

**Alma Mater Studiorum
Università degli Studi di Bologna**

FACOLTÀ DI FARMACIA

Dipartimento di Scienze Farmaceutiche
Dottorato di Ricerca in Scienze Farmaceutiche
Settore disciplinare CHIM09

**SVILUPPO E STUDIO DI FORMULAZIONI BIOADESIVE
AD USO TOPICO PER IL RILASCIO CONTROLLATO DI
PRINCIPI ATTIVI**

Tesi di Dottorato di
Valentina Bergamante

Tutore
Prof.ssa **Isabella Orienti**

Coordinatore
Chiar.mo Prof. **Domenico Spinelli**

INDICE

<u>INTRODUZIONE</u>	1
<u>1.LA MUCOSA ORALE</u>	3
1.1 Mucosa orale	3
1.2 Epitelio orale	6
1.3 Membrana basale	6
1.4 Il tessutoconnettivo	6
1.5 Sistema vascolare della mucosa orale	7
1.6 Secrezione salivare	7
1.7 Secrezione mucosale	10
<u>2.VEICOLAZIONE DEI FARMACI ATTRAVERSO LA MUCOSA</u>	11
2.1 Permeabilità della mucosa orale	14
2.2 Modelli animali per lo studio della permeabilità	18
<u>3. RILASCIO DI FARMACI DA FORMULAZIONI SOLIDE</u>	19
3.1 Modelli matematici della cinetica di rilascio	19
3.2 Rilascio di farmaci da idrogeli	19
<u>4. LA CONVALIDA (CONVALIDA MUCOSE)</u>	24
4.1 Caratteri generali	24
4.2 Tipi di convalida	25
4.3 Sviluppo della convalida	28
4.4 Principali parametri	31
<u>5. SISTEMI BIOADESIVI</u>	43
5.1 Il meccanismo di bioadesione	43
5.2 Teorie della bioadesione	45
5.3 I polimeri bioadesivi	48
5.4 Metodi di misura	50
<u>6. PARTE SPERIMENTALE</u>	52
6.1 Formulazioni sviluppate	52
6.2 Materiali	57
6.3 Apparecchiature	61
6.4 Metodiche	66
<u>7. SVILUPPO DEL LAVORO</u>	72
7.1 Test effettuati	72
7.2 Formulazioni sviluppate	76
<u>8. RISULTATI E COMMENTI</u>	79
8.1 Convalida della metodica HPLC usata nel test di permeazione	79
8.2 Solubilità della clorexidina nella formulazioni sviluppate	89
8.3 Test di dissoluzione secondo FUXI	91
8.4 Test di rilascio in vitro delle formulazioni studiate	95
8.5 Misure reologiche sui gel e sui polimeri bioadesivi sviluppati	99
8.6 Test bilaterale di permeabilità e rilascio	105
<u>9.CONCLUSIONI</u>	108
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	109

INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO

La ricerca scientifico-farmaceutica è focalizzata sulla produzione di formulazioni farmaceutiche capaci di prolungare l'azione terapeutica del principio attivo nel tempo e, contemporaneamente, di aumentare la specificità d'azione nel distretto dell'organismo in cui è richiesta l'attività farmacologica.

Molte preparazioni farmaceutiche, attualmente in commercio, infatti, non impediscono la dispersione del principio attivo nell'organismo; sono incapaci di mantenere pressoché costante, nel tempo, la concentrazione di efficacia del farmaco a livello del tessuto bersaglio e, spesso, non proteggono il principio attivo, contenuto nel veicolo, dalle degradazioni ossido-riduttive, enzimatiche ed idrolitiche apportate dall'ambiente biologico.

A tal proposito, per quello che riguarda le formulazioni ad uso stomatologico, la preparazione di sistemi, costituiti da materiali polimerici con azione mucoadesiva, rappresenta una possibile soluzione ai problemi precedentemente citati.

I materiali bioadesivi utilizzati nello sviluppo di formulazioni mucoadesive ad uso buccale sono in genere macromolecole idrofile caratterizzate dalla presenza di un elevato numero di funzioni capaci di garantire l'instaurarsi di numerose interazioni deboli, fra cui legami ionici e a idrogeno, che garantiscono la bioadesione della formulazione alle glicoproteine del muco (1).

Sistemi a rilascio controllato di farmaci ad azione topico-locale risultano essere importanti perché hanno la funzione di aumentare l'efficacia di azione del principio attivo nella zona terapeutica e limitarne l'assorbimento sistemico (2).

Per questo motivo la ricerca tecnologica si sta rivolgendo allo sviluppo di sistemi ad uso buccale (3,4) capaci di controllare il rilascio del principio attivo e di aumentarne il tempo di residenza a livello del sito di somministrazione, visto che molte di queste formulazioni attualmente disponibili presentano alcuni inconvenienti; ad esempio i film ricoprono un'ampia area (5), ma la loro applicazione non sempre è confortevole e la loro durata d'azione non è efficace per molto tempo, ed è difficile una corretta applicazione della dose terapeutica; i collutori sono di applicazione più semplice ed è possibile anche somministrare la dose esatta, ma la loro durata d'azione è brevissima. Nel presente studio sono state sviluppate tre diverse formulazioni mucoadesive a rilascio controllato per uso buccale in forma di compresse (6,7), di gel (8) e sistemi contenuti ciclostirine anfifiliche, preparate appositamente e studiate per le loro proprietà bioadesive (9).

Le compresse e i gel mucoadesivi sono caratterizzati dalla presenza nella formulazione di polimeri e derivati della cellulosa con note proprietà bioadesive: Acido poliacrilico, Carbossimetilcellulosa

Idrossipropilcellulosa, Idrossipropilmetilcellulosa. Le ciclodestrine anfifiliche sono state preparate per sostituzione di alcune funzioni ossidriliche con acidi grassi a diversa lunghezza.

Per studiare l'efficacia del controllo del rilascio dei sistemi bioadesivi sviluppati, associato a una ridotta permeazione mucosale, si è scelto come farmaco di riferimento la clorexidina, una bisbiguanide con proprietà antifungine e antisettiche ad ampio spettro, che è largamente utilizzata in odontoiatria principalmente per gestire irritazioni periodontali e nelle procedure pre-operatorie orali la clorexidina possiede un ampio spettro d'azione, ma il suo utilizzo a lungo termine è limitato dal sapore sgradevole e dalla tendenza a creare macchie sulla superficie dei denti (10). Il meccanismo con il quale la Clorexidina produce macchie scure ai denti sembra essere una conseguenza della denaturazione di proteine, accompagnata all'esposizione dei gruppi sulfidrilici, che reagirebbero con ioni metallici, come il ferro, formando dei solfuri colorati, oppure può direttamente far precipitare coloranti organici presenti nei cibi (11). Per poter valutare inoltre in maniera reale quanto le formulazioni sviluppate fossero efficaci nell'associare un buon controllo del rilascio a una ridotta permeazione mucosale, sono stati convalidati tutti i passaggi relativi al processo di permeazione attraverso la mucosa, dal suo prelievo dell'animale appena sacrificato, operazione effettuata da un veterinario, fino allo studio di permeazione del principio attivo attraverso la mucosa trattata. Si è scelto di valutare la permeazione della clorexidina attraverso una mucosa, in quanto è lo stesso farmaco presente nelle formulazioni sviluppate ad uso stomatologico. I test di permeazione sono stati effettuati sia sulla mucosa fresca sia su quella conservata a -21° C per diversi periodi di tempo: un giorno, 1,2,3,4 settimane di congelamento per studiare la riproducibilità in funzione del tempo di preparazione. È stata convalidata la metodica HPLC utilizzata nello studio di permeazione.

1. LA MUCOSA ORALE

1.1 Mucosa orale

La mucosa orale è un tessuto che ricopre la cavità buccale ed ha caratteristiche più vicine alla pelle che ad altre mucose (gastrica, intestinale, ecc...). I rivestimenti, che tappezzano la superficie interna di organi cavi comunicanti con l'esterno, sono denominati mucose o membrane mucose. La mucosa orale è sottoposta ad elevate sollecitazioni meccaniche e deve essere particolarmente resistente all'attacco dei microrganismi; è composta, infatti, dal tessuto epiteliale, da una membrana basale e dal tessuto connettivo.

1.2 Epitelio orale

L'epitelio orale è composto da vari strati di cellule di forma diversa e costituisce la parte della mucosa orale che limita l'assorbimento di una sostanza.

La nutrizione delle cellule epiteliali è garantita dalla diffusione delle sostanze per mezzo dei capillari presenti nel tessuto connettivo.

1.2.1 Istologia dell'epitelio buccale

Le cellule dell'epitelio orale sono classificate, dall'esterno verso l'interno, in:

- **Cellule dello strato corneo o cheratinociti**

I cheratinociti sono disposti in diversi piani, privi di nucleo, con membrana plasmatica molto spessa e forma appiattita. Ogni cellula sintetizza e accumula proteine fibrillari che rappresentano unità strutturali della cheratina.

- **Cellule dello strato lucido**

Sono disposte su vari piani, prive di nucleo, con citoplasma colmo di filamenti.

- **Cellule dello strato granuloso**

Sono cellule provviste di nucleo ed hanno forma appiattita. Nel citoplasma si trovano granuli di cheratoidina che contribuiscono alla struttura proteica della parete cellulare e forniscono una barriera rinforzante tra le cellule, costituendo un riparo nei confronti del materiale estraneo.

- **Cellule dello strato spinoso**

Queste cellule sono disposte su più piani, hanno una forma poliedrica, si presentano separate tra loro da piccoli spazi intercellulari ripieni di materiale glicoproteico. Nel citoplasma di queste cellule si trovano fascetti di tonofibrille che contribuiscono ad aumentare la resistenza dell'epitelio.

