambda 35, Novara; a Shimadzu – UV1650PC, Lille) alla lunghezza d'onda di 271 nm. I risultati presentati sono la media di tre determinazioni.

Studi di rigonfiamento in fluidi acquosi: valutazione della percentuale di fluido assorbito

La capacità dei pellets di assorbire fluidi acquosi è stata valutata in HCl 0,1N e tampone fosfato pH 6,8. Gli esperimenti sono stati eseguiti secondo il protocollo descritto in precedenza per i pellets contenenti celecoxib.

Studi di rigonfiamento in fluidi acquosi: valutazione della variazione di diametro

Il rigonfiamento dei pellets posti a contatto con fluidi acquosi è stata valutato in HCl 0,1N e tampone fosfato pH 6,8. Gli esperimenti sono stati eseguiti secondo il protocollo descritto in precedenza per i pellets contenenti celecoxib.

Studi di rilascio *in vitro*

Gli studi *in vitro* di rilascio della ranolazina dalle formulazioni allestite sono stati condotti usando un dissolutore Sotax AT7 Smart equipaggiato con sistema di agitazione a cestello (apparatus 1, European Pharmacopoeia) impostato ad una velocità rotazionale di 100 RPM ed a una temperatura di lavoro di 37 °C. I test di rilascio sono stati effettuati su quantità di formulazione corrispondenti a 18 mg di RNZ seguendo due protocolli differenti: nel primo, i saggi sono stati effettuati in HCl 0,1N (500 mL) o in di tampone fosfato pH 6,8 (500 mL) senza cambio di pH del fluido di ricevente; nel secondo i pellets, dopo 120 minuti di contatto con HCl pH 1,0 (500 mL), sono stati trasferiti in 500 mL di tampone fosfato a pH 6,8. Campioni di fluido ricevente sono stati prelevati ad intervalli di tempo predeterminati e analizzati per via spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 271 nm. I risultati sono la media di tre determinazioni.

RISULTATI E DISCUSSIONE PELLETS RNZ-N

Undici differenti formulazioni contenenti ranolazina sono state preparate mediante gelazione ionotropica di sistemi a base di alginato. Tali sistemi si differenziano tra di loro per la natura del polimero secondario, per la concentrazione del polimero secondario e per differente concentrazione di agente gelificante utilizzato nel processo di formazione dei pellets. La ranolazina in seguito ai test di solubilità è risultata essere praticamente insolubile in Labrasol e il principio attivo è stato caricato all'interno delle formulazioni in forma cristallina.

I pellets essiccati si presentavano bianchi opachi, di forma generalmente sferica e con superficie rugosa leggermente brillante su cui è possibile osservare la presenza di cristalli di farmaco. Dalle immagini riportate in figura 24 è evidente che maggiori quantità di polimero secondario nella formulazione inducono una diminuzione della sfericità dei pellets. Questo fenomeno è particolarmente evidente per le formulazioni RNZ-N-3, RNZ-N-4 e RNZ-N-5, contenenti rispettivamente HPC allo 0,75%, 1,5% e 2,25%; CaCl₂ 100mM. I pellets RNZ-N-3 mostrano forma regolare mentre le altre formulazioni, contenenti quantità più elevate di HPC, hanno forma progressivamente più irregolare. Quantità di polimero crescenti nella formulazione portano a sospensioni di viscosità crescenti; l'aumento di viscosità, è responsabile della formazione di gocce meno sferiche e più allungate, durante l'erogazione della sospensione dall'ago nel bagno gelificante. Caratteristiche simili possiedono le formulazioni RNZ-N-9, RNZ-N-10 e RNZ-N-11 che contengono quantità crescenti di HPC e che sono state preparate utilizzando CaCl₂ 300mM.

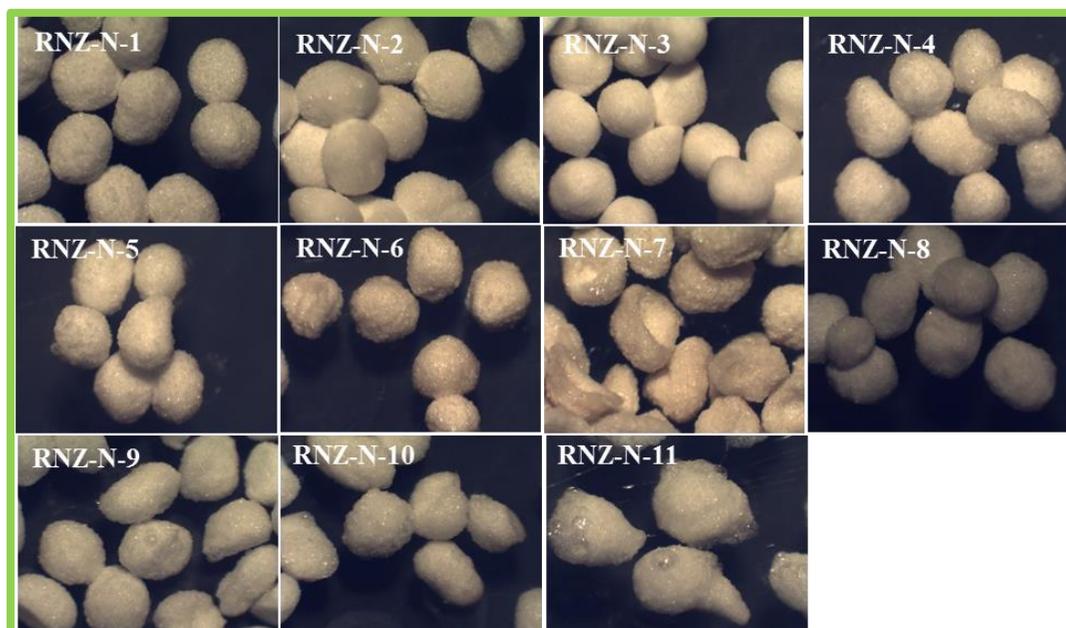


Fig. 24: Stereomicrofotografie di pellets essiccati contenenti ranolazina.

Un caso particolare è rappresentato dai pellets RNZ-N-7 (pectina al 2%) che presentavano forma decisamente irregolare, caratterizzata dalla presenza di una concavità centrale; la formazione della cavità è attribuibile ad una organizzazione differente della struttura del reticolo alginate causata dalla presenza di pectina. L'elevata quantità di pectina rispetto all'alginato (rapporto alginato:pectina 3:4) determina la formazione di un reticolo a maglie larghe, lasso e meccanicamente poco resistente. Questo fenomeno è riportato in letteratura: i geli di alginato-pectina sono caratterizzati dalla presenza di pori di dimensioni più elevate (diametro dei pori nell'ordine dei micrometri) rispetto alle dimensioni dei pori dei geli di solo alginato (diametro dei pori nell'ordine dei nanometri) (Walkenstrom et al. 2003). Durante il processo di essiccamento, l'allontanamento dell'acqua porta alla contrazione asimmetrica della struttura reticolare e alla formazione di pellets non sferici.

La caratterizzazione è stata inizialmente effettuata sui pellets RNZ-N-1, RNZ-N-2, RNZ-N-3, RNZ-N-4, RNZ-N-6 e RNZ-N-7 non rivestiti e preparati con un bagno gelificante 100mM e contenenti solo alginato, alginato e PVP, alginato e HPC e alginato e pectina. La caratterizzazione dei pellets non rivestiti non è stata effettuata su tutti i sistemi: appurata la necessità dell'applicazione di un rivestimento polimerico gastroresistente sui pellets, una parte dei sistemi è stata sottoposta immediatamente al processo di filmatura senza caratterizzarli precedentemente. Il diametro medio dei pellets variava tra 1400 μm e 1680 μm circa (tab. 14) e le dimensioni aumentavano all'aumentare della concentrazione del secondo polimero nella formulazione, come risulta dal confronto fra le formulazioni RNZ-N-3, RNZ-N-4 (contenenti HPC) e RNZ-N-6, RNZ-N-7 (contenenti pectina). L'aumento di concentrazione di HPC dall'1% al 1,5% aumenta il diametro da 1400 μm a 1550 μm circa; l'aumento di concentrazione di pectina dall' 1,5% al 2% aumenta il diametro da 1440 μm a 1680 μm circa. L'incremento dimensionale è imputabile a due cause: la viscosità delle formulazioni che aumenta proporzionalmente alla concentrazione di polimero secondario e che porta alla formazione di gocce di grande dimensione; l'erogazione di gocce costituite da una più elevata quantità di materiale solido, che, dopo gelificazione ed essiccamento, occupa un volume più grande.

Lo *shape factor* calcolato per le differenti formulazioni ha valori compresi tra 0,75 e 0,79. Similarmente a quanto osservato in precedenza per le formulazioni veicolanti celecoxib o ibuprofene, i valori di *shape factor* sono significativamente diversi da quello tipico di una particella sferica (1). Il contorno irregolare dei pellets è responsabile della sovrastima perimetro misurato dal programma di elaborazione immagini e conseguentemente dell'abbassamento del valore di *shape factor*. Questa diminuzione ha l'effetto di smorzare le differenze osservabili tra le diverse formulazioni. Nel caso della formulazione RNZ-N-7, non è stato calcolato il valore di *shape factor* inn quanto questi pellets sono di forma molto irregolare. L'equazione dello *shape factor* non è in grado di discriminare le concavità presenti nell'oggetto.

Tab. 14: Contenuto di ranolazina, diametro e *shape factor* di pellets a base d'alginato non rivestiti.

FORMULAZIONE	TITOLO RANOLAZINA (%)	DIAMETRO (μm)	SHAPE FACTOR
RNZ-A-1	71,0 \pm 0,3	1521,7 \pm 72,3	0,79
RNZ-A-2	62,2 \pm 0,2	1617,7 \pm 120,8	0,77
RNZ-A-3	59,8 \pm 1,3	1395,8 \pm 152,2	0,77
RNZ-N-4	57,9 \pm 1,1	1553,0 \pm 132,1	0,75
RNZ-N-5	-	-	-
RNZ-N-6	50,3 \pm 1,0	1440,9 \pm 89,2	0,78
RNZ-N-7	48,7 \pm 1,2	1680,5 \pm 239,1	-

Il titolo in principio attivo delle formulazioni varia dal 71,0% (pellets contenenti solo alginato) al 48,7% (pellets contenenti alginato e pectina al 2%); a quantità crescenti di polimero secondario corrispondono contenuti di ranolazina decrescenti.

Parte delle formulazioni sono state testate per verificare il comportamento di rilascio in HCl 0,1N e determinare il loro possibile utilizzo per controllare il rilascio del farmaco (fig. 25).

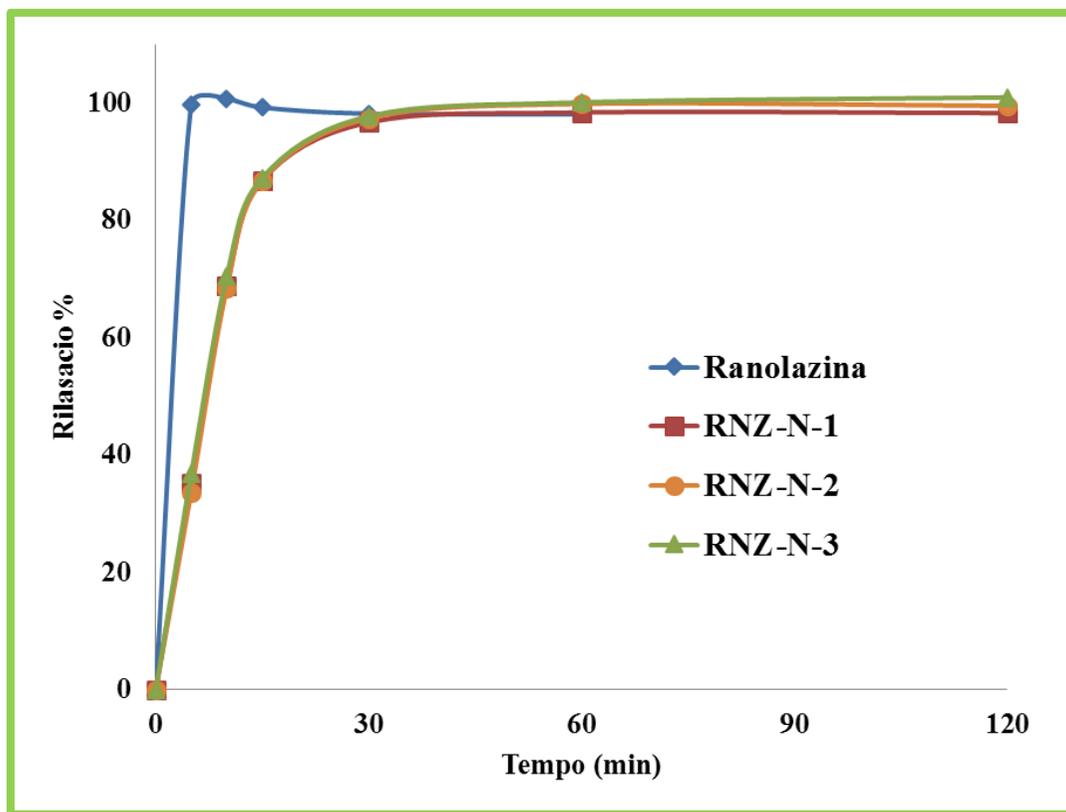


Fig. 25: Profili di rilascio di pellets veicolanti ranolazina in HCl 0,1N pH 1,0.

I risultati ottenuti mostrano che, a pH acidi le formulazioni non sono in grado di esercitare un controllo sul processo di rilascio della ranolazina. I cristalli di principio attivo solubilizzano più lentamente quando caricati nella matrice dei pellets rispetto a quanto osservato per il farmaco tal quale, ma la liberazione della ranolazina avviene velocemente, a prescindere dalla composizione della matrice polimerica; probabilmente l'elevata solubilità del farmaco a pH acidi ha un'influenza maggiore sul comportamento di rilascio rispetto alla formulazione.

Questo risultato ha indicato la necessità di applicare sulla superficie dei pellets un rivestimento polimerico gastroresistente per minimizzare il rilascio del farmaco in ambiente acido. Il materiale di rivestimento (Eudragit L100, solubile a $\text{pH} \geq 6,0$) è

costituito da una soluzione etanolica del polimero metacrilico plasticizzato con PEG 6000; la soluzione etanolica è stata agevolmente spruzzata usando una pistola ad aria compressa su quantità di pellets esattamente pesate e mantenute in movimento in una bassina. Questa tecnica di rivestimento e l'apparecchiatura utilizzata non hanno permesso di controllare in modo accurato alcuni parametri di processo come la temperatura a cui sono mantenuti i pellets e la velocità di flusso del getto spray. In figura 26 sono riportate le foto acquisite allo stereomicroscopio delle formulazioni rivestite.

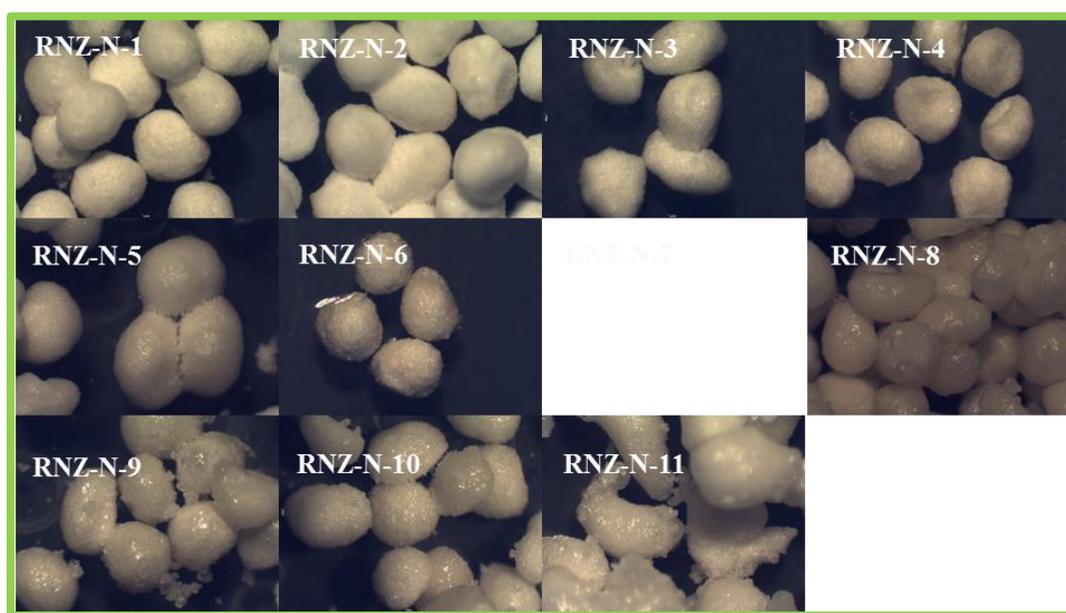


Fig. 26: Stereomicrofotografie di pellets a base di alginato veicolanti ranolazina rivestiti con Eudragit L100.

Il processo di filmatura è stato effettuato su tutti i pellets ad eccezione dei RNZ-N-7 (pectina al 2%); a causa della forma concava delle particelle ottenute dopo essiccamento. La forma dei pellets non viene alterata dal processo di rivestimento a cui i sistemi sono stati sottoposti. L'aspetto dei pellets viene invece modificato: la

superficie diviene più uniforme e meno rugosa mentre il colore diventa più lucido e meno intenso. In tabella 15 sono riportati il contenuto in principio attivo, il diametro e lo *shape factor* dei pellets rivestiti.

Tab. 15: Contenuto in principio attivo, il diametro e lo *shape factor* dei pellets rivestiti con Eudragit L100.