- **Cellule dello strato profondo o basale**

Sono cellule dotate di un'intensa attività proliferativa, destinata a rimpiazzare, assieme alle cellule dello strato spinoso, le cellule degli strati superiori. Esse presentano un grosso nucleo e poggiano direttamente sulla membrana basale. L'adesione tra le cellule è garantita da desmosomi, cioè dispositivi di connessione tra cellule contigue, costituiti da aree ovali o circolari in cui le membrane di cellule adiacenti sono collegate da un ponte di sottili filamenti. Tale sistema garantisce una maggiore resistenza dell'epitelio allo stress chimico e fisico.

L'epitelio buccale è composto da circa 50 strati di cellule mentre quello sublinguale ne conta una quantità inferiore. Man mano che le cellule maturano, migrano dallo strato basale verso la superficie, si appiattiscono, aumentano di peso ed inoltre aumentano i tonofilamenti mentre diminuiscono la maggior parte degli organelli citoplasmatici. Il turnover cellulare è di circa 6 giorni. Al processo di cheratinizzazione partecipano i tonofilamenti ed i granuli di cheratoialina. Con la differenziazione, nelle cellule basali si ha un accumulo di lipidi e di filamenti nelle proteine

citoplasmatiche. Una parte dei lipidi si accumula all'interno di piccoli organelli chiamati "granuli lamellari" evidenti nello strato spinoso.

Nelle cellule cheratinizzate tali organelli si fondono con la membrana citoplasmatica, riversando i lipidi nello spazio extracellulare. I granuli lamellari rappresentano delle barriere che diminuiscono la permeabilità dell'epitelio squamoso stratificato.

La composizione dell'epitelio, nella cavità orale, varia secondo la localizzazione, distinguendosi in:

- EPITELIO STRATIFICATO CHERATINIZZATO: è formato dallo strato basale, spinoso, granuloso, lucido e corneo. Ricopre le gengive ed il palato duro, cioè la parte della bocca maggiormente sollecitata meccanicamente. Questo epitelio è cheratinizzato in maniera simile all'epidermide.

- EPITELIO STRATIFICATO NON CHERATINIZZATO: è formato dallo strato basale, spinoso e granuloso. Ricopre il palato molle e le regioni sublinguali. In queste cellule il processo di cheratinizzazione è meno evidente.

Nell'epitelio cheratinizzato i granuli contengono lipidi polari (glicolipidi e fosfolipidi), glicoproteine e diversi enzimi proteolitici. Si è pensato che questi lipidi polari fossero i precursori dei lipidi non polari (acidi grassi liberi, ceramidi) responsabili della barriera di permeabilità dell'epitelio cheratinizzato; gli enzimi presenti potrebbero essere coinvolti in questo processo di conversione.

I granuli dell'epitelio non cheratinizzato hanno morfologia simile a quelli dell'epitelio cheratinizzato, con gli stessi enzimi idrolitici e con un comportamento simile in relazione alla permeabilità, tuttavia essi non contengono acilceramidi, hanno solo una modesta quantità di ceramidi e contengono una piccola quantità di lipidi neutri polari, principalmente colesterolo solfato e glicosil ceramidi.

Con l'avanzare dell'età, in alcune regioni della mucosa orale, si ha un assottigliamento dell'epitelio ed ispessimento del tessuto connettivo, inoltre si ha diminuzione del processo proliferativo cellulare e della permeabilità all'acqua. Si hanno cambiamenti anche a livello della lamina propria, infatti, malattie come diabete e aterosclerosi causano una riduzione dell'irrorazione della mucosa orale con conseguente riduzione della permeabilità.

1.3 Membrana basale

Strato continuo di materiale extracellulare interposto tra lo strato basale dell'epitelio ed il tessuto connettivo della lamina propria e della sottomucosa. La membrana basale ha una struttura trilaminare costituita, nella parte più alta, da uno strato amorfo dove distinguiamo: una lamina lucida, dello spessore di 40-80 nm, una lamina densa, di spessore simile ed una regione più larga di materiale fibroso.

Tale membrana ha probabilmente due funzioni:

- 1) Conferire aderenza fra epitelio e tessuto connettivo sottostante e supportare meccanicamente l'epitelio stesso.
- 2) Fare da barriera al passaggio delle cellule e di alcune grosse molecole attraverso la mucosa.

La membrana non offre alcun tipo di resistenza alla permeazione dei principi attivi poiché è perfusa dai capillari.

1.4 Il tessuto connettivo

Strato continuo contenente collagene, fibre elastiche ed elementi cellulari immersi in una sostanza idratata circostante.

Contiene, inoltre, capillari e fibre nervose che afferiscono alla mucosa stessa.

Il tessuto connettivo, come la membrana basale, non costituisce una barriera al passaggio del principio attivo, poiché ha una struttura poco densa che permette persino il passaggio di grosse molecole, inoltre la sua matrice idrofila facilita il passaggio dei penetranti idrofili. Studi di permeazione con traccianti (rafano perossidasi e nitrato di lantanio) hanno dimostrato che sia la membrana basale sia il tessuto connettivo sono facilmente attraversabili, mentre lo strato esterno dell'epitelio appare impermeabile ad entrambi i traccianti.

1.5 Sistema vascolare della mucosa orale

L'epitelio che ricopre il tessuto connettivo non è vascolarizzato, è invece vascolarizzata la tonaca propria della mucosa orale sottostante, il che spiega la sua colorazione rossa.

Le vene di ritorno che dalla bocca tornano nella circolazione sistemica, si immettono nella vena giugulare, evitando sia il tratto gastrointestinale sia il sistema portale epatico.

Tale irrorazione sanguigna è dovuta alla perifericità della mucosa orale, che non essendo specializzata nell'assorbimento delle sostanze nutritive, richiede minor afflusso ematico rispetto al restante tratto gastrointestinale. Tuttavia, essendo una mucosa molto ricca in vasi sanguigni e linfatici, permette il raggiungimento di elevati livelli plasmatici ed un rapido effetto terapeutico.

1.6 Secrezione salivare

Le tre ghiandole salivari maggiori (o extraparietali) che producono saliva nella cavità orale (parotidi, sublinguali e sottomandibolari), sono situate al di fuori della cavità orale. Le ghiandole salivari minori (o intraparietali), invece, sono situate nel vestibolo della bocca. Queste ghiandole producono fino a 1500 ml di saliva durante la giornata.

Le funzioni principali della saliva riguardano l'umidificazione della cavità orale, una pre-digestione del cibo e la lubrificazione del cibo per la masticazione e la deglutizione. Un ruolo importantissimo della saliva è di mantenere in buone condizioni i tessuti della bocca soggetta all'attacco di germi patogeni, capaci di provocare lesioni distruttive ai tessuti; essa, infatti, contiene ioni tiocianato ed enzimi proteolitici in grado di uccidere i microrganismi, nonché anticorpi capaci di uccidere i batteri, anche quelli responsabili della carie.

Oltre il 90% della saliva è secreta dalle ghiandole salivari maggiori, in particolare dalle ghiandole sottomandibolari, circa l'8% da quelle minori.

Normalmente la secrezione salivare è di circa 3 mL/min, ma può essere aumentata sia dalla stimolazione parasimpatica, che conduce ad una secrezione acquosa abbondante, sia dalla stimolazione simpatica la quale porta ad una secrezione mucinosa rada e spessa. Uomini adulti possiedono un volume medio di saliva di 0,9 mL mentre femmine adulte circa 0,8 mL. L'area totale della cavità orale normalmente disponibile all'accesso della saliva è di 217 cm² per l'adulto, mentre lo spessore medio del film di saliva che ricopre la cavità buccale è di circa 0,1 mm: esso tende ad aumentare vicino ai dotti escretori delle ghiandole salivari maggiori, oppure tende a diminuire

quando le superfici mucosali sono separate, ad esempio durante la fonazione o durante la respirazione con la bocca.

Si distinguono due tipi di secrezione:

- Secrezione sierosa dove è presente la ptialina, una α -amilasi;
- Secrezione mucosale che contiene mucina, sostanza che ha azione lubrificante.

Le ghiandole sottolinguali e sottomandibolari sono ghiandole mucose che secernono soltanto muco, le sottomandibolari sono mucose e sierose, mentre le parotidi sono sierose.

C'è una considerevole variazione del flusso di saliva tra gli individui, sia durante la giornata che in presenza di malattie. La secrezione è maggiore durante la giornata e minore durante la notte.

L'ampia variabilità nella velocità del flusso di saliva, che dipende anche dall'anatomia della bocca e della dentatura, determina conseguentemente variazioni nella quantità di rilascio dei farmaci durante la giornata.

La secrezione di saliva può essere stimolata in vari modi, mediante impulsi meccanici (pressione), chimici (gusto, olfatto), o fisici.

Stimoli acidi possono aumentare la secrezione di saliva di 2,5-3 volte e ciò è da tenere presente se si somministrano formulazioni acide.

La saliva è un liquido isotonico rispetto al plasma, viscoso, incolore, leggermente opalescente ed ha un valore di pH compreso tra 5,8 e 7,4.

Il pH all'interno della bocca può essere ridotto fino a valori di 3-4 in seguito all'azione di batteri che proliferano nella bocca grazie alla presenza di zuccheri provenienti dalla digestione parziale degli amidi da parte dell' α -amilasi.

La saliva è composta per il 99% di acqua ed è un fluido complesso, contenente materiali inorganici e organici (1%).

La saliva ha una scarsa capacità tamponante, il principale tampone della saliva è il bicarbonato. Questo può permettere di variare localmente il pH in modo tale da favorire l'assorbimento di farmaci non ionizzati. Inoltre quando la velocità di flusso è elevata le concentrazioni di ioni sodio e bicarbonato aumentano conducendo gradatamente ad un aumento del pH.

Il principale fattore che influenza la composizione della saliva è la velocità di flusso, che a sua volta dipende da tre fattori:

- Momento della giornata.
- Tipo di stimolo.
- Grado di stimolazione.

La semplice vista o l'introduzione di cibo nella bocca può stimolare le ghiandole salivari a produrre una maggiore quantità di saliva. Ciò determina un aumento del volume di saliva e la diluizione di eventuali farmaci presenti nella cavità orale.

Sono stati compiuti numerosi studi sulla ritenzione di sostanze in vari punti della bocca, ed è stato evidenziato come questa sia elevata a livello del solco labiale superiore, molto probabilmente dovuta alla distanza dall'apertura dei dotti delle ghiandole superiori, mentre è bassa a livello del solco labiale inferiore, a causa del maggiore effetto drenante della saliva nella parte inferiore della bocca. La rimozione maggiore si ha a livello sublinguale, dove la saliva forma una pozza, qui le sostanze vengono rapidamente diluite e rimosse dal liquido salivare prodotto dalle ghiandole sublinguali e sottomandibolari, nonché dal movimento della lingua.

Nella parte posteriore del solco superiore la saliva si diluisce e sposta le sostanze verso la parte labiale del solco superiore, poi in basso nel solco inferiore che termina a fondo cieco, quindi in queste zone si tende ad avere una maggiore concentrazione delle sostanze e la saliva confluisce proprio nel solco labiale inferiore a fondo cieco.

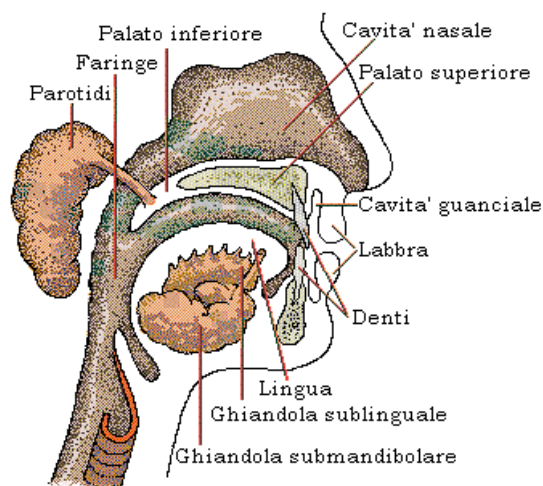


Figura 1: Ghiandole salivari.

1.7 Secrezione mucosale

Il ruolo principale del muco è quello di proteggere la mucosa dall'aggressione di agenti esterni, da insulti fisici, meccanici, chimici, chimico-fisici, batterici e virali.

Le cellule dell'epitelio orale sono circondate da una sostanza intercellulare chiamata muco, i cui principali componenti sono complessi proteici e carboidrati.

Questi complessi proteici possono essere liberi, oppure possono legarsi a certe regioni sulla superficie delle cellule; questa matrice può giocare un ruolo fondamentale nell'adesione tra le cellule, così come agire da lubrificante, permettendo alle cellule di muoversi verso altre cellule. Il muco gioca anche un ruolo fondamentale nel meccanismo di bioadesione di sistemi mucoadesivi a rilascio controllato.

Il muco si presenta molto viscoso, con un aspetto di gel, ed è dotato di forti proprietà coesive interne e adesive nei confronti di altre molecole. Ha azione lubrificante e protettiva allo stesso tempo.

La composizione chimica del muco è variabile: dipende dall'epitelio che lo ha prodotto e dal tipo di mucosa che ricopre.

Nella mucosa orale il muco è secreto dalle ghiandole salivari maggiori e minori come parte della saliva.

L'acqua rappresenta il 95% circa della massa mucosale. Gli altri componenti della mucosa sono:

- Proteine libere (0,5-5%);
- Glicoproteine (0,5-5%);
- Lipidi;
- Enzimi;
- Sali minerali (1%);
- Cellule epiteliali morte;
- Prodotti di origine batterica.

Il principale componente del muco è la mucina (PM 500000 Dalton).

Essa è una glicoproteina costituita da una catena proteica lineare (circa 800 aa). Gli aminoacidi maggiormente presenti nella catena sono: treonina, serina, prolina.

Molti dei gruppi ossidrilici appartenenti a questi aminoacidi sono legati, mediante legami O-glicosidici, a catene oligosaccaridiche secondarie che possono rappresentare fino all'80% del peso della glicoproteina. Le catene glucidiche contengono, in ordine decrescente, galattosio, N-acetilgalattosamina, N-acetilglucosamina, acido sialico. Circa il 70% della mucina presente

nella saliva è prodotta dalle ghiandole salivari minori. A pH fisiologico il muco possiede una carica negativa dovuta all'acido sialico e ai residui solfato, ciò può giocare un ruolo importantissimo nella mucoadesione. Infatti, a questo pH, il muco può formare un gel molto coesivo che genera nell'epitelio della superficie delle cellule uno strato gelatinoso.

2. VEICOLAZIONE DEI FARMACI ATTRAVERSO LA MUCOSA

Distinguiamo tre tipi di veicolazione di farmaci attraverso la mucosa:

a) **VEICOLAZIONE SISTEMICA BUCCALE:**

Interessa la somministrazione del farmaco attraverso la mucosa buccale propriamente detta, parte questa meno permeabile dell'area sublinguale, di conseguenza non dà un rapido assorbimento ed una rapida biodisponibilità. La mucosa buccale è abbastanza liscia ed ha una superficie immobile, idonea quindi all'applicazione di sistemi a rilascio controllato, quali possono essere le compresse mucoadesive. Queste caratteristiche rendono la mucosa più adatta per formulazioni a rilascio prolungato, per molecole poco permeabili. Per sopperire alla bassa biodisponibilità, in alcuni casi, si ricorre all'uso di un cosolvente o un modulatore di pH che aumenti la solubilità del farmaco o il coefficiente di ripartizione nel tessuto mucosale, al fine di modificare l'ambiente attorno al sito di assorbimento. Inoltre è possibile inserire nella formulazione promotori di assorbimento (enhancers).

b) **VEICOLAZIONE SISTEMICA SUBLINGUALE:**

Utilizza l'assorbimento sistemico di farmaci attraverso la mucosa sublinguale, costituita dalla membrana della superficie ventrale della lingua e da quella del pavimento della bocca. Le membrane citate sono abbastanza permeabili, quindi garantiscono un rapido assorbimento del farmaco ed una accettabile biodisponibilità. La membrana è ruvida e mobile ed è costantemente bagnata da una considerevole quantità di saliva e quindi non può essere utilizzata per la veicolazione di un sistema mucoadesivo. Per questa ragione la principale applicazione della veicolazione sublinguale rimane per quei sistemi per i quali sono richiesti tempi di rilascio brevi, o per i quali è richiesto un rapido inizio di azione. Generalmente le forme di dosaggio utilizzate sono rappresentate da compresse o capsule di gelatina molle contenenti all'interno un farmaco oleoso in forma liquida.

c) VEICOLAZIONE LOCALE:

Questo tipo di veicolazione trova applicazione nel trattamento di dentalgie, malattie parodontali, stomatiti, afte, affezioni batteriche e fungine, ecc. Le formulazioni per le somministrazioni orali locali sono principalmente pastiglie e collutori, che assicurano un'elevata quantità di farmaco a contatto con la cavità orale, anche se per breve periodo. Il flusso di saliva rappresenta un importante fattore da considerare quando si parla di veicolazione locale. Infatti, è necessario scegliere farmaci che vengano rapidamente assorbiti, oppure ricorrere a frequenti somministrazioni del farmaco. La durata dell'azione del farmaco può essere aumentata mediante l'utilizzo di creme, unguenti o gel che vengono applicati alla mucosa orale. Recentemente per prolungare il rilascio nella cavità orale sono state utilizzate compresse mucoadesive.

2.1 Permeabilità della mucosa orale

La permeabilità della mucosa orale varia secondo la zona della cavità orale che viene presa in considerazione. La permeabilità cresce nel seguente ordine: palatale, buccale, sublinguale.

Questo ordine è in accordo con le caratteristiche fisiche di questi tessuti. Infatti, la mucosa buccale è più spessa delle altre, quella sublinguale è la più sottile, mentre quella palatale ha uno spessore intermedio, però è cheratinizzata: questo giustifica la bassa permeabilità. La penetrazione attraverso la mucosa integra può avvenire tramite due vie: quella intracellulare e quella intercellulare.

- ✓ Via intracellulare: la molecola penetrante deve essere in grado di passare attraverso i pori della membrana cellulare o di diffondere nei suoi strati lipidici. Il passaggio attraverso i pori è limitato a molecole di piccole dimensioni, mentre la diffusione attraverso la membrana cellulare riguarda molecole solubili in acqua o nei lipidi.

- ✓ Via intercellulare: essa richiede una matrice sufficientemente aperta in modo da consentire la diffusione nello spazio intercellulare. La capacità di principi attivi di attraversare la mucosa dipende dal loro peso molecolare, dalla liposolubilità e dal grado di ionizzazione.

D = coefficiente diffusionale del farmaco attraverso la mucosa, questo dipende dalle proprietà del penetrante e dalle interazioni che esso ha con lo strato epiteliale.

Per sostanze ionizzabili, il grado di ionizzazione dipende dal pKa del principio attivo e dal pH presente sulla superficie mucosale. L'assorbimento massimo si ha quando i farmaci si trovano nella forma non ionizzata. Variando il pH nella cavità orale in modo da favorire la formazione della forma non ionizzata, si creano le condizioni ideali per cui il farmaco si ripartisce facilmente negli strati superficiali della mucosa.