FORMULAZIONE	TITOLO RANOLAZINA (%)	DIAMETRO (μm)	SHAPE FACTOR
RNZ-A-1	65,7 \pm 0,6	1494,2 \pm 54,8	0,79
RNZ-A-2	58,9 \pm 1,1	1600,0 \pm 117,5	0,78
RNZ-A-3	50,9 \pm 1,1	1401,9 \pm 102,2	0,77
RNZ-N-4	44,7 \pm 0,9	1538,6 \pm 116,7	0,75
RNZ-N-5	39,9 \pm 0,9	1713,0 \pm 234,1	0,74
RNZ-N-6	50,9 \pm 0,6	1431,1 \pm 145,9	0,78
RNZ-N-8	39,5 \pm 0,7	1346,5 \pm 100,7	0,78
RNZ-N-9	34,6 \pm 0,7	1520,2 \pm 122,5	0,80
RNZ-N-10	36,8 \pm 0,5	1553,0 \pm 132,1	0,75
RNZ-N-11	39,5 \pm 0,5	1460,7 \pm 144,3	0,78

Confrontando i pellets rivestiti e i pellets non rivestiti si osserva la diminuzione in titolo del principio attivo nei primi rispetto ai secondi. Questo è facilmente spiegabile considerando come l'applicazione del rivestimento sui pellets comporti inevitabilmente la diminuzione della percentuale di ranolazina rispetto al peso totale. Più interessante è notare come l'applicazione del film di rivestimento non alteri in modo significativo il diametro dei pellets ad indicare che il film polimerico applicato

è molto sottile. Inoltre questo strato aderisce bene sulla superficie dei pellets e non provoca alterazioni significative del contorno del pellet con conseguente limitate variazioni del valore di *shape factor*.

Studi di rigonfiamento sono stati effettuati sui pellets rivestiti allo scopo di verificare se la presenza del film di rivestimento e/o la diversa composizione polimerica fossero in grado modificare significativamente la capacità dei sistemi di assorbire fluidi acquosi. In figura 27 sono messi a confronto i risultati ottenuti per i pellets rivestiti e privi del rivestimento delle formulazioni RNZ-N-1, RNZ-N-2 e RNZ-N-3 (costituiti da solo alginato, alginato e PVP K30 1% o alginato e HPC 1%). In ambiente acido si è osservato un aumento in peso limitato per questi pellets (meno del 100% dopo 2 ore); i pellets non rivestiti raggiungono la percentuale massima di rigonfiamento dopo solo 5 minuti di contatto con l'HCl; i pellets rivestiti, sebbene abbiano mostrato un valore massimo di assorbimento paragonabile, hanno raggiunto il valore di picco più lentamente (circa 30 minuti). Il rallentamento causato dalla presenza dello strato di rivestimento è stato osservabile in maniera ancora più marcata nei test effettuati in tampone fosfato. In generale, l'aumento in peso è stato elevato (si supera il 200% per ogni formulazione), ed è seguito, nel caso delle formulazioni RNZ-N-1 e RNZ-N-2, da una marcata riduzione di peso che si manifesta dopo circa 60 minuti.

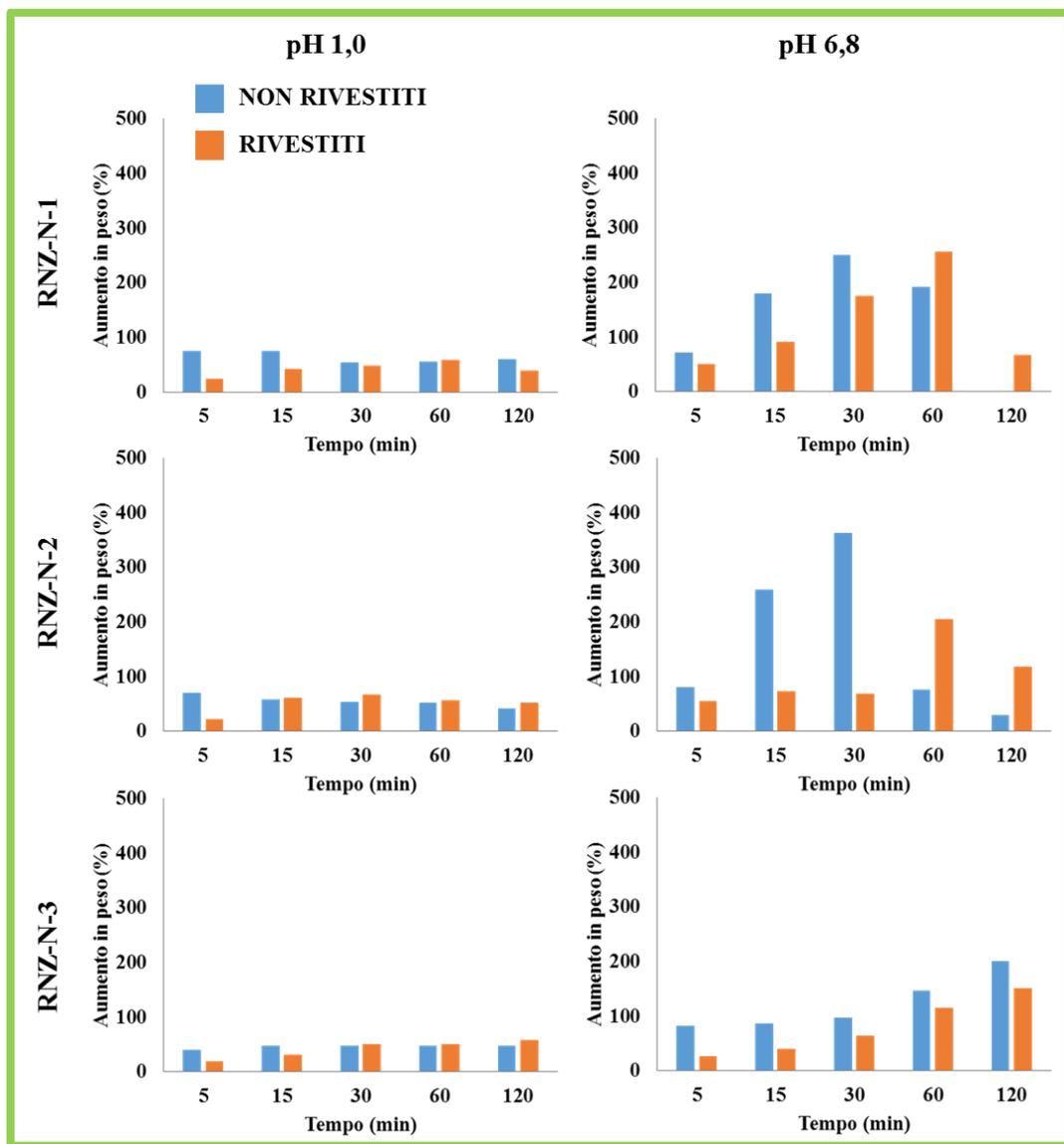


Fig. 27: Rigonfiamento in peso di pellets rivestiti e non rivestiti in HCl 0,1N e tampone fosfato pH 6,8.

A pH 6,8 la riduzione di peso è iniziata tra i 30 e i 60 minuti; tale ritardo è causato dalla lenta e parziale solubilizzazione del polimero di rivestimento. L'andamento del processo di rigonfiamento non varia ma è solamente rallentato; sulla base di questa osservazione è ipotizzabile che il processo di filmatura non alteri le caratteristiche

strutturali del reticolo polimerico del pellets. In figura 28 sono stati riportati i risultati dei saggi di rigonfiamento ottenuti in ambiente acido per tutti i pellets rivestiti.

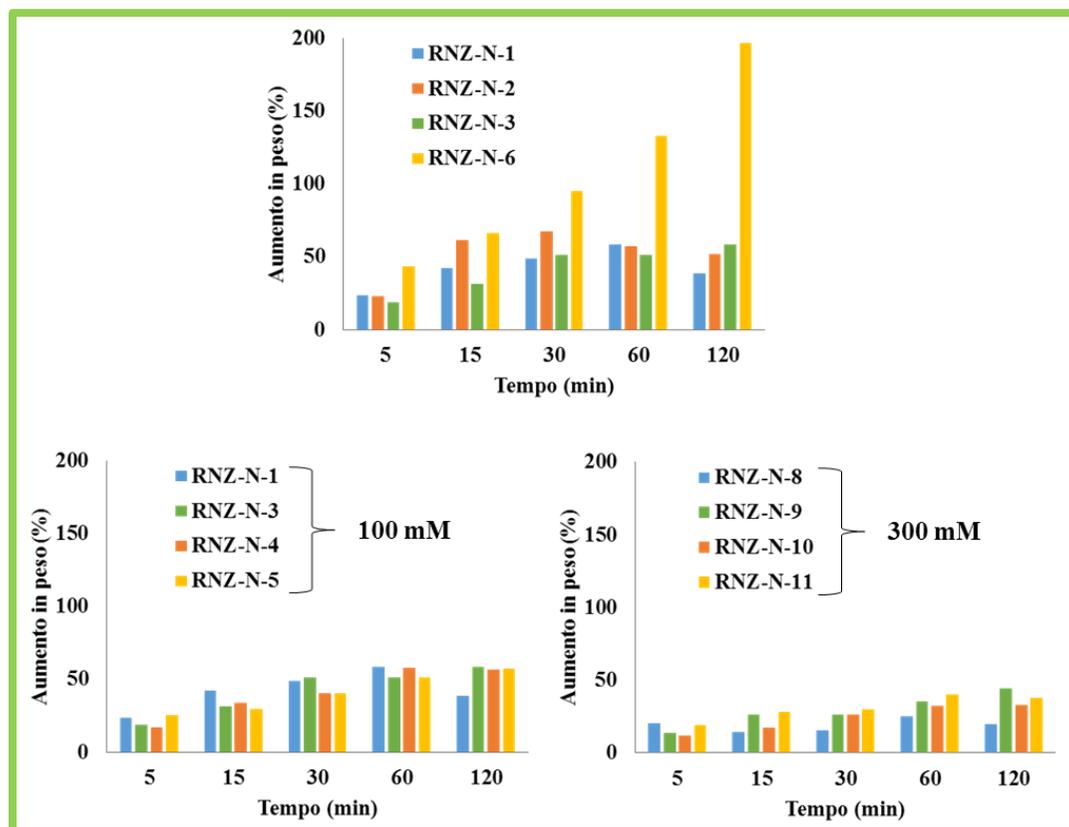


Fig. 28: Rigonfiamento in peso dei pellets a base di alginato veicolanti ranolazina e rivestiti con Eudragit L100 in HCl 0,1N pH 1,0.

Come osservato in precedenza per i pellets veicolanti celecoxib e ibuprofene, il rigonfiamento in HCl è generalmente limitato. La presenza del rivestimento sulla superficie dei pellets e l'eventuale formazione di acido alginico a partire da alginato di calcio agiscono come fattore limitante del processo di rigonfiamento. Il sistema contenente pectina (RNZ-N-6) ha un comportamento diverso da quello degli altri sistemi. RNZ-N-6 dopo 5 minuti mostra un rigonfiamento doppio rispetto agli altri

pellets, il peso non raggiunge un plateau ma continua ad aumentare durante tutta la durata del test. Differenti fattori concorrono a provocare questo comportamento: il processo di rivestimento porta alla formazione di un film non sufficientemente omogeneo e completo, incapace di impedire l'ingresso di HCl all'interno della matrice; la deposizione di un film irregolare su questi pellets è probabilmente dovuta alla struttura del sistema e alle irregolarità morfologiche della superficie dei pellets. Il reticolo polimerico formato dall'intreccio di alginato e pectina, come visto in precedenza non è particolarmente robusto. La formazione di legami tramite gli ioni calcio tra catene di alginato e catene di pectina porta alla formazione di un reticolo con maglie relativamente grandi, che permettono il passaggio di grandi quantità di fluido. Infine l'elevata solubilità della ranolazina crea spazi vuoti che possono essere occupati dal fluido. Osservando e comparando le formulazioni preparate utilizzando CaCl_2 100mM e con quelle ottenute utilizzando CaCl_2 300mM si nota che quest'ultime rigonfiano meno: il peso delle formulazioni RNZ-N-1, RNZ-N-3, RNZ-N-4 e RNZ-N-5 (100mM) aumenta di circa il 50%, mentre per le formulazioni RNZ-N-8, RNZ-N-9, RNZ-N-10 e RNZ-N-11 (300mM) l'incremento in peso è compreso tra il 25 e il 30%. Durante il processo di gelificazione, la più elevata concentrazione di ioni calcio nel bagno gelificante, porta alla formazione di un reticolo di calcio alginato caratterizzato da una più elevata densità e quindi di una struttura più compatta, a maglie più strette che oppone maggior resistenza alla penetrazione di fluido. In tampone fosfato a pH 6,8 (fig. 29); per tutte le formulazioni le percentuali di rigonfiamento maggiori sono superiori a quelle osservate in ambiente acido: ad eccezione delle formulazioni contenenti HPC, il peso dei pellets aumenta proporzionalmente al tempo e raggiunge il valore di picco dopo un'ora di contatto col fluido; dopo tale tempo il loro peso diminuisce. Come già osservato per i pellets veicolanti celecoxib o ibuprofene, nel fluido a pH neutro, il reticolo polimerico va incontro ad un processo di erosione dovuto alla dissoluzione progressiva delle strutture *egg box* dell'alginato. Le formulazioni contenenti solo alginato, alginato-PVP e alginato-pectina (RNZ-N-1, RNZ-N-2, RNZ-N-6) non essere possiedono

resistenza meccanica sufficiente a impedire il processo d'erosione. La matrice sIPN dei pellets alginato-HPC (Karewicz et al. 2010) è, invece, sufficientemente robusta da limitare la solubilizzazione dei sistemi per tutta la durata del saggio. La combinazione di bassa velocità di assorbimento di acqua legato al componente cellulosico e di elevata compattezza del sistema, determina un incremento graduale del peso dei pellets e una limitata disgregazione del reticolo polimerico. Differenze marcate nel comportamento di rigonfiamento sono state osservate solamente per pellets costituiti da solo alginato (RNZ-N-1 e RNZ-N-8) prodotti con bagni gelificanti a diversa concentrazione di CaCl_2 . RNZ-N-1 (100mM) mostra un livello massimo di rigonfiamento pari a circa il 250% dopo 60 minuti di test, per poi perdere velocemente peso; RNZ-N-8 (300 mM) invece aumenta gradualmente di peso per l'intera durata del test raggiungendo dopo 120 minuti incremento in peso di circa il 100%. Utilizzando come gelificante CaCl_2 300mM si ottiene una matrice polimerica più resistente all'erosione e più compatta che rallenta la penetrazione del fluido al suo interno.

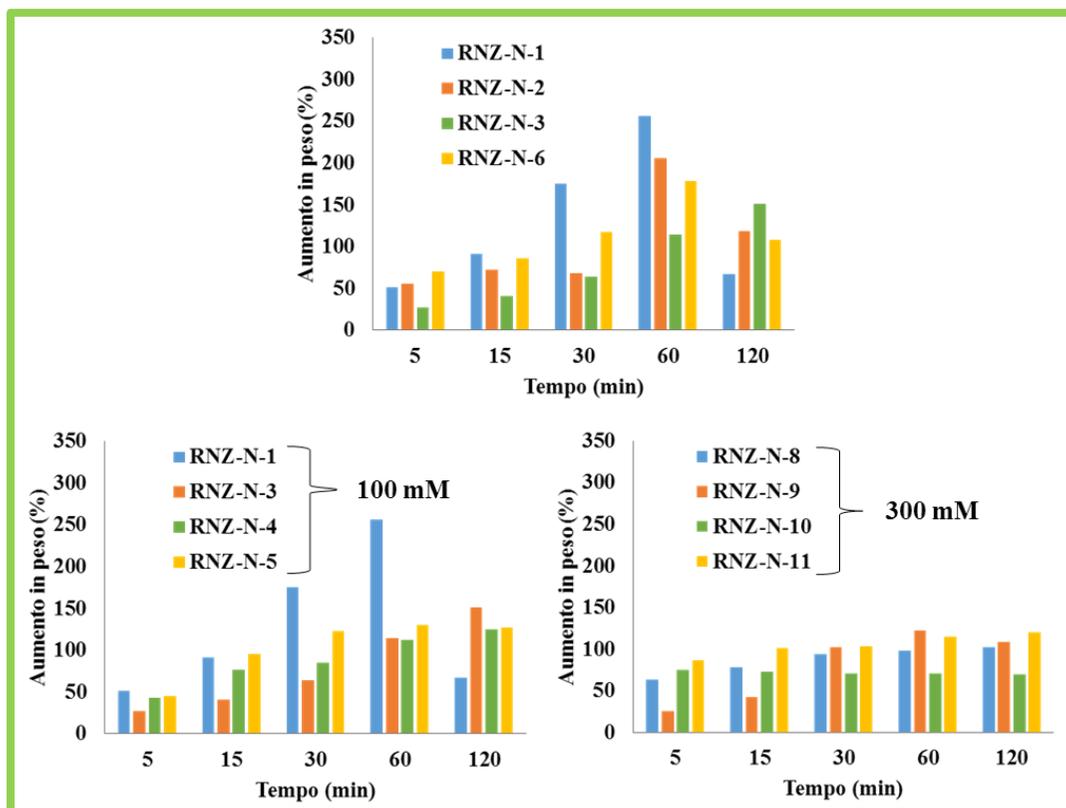


Fig. 29: Rigonfiamento in peso in tampone fosfato a pH 6,8 delle formulazioni rivestite con Eudragit L100.

Il comportamento di rigonfiamento dei pellets contenenti HPC e preparati con soluzioni gelificanti a concentrazioni diverse è più simile. L'assorbimento di fluido da parte di tutti i sistemi è graduale e si protrae per l'intera durata del test. Diversa è relativa l'entità assoluta del fenomeno; infatti le formulazione preparate col bagno gelificante 100mM mostrano un incremento in peso compreso tra il 100 e il 150%, mentre le formulazioni preparate col bagno 300mM rigonfiano più lentamente e alla fine del test i valori massimi di rigonfiamento sono compresi tra il 50 e il 100%.

Per acquisire ulteriori informazioni in merito alla capacità di rigonfiamento dei pellets è stato anche valutato l'aumento dimensionale in seguito a contatto con i fluidi acquosi (HCl 0,1N pH 1,0; tampone fosfato pH 6,8). Questo saggio è stato impiegato

per confrontare il comportamento all'imbibizione di pellets non rivestiti e rivestiti con polimero gastroresistente. La figura 30 mostra i risultati ottenuti.