Per molte molecole il passaggio attraverso la membrana avviene per diffusione passiva. Questo processo è descritto dalla prima legge di Fick:

$$J = \frac{DP}{h} C_d$$

J = quantità di farmaco che attraversa la mucosa per unità di tempo e area (flusso).

D = coefficiente diffusionale del farmaco attraverso la mucosa.

P = coefficiente di partizione tra mucosa e veicolo.

h = spessore dello strato mucosale.

Cd = concentrazione di farmaco nel veicolo.

Affinché la legge di Fick sia valida Cd, h e D devono rimanere costanti, inoltre, per mantenere costante la diffusione, anche la temperatura non deve cambiare.

Per la valutazione della diffusione del farmaco attraverso la mucosa si misura la concentrazione nella fase ricevente.

L'area superficiale della mucosa interessata al passaggio del principio attivo deve rimanere costante, così come la concentrazione iniziale della fase donatrice, perciò il flusso può essere espresso come:

$$J = K_p C$$

L'equazione che descrive come determinare l'assorbimento allo steady-state (stato stazionario, ovvero il periodo tempo in cui la formulazione cede il principio attivo in maniera costante) considerando una dose infinita nella camera donatrice è la seguente:

$$M_t = \frac{D P C_d}{h} t \left[\frac{h^2}{6D} \right] \quad (1)$$

M_t = quantità di farmaco trasportato nel tempo per unità di area superficiale.

P = coefficiente di partizione tra mucosa e soluzione cedente.

C_d = concentrazione di principio attivo nella fase donatrice.

D = coefficiente diffusionale del principio attivo all'interno della mucosa.

t = tempo.

h = spessore dello strato mucosale.

In realtà questa equazione è semplificata, poiché allo steady-state, per t che tende all'infinito, la maggior parte dei termini dell'equazione originale tende a zero.

Consideriamo l'equazione (1); ponendo in diagramma M_t contro t , si ottiene un grafico (figura 3) in cui $[(DPC_d)/h]$ rappresenta la pendenza della retta allo steady-state, cioè il flusso, mentre $h^2/6D$ è l'intercetta con l'asse delle ascisse ed è chiamata lag-time o tempo di latenza.

Gli studi di diffusione non iniziano mai con lo steady-state.

Teoricamente lo steady-state non viene mai raggiunto perché la concentrazione, sia della fase donatrice che della fase ricevente varia continuamente. Se però queste variazioni sono piccole, si può assumere di essere in condizioni di steady-state. Sperimentalmente negli studi di permeabilità, condotti, ad esempio, con celle di Franz, si effettuano prelievi ed analisi ad intervalli regolari. La quantità di farmaco permeato attraverso la mucosa si accumula nella fase ricevente, perciò occorre sempre ripristinare i volumi e cioè aggiungere alla quantità prelevata con un campione quella prelevata in precedenza in modo da avere la quantità totale di farmaco permeata. Per calcolare K_p è necessario conoscere il flusso allo steady-state, quindi conviene calcolare il flusso ad ogni intervallo, per stabilire quando diventa costante.

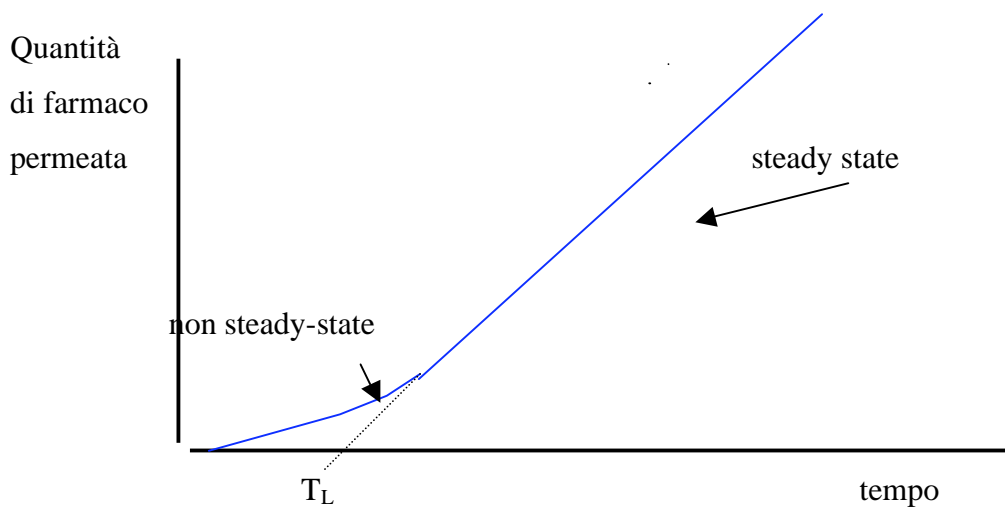


Figura 3: diagramma che riporta la quantità di farmaco permeato rispetto al tempo.

2.2 Modelli animali per lo studio della permeabilità

Gli animali maggiormente utilizzati negli esperimenti da laboratorio sono: ratti, cavie, cani, scimmie, conigli e maiali.

Ratti e cavie hanno una mucosa orale altamente cheratinizzata, infatti, studi di permeabilità attraverso mucosa orale umana e di cavie hanno dimostrato che la mucosa orale di cavie è meno permeabile poiché più cheratinizzata.

Maiali, cani, conigli e scimmie hanno la mucosa orale simile a quella dell'uomo, infatti, studi di permeabilità attraverso la mucosa orale di questi animali e dell'uomo hanno dimostrato un'equivalenza accettabile.

La mucosa orale porcina è quella maggiormente utilizzata, sia perché il maiale ha una superficie buccale più grande degli altri animali, sia per la facile reperibilità.

3. RILASCIO DI FARMACI DA FORMULAZIONI SOLIDE

Uno degli obiettivi della ricerca in campo tecnologico è attualmente quello di migliorare il controllo della cinetica di rilascio, pertanto, nello studio di nuovi sistemi terapeutici, è importante ottenere un rilascio prolungato nel tempo del farmaco; ciò risulta evidente considerando gli elevati vantaggi legati principalmente ad un miglior andamento dei tassi ematici (minore fluttuazione e maggiore permanenza della concentrazione all'interno dell'intervallo terapeutico) ed una riduzione della frequenza di somministrazione.

I sistemi di rilascio più comuni utilizzano i seguenti fenomeni:

- Diffusione.
- Dissoluzione.
- Erosione.
- Osmosi.
- Scambio ionico.

Le formulazioni a pronto rilascio non permettono un efficace controllo della cinetica, in quanto troppe sono le variabili che intercorrono a modificare nel tempo tale rilascio. Così pure sono risultati insoddisfacenti i sistemi matriciali classici, di tipo monolitico, con i quali non è possibile raggiungere una cinetica di tipo non fickiano.

Maggiori risultati si sono ottenuti con i sistemi riserva, gli osmotici, i rigonfiabili e gli erodibili, con i quali è possibile ottenere un rilascio prolungato e con cinetica di ordine zero per tempi lunghi.

3.1 Modelli matematici della cinetica di rilascio

La diffusione di un farmaco attraverso una struttura polimerica può essere indicata con la seguente espressione di origine empirica:

$$M_t / M_0 = k t^n$$

Dove:

M_t = quantità di farmaco ceduta al tempo t .

M_0 = quantità di farmaco presente nella formulazione a $t = 0$.

k = costante diffusionale.

n = esponente diffusionale.

t = tempo.

La derivata prima di tale espressione rispetto al tempo descrive la velocità del rilascio:

$$dM/dt = n M_0 k t^{(n-1)}$$

dove:

$(n-1)$ = esponente cinetico.

L'esponente n permette di valutare la cinetica di cessione; questa sarà di ordine zero e quindi indipendente dal tempo nel caso in cui n è pari a 1, in tal caso il rilascio del farmaco dalla formulazione è costante nel tempo e ciò rappresenta la cinetica ideale per un sistema a rilascio prolungato.

Nella tabella I sono riassunti i valori degli esponenti cinetico e diffusionale ai quali corrispondono meccanismi di trasporto diversi.

Tabella I: Valori degli esponenti diffusionale e cinetico corrispondenti a differenti meccanismi di trasporto di un soluto attraverso un sistema farmaceutico.

Esponente diffusionale	Meccanismo di trasporto	Esponente cinetico
0,5	Diffusione fickiana	- 0,5
$0,5 < n < 1$	Trasporto anomalo non Fickiano	$-0,5 < n < 0$
1,0	Trasporto caso II	0 (ordine 0)
> 1	Trasporto super caso II	> 0

L'esponente n, per un determinato tipo di rilascio, può essere calcolato matematicamente partendo da dati sperimentali. Effettuando il logaritmo dell'equazione generale $M_t / M_0 = k t^n$ si ottiene una relazione lineare di facile interpretazione:

$$\ln M_t / M_0 = \ln k + n \ln t$$

Con questa equazione è possibile descrivere l'andamento del rilascio nel tempo. Dal valore dell'intercetta con l'asse delle y si ottiene la costante k, mentre il coefficiente angolare della retta corrisponde a n.