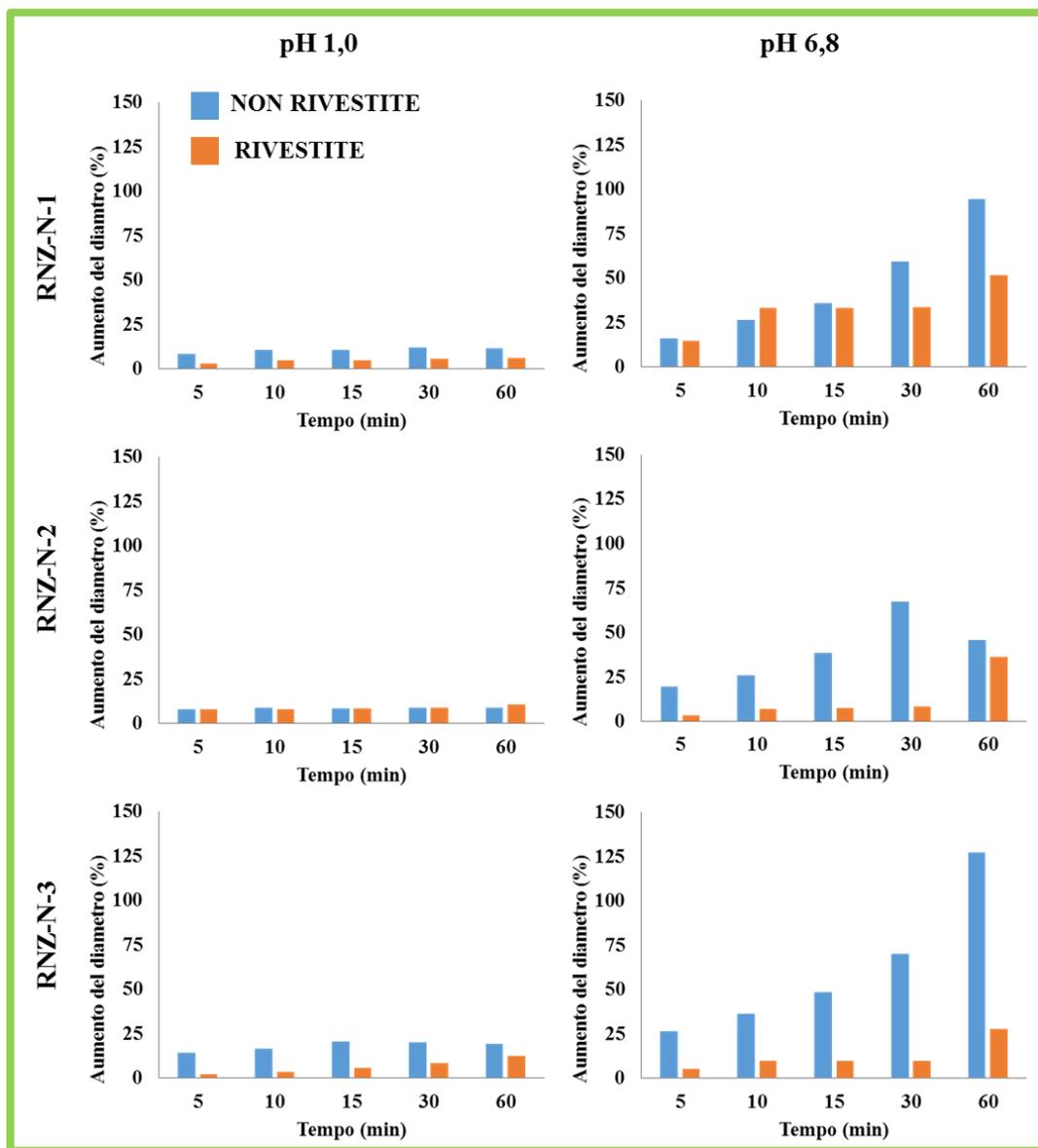


Fig. 30: Aumento del diametro di pellets rivestiti e non rivestiti in HCl 0,1N e tampone fosfato pH 6,8.

Come già osservato, in precedenza il rigonfiamento dei pellets è fortemente influenzato dal fluido con cui le formulazioni sono messe in contatto. In ambiente acido, in seguito alla formazione di acido alginico, il rigonfiamento è limitato (inferiore al 25%) (figura 31) ed è legato all'azione sinergica del film di polimero gastroresistente insolubile a pH acido e dell'acido alginico formatosi in seguito al limitato contatto dei pellets col fluido di rigonfiamento. L'aumento percentuale di diametro dei pellets non supera mai il 15% e nel caso di diverse formulazioni il 10%. A causa dell'entità ridotta del rigonfiamento non è possibile osservare delle variazioni significative nel comportamento dei differenti pellets.

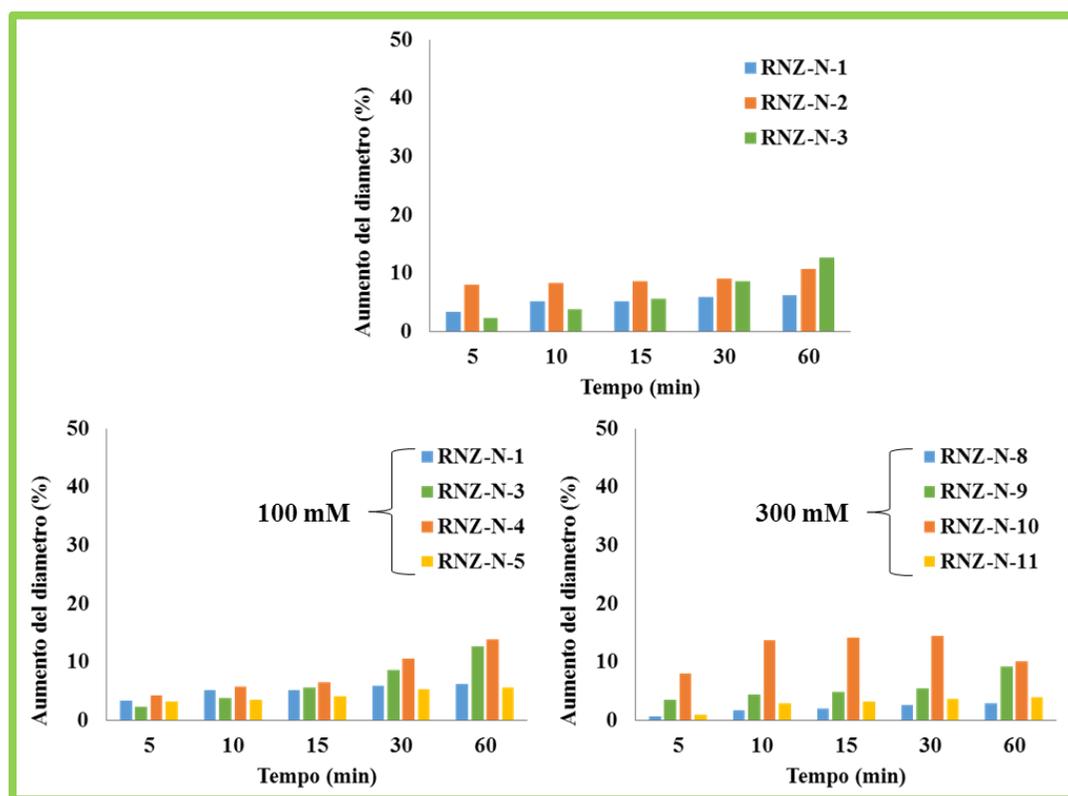


Fig. 31: Aumento del diametro di pellets rivestiti con Eudragit L100 in HCl 0,1N pH 1,0.

A pH più elevati, l'incremento dimensionale dei pellets è elevato ed è possibile osservare un ritardo nel processo di rigonfiamento legato alla presenza del film di rivestimento. In ambiente neutro (pH 6,8), i pellets rigonfiano fino a raggiungere dei valori massimi di circa il 50% per RNZ-N-1 non rivestita (solo alginato), del 40% per RNZ-N-2 (alginato e PVP) e del 30% per RNZ-N-3 (alginato e HPC) dopo 60 minuti di test (figura 32). Si osserva un limitato aumento di diametro dopo 10 minuti in tampone seguito da un plateau per i successivi 20/30 minuti; dopo 60 minuti vi è un'ulteriore aumento del diametro. Questi risultati sono spiegabili considerando che, a causa del film di rivestimento, nella prima fase del test solo una ridotta quantità di fluido riesce ad entrare in contatto con la matrice con conseguente ridotto aumento dimensionale. Dopo circa 30 minuti, il film polimerico è stato sufficientemente eroso da non essere più in grado di limitare l'ingresso del tampone fosfato nei pellets e, conseguentemente, il diametro dei pellets aumenta in modo significativo. L'utilizzo di una concentrazione maggiore di ioni calcio (300 mM) porta alla formazione di un reticolo con più legami e più compatto che risulta in un rigonfiamento ed un aumento di diametro più contenuto. I pellets contenenti HPC rigonfiano generalmente meno velocemente rispetto ai pellets di solo alginato. Unica eccezione è il sistema RNZ-N-10 (HPC 1,5%, CaCl₂ 300mM) che raggiunge valori percentuali di aumento di diametro più elevati rispetto a RNZ-N-8 (solo alginato, CaCl₂ 300mM). Questo comportamento anomalo potrebbe essere causato da un processo di filmatura errato che ha portato alla formazione di un film disomogeneo.

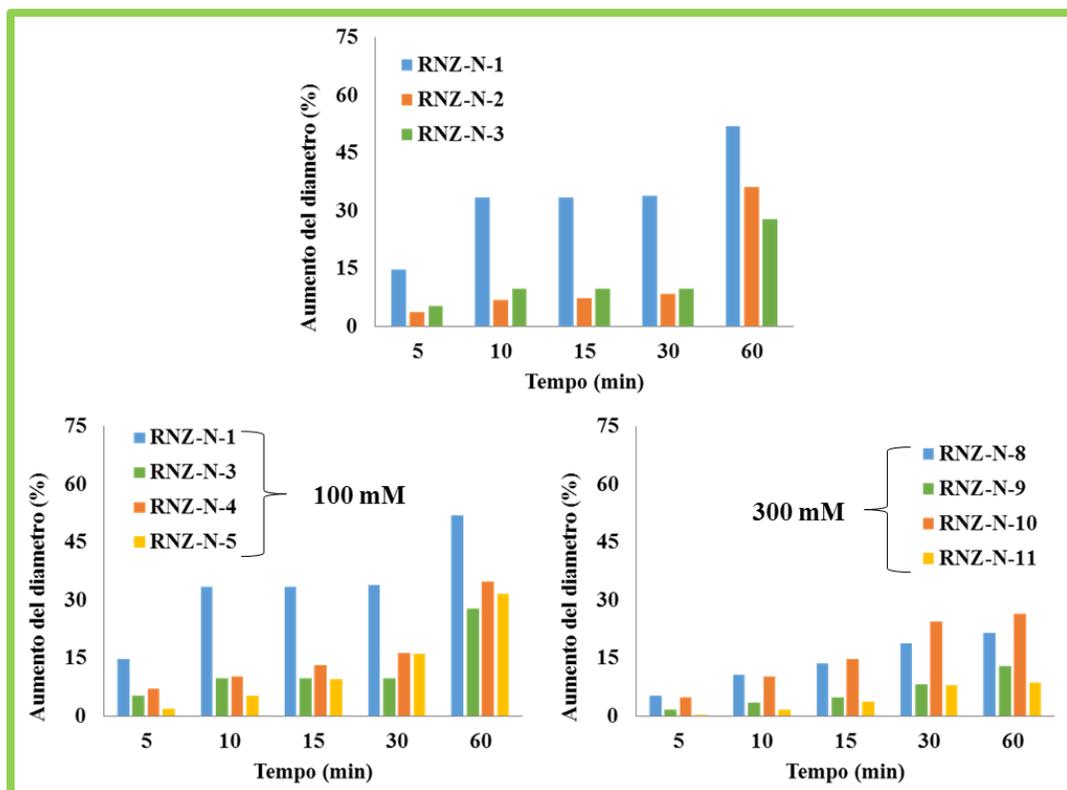


Fig. 32: Aumento del diametro di pellets rivestiti con Eudragit L100 (tampone fosfato pH 6,8).

Dai profili di rilascio ottenuti tramite test *in vitro* (figura 33) si può osservare come l'efficacia del processo di rivestimento vari considerevolmente a seconda della composizione della matrice polimerica dei pellets. La matrice dei pellets di solo alginato e alginato-HPC risulta essere adatta all'applicazione del film di rivestimento, il materiale gastroresistente si dimostra poco efficace nel ricoprire i pellets alginato-pectina e alginato-PVP. Il rivestimento applicato su RNZ-N-2, RNZ-N-6 non è in grado di impedire il rilascio del farmaco in ambiente acido (dopo 2 ore più dell'80% della ranolazina è in soluzione) ma solo di rallentarlo rispetto alle formulazioni non rivestite. Questo è dovuto probabilmente dalla presenza di un film gastroresistente non omogeneo, caratterizzato da pori e fessure: l'incompleta

formazione del film imputabile sia alle caratteristiche di irregolarità morfologica della superficie di questi pellets sia alla natura lassa della matrice che permette l'assorbimento parziale del materiale di rivestimento all'interno del pellet. I pellets contenenti alginato e alginato-HPC hanno prodotto risultati soddisfacenti anche se non ottimali. Dopo due ore dall'inizio del test in HCl, la quantità di farmaco liberato dai sistemi è compresa tra il 10% e il 22%. Questo risultato rappresenta un netto miglioramento rispetto a quello ottenuto con i pellets non rivestiti ma la quantità di farmaco rilasciata è per alcuni sistemi pari o superiore al limite generalmente accettato. L'osservazione allo stereomicroscopio ottico ha evidenziato la presenza di imperfezioni del film polimerico che permettono il passaggio del fluido con conseguente solubilizzazione parziale dei cristalli di ranolazina. Si può supporre che l'utilizzo di un apparecchio per la filmatura che consente di controllare in modo più accurato e preciso i parametri di processo possa permettere di superare i problemi riscontrati.

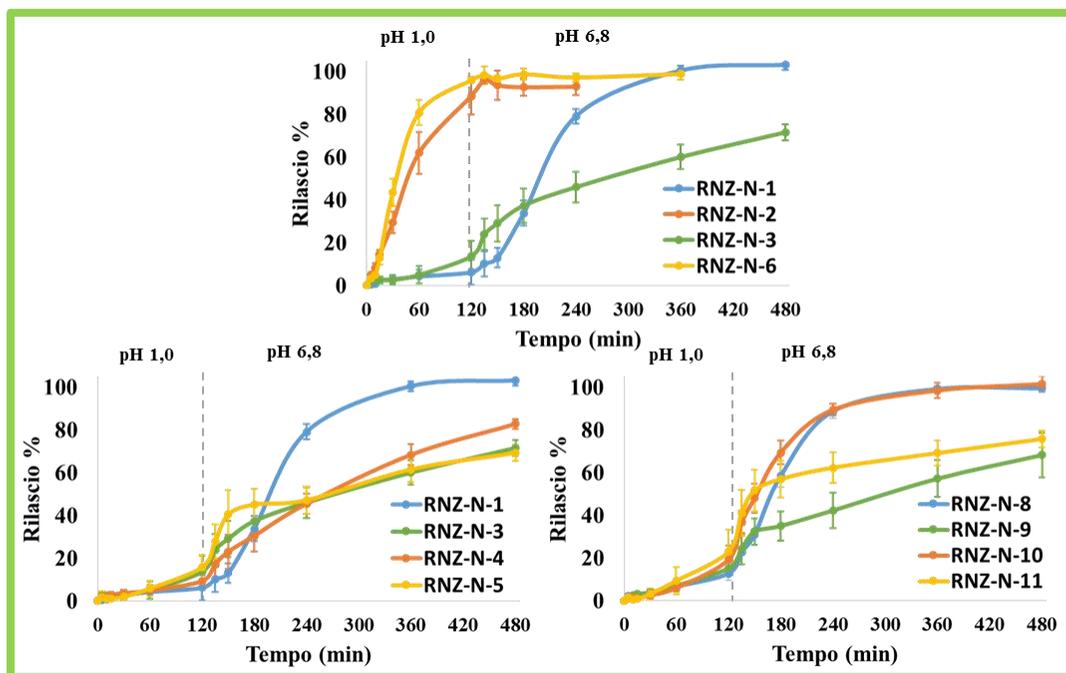


Fig. 33: Profili di rilascio di pellets rivestiti in HCl 0,1N pH 1,0 e tampone fosfato pH 6,8.

In tampone fosfato a pH 6,8 i pellets costituiti da solo alginato (RNZ-N-1, RNZ-N-8) non sono in grado di controllare il rilascio del farmaco: dopo 2 ore l'80% della ranolazina veicolata nei pellets è presente in soluzione. Non si osservano differenze di comportamento tra i sistemi preparati con bagni gelificanti a concentrazione di CaCl_2 differente; la maggior reticolazione indotta dal CaCl_2 300mM non influenza in modo significativo il comportamento di rilascio. Più interessanti i risultati ottenuti con i pellets contenenti HPC: RNZ-N-3 e RNZ-N-9, i sistemi in cui il rapporto alginato:HPC è 3:2, mostrano che dopo i primi 30 minuti in tampone fosfato in cui viene rilasciato circa il 20% del farmaco totale, la velocità di liberazione dell'attivo rallenta e diviene costante. Il *burst effect* osservato al cambio di pH è probabilmente causato dalla veloce solubilizzazione del film gastro-resistente: la porzione di ranolazina dispersa molecularmente negli strati superficiali della matrice viene liberata nel fluido di rilascio. Durante i minuti seguenti avviene il rigonfiamento della

matrice sIPN, la quale gelificando esercita un'azione di controllo sul rilascio dovuto alla solubilizzazione della ranolazina presente nella matrice in forma cristallina. Le matrici prodotte utilizzando quantità più elevate di HPC non sono in grado di esercitare un migliore controllo sul processo di liberazione del farmaco. Infine, nel caso dei sistemi preparati col bagno gelificante meno concentrato (CaCl_2 100mM) i RNZ-N-3, RNZ-N-4 e RNZ-N-5 (alginato:HPC 3:2, 1:1, 2:3) i profili di rilascio sono sostanzialmente simili. L'aumento della proporzione di HPC rispetto all'alginato non ha effetti rilevanti sulla cinetica di liberazione della ranolazina; in seguito a questa osservazione si è considerato come ottimale il sistema RNZ-N-3 (alginato:HPC 3:2).

RISULTATI E DISCUSSIONE PELLETS RNZ-L

In questa fase del progetto di dottorato si è voluto indagare quali fossero le caratteristiche di rilascio di pellets aventi al loro interno quantità minori di HPC rispetto ai pellets preparati presso il Dipartimento di Scienze del Farmaco di Novara. I sistemi studiati presso la Faculté de Pharmacie di Lille (5 composizioni) hanno portato alla preparazione di pellets che, essiccati, si presentano bianchi, di forma pressoché sferica e con superficie rugosa su cui è possibile osservare la presenza di cristalli di farmaco (fig 34). La presenza di HPC in quantità differenti nei pellets non determina variazioni morfologiche visibili allo stereomicroscopio. La morfologia di questi batch di pellets prodotti presso il laboratorio di Lille è simile a quella dei pellets precedentemente prodotti presso il laboratorio di Novara.

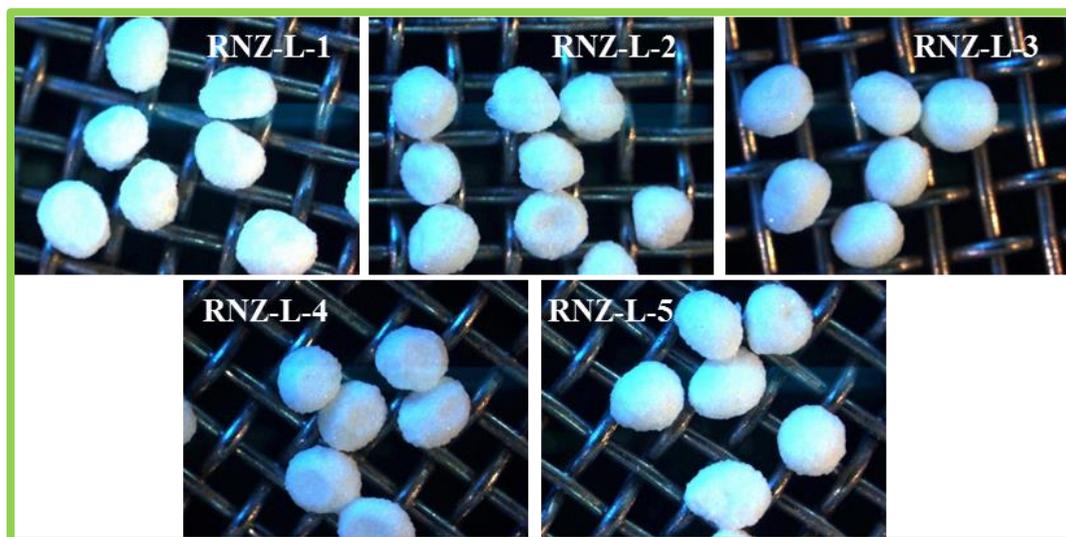


Fig. 34: Stereomicrofotografie di pellets alginato e alginato-HPC contenenti ranolazina. Ingrandimento 3x.

Allo scopo di ottenere informazioni più dettagliate sulla struttura interna ed esterna, i pellets sono stati esaminati mediante microscopia elettronica a scansione (fig. 35).

Esteriormente i pellets si presentano sferici, la loro superficie è irregolare e rugosa e presenta molteplici increspature; l'osservazione con ingrandimento 1000x evidenzia i numerosi cristalli di ranolazina sulla superficie.

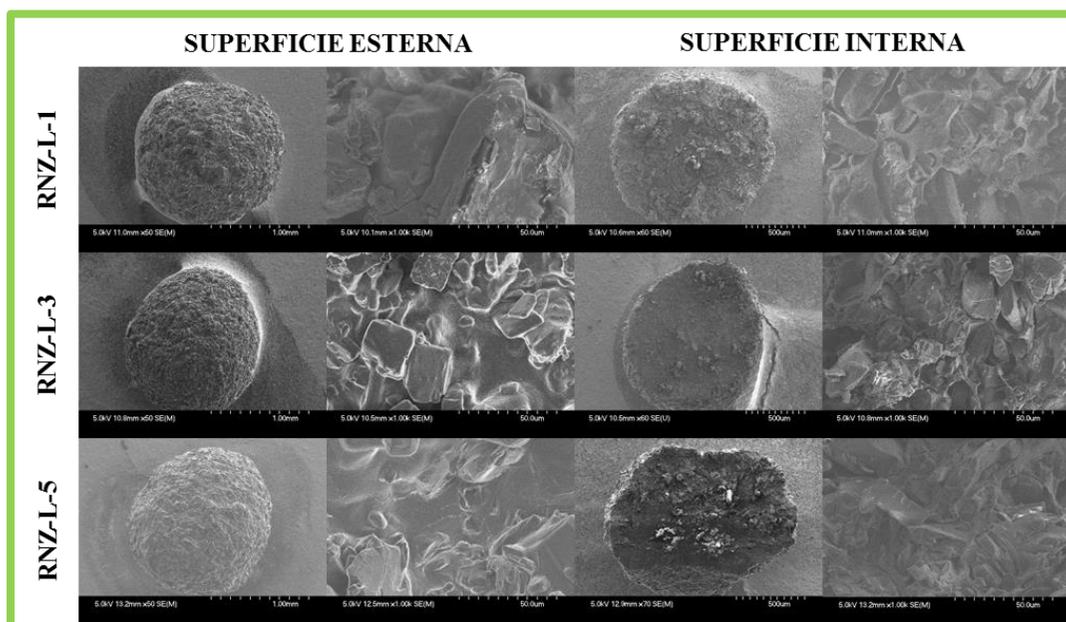


Fig. 35: Immagini al microscopio elettronico a scansione di pellets alginato e alginato-HPC contenenti ranolazina.

La struttura interna dei pellets ha caratteristiche differenti in funzione della loro composizione (presenza o meno di HPC e sua concentrazione). Nei pellets di solo alginato (RNZ-L-1) è possibile osservare la presenza di cristalli di farmaco tra le maglie della matrice. I cristalli di ranolazina conferiscono al materiale un aspetto poroso, legato all'incompleto impaccamento del reticolo polimerico durante l'essiccamento. La porosità della struttura dei pellets diminuisce in presenza di HPC (RNZ-L-3) e ancor di più quando la sua percentuale è elevata (RNZ-L-5). Nei pellets prodotti utilizzando una soluzione di HPC 0,65% p/p (RNZ-L-3) è ancora possibile osservare la presenza di cavità intorno ai cristalli di principio attivo, ma queste

risultano essere di dimensioni minori rispetto a quelle osservate nei pellets di solo alginato (RNZ-L-1). In questo caso la struttura della matrice è un sIPN formato dal reticolo di alginato in cui sono disperse le singole catene di HPC: questa struttura sIPN è più compatta di quella di solo alginato a causa della presenza delle catene di cellulosa, che durante il processo di essiccamento sono in grado di occupare gli spazi vuoti presenti nelle maglie dal reticolo di alginato. Nell'ultimo caso, ovvero i pellets prodotti utilizzando una soluzione di HPC all'1,00% p/p (RNZ-L-5), non è più possibile osservare la presenza di cavità attorno ai cristalli di ranolazina.

Le dimensioni dei pellets variano da 1490 a 1570 μm (tab. 16), con un graduale aumento delle dimensioni all'aumentare della proporzione del polimero secondario. Lo *shape factor* calcolato è simile per tutte le formulazioni e il suo valore è compreso tra 0,77 e 0,80; la quantità di HPC all'interno della matrice polimerica non è sufficientemente elevata da alterare in modo significativo la sfericità dei pellets a differenza di quanto osservato nelle formulazioni precedenti (RNZ-N-4 e RNZ-N-5). Il titolo dei pellets è compreso tra il 71,1% della formulazione RNZ-L-1 (matrice di solo alginato) e il 59,9% della formulazione RNZ-L-5 (matrice alginato:HPC 3:2) come atteso dal cambio di proporzione tra i componenti al variare della quantità di HPC.

Tab. 16: Contenuti di ranolazina, diametro e *shape factor* di pellets alginato e alginato-HPC contenenti ranolazina.

FORMULAZIONE	TITOLO IN RANOLAZINA (%)	DIAMETRO (µm)	SHAPE FACTOR
RNZ-L-1	71,1 ± 0,8	1492,3 ± 78,2	0,78
RNZ-L-2	65,5 ± 0,5	1544,0 ± 98,1	0,79
RNZ-L-3	63,8 ± 0,6	1547,1 ± 83,9	0,77
RNZ-L-4	62,7 ± 0,6	1552,2 ± 94,7	0,79
RNZ-L-5	59,9 ± 0,3	1571,6 ± 88,4	0,80

La caratterizzazione delle formulazioni ha previsto anche per questi sistemi, la valutazione della capacità di rigonfiamento in fluidi acquosi (fig. 36). Le formulazioni RNZ-L, in modo simile a quanto osservato precedentemente, quando poste in contatto con HCl 0,1N a pH 1,0 aumentano in modo limitato di peso fino a raggiungere un valore costante. RNZ-L-1 (solo alginato) raggiunge velocemente il valore massimo di assorbimento (15 minuti); i sistemi contenenti l'HPC assorbono l'acido cloridrico più lentamente: maggiore è la quantità di HPC presente, più lento è questo processo. La percentuale massima di incremento in peso si osserva dopo circa 30 minuti. L'uptake più lento di fluido da parte dei pellets contenenti HPC è dovuto alla struttura semi-interpenetrata della matrice; struttura che come detto è più compatta e rallenta la penetrazione di fluido e conseguentemente la formazione di acido alginico.

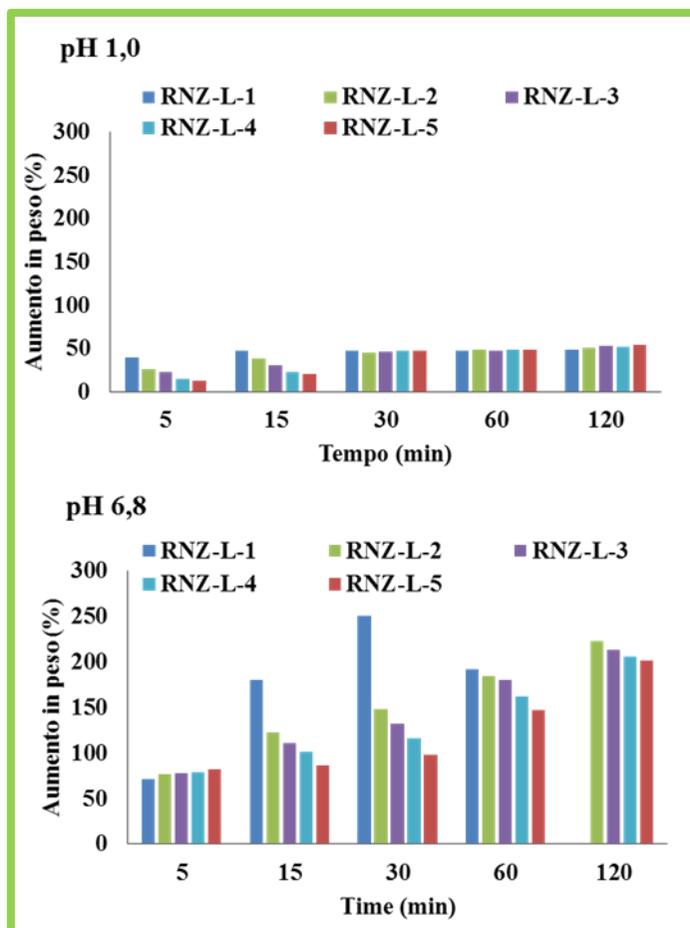


Fig. 36: Assorbimento di fluidi di pellets alginato e alginato-HPC contenenti ranolazina.

I test effettuati a pH 6,8 mostrano un comportamento marcatamente differente tra la formulazione RNZ-L-1 (solo alginato) e le formulazioni (alginato-HPC). Il peso del sistema RNZ-L-1 aumenta velocemente raggiungendo quasi il 250% di incremento dopo solo 30 minuti di permanenza nel fluido. Questo rapido aumento di peso è seguito da un veloce decremento causato dall'erosione dei pellets e dalla solubilizzazione dei cristalli di ranolazina; dopo 120 minuti i pellets sono quasi completamente disgregati e il loro peso non è più misurabile. Per i pellets alginato-

HPC l'incremento in peso è più lento e progressivo per tutta la durata del test. L'aumento in peso dei pellets è strettamente correlato alla percentuale di HPC nel sistema e alla compattezza della matrice.

L'aumento di diametro dei pellets descrive in modo alternativo il comportamento di swelling dei pellets (fig. 37). I pellets posti a contatto con HCl 0,1N rigonfiano velocemente raggiungendo un valore massimo di incremento compreso tra circa il 20 e il 35% dopo solo 10 minuti. I pellets RNZ-L-1 (solo alginato) rigonfiano più velocemente rispetto agli altri sistemi ma raggiungono un picco di rigonfiamento minore che si attesta su valori leggermente inferiori al 25%. I pellets contenenti HPC rigonfiano in modo leggermente più lento ma raggiungono valori assoluti più elevati; in particolare ad una maggiore quantità di polimero secondario presente nella matrice corrisponde un aumento del valore massimo di rigonfiamento ottenuto: la formulazione RNZ-L-5 (alginato:HPC 3:2), ha dopo 60 minuti, un rigonfiamento del 35%, la formulazione RNZ-L-2 (alginato:HPC 3:1) un rigonfiamento leggermente inferiore al 30%. Si può spiegare questo fenomeno considerando la capacità dell'HPC di rigonfiare a pH acidi, capacità posseduta dall'alginato solo in minima parte a causa della formazione di acido alginico.

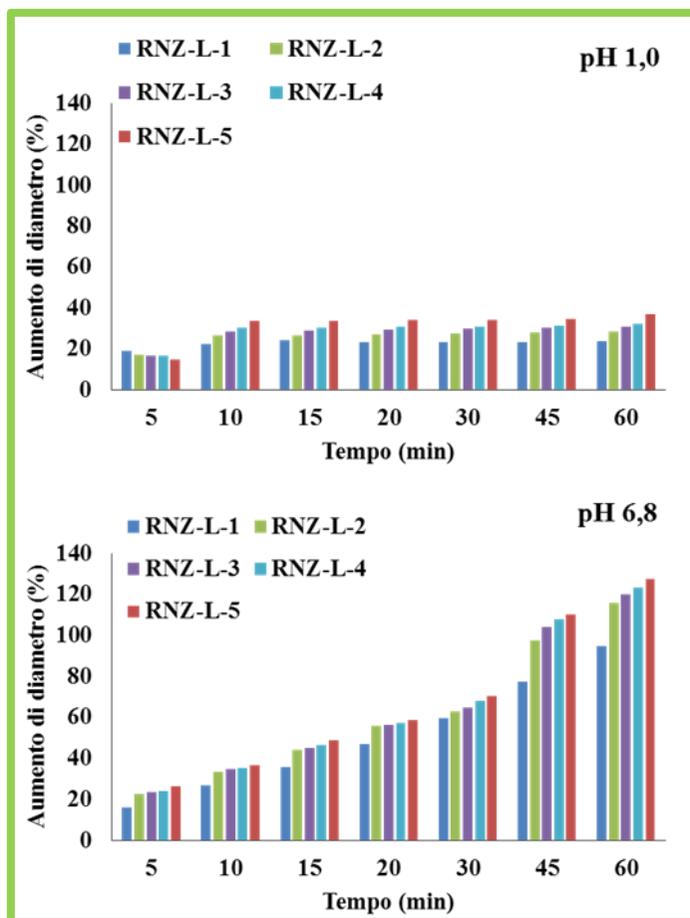


Fig. 37: Aumento in diametro conseguente a reidratazione di pellets alginato e alginato-HPC contenenti ranolazina.

In tampone fosfato a pH 6,8 si assiste a rigonfiamenti più ingenti (i valori massimi dopo 60 minuti di contatto con i fluidi oscillano tra il 90 e il 120%). Non è possibile assistere a grosse differenze nel comportamento di rigonfiamento dei differenti pellets. Si può osservare che i valori di rigonfiamento aumentano leggermente all'aumentare della quantità di HPC all'interno dei pellets; unica differenza di rilievo la si può osservare dopo 45 e 60 minuti di rigonfiamento quando il sistema RNZ-L-1 si attesta su percentuali di swelling minori rispetto a quelle raggiunte dai sistemi contenenti HPC. Queste osservazioni sono confermate dal calcolo della velocità di

rigonfiamento dei pellets in tampone fosfato a pH 6,8 effettuata correlando l'entità di rigonfiamento con il quadrato del tempo. Le formulazioni contenenti HPC hanno valori della pendenza delle rette ottenute simili tra loro. RNZ-L-3, RNZ-L-4 e RNZ-L-5 hanno valori compresi tra 11,55 e 11,70; la formulazione RNZ-L-2 ha un valore leggermente inferiore di 10,69 e, unica formulazione avente una pendenza marcatamente differente, RNZ-L-1 ha un valore di 7,70. La presenza di maggior quantità di idrossipropilcellulosa all'interno della matrice ha un duplice effetto: da una parte il polimero rigonfia portando, insieme al rigonfiamento del reticolo di alginato, ad un incremento dimensionale dei pellets maggiore, dall'altra il sIPN più ricco di HPC dona maggior resistenza al network di calcio alginato ritardando il processo di erosione.

Tab. 17: Velocità di rigonfiamento dei pellets contenenti ranolazina in tampone fosfato pH 6,8.

Formulazione	Pendenza	R²
RNZ-L-1	7,695	0,976
RNZ-L-2	10,687	0,990
RNZ-L-3	11,549	0,991
RNZ-L-4	11,649	0,996
RNZ-L-5	11,703	0,991

Le caratteristiche di rilascio dei pellets non ancora rivestiti con polimeri gastroresistenti sono stati valutati mediante test *in vitro* di rilascio. I risultati ottenuti sono riportati in figura 38. I risultati dei test di rilascio in HCl sono comparabili con quelli osservati nei test effettuati sulle formulazioni RNZ-N; le formulazioni

rilasciano velocemente il farmaco, circa l'80% dopo solo 15 minuti, e il rilascio si completa in 30 minuti. Come descritto in precedenza questo comportamento è dovuto all'elevata solubilità della ranolazina in ambiente acido, caratteristica che permette una veloce solubilizzazione dei cristalli di farmaco. Le differenze di struttura della matrice dei pellets osservate al microscopio a scansione elettronica non risultano, in questo fluido di dissoluzione, in differenti profili di rilascio: l'elevata solubilità del farmaco è il fattore determinante del rilascio a questo pH, fattore che prevale sulle altre caratteristiche dei pellets. Dai saggi condotti a pH 6,8, si possono apprezzare comportamenti di rilascio differenti: l'aumento della percentuale di idrossipropilcellulosa nei pellets determina un rilascio progressivamente più lento del principio attivo. I pellets RNZ-L-1 (solo alginato) non mostrano un controllo marcato del rilascio: circa l'80% del farmaco è liberato in 120 minuti e il 100% in 240 minuti. Viceversa i sistemi RNZ-L-3, RNZ-L-4 e RNZ-L-5 (alginato-HPC) sono in grado di controllare il rilascio di ranolazina in modo efficiente: per questi tre sistemi il rilascio dell'80% della ranolazina è raggiunto rispettivamente dopo 360, 480 e 720 minuti, ed è completo dopo 480, 600 e 1080 minuti. I pellets RNZ-L-2 (prodotta a partire da una soluzione di alginato 1,5% p/p e HPC 0,5% p/p) presentano un profilo di rilascio particolare: durante le prime due ore di test in tampone fosfato a pH 6,8 il profilo di rilascio è simile a quello osservato per il sistema RNZ-L-3 (liberazione di circa il 40% dell'attivo); successivamente si ha un netto aumento della velocità (dopo 180 minuti è stato liberato circa l'80% del farmaco) il rilascio risulta completo dopo circa 5 ore di test similmente a quanto osservato per la formulazione RNZ-L-1.