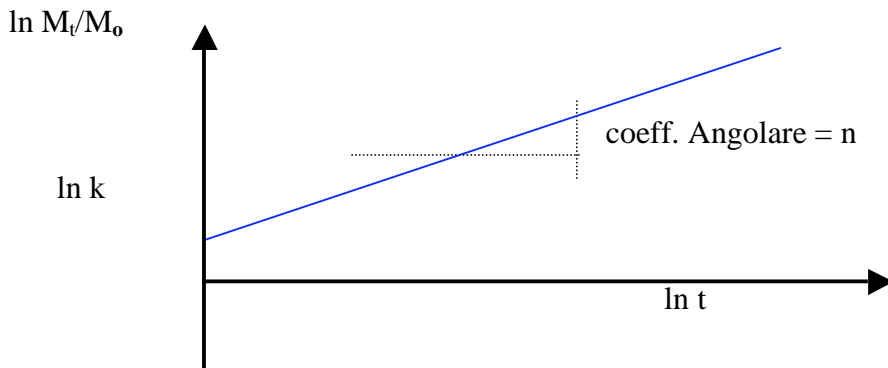


Figura 4: grafico \ln/\ln del tempo in funzione della massa rilasciata.

3.2 Rilascio di farmaci da idrogeli

Gli idrogeli sono costituiti da un reticolo polimerico idrofilico che in presenza di acqua si idrata e rigonfia senza dissolversi in quanto i legami crociati tra le catene lineari del polimero impediscono la solubilizzazione.

Nel caso di gel non ionici, il rigonfiamento è il prodotto dell'interazione polimero-solvente che promuove l'assorbimento di acqua e dell'elasticità del reticolo che invece si oppone al rigonfiamento. Nel caso di gel che presentano gruppi ionizzabili, il rigonfiamento è influenzato anche dalla qualità e densità di tali gruppi, dal pH e dalla forza ionica del mezzo. In condizioni di pH maggiori di quelle del pKa di idrogel anionici si avrà un rigonfiamento più elevato.

Il rilascio del principio attivo da idrogel può avvenire a:

- Matrice reidratata: il rilascio da una matrice rigonfiata è controllato dal solo processo di diffusione; si tratta, da un punto di vista teorico, di una matrice classica con cinetica di tipo fickiano.
- Matrice rigonfiante: in tal caso il rilascio avviene durante il rigonfiamento ed è influenzato da due fenomeni opposti:
 1. Diffusione del solvente nella matrice vetrosa che diventa gommosa, dalla quale il farmaco può diffondere;
 2. Aumento del volume del sistema.

Considerando il coefficiente di diffusione del farmaco attraverso il polimero idratato sufficientemente elevato, la cinetica di rilascio è determinata dall'equilibrio esistente tra questi due fenomeni, quantificabile con il numero di Deborah:

$$De = \tau / \theta$$

Dove:

τ = tempo di rilascio delle catene;

θ = tempo di diffusione del solvente.

Si ottiene una cinetica di ordine zero per valori di De vicini all'unità.

4. LA CONVALIDA (CONVALIDA MUCOSE)

4.1 Caratteri generali

La convalida del metodo di analisi è un processo, che permette di studiare valutare le *performance* di un metodo analitico al fine di dimostrare che i requisiti particolari per l'uso previsto siano soddisfatti.(12)

La convalida consiste in una serie di prove condotte al fine di stabilire se le prestazioni caratteristiche del metodo soddisfino le richieste analitiche per le quali il metodo viene applicato; determina l' adeguatezza di un analisi a fornire l'informazione desiderata. Possono essere sottoposti a convalida dati, campioni e metodologie. (13)

La convalida è un requisito fondamentale in uno studio, per assicurare attendibilità e ripetibilità ai risultati; rientra tra gli elementi della Garanzia di Qualità.(14)

Il controllo di qualità dei risultati ottenuti da uno studio è una parte molto importante all'interno del sistema di Quality Assurance.

La convalida di un metodo è obbligatoria come previsto dalla ISO EN 17025, permette di chiarire ogni aspetto confuso dello stesso, con conseguente miglioramento della qualità dello studio e del prodotto ottenuto; inoltre riduce i costi del controllo di qualità.

La convalida del metodo analitico è un elemento chiave sia nel processo di elaborazione di un metodo di riferimento, sia nella valutazione della capacità del laboratorio di fornire dati analitici attendibili. Quindi l'ambito del termine convalida del metodo è vasto, soprattutto se si tiene presente che esiste o dovrebbe esistere una stretta relazione fra convalida, calibrazione e controllo di qualità QA/QC.

Inoltre la convalida non riguarda solo l'aspetto strumentale quanto piuttosto l'intero processo analitico che va dal campionamento alla valutazione del dato analitico, deve essere concomitante allo sviluppo del metodo.(15)

Secondo la normativa devono essere convalidati sia i metodi " originali" (metodi innovativi sviluppati in laboratorio), sia i metodi che hanno subito modifiche o applicazioni diverse.(14)

Le più comuni situazioni sperimentali che impongono la convalida sono:

- lo sviluppo di un nuovo metodo per scopi particolari;
- aggiornamento, miglioramento o estensione ad un nuovo problema di un metodo analitico stabilito;
- eventuali variazioni temporali dei parametri di qualità evidenziati attraverso il controllo di qualità;

- utilizzo in un diverso laboratorio e/o da un diverso analista e/o con diversa strumentazione di un metodo stabilito;

- dimostrazione dell'equivalenza del metodo in esame con un metodo standard.

Esistono diverse tipologie di metodi e conseguentemente diversi schemi di convalida che possono differire sia per il numero di parametri da verificare sia in termini di completezza delle procedure da eseguire.

Ogni schema deve essere valutato in funzione dello scopo e della natura del metodo, delle tecniche strumentali utilizzate e della natura delle matrici da analizzare.

In generale durante lo sviluppo della convalida di un metodo analitico ci si pongono delle domande (13):

- Quali parametri si devono scegliere e controllare?
- Quali procedimenti devono essere usati per valutare un particolare parametro?
- Quali sono i criteri con cui giudicare i valori di un parametro?

Un metodo analitico si considera convalidato quando:

- è adeguato per l'uso a cui è destinato
- fornisce dati analitici utili in determinate situazioni
- risponde alle richieste poste dal problema analitico considerato
- assicura il livello di prestazioni prestabilito
- permette di ottenere ciò che ci si aspettava.

4.2 Tipi di convalida

La “Guidelines on General Principles of Process Validation” distingue quattro diversi approcci di convalida:

- convalida prospettiva
- convalida concorrente
- convalida retrospettiva
- riconvalida

CONVALIDA PROSPETTIVA

Si effettua prima della distribuzione di un nuovo prodotto in commercio o prima dell' applicazione di un nuovo metodo. Si basa su dati ottenuti durante le fasi di sviluppo. La convalida prospettiva deve includere i seguenti elementi, senza tuttavia essere limitata soltanto ad essi:

- (a) breve descrizione del processo;
- (b) sommario delle fasi critiche da analizzare;
- (c) elenco delle attrezzature/impianti da utilizzare (incluse le apparecchiature di misurazione/monitoraggio/registrazione) unitamente al loro stato di taratura;
- (d) specifiche per i prodotti finiti ai fini del rilascio;
- (e) elenco dei metodi analitici, in funzione delle necessità;
- (f) controlli di processo proposti con i criteri di accettazione;
- (g) test aggiuntivi da eseguire, con criteri di accettazione e convalida analitica in funzione delle necessità;
- (h) piano di campionamento;
- (i) metodi di registrazione e di valutazione dei risultati;
- (j) funzioni e responsabilità;
- (k) calendario proposto.

Utilizzando questo processo definito (comprendente componenti specificati) è possibile la riproduzione del metodo, da parte di qualsiasi operatore .

In teoria il numero di processi condotti e di osservazioni eseguite dovrebbe essere sufficiente a consentire di determinare l'entità normale della variazione e le tendenze, a fornire dati sufficienti per la valutazione. Si considera generalmente accettabile una convalida se dà un risultato positivo su almeno tre lotti/processi eseguiti in modo consecutivo entro i parametri concordati.

I lotti utilizzati per la convalida è opportuno che siano delle stesse dimensioni.(16)

CONVALIDA CONCOMITANTE

Si effettua in casi eccezionali in cui è accettato non completare il programma di convalida prima dell' applicazione del metodo.

La decisione di eseguire una convalida concomitante deve essere giustificata, documentata e approvata dal personale autorizzato.

I requisiti relativi alla documentazione per la convalida concomitante sono identici a quelli previsti per la convalida prospettiva. Principalmente è applicata a processi farmaceutici cioè processi per la produzione di farmaci.(16)

CONVALIDA RETROSPETTIVA

È un' analisi critica dei dati ottenuti sui metodi e prodotti già realizzati da anni.

Essa è accettabile soltanto per processi e metodi consolidati ed è inopportuna allorché si sono verificati recenti cambiamenti nella composizione del prodotto, delle procedure operative o delle attrezzature.

La convalida di tali processi si basa su dati storici. Una delle fasi è costituita dalla preparazione di un protocollo specifico e di un resoconto dei risultati, della revisione dei dati, con la conseguente elaborazione di conclusioni e raccomandazioni.

Le fonti dei dati per tale convalida debbono includere i seguenti elementi, senza tuttavia essere limitata soltanto ad essi:

- a) rendiconti sulla produzione e sul confezionamento dei lotti,
- b) carte di controllo del processo,
- c) registri di manutenzione,
- d) registrazioni delle sostituzioni del personale,
- e) studi sulla capacità del processo,
- f) dati sul prodotto finito, incluse carte delle tendenze e risultati sulla stabilità delle scorte.

I lotti selezionati per la convalida retrospettiva devono essere rappresentativi di tutti i lotti prodotti durante il periodo in esame, compresi tutti i lotti risultati non conformi alle specifiche, ed essere in numero sufficiente a dimostrare la coerenza del processo. Talvolta possono essere necessari ulteriori test sui contro campioni per ottenere la quantità o il tipo di dati necessari per consentire la convalida retrospettiva del processo.