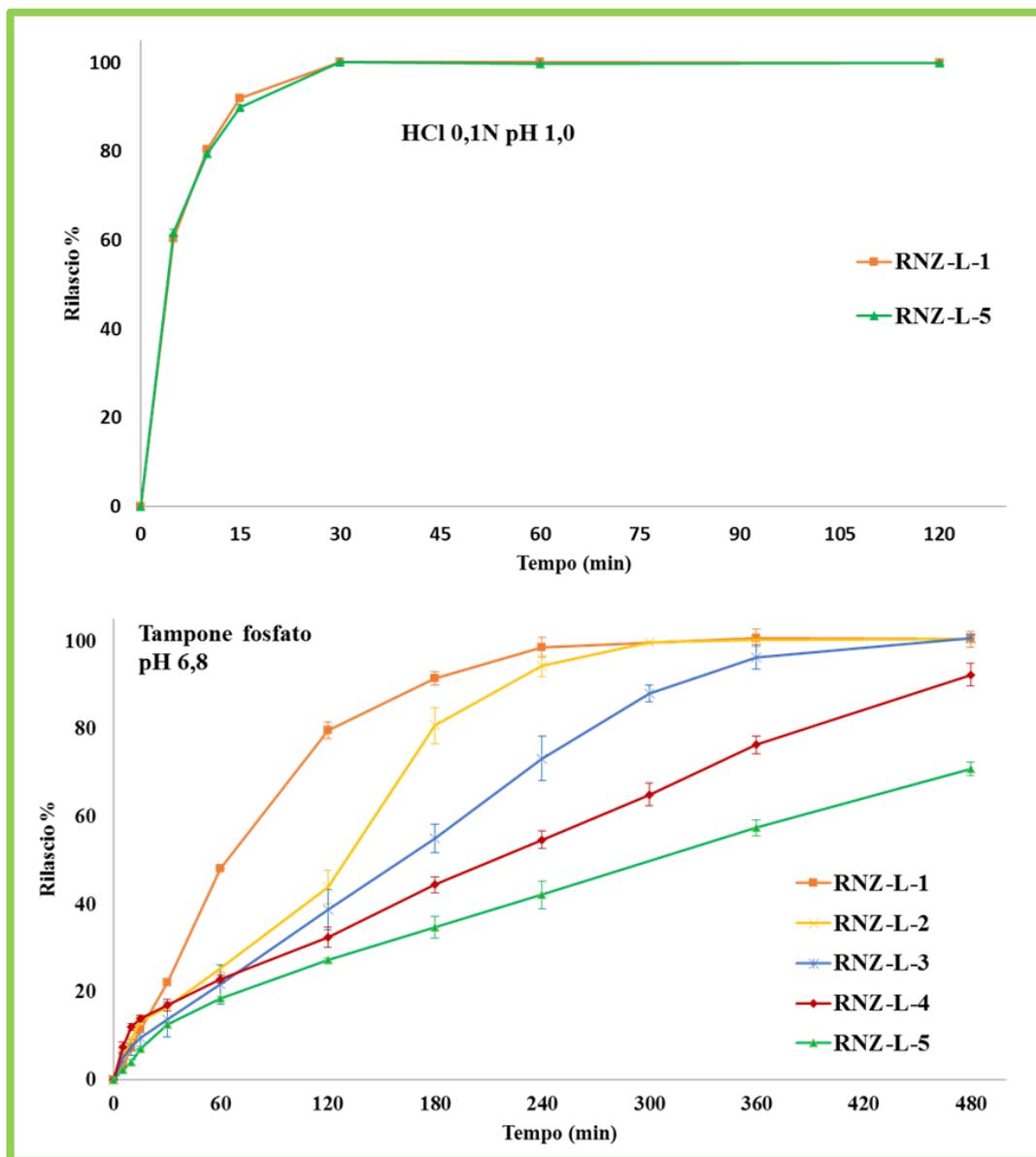


Fig. 38: Profili di rilascio di pellets di alginato e alginato-HPC contenenti ranolazina non rivestiti in HCl 0,1N pH 1,0 e tampone fosfato pH 6,8.

Il comportamento di rilascio dipende principalmente da due fattori: la ridotta solubilità della ranolazina a valori di pH vicino alla neutralità e la struttura della matrice. Come osservato mediante le analisi al microscopio elettronico a scansione,

i pellets presentano differente struttura interna. I pellets costituiti da solo alginato (RNZ-L-1) possiedono una struttura molto porosa e i cristalli di farmaco sono ospitati nelle cavità che si formano durante l'essiccamento per contrazione della matrice. Queste cavità permettono una maggiore e più veloce penetrazione del fluido nei pellets, con conseguente rigonfiamento e erosione più veloce delle sfere; esse inoltre determinano un contatto diretto del fluido su un'area più ampia dei cristalli con conseguente più veloce solubilizzazione degli stessi. A seguito della penetrazione del liquido e del rigonfiamento si forma una struttura che permette la veloce diffusione del principio attivo solubilizzato. Nei sistemi polimerici binari, con HPC ed alginato, in seguito a gelificazione, formano un sistema sIPN; all'aumentare della concentrazione di HPC diminuisce la porosità della matrice, in quanto diminuisce il volume delle cavità presenti in essa. Un rapporto alginato:HPC di 3:2 (RNZ-L-5) determina la formazione di una struttura quasi completamente priva di cavità. La ridotta porosità comporta il più lento rilascio del farmaco, poiché risulta più lenta la penetrazione del fluido all'interno della matrice, e l'erosione dei pellets. Il particolare profilo di rilascio dei pellets RNZ-L-2 (rapporto alginato:HPC 3:1) è spiegabile con la presenza in questi pellets di una matrice sIPN non molto robusta che perde la propria integrità durante il test. Inizialmente la lenta penetrazione del fluido esercita un buon controllo sul rilascio del principio attivo, dopo circa 2 ore, però, il sistema perde consistenza e collassa permettendo alla ranolazina di fuoriuscire più velocemente dalla matrice. I risultati di questi saggi rendono conto di quanto osservato per le formulazioni RNZ-N-3, RNZ-N-4, RNZ-N-5 (contenenti rispettivamente rapporto alginato:HPC 3:2, 1:1 e 2:3). Le concentrazioni di HPC impiegata nella preparazione di questi pellets portano alla formazione di matrici compatte e di struttura simile; utilizzi di concentrazione elevate di HPC non cambiano in modo significativo il comportamento di rilascio della ranolazina.

Utilizzando l'equazione di Korsmayer-Peppas, si è valutato il meccanismo con cui avviene il rilascio della ranolazina dai pellets in tampone fosfato pH 6,8 (tabella 18).

Similmente a quanto ottenuto in precedenza nei pellets veicolanti celecoxib, i valori di n sono compresi tra 0,5 e 1,0 e ciò indica un meccanismo di rilascio anomalo, legato alla diffusione e al rilassamento della matrice. I profili di rilascio ottenuti per i sistemi contenenti HPC in concentrazione più elevata, indicano che è possibile modulare il rilascio del farmaco cambiando la composizione della miscela di polimeri eccipienti.

Tab. 18: Equazione di Korsmayer-Peppas in tampone fosfato pH 6,8. Parametri cinetici ($0,976 < R^2 < 0,996$)

Formulazione	K	n
RNZ-L-1	0,0111	0,89
RNZ-L-2	0,0190	0,65
RNZ-L-3	0,0083	0,81
RNZ-L-4	0,0191	0,62
RNZ-L-5	0,0106	0,68

Come riportato in precedenza per le formulazioni RNZ-N, il rilascio della ranolazina è cospicuo e veloce. Per ovviare al problema applicato un rivestimento polimerico costituito da materiale con una solubilità pH dipendente. Per l'applicazione del rivestimento è stato usato un letto fluido con inserto wurster e si sono usati 2 differenti polimeri con struttura chimica in parte simile: un copolimero di acido metacrilico e metil-metacrilato 1:1 (Eudragit L100) e un copolimero di acido metacrilico e etil-metacrilato 1:1 (Eudragit L30 D55). I polimeri hanno entrambi temperatura di transizione vetrosa elevata (130 °C L100 e 95 °C L30 D55) e sono in di formare film friabili. La temperatura di formazione del film e la friabilità dello stesso ha reso necessario l'utilizzo di un plasticizzante; il trietilcitrato (TEC) che è stato addizionato in ragione del 10% alla soluzione di rivestimento. Il processo di

rivestimento con EU L100 è stato effettuato con la soluzione EU L100/TEC in acqua:etanolo 50:50 e ad una velocità di flusso del materiale di rivestimento maggiore e a temperature minori rispetto a quanto fatto con EU L30 D55. I pellets ottenuti non hanno mostrato segni di adesione tra loro o con le pareti del letto fluido e presentavano un rivestimento omogeneo e resistente. Nel caso di EU L30 D55, poiché questo polimero viene usato in una dispersione acquosa e mostra una discreta adesività, è stato necessario aggiungere alla formulazione talco in percentuale relativamente elevata (il 50% rispetto al peso del polimero nella soluzione acquosa). Quantità minori di talco comportano adesione dei pellets nella della camera del letto fluido; sebbene questi fenomeni siano di portata limitata, alterano in modo significativo le caratteristiche del prodotto. In tabella 19 sono riportate le immagini allo stereomicroscopio dei pellets RNZ-L-1 e RNZ-L-5 dopo applicazione del rivestimento in diversa percentuale. In generale, si può osservare che non ci sono differenze significative nella morfologia dei pellets rivestiti con materiali differenti; i pellets risultano sferici, bianchi e con superficie liscia; l'aumento della quantità di polimero applicato non permette di vedere i cristalli di ranolazina presenti sulla superficie dei pellets. I cristalli, ben visibili nei pellets non rivestiti, sono ancora parzialmente riconoscibili sulla superficie dei pellets aventi un rivestimento del 5% e scompaiono del tutto alla vista quando la quantità di polimero di rivestimento è pari o superiore al 10%. I pellets aventi un livello di rivestimento del 10% di EU L30 D55 presentano saltuariamente sulla loro superficie delle fessure; le fessure sono assenti nei pellets aventi un livello di rivestimento più elevato. Queste fessure sono probabilmente dovute alla formazione di uno strato di polimero troppo sottile. Durante la fase di essiccamento e curing, il film non risulta essere sufficientemente elastico da dare una struttura uniforme sulla totalità della superficie dei pellets.

Tab. 19: Stereomicrofotografie di pellets di alginato e alginato-HPC contenenti ranolazina rivestiti con differenti percentuali di polimero.

LIVELLO DI RIVESTIMENTO	EUDRAGIT L30 D-55		EUDRAGIT L100	
	RNZ-L-1	RNZ-L-5	RNZ-L-1	RNZ-L-5
0 %				
5 %				
10 %				
20 %				
30 %				

Il rilascio *in vitro* della ranolazina dai pellets è stato valutato in fluidi a pH differente. Sebbene tutte le formulazioni siano capaci di limitare il rilascio del farmaco rispetto alle formulazioni non rivestite solo quelle con rivestimento polimerico superiore al 10% hanno prodotto risultati apprezzabili. In particolare, i pellets rivestiti sia con EU L100 sia con EU L30 D55 ad una percentuale del 5% o del 10% mostrano un rilascio di attivo, dopo 120 minuti in HCl 0,1N pH 1,0, ancora troppo elevato (fig. 39).

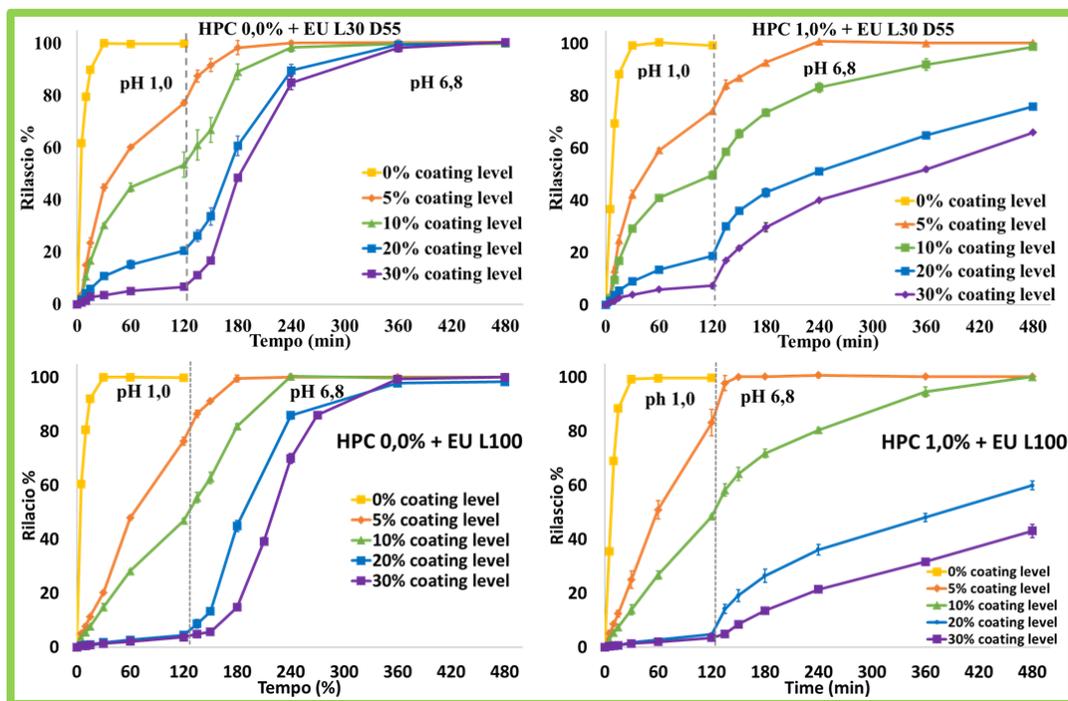


Fig. 39: Profili di rilascio di pellets di alginato e alginato-HPC contenenti ranolazina rivestiti con EU L30 D55 e EU L100.

Risultati migliori sono stati ottenuti per i pellets con percentuali di rivestimento più elevate: nel caso dell'EU L30 D55 il coating con il 20% di materiale porta a una riduzione sostanziale del rilascio del farmaco dopo 2 ore in HCl (20% circa di ranolazina in soluzione) un ulteriore aumento dello spessore dello strato di coating (30%) determina un rilascio di ranolazina inferiore al 10%. Il polimero EU L100 si è dimostrato il più performante sul controllo del rilascio in ambiente acido. Il rivestimento con il 20% e il 30% di questo polimero riduce il rilascio di farmaco dopo 2 ore in ambiente acido a meno del 5%. Il cambio di pH effettuato dopo le prime due ore dall'inizio del saggio ha permesso di valutare del rilascio della ranolazina a pH 6,8. Dalla figura 39, si può osservare che la velocità di liberazione del principio attivo non è influenzata dal tipo di polimero impiegato per il rivestimento, né dalla loro quantità: lo spessore dello strato di rivestimento rende

conto del *lag-time* di circa 30 minuti osservato a pH 6,8 per i pellets al 30% di coating. È necessario un tempo maggiore perché l'erosione del polimero raggiunga uno stadio sufficientemente avanzato da permettere l'idratazione del pellet e la fuoriuscita del principio attivo. Il polimero secondario HPC, invece modifica sensibilmente la velocità di rilascio del farmaco e quindi la quantità dello stesso presente in soluzione nel tempo. Per i pellets costituiti da solo alginato dopo 180 minuti di permanenza in tampone fosfato la quantità di ranolazina presente in soluzione è maggiore del 90% di quella iniziale, indipendentemente dallo spessore del coating. Per i pellets costituiti da alginato e HPC in rapporto 3:2 (RNZ-L-5) dopo sei ore dal cambio pH circa il 55% dell'attivo è stata rilasciata dai sistemi con il 20% di rivestimento e il 35% da quelli con il 30%. La migliore performance dell'EU L100 rispetto all'EU L30 D55 è probabilmente dovuta alla maggior plasticità del film che determina il completo ricoprimento delle irregolarità di superficie dei pellets e di una migliore adesione al *core* del materiale applicato.

I profili di rilascio dei sistemi RNZ-L-1 e RNZ-L-5 non rivestiti e rivestiti con il 30% di EU L30 D55 e con il 20% di EU L100 (figura 40) sono stati confrontati tra loro calcolando il fattore di similarità f_2 . I profili di rilascio di ranolazina dai pellets non rivestiti e dai corrispondenti pellets rivestiti risultano essere simili ($f_2 > 50$). Questo risultato conferma che la velocità di liberazione del principio attivo dipende dalla composizione della matrice dei pellets e non dal rivestimento su essi applicato.