Ai fini della convalida retrospettiva, per valutare la coerenza del metodo sono normalmente esaminati i dati relativi a un minimo di dieci e a un massimo di trenta lotti consecutivi. Se la situazione lo giustifica, può essere preso in esame un numero inferiore di lotti. È utilizzata per la convalida di processi di fabbricazione di forme farmaceutiche.(16)

RICONVALIDA

Ripetizione della convalida per garantire che le modifiche apportate al processo, al metodo o all'apparecchiatura in accordo alle procedure di controllo dei cambiamenti, modifiche nel sistema analitico (estensione del metodo ad un nuovo problema analitico, applicazione del metodo da parte di un diverso laboratorio, da un diverso analista o con diversa strumentazione), non influenzano negativamente le caratteristiche del processo e la qualità del prodotto. (16)

4.3 Sviluppo della convalida

Lo sviluppo della convalida di un metodo analitico è un processo complesso, può essere eseguita attraverso uno studio inter-laboratorio, quali quelli istituiti dal Codex Alimentarius, dall'ISO o dall'IUPAC oppure in base a metodi alternativi, quali studi condotti in singoli laboratori o attraverso la convalida interna (17, 18, 19).

La valutazione dell'adeguatezza di un metodo analitico prevede:

1. La definizione dello scopo del metodo
2. La stesura di un protocollo scritto di convalida in cui si stabiliscono i parametri da analizzare, si indicano le modalità di esecuzione, si qualificano i materiali e la strumentazione.
3. L'esecuzione del protocollo
4. La raccolta ed elaborazione dei dati
5. La relazione finale. Conclusioni ed approvazione
6. L'eventuale riconvalida

SCOPO DEL METODO

Si definiscono gli analiti a cui è applicabile il metodo, l'intervallo di concentrazione, la matrice del campione, se esistono sostanze che possono costituire interferenza potenziale, come rilevarle e quantificarle. Si specifica se il metodo è di tipo qualitativo o quantitativo, se il metodo sarà utilizzato in un singolo laboratorio o presso un numero maggiore.(19)

STESURA DEL PROTOCOLLO

La stesura di un protocollo di convalida, piano prospettico sperimentale (VP) , quando eseguito fornisce l'evidenza documentata che il sistema è stato convalidato. Il Validation Plan (VP) deriva dal Validation Master Plan. Il VMP descrive i processi e i reparti coinvolti nella convalida e indica in linea di massima le procedure adottate per documentare, le attività e le prestazioni attese dagli strumenti utilizzati. Il VP descrive in dettaglio come la convalida deve essere svolta; prevede diversi punti:(17)

- Definizione del sistema completo da convalidare
- Definizione dei parametri
- Identificazione delle materie usate
- Identificazione dell' attrezzatura
- Obiettivo da raggiungere
- Presentazione della fase operativa e suo valore critico
- Individuazione delle variabili critiche e loro influenza
- Definizione dei parametri di controllo e dei loro intervalli di accettabilità
- Prove sperimentali da eseguire per la determinazione dei limiti di sicurezza delle variabili critiche.

Devono essere fornite informazioni anche sulla composizione unitaria o percentuale del campione e la quantità dei singoli lotti; metodi di campionamento e analisi delle materie prime.

Il procedimento dettagliato di preparazione del campione; il numero di repliche appropriate per avere risultati statisticamente significativi.

ESECUZIONE DEL PROTOCOLLO

Allo scopo di verificare l' idoneità del procedimento di preparazione e delle apparecchiature, si effettuano le prove stabilite e si raccolgono i dati relativi al procedimento.

Si ripetono le prove su almeno tre lotti.

Durante il procedimento si effettua anche un controllo della funzionalità delle apparecchiature. In genere esiste un programma di calibrazione con limiti di accuratezza specificati.

RACCOLTA ED ELABORAZIONE DEI DATI

I dati vengono raccolti ed elaborati; si confrontano con i limiti di accettabilità.

Se i dati non sono all'interno dei limiti, si prepara un ulteriore protocollo dove si immettono le modifiche e le ragioni di tali modifiche.

RELAZIONE FINALE

Essa è definita anche Rapporto di convalida, contiene un riferimento al protocollo, tutti i passaggi svolti, una descrizione delle apparecchiature, delle fasi del processo, dei controlli, dei limiti di accettabilità, delle prove; descrive i risultati ottenuti e le conclusioni del lavoro (in base ai risultati si stabilisce se la convalida è avvenuta oppure no).

Si può procedere ad un eventuale riconvalida in caso di inconvenienti durante le fasi del processo, dopo manutenzione delle apparecchiature, per variazione dei fornitori di materie prime, per variazioni della composizione, delle dimensioni, della produzione del lotto.

4.4 Principali parametri

I principali parametri da considerare ogni volta sono durante la convalida del metodo:

- Specificità e recupero
- Sensibilità
- Curva di taratura
- Accuratezza (precisione ed esattezza)
- Limite di rivelabilità e di quantificazione (LR e LQ)
- Intervallo di validità
- Robustezza
- Incertezza
- Linearità

Non sempre è necessario valutare tutti questi parametri contemporaneamente. La scelta sarà funzione della tipologia del metodo in esame.

Un esempio è riportato nella tabella successiva, dove i metodi sono stati raggruppati in quattro diverse tipologie, fra le più utilizzate, in base ai parametri necessari per caratterizzare correttamente il metodo.

	Analisi di comportamento o valutazione di attributi	Valutazione rispetto ad un valore fissato	Determinazione quantitativa di componenti maggiori	Determinazione quantitativa di componenti minori e tracce
Specificità e recupero		•	•	•
Curva di taratura		•	•	•
Intervallo di lavoro			•	•
Accuratezza		•	•	•
Ripetibilità	•	•	•	•
Limite di rivelabilità				•

Tabella II: Tipologia metodi e parametri convalida

La direttiva 26/96/ CE del Consiglio distingue i parametri che servono per convalidare un metodo in: (15)

- 1) Parametri di rendimento indipendenti dal modello (specificità, robustezza, esattezza, stabilità, curve di calibrazione) da considerare in ogni convalida.
- 2) Parametri dipendenti dal metodo (parametri specifici che vengono stabiliti nel protocollo di convalida)

- ***Specificità***

Questo parametro è quasi sempre il primo che l'analista deve controllare e solo una verifica positiva consente di continuare il lavoro di messa a punto del metodo; non ha valore numerico.

In generale, la specificità riguarda la capacità di un procedimento di determinare solo l'analita che si vuol misurare anche in presenza di molti composti affini dal punto di vista chimico-fisico.

Con più esattezza questo parametro viene definito come: la proprietà di un metodo di prova con il quale l'analita di interesse viene determinato inequivocabilmente, con il livello di accuratezza prefissato, in presenza dei composti che prevedibilmente sono contenuti nei campioni da esaminare.

Il metodo più efficace per la sua valutazione è quello di ricostruire le matrici dei campioni senza l'analita di interesse e valutare la risposta del procedimento per scoprire interferenze o sovrapposizioni con quella dell'analita stesso.

Il controllo dovrebbe essere completato per ciascuna matrice con l'aggiunta di quantità scalari di analita e il successivo confronto delle risposte del procedimento con quelle ricavate, misurando direttamente i materiali (di solito soluzioni) di riferimento puri. Nel caso in cui non sia possibile ricostruire in modo sicuro le matrici, si usano quelle dei campioni stessi e si opera come descritto sopra (metodo delle aggiunte note).

Da notare che il metodo delle aggiunte note permette di evidenziare solamente le interferenze di tipo proporzionale.

A seconda della tipologia del metodo utilizzato la specificità potrà comunque essere stabilita correttamente curando i dettagli delle operazioni di misurazione.

- ***Recupero***

Misura dell'inaccuratezza di un metodo mediante aggiunte di analista standard al campione. Viene espresso, di solito, in percentuale rispetto alla concentrazione teorica aggiunta. In rapporto alla complessità del metodo e alle concentrazioni da determinare possiamo avere diversi criteri di accettabilità. Ad esempio, nel caso della determinazione di componenti maggiori in matrici non complesse la percentuale di recupero è ritenuta accettabile se compresa tra il 95 ed il 105%.

Nel caso di determinazioni di componenti in tracce, in matrici complesse sono considerati accettabili i valori variano in relazione alle concentrazioni dell'analita da determinare.

- **Sensibilità**

È il rapporto tra la variazione del segnale (strumentale) e la variazione della concentrazione dell'analita. In pratica la sensibilità misura la pendenza della retta di calibrazione, dal coefficiente angolare della retta di taratura.

$$Y = \frac{Mx+q}{S_a} = m [c] + S_b$$

$M = \text{sensibilità} = \text{variazione segnale} / \text{variazione concentrazione} = \Delta S_a / \Delta [c]$

$S_a = \text{segnale analita}$

$S_b = \text{segnale del bianco o intercetta}$

La maggior parte degli operatori sono concordi sul fatto che la sensibilità di uno strumento, di un metodo indichi la sua capacità di discriminare fra le piccole differenze di concentrazioni di analita. Due fattori limitano la sensibilità: la pendenza della retta di calibrazione e la riproducibilità o ripetibilità o imprecisione del dispositivo di misura.

- **Curva di taratura**

La concentrazione dell'analita in genere viene misurata mediante l'impiego di una curva di taratura, costruita in base alle risposte strumentali prodotte da soluzioni a titolo noto dell'analita stesso.

Solitamente si preferiscono curve di taratura lineari, in modo da avere risultati direttamente proporzionali alla concentrazione dell'analita.

L'equazione della curva $y = bx + m$ si calcola con il metodo quindi della regressione lineare e l'algoritmo più utilizzato è in genere quello dei minimi quadrati non pesati.

La validità del modello lineare viene valutata attraverso il coefficiente di correlazione lineare, che deve sempre essere accompagnato dall'esame visivo del grafico.