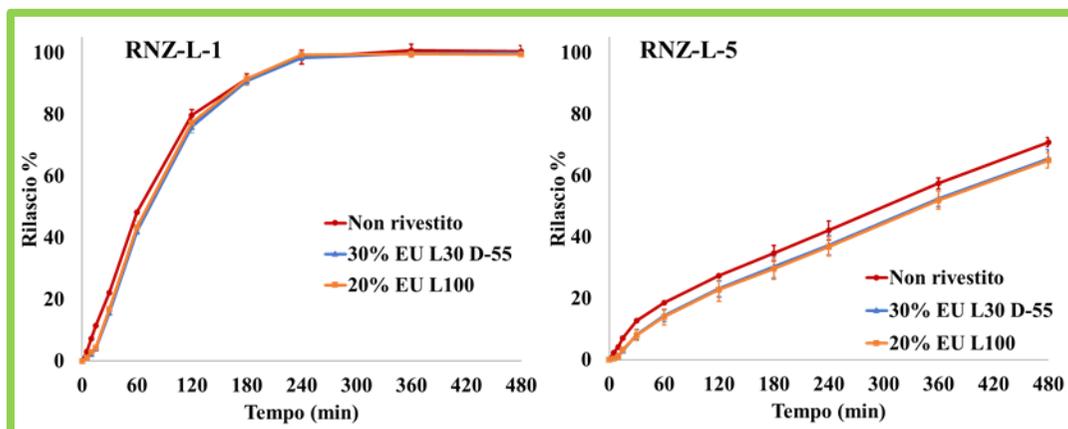


Fig. 40: Profili di rilascio in tampone fosfato pH 6,8 di pellets di alginato e alginato-HPC veicolanti ranolazina rivestiti e non.

In seguito alla verifica di una limitata interferenza del rivestimento sul profilo di rilascio del farmaco in tampone fosfato, sulla formulazione RNZ-L-3 (formulazione contenente la quantità intermedia di HPC) è stato applicato un coating di EU L100 (20%). In figura 41 il profilo di rilascio della ranolazina da questi pellets è stato confrontato con quelli di RNZ-L-1 e RNZ-L-5.

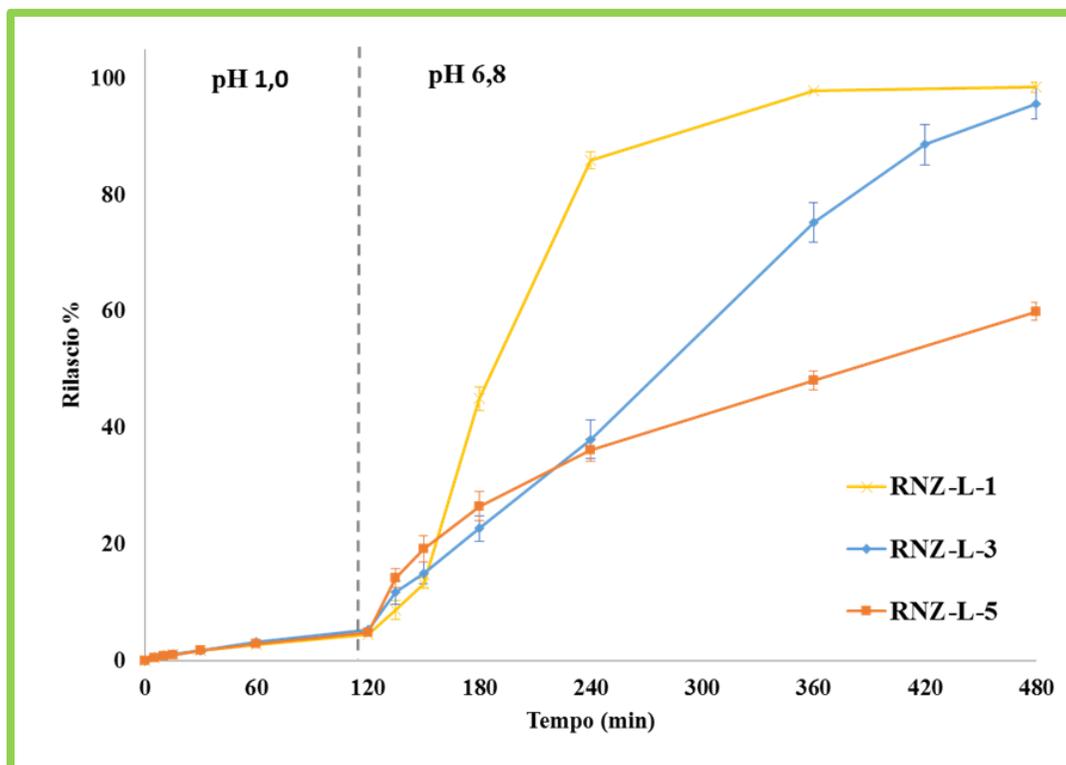


Fig. 41: profili di rilascio di pellets contenenti ranolazina rivestiti al 20% con Eudragit L100.

Tutte le formulazioni riescono a controllare in modo efficace il rilascio del farmaco in HCl 0,1N (rilascio dopo due ore di circa il 5%) grazie al rivestimento di polimero gastroresistente. In modo simile a quanto osservato in precedenza per le formulazioni non rivestite, i pellets sono in grado di controllare il rilascio di ranolazina in tampone fosfato pH 6,8 quando nella matrice è presente HPC. In particolare, per la formulazione RNZ-L-3, la velocità di rilascio del principio attivo è risultata intermedia rispetto a quella degli altri sistemi confermando che il derivato della cellulosa modula la penetrazione del tampone fosfato nel pellet e la solubilizzazione e diffusione del principio attivo nella matrice rigonfiata. La formulazione RNZ-L-3 può essere considerata una promettente forma di dosaggio per il farmaco in quanto

rende disponibile per l'assorbimento la totalità dello stesso in sei ore, lasso di tempo richiesto per il transito dei pellets nell'intestino tenue.

L'applicazione di una maggiore quantità di materiale di rivestimento sui pellets di alginato ha portato alla realizzazione di sistemi in grado di dilazionare il rilascio della ranolazina, rendendola disponibile per l'assorbimento a livello dell'intestino crasso-colon. Le formulazioni selezionate erano RNZ-L-1 e RNZ-L-3 (solo alginato e alginato e HPC alla concentrazione di 0,65% p/p durante la produzione dei pellets) e su queste è stato applicato il rivestimento a base di EU L100 in quantità tale da raggiungere un incremento in peso del pellet pari al 40 e al 50%. Il coating ha determinato un'ulteriore, limitata, riduzione del rilascio di ranolazina in ambiente acido: infatti, per i pellets rivestiti con il 50% di EU L 100, il rilascio del principio attivo è risultato essere del 2% circa. Il rilascio in tampone fosfato pH 6,8 dai pellets RNZ-L-1 viene ritardato in misura proporzionale alla quantità di polimero di rivestimento applicato; ad ogni aumento del 10% del livello di rivestimento, oltre il 20%, corrisponde un ritardo di circa 30 minuti nella liberazione di quantità significative del farmaco. A conferma di quanto già osservato in precedenza, la velocità del processo risulta essere praticamente uguale per tutti i pellets e non influenzata dal materiale di coating impiegato. Anche per il sistema RNZ-L-3 ricoperto con quantità elevate di polimero gastroresistente è stata osservata una dilazione del rilascio del principio attivo; in questo caso, ad ogni aumento del 10% del livello di rivestimento, oltre il 20%, corrisponde un ritardo di circa 60 minuti, ciò probabilmente per la migliore adesione del co-polimero acrilico sulla superficie del pellet. La velocità di rilascio è risultata, anche per queste formulazioni, praticamente identica e minore di quella osservata per i pellets RNZ-L-1 in cui HPC non era presente. Questi risultati sono perfettamente in linea con quelli ottenuti per pellets con rivestimento di minor spessore.

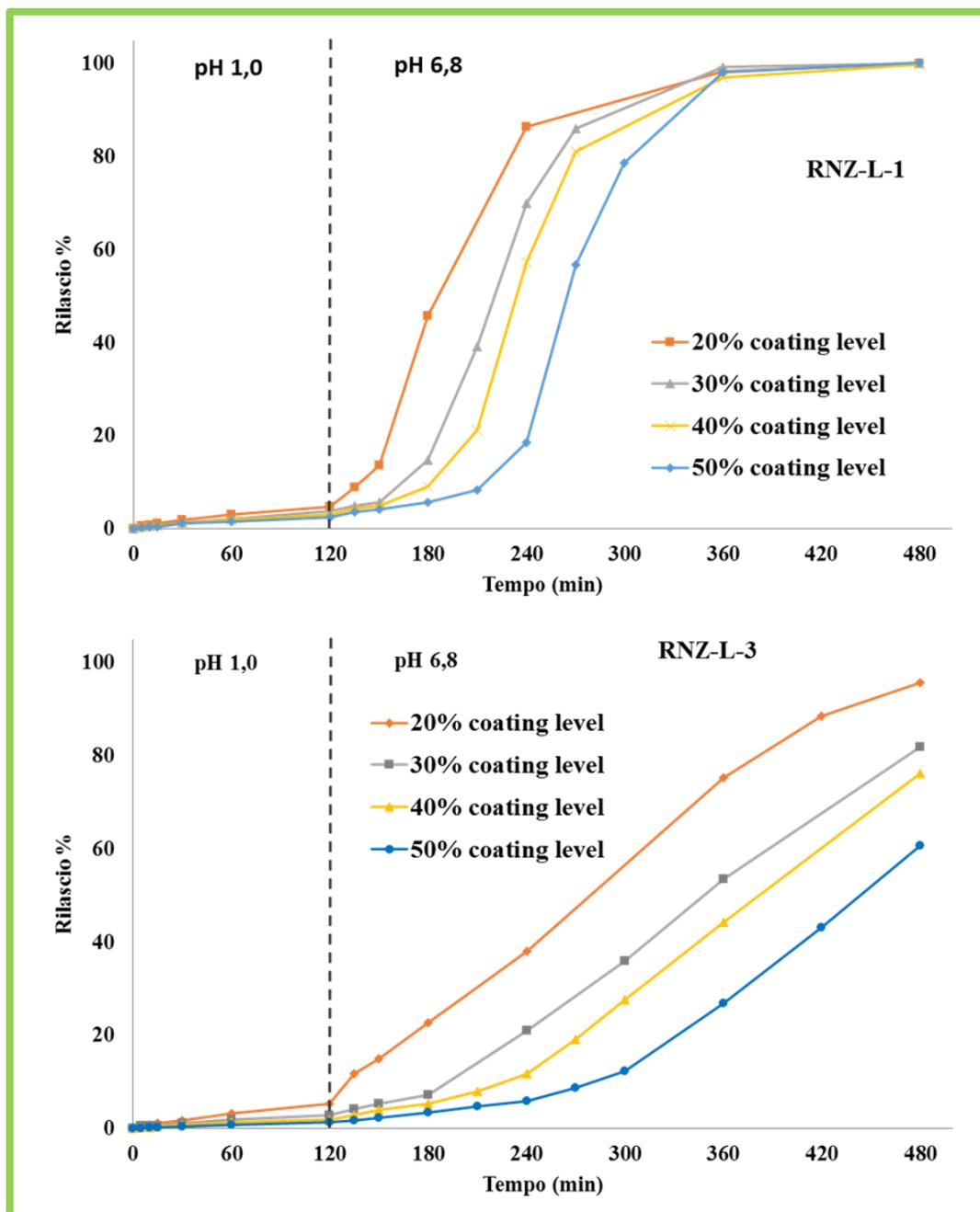


Fig. 42: Profili di rilascio delle formulazioni RNZ-L-1 e RNZ-L-3 in seguito all'applicazione di differenti quantità di polimero di rivestimento (Eudragit L100).

CONCLUSIONI

I sistemi a base di calcio alginato si sono dimostrati una forma di dosaggio promettente per la veicolazione della ranolazina. In particolare, le matrici semi-interpenetranti di calcio alginato e HPC sono in grado di controllare in modo efficace il rilascio del farmaco. L'applicazione del rivestimento gastroresistente minimizza il rilascio dell'attivo in ambiente gastrico e lo rende disponibile a livello del primo tratto dell'intestino.

CONCLUSIONI

Mediante la tecnica della gelazione ionotropica dell'alginato di sodio sono state prodotte forme di dosaggio multiparticolate a base di biopolimeri, veicolanti principi attivi differenti per struttura chimica, indirizzo terapeutico e problematiche tecnologiche-farmaceutiche. La gelazione ionotropica si è dimostrata essere una tecnica versatile, veloce ed economica, che non richiede apparecchiature particolari, né solventi organici.

Sulla base dei risultati ottenuti in questo lavoro si possono trarre le seguenti conclusioni: al fine di ottenere sistemi con le adeguate proprietà meccaniche è importante determinare che nel processo di gelazione ionotropica vengano identificati e selezionati i corretti valori di alcuni parametri (tempo di gelificazione dell'alginato, concentrazione di agente gelificante, rapporto tra fase acquosa e fase auto-emulsionante dei pellets). La combinazione dell'alginato con alcuni biopolimeri e in particolare i derivati della cellulosa consente di realizzare forme di dosaggio capaci di modulare il rilascio di sostanza attiva. In particolare, in questo lavoro di ricerca, è risultato che i sistemi semi-interpenetranti costituiti da alginato e idrossipropilcellulosa rispondono pienamente a questo obiettivo e che il controllo della cinetica di liberazione delle sostanze di interesse è legato alle proporzioni dei polimeri costituenti il reticolo.

Con questa tecnica sono stati messi a punto sistemi terapeutici contenenti diversi farmaci in stato fisico diverso: la ranolazina è stata incorporata nel veicolo biopolimerico in forma solida a produrre forme di dosaggio in grado di controllare il rilascio dell'attivo per dissoluzione ed erosione della matrice. Per il celecoxib e l'ibuprofene sono stati prodotti anche pellets costituiti da una miscela auto-emulsionante nella quale il principio attivo risulta solubile: questi pellets a struttura bifasica si sono dimostrati anch'essi capaci di modulare la liberazione della sostanza attiva. L'applicazione di un rivestimento gastroresistente sui pellets di alginato ha portato alla realizzazione di sistemi terapeutici che liberano il farmaco in modo dilazionato, consentendo allo stesso di raggiungere in quantità e tempi prevedibili il

sito di miglior assorbimento dopo somministrazione orale. La dilazione del rilascio così ottenuta rende, inoltre, possibile l'impiego di questa forma di dosaggio multi-unità nella terapia di affezioni localizzate nella sezione inferiore dell'apparato gastrico.

BIBLIOGRAFIA

1. Ågren M.S.; Matrix metalloproteinases (MMPs) are required for re-epithelialization of cutaneous wounds, *Archives of Dermatological Research*, 1999 Nov:291(11):583-590.
2. Almeida-Prieto S., Blanco-Mendez J., Otero-Espinar F.J.; Image analysis of the shape of granulated powder grains, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004, 93:621-634.
3. Alvarez-Lorenzo C., Blanco-Fernandez B., Puga A.M., Concheiro A.; Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery, *Advanced Drug Delivery Review*, 2013 Aug:65(9):1148-71.
4. Amidon G.L., Lennernäs H., Shah, V.P., Crison J.R.; A theoretical basis for a biopharmaceutics drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability, *Pharmaceutical Research*, 1995, 12:413-420.
5. Andresen I.L., Smidsørod O.; Temperature dependence of the elastic properties of alginate gels, *Carbohydrate Research*, 1977 Oct:58:2:271–279
6. Auman J.T., Church R., Lee S.Y., Watson M.A., Fleshman J.W., McLeod H.L.; Celecoxib pre-treatment in human colorectal adenocarcinoma patients is associated with gene expression alterations suggestive of diminished cellular proliferation, *European Journal of Cancer*, 2008, 44:1754-1760.
7. Bajpai S.K., Sharma S.; Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions, *Reactive and Functional Polymers*, 2004 May 59:2:129–140.
8. Balakrishnan B., Mohanty M., Umashankar P.R., Jayakrishnan A.; Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin, *Biomaterials*, 2005 Nov:26(32):6335-42.
9. Becker J.C., Domschke , Pohle T.; Current approaches to prevent NSAID-induced gastropathy – COX selectivity and beyond, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2004, 58(6):587–600.

10. Bernkop-Schnürch A., Kast C.E., Richter M.F.; Improvement in the mucoadhesive properties of alginate by the covalent attachment of cysteine, *Journal of Controlled Release*, 2001 Apr:71(3):277-85.
11. Bijman M.N., Hermelink C.A., van Berkel M.P., Laan A.C., Janmaat M.L., Peters G.J., Boven, E.; Interaction between celecoxib and docetaxel or cisplatin in human cell lines of ovarian cancer and colon cancer is independent of COX-2 expression levels, *Biochemical Pharmacology*, 2008, 75:427-437.
12. Braccini I., Pérez S.; Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited, *Biomacromolecules*, 2001 Winter 2(4):1089-96.
13. Brayfield A; Martindale: The Complete Drug Reference.ed, Pharmaceutical Press, 2014 London (UK).
14. Brigham M.D., Bick A., Lo E., Bendali A., Burdick J.A., Khademhosseini A.; Mechanically robust and bioadhesive collagen and photocrosslinkable hyaluronic acid semi-interpenetrating networks, *Tissue Engineering A*, 2009, 15:1645–1653.
15. Calafiore R.; Alginate microcapsules for pancreatic islet cell graft immunoprotection: struggle and progress towards the final cure for type 1 diabetes mellitus. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2003, 3:201–205.
16. Cao .L, Mooney D.J.; Spatiotemporal control over growth factor signaling for therapeutic neovascularization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 59:1340–1350.
17. Carlsson G.E., Ortorp A., Omar R.J.; What is the evidence base for the efficacies of different complete denture impression procedures? A critical review. *Journal of Dentistry*, 2013 Jan:41(1):17-23.
18. Chaitman B.R., Pepine C.J., Parker J.O., Skopal J., Chumakova G., Kuch J., Wang W., Skettino S.L., Wolff A.A.; Effects of ranolazine with atenolol, amlodipine, or diltiazem on exercise tolerance and angina frequency in

- patients with severe chronic angina: a randomized controlled trial, *JAMA*, 2004a Jan:291(3):309-16.
19. Chaitman B.R., Skettino S.L., Parker J.O., Hanley P., Meluzin J., Kuch J., Pepine C.J., Wang W., Nelson J.J., Hebert D.A., Wolff A.A.; Anti-ischemic effects and long-term survival during ranolazine monotherapy in patients with chronic severe angina, *Journal of the American College of Cardiology*, 2004b Apr:43(8):1375-82.
 20. Chakraborty S., Shukla D., Mishra B., Singh S.; Lipid – An emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009, 73:1-15.
 21. Chandran S., Asghar F.A., Mantha N.; Design and Evaluation of Ethyl Cellulose Based Matrix Tablets of Ibuprofen with pH Modulated Release Kinetics, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008 Sep-Oct:70(5): 596–602.
 22. Chang S.C.N., Tobias G., Roy A.K., Vacanti C.A., Bonassar L.J.; Tissue engineering of autologous cartilage for craniofacial reconstruction by injection molding. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2003, 112:793–799.
 23. Chen S.C., Wu Y.C., Mi F.L., Lin Y.H., Yu L.C., Sung H.W.; A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 2004 Apr:28;96(2):285-300.
 24. Chikh L., Delhorbe V., Fichet O.; (Semi-)Interpenetrating polymer networks as fuel cell membranes, *Journal of Membrane Science*, 2011, 368:1–17.
 25. Colinet I., Dulong V., Mocanu G., Picton L., Le Cerf D.; New amphiphilic and pH sensitive hydrogel for controlled release of model poorly water soluble drug, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009, 73:345-350.

26. Comisar W.A., Hsiong S.X., Kong H.J., Mooney D.J., Linderman J.J.; Multi-scale modeling to predict ligand presentation within RGD nanopatterned hydrogels, *Biomaterials*, 2006: 27:2322–2329.
27. Costa P., Sousa Lobo J.M.; Modeling and comparison of dissolution profiles, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001, 13:123-133.
28. Coviello T., Matricardi P., Marianecchi C., Alhaique F.; Polysaccharide hydrogels for modified release formulations, *Journal of Controlled Release*, 2007 May:119(1):5-24.
29. Del Gaudio P., Auriemma G., Russo P., Mencherini T., Campiglia P., Stigliani M., Aquino R.P.; Novel co-axial prilling technique for the development of core-shell particles as delayed drug delivery systems, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2014 Aug:87(3):541-7.
30. DeVolder R., Kong H.J.; Hydrogels for in vivo-like three-dimensional cellular studies. *Wiley Interdisciplinary Reviews: System Biology and Medicine*, 2012, Jul-Aug:4(4):351-65.
31. Devrim B., Canefe K.; Preparation and evaluation of modified release ibuprofen microspheres with acrylic polymers (eudragit®) by quasiemulsion solvent diffusion method: effect of variables, *Acta Poloniae Pharmaceutica and Drug Research*, 2006, 63(6):521-534.
32. Dey N.S., Majumdar S., Rao M.E.B.; Multiparticulate Drug Delivery Systems for Controlled Release, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2008 Sep: 7(3):1067-1075.
33. Dobesh P.P., Trujillo T.C.; Ranolazine: a new option in the management of chronic stable angina, *Pharmacotherapy*, 2007 Dec:27(12):1659-76.
34. Donati I., Holtan S., Mørch Y.A., Borgogna M., Dentini M., Skjåk-Braek G.; New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels, *Biomacromolecules*, 2005 Mar-Apr:6(2):1031-40.

35. Doria-Serrano M.C., Ruiz-Treviño F.A., Rios-Arciga C., Hernández-Esparza M., Santiago P.; Physical characteristics of poly(vinyl alcohol) and calcium alginate hydrogels for the immobilization of activated sludge, *Biomacromolecules*, 2001 Summer:2(2):568-74.
36. Draget K.I., Skjåk Bræk G., Smidsrød O.; Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight, *Carbohydrate Polymers*, 1994, 25:1:31-38.
37. Draget K.I., Smidsrød O., Skjåk-Bræk G.; Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry. Properties, Production and Patents, Wiley-Blackwell, Weinheim (DE), 2005.
38. Draget K.I., Strand B., Hartmann M., Valla S., Smidsrød O., Skjåk-Bræk G.; Ionic and acid gel formation of epimerised alginates; the effect of Alge4, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2000 Apr:12;27(2):117-22.
39. Draget K.I.; Handbook of hydrocolloids, Woodhead Publishing, Cambridge (UK), 2009, 375-95.
40. Drury J.L., Boontheekul T., Mooney D.J.; Cellular cross-linking of peptide modified hydrogels, *Journal of Biomechanical Engineering*, 2005 Apr:127(2):220-8.
41. Drury J.L., Dennis R.G., Mooney D.J.; The tensile properties of alginate hydrogels, *Biomaterials*, 2004 Jul;25(16):3187-99.
42. Dusseault J., Leblond F.A., Robitaille R., Jourdan G., Tessier J., Ménard M., Henley N., Hallé J.P.; Microencapsulation of living cells in semi-permeable membranes with covalently cross-linked layers, *Biomaterials*. 2005 May:26(13):1515-22.
43. Eiselt P., Lee K.Y., J. Mooney D.J.; Rigidity of Two-Component Hydrogels Prepared from Alginate and Poly(ethylene glycol)-Diamines, *Macromolecules*, 1999 32(17): 5561–5566.

44. El-Sherbiny I.M., Salama A., Sarhan A.A.; Ionotropically cross-linked pH-sensitive IPN hydrogel matrices as potential carriers for intestine-specific oral delivery of protein drugs, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2011 Feb:37(2):121-30.
45. Elzatahry A.A., Mohy Eldin M.S., Soliman E.A., Hassan E.A. Evaluation of alginate–chitosan bioadhesive beads as a drug delivery system for the controlled release of theophylline, *Journal of Applied Polymer Science*, 2009 Mar:11:(5):2452–2459.
46. Espevik T., Otterlei M., Skjåk-Bræk G., Ryan L., Wright S. D., Sundan, A.; The involvement of CD 14 in stimulation of cytokine production by uronic acid polymers, 1993, *European Journal of Immunology* 23, 255-261.
47. Fang Y., Al-Assaf S., Phillips G.O., Nishinari K., Funami T., Williams P.A., Li L.; Multiple steps and critical behaviors of the binding of calcium to alginate, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2007 Mar:111(10):2456-62.
48. Farhana S.A., Shantakumar S.M., Shyale S., Shalam M., Narasu L.; Sustained release of verapamil hydrochloride from sodium alginate microcapsules. *Current Drug Delivery*, 2010 Apr:7(2):98-108.
49. Fasinu P., Pillay V., Ndesendo V.M.K., du Toit L.C., Choonara, Y.E.; Diverse approaches for the enhancement of oral drug bioavailability, *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 2011, 32:185-209.
50. Fischbach C., Kong H.J., Hsiong S.X., Evangelista M.B., Yuen W., Mooney D.J.; Cancer cell angiogenic capability is regulated by 3D culture and integrin engagement, *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America*, 2009: 106:399–404.
51. Food & Drug Administration, Guidelines for industry - dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms, 1997.
52. Food and Drug Administration:
http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/briefing/4012B2_01_Action%20Letter.pdf. Documento recuperato il 23 Ottobre, 2014.

53. Gandhi J.K., Opara E.C., Brey E.M.; Alginate-based strategies for therapeutic vascularization, *Therapeutic Delivery*, 2013, Mar:4(3):327-41.
54. Garti N., Avrahami M., Aserin A.; Improved solubilization of celecoxib in u-type nonionic microemulsions and their structural transitions with progressive aqueous dilution, *Journal of Colloidal and Interface Science*, 2006, 299:352-365.
55. Gåserød O., Sannes A., Skjåk-Braek G.; Microcapsules of alginate-chitosan. II. A study of capsule stability and permeability, *Biomaterials*, 1999 Apr:20(8):773-83.
56. Gattani S.G., Savaliya P.J., Belgamwar V.S.; Floating-mucoadhesive beads of clarithromycin for the treatment of *Helicobacter pylori* infection, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 2010 Jun:58(6):782-7.
57. Georg J.M., Pedersen C., Kristensen M., Frost G., Astrup A.; Review: efficacy of alginate supplementation in relation to appetite regulation and metabolic risk factors: evidence from animal and human studies, *Obesity Reviews*, 2013 Feb:14(2):129-44.
58. George M., Abraham T.E.; Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review, *Journal of Controlled Release*, 2006 Aug:114(1):1-14.
59. Ghorab D. M., Amin M. M., Khowessah O. M., Tadros M. I.; Colon-targeted celecoxib-loaded Eudragit® S100-coated poly-ε-caprolactone microparticles: Preparation, characterization and in vivo evaluation in rats, *Drug Delivery*, 2011, 18:523-535.
60. Ghosh A., Chakraborty P.; Formulation and mathematical optimization of controlled release calcium alginate micro pellets of frusemide, *Biomed Research International*, 2013, 2013:819674.
61. Giri T.K., Thakur D., Alexander A., Ajazuddin, Badwaik H., Tripathy M., Tripathi D.K.; Biodegradable IPN hydrogel beads of pectin and grafted

- alginate for controlled delivery of diclofenac sodium. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2013 May:24(5):1179-90.
62. Goh C.H., Heng P.W.S., Chan, L.W.; (2012). Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, 2012 March:88:1(17):1–12.
63. Gombotz W.R., Wee S.F.; Protein release from alginate matrices, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012 Dec 64 Supplement 194–205.
64. Gowda D.V., Manjunatha M., Balmurlidhara V., Khan M.S.; Study on encapsulation of Ranolazine in bees wax microspheres: Preparation, characterization and release kinetics of microspheres, *Der Pharmacia Lettre*, 2010, 2(6): 232-243.
65. Gowda D., Gowrav M., Gangadharappa H., Khan M.; Preparation and evaluation of mixture of eudragit and ethylcellulose microparticles loaded with ranolazine for controlled release, *Journal of Young Pharmacists*, 2011 Jul:3(3):189-96.
66. Graham D., Campen D., Hui R., Spence M., Cheetham C., Levy G., Shoor S., Ray W.A.; Risk of acute myocardial infarction and sudden cardiac death in patients treated with cyclo-oxygenase 2 selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs: Nested control study, *Lancet*, 2005, 365: 475–481.
67. Gupta M.K., Vanwert A., Bogner, R.H.; Formation of physically stable amorphous drugs by milling with neusilin, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003, 92:536-551.
68. Guzmán H.R., Tawa M., Zhang Z., Ratanabanangkoon P., Shaw P., Gardner C.R., Chen H., Moreau J.P., Almarsson O., Remenar, J.F.; Combined use of crystalline salt forms and precipitation inhibitors to improve oral absorption of celecoxib from solid oral formulations, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007, 96:2686-2702.

69. Hao X.J., Silva E.A., Mansson-Broberg A., Grinnemo K.H., Siddiqui A.J., Dellgren G., Wardell E., Brodin L.A., Mooney D.J., Sylven C.; Angiogenic effects of sequential release of VEGFA(165) and PDGF-BB with alginate hydrogels after myocardial infarction, *Cardiovascular Research*. 2007. 75:178–185.
70. Harper B.A., Barbut S., Lim L.T., Marcone M.F.; Effect of various gelling cations on the physical properties of "wet" alginate films, *Journal of Food Science*, 2014 Apr:79(4):562-7.
71. Hashimoto T., Suzuki Y., Kitada M., Kataoka K., Wu S., Suzuki K., Endo K., Nishimura Y., Ide C.; Peripheral nerve regeneration through alginate gel: analysis of early outgrowth and late increase in diameter of regenerating axons, *Experimental Brain Research*, 2002, 146:356–368.
72. Hashimoto T., Suzuki Y., Suzuki K., Nakashima T., Tanihara M., Ide C.; Peripheral nerve regeneration using non-tubular alginate gel crosslinked with covalent bonds. *Journal of Materials Science-Materials in medicine*, 2005, 16:503–509.
73. Haug A., Larsen B., Smidsrød O.; A Study of the Constitution of Alginic Acid by Partial Acid Hydrolysis, *Acta Chemica Scandinavica* 1966 20:1:183-190.
74. Haug A., Myklestad S., Larsen B., Smidsrød O.; Correlation between Chemical Structure and Physical Properties of Alginates, 1967 21:3:768:778.
75. Hill E., Boontheekul T., Mooney D.J.; Designing scaffolds to enhance transplanted myoblast survival and migration. *Tissue Engineering*, 2006a, 12:1295–1304.
76. Hill E., Boontheekul T., Mooney D.J.; Regulating activation of transplanted cells controls tissue regeneration. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America*, 2006b, 103:2494–2499.

77. Hippisley-Cox J., Coupland C. and Logan R.; Risk of adverse gastrointestinal outcomes in patients taking cyclo-oxygenase-2 inhibitors or conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs: population based nested case-control analysis, *BMJ*, 2005 Dec:331:1310–1316.
78. Hsiao P.W., Chang C.C., Liu H.F., Tsai C.M., Chiu T.H., Chao, J.I.; Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by celecoxib oppositely regulates surviving and gamma-H2AX in human colorectal cancer cells, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2007, 222:97-104.
79. Hsiong S.X., Boonthekul T., Huebsch N., Mooney D.J.; Cyclic arginine-glycine-aspartate peptides enhance three-dimensional stem cell osteogenic differentiation, *Tissue Engineering Part A*, 2009:15:263–272.
80. Hsu F.Y., Yu D.S., Huang C.C.; Development of pH-sensitive pectinate/alginate microspheres for colon drug delivery, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2013 Feb:24(2):317-23.
81. Igarashi T., Iwasaki N., Kasahara Y., Minami A.; A cellular implantation system using an injectable ultra-purified alginate gel for repair of osteochondral defects in a rabbit model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010, 94:844–855.
82. Jay S.M., Saltzman W.M.; Controlled delivery of VEGF via modulation of alginate microparticle ionic cross-linking. *Journal of Controlled Release*, 2009, 134:26–34.
83. Jenkins A.D., Kratochvíl P., Stepto R.F.T., Suter U.W.; Glossary of basic terms in polymer science (IUPAC Recommendations 1996), *Pure and Applied Chemistry*, 2009 Jan:68(12):2287–2311.
84. Jeon O., Bouhadir K.H., Mansour J.M., Alsberg E.; Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties, *Biomaterials*, 2009 May:30(14):2724-34.
85. Jork A., Thürmer F., Cramer H., Zimmermann G., Gessner P., Hämel K., Hofmann G., Kuttler B., Hahn H.J., Josimovic-Alasevic O., Fritsch KG.,

- Zimmermann U.; Biocompatible alginate from freshly collected *Laminaria pallida* for implantation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000 Feb:53(2):224-9.
86. Kajari P.B., Manjeshwar L.S., Aminabhavi T.M.; Novel pH- and temperature-responsive blend hydrogel microspheres of sodium alginate and PNIPAAm-g-GG for controlled release of isoniazid, *AAPS PharmSciTech*, 2012 Dec:13(4):1147-57.
87. Kanczler J.M., Ginty P.J., White L., Clarke N.M.P., Howdle S.M., Shakesheff K.M., Oreffo R.O.C.; The effect of the delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenic protein-2 to osteoprogenitor cell populations on bone formation, *Biomaterials*, 2010, 31:1242–1250.
88. Karavas E., Ktistis G., Xenakis A.; Georgarakis E.; Effect of hydrogen bonding interactions on the release mechanism of felodipine from nanodispersions with polyvinylpyrrolidone, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2006, 63:103-114.
89. Karczewicz A., Zasada K., Bielska D., Douglas T.E., Jansen J.A., Leeuwenburgh S.C., Nowakowska M.; Alginate-hydroxypropylcellulose hydrogel microbeads for alkaline phosphatase encapsulation, *Journal of Microencapsulation*, 2014, 31(1):68-76.
90. Karczewicz A., Zasada K., Szczubialka K., Zapotoczny S., Lach R., Nowakowska M.; “Smart” alginate–hydroxypropylcellulose microbeads for controlled release of heparin, *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, 385:163–169.
91. Kataoka K., Suzuki Y., Kitada M., Hashimoto T., Chou H., Bai H.L., Ohta M., Wu S., Suzuki K., Ide C.; Alginate enhances elongation of early regenerating axons in spinal cord of young rats. *Tissue Engineering*, 2004, 10:493–504.

92. Klemm D., Heublein B., Fink H.P., Bohn A.; Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 2005 May:44(22):3358-93.
93. Koizumi T., Aoki T., Kobayashi Y., Yasuda D., Izumida Y., Jin Z.H., Nishino N., Shimizu Y., Kato H., Murai N., Niiya T., Enami Y., Mitamura K., Yamamoto T., Kusano M.; Long-term maintenance of the drug transport activity in cryopreservation of microencapsulated rat hepatocytes. *Cell Transplantation*, 2007, 16:67–73.
94. Kong H.J., Kim E.S., Huang Y.C., Mooney D.J.; Design of biodegradable hydrogel for the local and sustained delivery of angiogenic plasmid DNA, *Pharmaceutical Research*, 2009, 25:1230–1238.
95. Krebs M.D., Salter E., Chen E., Sutter K.A., Alsberg E.; Calcium alginate phosphate-DNA nanoparticle gene delivery from hydrogels induces in vivo osteogenesis, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010, 92:1131–1138.
96. Kuo C.K., Ma P.X.; Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties, *Biomaterials*, 2001 Mar:22(6):511-21.
97. Kwok K.K., Groves M.J., Burgess D.J.; Sterile microencapsulation of BCG in alginate–poly-L-lysine by an air spraying technique, *Proceedings International Symposium of Controlled Release of Biactive Materials*, 1989, 16:170–171.
98. Lee D.A., Reisler T., Bader D.L.; Expansion of chondrocytes for tissue engineering in alginate beads enhances chondrocytic phenotype compared to conventional monolayer techniques, *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 2003 Feb:74(1):6-15.
99. Lee K.Y., Alsberg E., Hsiong S., Comisar W., Linderman J., Ziff R., Mooney D.; Nanoscale adhesion ligand organization regulates osteoblast proliferation and differentiation, *Nano Letters*, 2004, 4:1501–1506.

100. Lee K.Y., Mooney D.J.; Alginate: properties and biomedical applications, *Progress Polymer Science*, 2012 Jan:37(1):106-126.
101. Lee K.Y., Peters M.C., Anderson K.W., Mooney D.J.; Controlled growth factor release from synthetic extracellular matrices, *Nature*, 2000 Dec 21-28;408(6815):998-1000.
102. Lee P.I., Peppas N.A.; Prediction of polymer dissolution in swellable controlled-release systems, *Journal of Controlled Release*, 1987, 6:207-215.
103. Lee Y., Kim H., Kim W., Yoon J.H., Jeong S. H., Jung, Y.; Colon-specific delivery of celecoxib is a potential strategy to improve toxicological and pharmacological properties of the selective Cox-2 inhibitor: implication in treatment of familiar adenomatous polyposis, *Journal of Drug Targeting*, 2012, 20:524-534.
104. Leonard M., De Boisseson M.R., Hubert P., Dalençon F., Dellacherie E.; Hydrophobically modified alginate hydrogels as protein carriers with specific controlled release properties, *Journal of Controlled Release*, 2004, Aug:98(3):395-405.
105. Levenberg S., Rouwkema J., Macdonald M., Garfein E.S., Kohane D.S., Darland D.C., Marini R., van Blitterswijk C.A., Mulligan R.C., D'Amore P.A., Langer R.; Engineering vascularized skeletal muscle tissue, *Nature Biotechnology*, 2005, 23:879–884.
106. Lim F., Sun A.M.; Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas, *Science*, 1980, 210:908–910.
107. Lima A.A., Soares-Sobrinho J.L., Silva J.L, Corrêa-Júnior R.A., Lyra M.A., Santos, F.L., Oliveira B.G., Hernandes M.Z., Rolim L.A.; Rolim-Neto P.J.; The use of solid dispersion systems in hydrophilic carriers to increase benzonidazole solubility, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, 100: 2443-2451.