Ulteriori modi di valutazione sono:

- riportare in grafico il fattore di risposta (rapporto tra la concentrazione e la risposta analitica) contro la concentrazione. In caso di adeguatezza del modello lineare si otterrà una retta parallela all'asse delle concentrazioni;
- riportare in grafico i residui della regressione contro la concentrazione. In caso di adeguatezza del modello lineare si otterrà un andamento dei residui casuale alternato rispetto alle concentrazioni (asse x).

- **Accuratezza (accuracy)**

Questo parametro è sicuramente il più importante tra quelli impiegati nella convalida di un metodo di analisi.

Secondo VIM (International Vocabulary of basic and general term in metrology - 1993) l'accuratezza viene definita come “grado di accordo tra il risultato di una misurazione e il valore vero del misurando”, oppure (definizione ISO 5725 – 1: 1994) come “grado di accordo tra il risultato di un procedimento analitico e il valore di riferimento accettato”.

Quest'ultima definizione, evidenzia che non esiste in generale il “valore vero” di un'analita o comunque tale valore non può essere esattamente conosciuto. Ciò che può essere stabilito è il valore più attendibile in condizioni ben specificate e perciò accettato come valore di riferimento in quelle condizioni. In chimica analitica spesso si intende per valore vero quello ottenuto preparando standard primari, con sostanze chimicamente pure. L'accuratezza misura l'esattezza del metodo. Solitamente viene espressa in termini di errore assoluto ($x_i - \mu$ oppure $x - \mu$) o di errore relativo, di solito espressi in percentuale:

$$\frac{x_i - \mu}{\mu} * 100$$

Viene valutata tramite il recovery percentuale.

- **Precisione**

Grado di accordo tra risultati indipendenti ottenuti con un procedimento di analisi, quando la procedura è applicata a un elevato numero di campioni omogenei.

Le considerazioni più importanti che scaturiscono da questa definizione sono sinteticamente tre:

- la precisione non dipende dal valore di riferimento accettato e può essere valutata ripetendo più volte il procedimento analitico senza conoscere il contenuto dell'analita in esame;

- i risultati devono essere indipendenti, intendendo che tutte le fasi di un procedimento analitico devono essere eseguite in modo indipendente dagli altri; ossia ogni analisi in replicato deve essere ripetuta in ogni sua fase;
- le condizioni in cui i risultati sono ottenuti devono essere ben specificate

I fattori che possono variare e quindi determinare condizioni diverse sono i seguenti:

- Metodo
- Materiale esaminato (campione)
- Laboratorio
- Operatore
- Apparecchiatura e sua taratura
- Intervallo di tempo

Mantenendo inalterati metodo e materiale da esaminare, in funzione delle diverse modalità di replica, si possono definire tre tipi di precisione:

- Ripetibilità stretta o ripetibilità
- Ripetibilità intermedia
- Riproducibilità

La *ripetibilità stretta* deve essere intesa come precisione in cui tutti i fattori sopra considerati sono mantenuti costanti.

La *ripetibilità intermedia* deve essere intesa come precisione ottenuta nelle condizioni in cui i fattori sopra considerati variano con diverse modalità.

La *riproducibilità*, a sua volta deve essere intesa come precisione ottenuta nelle condizioni in cui, oltre ai quattro fattori sopra considerati, varia anche il laboratorio.

È espressa come deviazione standard e coefficiente (CV), è rappresenta una misura della riproducibilità di una metodica in condizioni standard.

I valori della ripetibilità sono importanti in quanto forniscono un'indicazione del livello della qualità delle misure eseguite, permettendo di capire immediatamente il grado di affidabilità dei risultati ottenuti. Nella valutazione della qualità delle misure, la ripetibilità è infatti il parametro di approccio più immediato ed è assolutamente indispensabile che ogni laboratorio che operi correttamente lo determini, anche nel caso che impieghi un metodo normato.

Nel caso di metodi sviluppati in laboratorio sarà necessario valutare anche gli altri parametri già citati.

Attraverso i dati di ripetibilità è possibile:

- a) verificare la possibilità di esprimere il risultato come media di dati replicati;
- b) confrontare tra loro metodi di prova diversi.

Nel primo caso è sufficiente condurre una prova in doppio e verificare che il valore assoluto della differenza non ecceda il limite di ripetibilità r .

Se questo non è possibile si possono eseguire ulteriori prove e valutare i dati ottenuti secondo il cosiddetto “Test del fattore di intervallo critico”, verificando che la differenza tra il valore massimo (x_{max}) e quello minimo (x_{min}) misurati sia minore del prodotto dello scarto tipo di ripetibilità (S_r) per il fattore critico $f(n)$.

La conoscenza della ripetibilità di due metodi di prova consente inoltre di stabilire se i metodi forniscono risultati simili tramite l'esecuzione del Test F.

Si considerano due metodi equivalenti, in termini di precisione, quando il rapporto tra le varianze dei risultati rispetta la seguente relazione:

$$S_1^2 / S_2^2 \leq F \quad (S_1^2 > S_2^2)$$

I valori di F , relativi al livello di confidenza del 95%, si trovano tabulati in funzione dei gradi di libertà dei due gruppi di prove.

Il termine varianza (quadrato dello scarto tipo) rappresenta una funzione statistica che permette di confrontare fra loro gli scarti tipo ed è definito dall'ISO 3534-1 come:

“Misura della dispersione che è data dalla somma dei quadrati degli scarti delle osservazioni dalla loro media divisa per un numero pari a quello delle osservazioni meno uno”.

Se la relazione sopra riportata è rispettata è possibile proseguire nel confronto e valutare così l'accordo dell'accuratezza dei due metodi.

A questo scopo si devono calcolare:

- le medie dei due gruppi di misure x_{m1} e x_{m2}
- le varianze delle medie S_1^2/n_1 e S_2^2/n_2 (n = numero di repliche)
- lo scarto tipo delle differenze delle medie $S_d = (S_1^2/n_1 + S_2^2/n_2)^{1/2}$
- la differenza assoluta delle medie
- il numero di gradi di libertà effettivi delle prove $\nu = n_1 + n_2 - 2$

Noti tali valori si procede al calcolo del semintervallo di confidenza delle medie (semi I.C.):

$$\text{semi I.C.} = S_d - t_\nu$$

dove

t_ν è il valore del coefficiente di Student relativo ai gradi di libertà effettivi.

Se è soddisfatta la relazione :

$$|x_{m1} - x_{m2}| \leq S_d - t_v$$

si può affermare che i risultati forniti dai due metodi, a quel particolare livello di concentrazione dell'analita, hanno lo stesso grado di accuratezza.

- **Esattezza**

Grado di accordo tra la media dei valori ottenuta da una larga serie di dati analitici e il valore di riferimento accettato.

- **Limite di rivelabilità (LR) e limite di quantificazione (LQ)**

Per *limite di rivelabilità* si intende:

Concentrazione minima di analita in un campione che si può distinguere dal bianco con un dato rischio (di solito del 5%).

Per *limite di quantificazione* si intende:

Concentrazione minima di analita in un campione che si può misurare con una precisione desiderata (di solito $CV\% \leq 10$). Può essere espresso come

$$LQ = 10 \sigma / S$$

Il limite di rivelabilità statisticamente è definito come il valore dell' analita che produce un segnale Y equivalente a quello di un "bianco" Y_B più K volte il valore dello scarto tipo SB determinato sul segnale del bianco:

$$LR = Y_B + K SB$$

(il fattore K è determinato dall'intervallo di confidenza desiderato ossia dal grado di rischio che si accetta nel dire che l'analita è presente).

Operativamente viene spesso definito come la concentrazione di analita che fornisce un segnale pari a 3 volte il rumore di fondo (segnale di un "bianco"):

$$S/N = 3 \text{ (n = noise)}$$

Le modalità con cui può essere stimato S/N sono legate alle caratteristiche del metodo utilizzato.

Per i metodi cromatografici si possono utilizzare parametri ottenibili dalla curva di taratura:

$$LR = 3 SB/b \text{ oppure } LR = 3,3 SB$$

Dove:

b = pendenza della retta di regressione

SB = errore statistico S y/x (o “errore standard“ della stima di y su x)

Deve comunque essere rispettata la relazione:

$$x1/2 \leq LR \leq x1$$

dove :

x1 punto più basso della curva di taratura.

Il limite di quantificazione viene calcolato come 10 volte lo scarto tipo del rumore, che corrisponde ad avere risultati quantitativi con CV% ≤ 10 .

Normalmente si calcola come multiplo del valore di LR:

$$LQ = 10/3 LR \text{ oppure } LQ = 3 LR$$

È comunque ragionevole che LQ risulti almeno 1/5-1/10 del valore massimo stabilito dalla legislazione.

- *Intervallo di validità*

È l'intervallo di concentrazione di un analita nel quale sono state determinate l'accuratezza, precisione, linearità (U.S.P XIII, pag. 1982). Si intende l'intervallo di concentrazioni in cui è stato verificato che i parametri caratteristici del metodo hanno valori accettabili. È compreso tra due valori limite, concentrazione massima e concentrazione minima entro cui è applicabile il metodo. L'intervallo di lavoro è compreso tra il -20% del valore percentuale più basso ottenuto nei test, al +20% del valore percentuale più elevato ottenuto.

- ***Robustezza***

Capacità posseduta da un metodo di non essere influenzato significativamente, in termini di risultati finali, per effetto di variazioni deliberate introdotte nelle sue fasi di realizzazione.