108. Lin H.R., Yeh Y.J.; Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: preparation, characterization, and in vitro studies. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, 2004, 71:52–65.
109. Lipatov Y.S., Alekseeva T.T.; Phase-separated interpenetrating polymer networks, *Advanced Polymers Science*, 2007, 208:1–227.
110. Liu Y., Liu J., Zhang X., Zhang R., Huang Y., Wu C.; In situ gelling gelrite/alginate formulations as vehicles for ophthalmic drug delivery, *AAPS PharmSciTech*, 2010 Jun:11(2):610-20.
111. Luo Y., Wang Q.; Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014 Mar:64:353-67.
112. Ma Y., Coombes A.G.; Designing colon-specific delivery systems for anticancer drug-loaded nanoparticles: an evaluation of alginate carriers, *Journal of Biomedical Materials Research A*, 2014 Sep:102(9):3167-76.
113. Mackie W.; Semi-quantitative estimation of the composition of alginates by infra-red spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 1971 20:413–415.
114. Mandal S., Thimmasetty M.K., Prabhushankar G., Geetha M.; Formulation and evaluation of an in situ gel-forming ophthalmic formulation of moxifloxacin hydrochloride; *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2012, Apr:2(2):78-82.
115. Manjanna K.M., Pramod Kumar T.M., Shivakumar B.; Calcium alginate cross-linked polymeric microbeads for oral sustained drug delivery in arthritis, *Drug Discoveries & Therapeutics*, 2010 Apr:4(2):109-22.
116. Matricardi P., Di Meo C., Coviello T., Hennink W.E., Alhaique F.; Interpenetrating Polymer Networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013 Aug;65(9):1172-87.
117. Mazhar D., Ang R., Waxman J.; COX inhibitors and breast cancer, *British Journal of Cancer*, 2006, 94:346-350.

118. Mohammed S.I., Dhawan D., Abraham S., Snyder P.W., Waters D.J., Craig B.A., Lu M., Wu M., Zheng R., Stewart J., Knapp D.W.; Cyclooxygenase inhibitors in urinary bladder cancer: in vitro and in vivo effects, *Molecular Cancer Therapeutics*, 2006, 5:329-336.
119. Mohsin K., Long M.A., Pouton C.W.; Design of lipid-based formulations for oral administration of poorly water-soluble drugs: precipitation of drug after dispersion of formulations in aqueous solution, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009, 98:3582-3595.
120. Moore J.W., Flanner H.H.; Mathematical comparison of dissolution profiles, *Pharmaceutical Technology*, 1996, 20:64-74.
121. Mørch Y.A., Donati I., Strand B.L., Skjåk-Braek G.; Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on alginate microbeads, *Biomacromolecules*, 2006 May:7(5):1471-80.
122. Mukhiddinov Z.K., Khalikov D.K., Abdusamiev F.T., Avloev C.C.; Isolation and structural characterization of a pectin homo and ramnogalacturonan, *Talanta*, 2000 Oct:53(1):171-6.
123. Nagarsenker M.S., Joshi M.S.; Celecoxib - cyclodextrin systems: characterization and evaluation of in vitro and in vivo advantage, *Drug Development & Industrial Pharmacy*, 2005, 31:169-178.
124. Nagarwal R.C., Kumar R., Pandit J.K.; Chitosan coated sodium alginate-chitosan nanoparticles loaded with 5-FU for ocular delivery: in vitro characterization and in vivo study in rabbit eye, *European Journal of Pharmaceutical Science*, 2012, Nov:47(4):678-85.
125. Nochos A., Douroumis D., Bouropoulos N.; In vitro release of bovine serum albumin from alginate/HPMC hydrogel beads, *Carbohydrate Polymers*, 2008, 74:451-457.
126. Oh S.Y., Yoo D.I., Shin Y., Kim H.C., Kim H.Y., Chung Y.S., Park W.H., Youk J.H.; Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium

- hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy, *Carbohydrate Research*, 2005 Oct:340(15):2376-91.
127. Orive G., Ponce S., Hernández R.M., Gascón A.R., Igartua M., Pedraz J.L.; Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates, *Biomaterials*, 2002 Sep:23(18):3825-31.
128. Otterlei M., Ostgaard K., Skjåk-Braek G., Smidsrød O., Soon-Shiong P., Espevik T.; Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate, *Journal of Immunotherapy*, 1991, Aug:10(4):286-91.
129. Pal D., Nayak A.K.; Development, optimization, and anti-diabetic activity of gliclazide-loaded alginate-methyl cellulose mucoadhesive microcapsules, *AAPS PharmSciTech*, 2011, Dec:12(4):1431-41.
130. Pandey R., Ahmad Z., Sharma S., Khuller G.K.; Nano-encapsulation ofazole antifungals: potential applications to improve oral drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 2005 Sep:14;301(1-2):268-76.
131. Pandey R., Khuller G.K.; Chemotherapeutic potential of alginate-chitosan microspheres as anti-tubercular drug carriers, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004 Apr:53(4):635-40.
132. Paredes-Carbajal M.C., Monsalvo I., Hernández-Díaz C., Regla I., Demare P., Mascher D.; Effects of ranolazine on vasomotor responses of rat aortic rings, *Archives of Medical Research*, 2013 Jan:44(1):8-12.
133. Park D.J., Choi B.H., Zhu S.J., Huh J.Y., Kim B.Y., Lee S.H; Injectable bone using chitosan-alginate gel/mesenchymal stem cells/BMP-2 composites, *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 2005 Feb:33(1):50-4.
134. Park H., Kang S.W., Kim B.S., Mooney D.J., Lee K.Y.; Shear-reversibly cross-linked alginate hydrogels for tissue engineering, *Macromolecular Bioscience*, 2009, 9:895–901.

135. Pasparakis G., Bouropoulos N.; Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads, *International Journal of Pharmaceutics*, 2006 Oct:323(1-2):34-42.
136. Pawar S.N., Edgar K.J.; Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications, *Biomaterials*. 2012 Apr;33(11):3279-305.
137. Penman A., Sanderson G.R.; A method for the determination of uronic acid sequence in alginates, *Carbohydrate Research*, 1972 Dec: 25:2:273-282
138. Ponce S., Orive G., Hernández R., Gascón A.R., Pedraz J.L., de Haan B.J., Faas M.M., Mathieu H.J., de Vos P.; Chemistry and the biological response against immunoisolating alginate-polycation capsules of different composition, *Biomaterials*, 2006 Oct:27(28):4831-9.
139. Potthast H., Dressman J.B., Junginger H.E., Midha K.K., Oeser H., Shah V.P., Vogelpoel H., Barends D.M.; Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: ibuprofen, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005 94:2121–2131.
140. Puguán J.M., Yu X., Kim H.; Characterization of structure, physico-chemical properties and diffusion behaviour of Ca-Alginate gel beads prepared by different gelation methods. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2014 Oct:432:109-16.
141. Puttipipatkachron S., Pongjanyakul T., Priprem A.; Molecular interaction in alginate beads reinforced with sodium starch glycolate or magnesium aluminium silicate and their characteristics, *International Journal of Pharmaceutics*, 2005, 293:51-62.
142. Queen D., Orsted H., Sanada H., Sussman G.; A dressing history. *International Wound Journal*, 2004; 1:59–77.
143. Rahman M., Hasan S., Alam A., Roy S., Jha M.K, Ahsan Q., Rahman H.; Formulation and evaluation of Ranolazine sustained release matrix tablets using Eudragit and HPMC, *International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Research*, 2011, 2(1), 7-12.

144. Rawat S., Jain S.K.; Solubility enhancement of celecoxib using β -cyclodextrin inclusion complexes, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2004, 57:263-267.
145. Reddy B.M., Weintraub H.S., Schwartzbard A.Z.; Ranolazine: a new approach to treating an old problem. *Texas Heart Institute Journal*, 2010, 37(6):641-7.
146. Reis C.P., Candeias S., Fernandes C., Martinho N., Aniceto N.; Ibuprofen Nanoparticles for Oral Delivery: Proof of Concept. *Journal of Nanomedicine and Biotherapeutic Discovery*, 2013, 4:119.
147. Reis C.P., Ribeiro A.J., Houg S., Veiga F., Neufeld R.J.; Nanoparticulate delivery system for insulin: design, characterization and in vitro/in vivo bioactivity, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007 Apr:30(5):392-7.
148. Remunan-Lopez C., Bodmeier R.; Mechanical, water uptake and permeability properties of crosslinking chitosan glutamate and alginate films, *Journal of Controlled Release*, 1997, 44:215-225.
149. Rinaudo M.; On the abnormal exponents in Mark Houwink type equations for wormlike chain polysaccharides, *Polymer Bulletin*, 1992, 27: 585–589.
150. Ritger P. L., Peppas N.A.; A simple equation for description of solute release. I. Fickian and non-Fickian release from non swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs, *Journal of Controlled Release*, 1987, 5:23-36.
151. Roberts G.A.F., *Chitin Chemistry*, MacMillan edition, 1992, London (UK).
152. Robeson L.M.; *Polymer Blends: A Comprehensive Review*, Hanser Gardner Publications, Cincinnati, (USA), 2007.
153. Rowley J.A., Madlambayan G., Mooney D.J.; Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials, *Biomaterials*, 1999 Jan:20(1):45-53.

154. Roy R., Boskey A., Bonassar L.J.; Processing of type I collagen gels using nonenzymatic glycation. *Journal of Biomedical Materials Research A*. 2010 Jun 1;93(3):843-51.
155. Rupenthal I.D., Green C.R., Alany R.G.; Comparison of ion-activated in situ gelling systems for ocular drug delivery. Part 1: physicochemical characterisation and in vitro release, *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, Jun:411(1-2):69-77.
156. Rzaev Z.M.O., Dincer S., Piskin E.; Functional copolymers of N-isopropylacrylamide for bioengineering applications, *Progress in Polymer Science*, 2007; 32:534–595.
157. Sæther H.V., Holme H.K., Maurstad G., Smidsrød O., Stokke B.T.; Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan, *Carbohydrate Polymers*, 2008 Nov:74(4):813–821.
158. Saha S., Pal A., Kundu S., Basu S., Pal T.; Photochemical green synthesis of calcium-alginate-stabilized Ag and Au nanoparticles and their catalytic application to 4-nitrophenol reduction, *Langmuir*.2010 Feb 16:26(4):2885-93.
159. Sankalia M.G., Mashru R.C., Sankalia J.M., Sutariya V.B.; Papain entrapment in alginate beads for stability improvement and site-specific delivery: physicochemical characterization and factorial optimization using neural network modeling. *AAPS PharmSciTech*, 2005 Sep:6(2):209-22.
160. Seedher N., Bhatia S.; Solubility enhancement of Cox-2 inhibitors using various solvent systems, *AAPS PharmSciTech*, 2003, 4:E33.
161. Shapiro L., Cohen S.; Novel alginate sponges for cell culture and transplantation, *Biomaterials*. 1997 Apr:18(8):583-90.
162. Shepherd R., Reader S., Falshaw A.; Chitosan functional properties, *Glycoconjugate Journal*, 1997 Jun:14(4):535-42.
163. Shimoyama T., Itoh K., Kobayashi M., Miyazaki S., D'Emanuele A., Attwood D.; Oral liquid in situ gelling methylcellulose/alginate

- formulations for sustained drug delivery to dysphagic patients. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2012 Aug;38(8):952-60.
164. Skjåk-Braek G., Grasdalen H., Larsen B.; Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates, *Carbohydrate Research*, 1986 Oct;154:239-50.
165. Skórkowska-Telichowska K., Czemplik M., Kulma A., Szopa J. The local treatment and available dressings designed for chronic wounds, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2013 Apr;68(4):e117-26.
166. Sörgel F., Fuhr U., Minic M., Siegmund M., Maares J., Jetter A.; Pharmacokinetics of ibuprofen sodium dihydrate and gastrointestinal tolerability of short-term treatment with a novel, rapidly absorbed formulation, *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2005, 43:140–149.
167. Sosnik A.; Alginate Particles as Platform for Drug Delivery by the Oral Route: State-of-the-Art; *ISRN Pharmacology*, 2014 Apr:2014:926157.
168. Sriamornsak P.; Preliminary investigation of some polysaccharides as a carrier for cell entrapment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1998 Sep;46(2):233-6.
169. Steginsky C.A., Beale J.M., Floss H.G., Mayer R.M. Structural determination of alginic acid and the effects of calcium binding as determined by high-field NMR, *Carbohydrate Research*, 1992 Feb;17;225(1):11-26.
170. Stone P.H.; Ranolazine: new paradigm for management of myocardial ischemia, myocardial dysfunction, and arrhythmias, *Cardiology Clinics*, 2008 Nov;26(4):603-14.
171. Strasdat B., Bunjes H.; Incorporation of lipid nanoparticles into calcium alginate beads and characterization of the encapsulated particles by differential scanning calorimetry, *Food Hydrocolloids*, 2013, 30:567-575.

172. Sudheer K., Mandal P.K., Das C., Pal U.K., Santoshkumar H.T., Rao V.K.; Development of restructured chicken block utilizing gizzard and its refrigerated storage stability, *Journal of Food Science and Technology*, 2011 Feb;48(1):96-101.
173. Sun Q.H., Silva E.A., Wang A.X., Fritton J.C., Mooney D.J., Schaffler M.B., Grossman P.M., Rajagopalan S. Sustained release of multiple growth factors from injectable polymeric system as a novel therapeutic approach towards angiogenesis, *Pharmaceutical Research*, 2010, 27:264–271.
174. Sun X, Uyama H.; A poly(vinyl alcohol)/sodium alginate blend monolith with nanoscale porous structure, *Nanoscale Research Letters*, 2013 Oct 4:8(1):411.
175. Susanto H., Ulbricht M.; High-performance thin-layer hydrogel composite membranes for ultrafiltration of natural organic matter, *Water Research*, 2008 May;42(10-11):2827-35.
176. Suzuki K., Suzuki Y., Tanihara M., Ohnishi K., Hashimoto T., Endo K., Nishimura Y.; Reconstruction of rat peripheral nerve gap without sutures using freeze-dried alginate gel. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000, 49:528–533.
177. Szymanski J.M., Feinberg A.W.; Fabrication of freestanding alginate microfibers and microstructures for tissue engineering applications, *Biofabrication*, 2014 Jun;6(2):024104.
178. Tavakol M., Vasheghani-Farahani E., Hashemi-Najafabadi S.; The effect of polymer and CaCl₂ concentrations on the sulfasalazine release from alginate-N,O-carboxymethyl chitosan beads, *Progress in Biomaterials* 2013 Apr;2:10 .
179. Thornton A.J., Alsberg E., Albertelli M., Mooney D.J.; Shape-defining scaffolds for minimally invasive tissue engineering. *Transplantation*, 2004, 77:1798–1803.

180. Tønnesen H.H., Karlsen J.; Alginate in drug delivery systems, *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2002 Jul;28(6):621-30.
181. Truffa A.A., Newby L.K., Melloni C.; Extended-release ranolazine: critical evaluation of its use in stable angina, *Vascular Health and Risk Management*, 2011, 7:535-9.
182. Uludag H., De Vos P., Tresco P.A.; Technology of mammalian cell encapsulation, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2000 Aug 20;42(1-2):29-64.
183. Velings N.M., Mestdagh, M.M.; Physico-Chemical Properties of Alginate Gel Beads, *Polymer Gels and Networks*, 1995, 3(20):311-330.
184. Verreck G., Six K., Van den Mooter G., Baert L., Peeters J., Brewster M.E.; Characterization of solid dispersions of itraconazole and hydroxypropylmethylcellulose prepared by melt extrusion – Part I, *International Journal of Pharmaceutics*, 2003, 251:165-174.
185. Vos P., Faas M.M., Strand B., Calafiore R.; Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets, *Biomaterials*, 2006 Nov;27(32):5603-17.
186. Walkenstrom P., Kidman S., Hermansson A.M., Rasmussen P.B., Hoegh, L., Microstructure and rheological behaviour of alginate/pectin mixed gels, *Food Hydrocolloids*, 2003 Sep;17(5):593-603.
187. Wallace J.L.; Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself?, *Physiological Reviews*, 2008, 88: 1547–1565.
188. Wandrey C., Vidal D.S.; Purification of polymeric biomaterials, *Annals of the New York Academy Sciences*, 2001 Nov;944:187-98.
189. Weng L., Gouldstone A., Wu Y., Chen W., Mechanically strong double network photo cross linked hydrogels from N, N-dimethylacrylamide and glycidyl methacrylated hyaluronan, *Biomaterials*, 2008, 29:2153–2163.

190. Wiegand C., Heinze T., Hipler U.C.; Comparative in vitro study on cytotoxicity, antimicrobial activity, and binding capacity for pathophysiological factors in chronic wounds of alginate and silver-containing alginate. *Wound Repair and Regeneration*, 2009 Jul-Aug;17(4):511-21.
191. Zhao S., Cao M., Li H., Li L., Xu W.; Synthesis and characterization of thermo-sensitive semi-IPN hydrogels based on poly(ethylene glycol)-copoly(epsilon-caprolactone) macromer, N-isopropylacrylamide, and sodium alginate, *Carbohydrate Research*, 2010 Feb 11;345(3):425-31.
192. Zimmermann U., Klöck G., Federlin K., Hannig K., Kowalski M., Bretzel R.G., Horcher A., Entenmann H., Sieber U., Zekorn T.; Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis, *Electrophoresis*, 1992 May;13(5):269-74.
193. Zmora S., Glicklis R., Cohen S.; Tailoring the pore architecture in 3-D alginate scaffolds by controlling the freezing regime during fabrication, *Biomaterials*, 2002, 23:4087–4094.