- ***Incertezza***

Parametro associato al risultato di una misura che caratterizza la dispersione dei valori che potrebbero ragionevolmente essere attribuiti al misurando (definizione VIM). Una delle proprietà più importanti di un risultato analitico è la confrontabilità dei dati. La maniera migliore per raggiungere questo scopo è quella di associare al risultato il parametro dell'incertezza. Conoscere l'incertezza di una misura implica quindi una aumentata fiducia sulla validità del risultato e ogni risultato per essere completo, dovrebbe essere accompagnato da questo parametro che non è altro che una precisione associata a risultati la cui indipendenza è assoluta. Per la sua valutazione esistono due approcci:

- l'approccio tradizionale;
- l'approccio GUM (*guida ISO "Guide to the expression of uncertainty in measurements" tradotta e pubblicata da UNI nella Norma UNI CEI 9:1997 sostituita da UNI CEI ENV 13005:2000*).

Il primo si basa sulla valutazione dei parametri di prestazione del metodo usato mediante i dati di ripetibilità e di riproducibilità.

Il secondo è basato su di un modello matematico e permette una valutazione dell'incertezza all'interno del laboratorio.(15-20)

- ***Linearità***

Indica la capacità di ottenere, entro un certo intervallo, dei risultati dell'analisi conformi ad una regressione lineare:

$$Y = mx + c$$

Si calcola con il coefficiente di correlazione, tramite una regressione lineare o quadrata che permette di stabilire la relazione tra due variabili. X e Y come mostra la fig 4. La regressione si esprime con R^2 che è compreso tra 0 e 1.

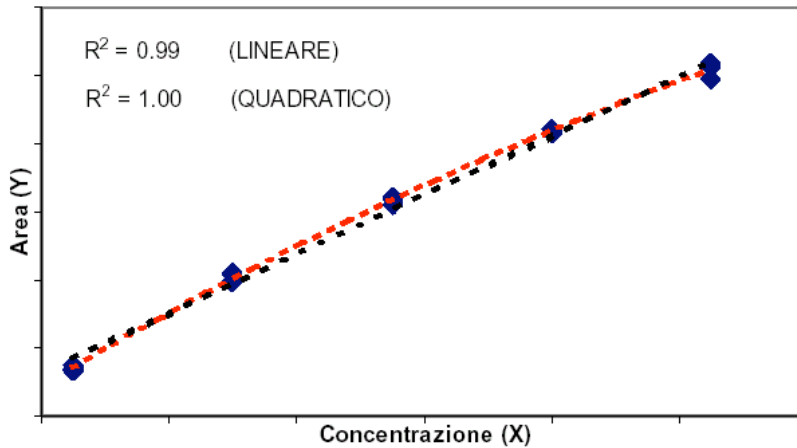


Figura 5 : grafico della linearità

Nella convalida della metodica di permeazione mucosale si è scelto di analizzare alcuni parametri che rendessero il lavoro ripetibile da qualsiasi operatore.

I parametri che sono stati convalidati sono:

- ✓ caratteristiche della mucosa lavorata : peso e spessore
- ✓ temperatura e volume della soluzione prelevata dal compartimento ricevente delle celle di Franz
- ✓ tempi di giusta conservazione della mucosa a -21°C

Nella convalida della metodica HPLC utilizzata nello studio di permeazione si è seguito il protocollo ufficiale di convalida. Il protocollo ufficiale di convalida per la metodica HPLC prevede la determinazione di alcuni parametri indicati qui di seguito, descritti precedentemente e la redazione di una scheda tecnica mostrata in fig. 6.

I parametri sono:

- ✓ intervallo di validità
- ✓ accuratezza
- ✓ precisione
- ✓ specificità
- ✓ linearità
- ✓ limite di quantificazione

Informazioni generali:	
data _____	analista _____
analisi per _____	lavoro n° _____
richiesto da _____	il _____
nome del campione _____	analita _____
Condizioni cromatografiche:	
Fase mobile _____	gradiente(se presente) _____
Temperatura _____	Colonna _____
Colonna prodotta _____	N° di serie _____
Fase stazionaria _____	Pressione _____ (bar/psi)
Limiti _____ ID _____ OD _____	
Flusso (ml/min.) _____	Velocità _____ (cms/min)
Rivelatore _____	Intervallo _____
Altri parametri _____	
Attenuazione del rivelatore _____	Tempo di risposta _____
Strumenti Cromatografici:	
Pompa (produttore e modello) _____	Iniettore _____
Rivelatore _____	Integratore _____
Aitri _____	
Annotazioni _____	

Figura 6: Informazioni cromatografiche richieste per la convalida

5. SISTEMI BIOADESIVI

Negli ultimi anni i polimeri bioadesivi sono stati particolarmente studiati come base per il controllo del rilascio del principio attivo. Sono sistemi che consentono inoltre:

- Applicazione della formulazione in precise regioni del corpo;
- Prolungata permanenza della formulazione e quindi del principio attivo nel punto di applicazione escludendo gli inconvenienti dovuti alla somministrazione ripetuta;
- Perfetta adesione tra formulazione e superficie assorbente con possibilità di modificazione della permeabilità del tessuto;
- Inibizione dell'attività enzimatica e soppressione della produzione di muco;

I punti di applicazione dei sistemi bioadesivi sono: cavità orale, vaginale, ma anche occhio e naso. Tutti questi epiteli sono protetti e lubrificati da uno strato di muco. Il muco è composto da acqua (95%) e da una miscela di glicoproteine ad alto peso molecolare chiamate mucine. Contiene inoltre cellule epiteliali, elettroliti, batteri ed altri materiali che dipendono dall'origine e dalla localizzazione del muco.

La frazione più importante è quella glicoproteica che dà consistenza e viscosità al muco. Ad essa sono legati covalentemente circa 200 oligosaccaridi che si legano preferenzialmente agli amminoacidi serina e treonina. Le catene oligosaccaridiche terminano con un residuo di acido sialico e sono unite tra loro da legami disolfuro. La struttura del muco si presenta fortemente reticolata in quanto le catene più lunghe si intrecciano fra loro dando luogo a legami di tipo fisico.

Le caratteristiche da prendere in considerazione nel meccanismo di mucoadesione sono:

- 1) Presenza di catene oligosaccaridiche lunghe, flessibili, disposte casualmente;
- 2) Presenza di cariche negative nelle catene oligosaccaridiche legate con acido sialico che ha un pKa di 2,6;
- 3) Elevata idratazione;
- 4) Struttura costituita da una rete di legami crociati dovuti alla reticolazione di tipo fisico nelle molecole di mucina.

5.1 Il meccanismo di bioadesione

L'adesione è un fenomeno interfacciale influenzato da energie di superficie. Quando si stabilisce un legame adesivo tra due materiali l'energia superficiale totale diminuisce, distruggendo due superfici libere e creando una nuova interfaccia. Questo dal punto di vista termodinamico, mentre dal punto

di vista cinetico (forze fisiche) si ha una vera e propria intercalazione delle catene polimeriche con il rivestimento glicoproteico della mucosa. Soddisfacenti legami bioadesivi si ottengono tra un polimero carrier e il muco dello stomaco, dell'intestino, delle aree buccale, vaginale e rettale.

Sono diversi i meccanismi proposti per capire il fenomeno della bioadesione dal punto di vista molecolare. Molte ricerche sono state rivolte ad analizzare le interazioni tra idrogel polimerici e tessuti molli. Il processo coinvolto nella formazione di tali legami avviene in tre passaggi:

- a) Idratazione e rigonfiamento di polimeri per permettere un intimo contatto con i tessuti biologici;
- b) Compenetrazione delle catene dei polimeri bioadesivi formanti il reticolo di polimero e le catene di mucina;
- c) Formazione di deboli legami chimici tra le catene.

È stato stabilito che per ottenere l'adesione sono richieste le seguenti caratteristiche polimeriche:

- Sufficiente quantità di gruppi chimici che formano legami a idrogeno (gruppi -OH e -COOH);
- Cariche anioniche di superficie;
- Elevato peso molecolare;
- Elevata flessibilità delle catene, in modo da permettere la penetrazione nella fitta rete di muco;
- Tensione superficiale sufficiente a bagnare il muco o le superfici del tessuto mucosale.

Tutte queste caratteristiche favoriscono la formazione di legami sia chimici sia meccanici. Tra i legami chimici sono compresi sia i legami forti (es: covalente) che i legami deboli (ionici, interazioni di Van der Waals, legami a idrogeno e idrofobici). I legami meccanici, invece, possono essere considerati come unioni tra superfici, simili a pezzi di puzzle che si concatenano. Microscopicamente questi legami comportano l'inclusione di una sostanza all'interno dei pori di un'altra sostanza; microscopicamente essi possono causare un intreccio della struttura della mucina con le catene flessibili del polimero o compenetrare con il proprio substrato polimerico nell'intreccio di mucina. La velocità di penetrazione delle catene di polimero all'interno dello strato di muco è dipendente dalla flessibilità delle catene e dal coefficiente di diffusione di entrambi. La forza del legame adesivo è direttamente proporzionale alla profondità di penetrazione delle catene di polimero. Un altro fattore che influenza la forza del legame è la presenza di acqua che consente al bioadesivo di idratarsi ed aderire alla superficie tissutale: le molecole di acqua si inseriscono tra le catene del polimero provocando la rottura dei legami intermolecolari, con la conseguente

liberazione dei gruppi funzionali delle catene bioadesive, favorendo così la formazione di nuovi legami polimero-mucosa.

5.2 Teorie della bioadesione

Sono state proposte cinque teorie sulla bioadesione: elettronica, dell'adsorbimento, della bagnabilità, della diffusione e della frattura.

5.2.1 Teoria elettronica

L'ipotesi della teoria elettronica si basa sul fatto che i materiali bioadesivi e il target biologico (muco), possiedono differenti strutture elettroniche. Sulla base di ciò, quando due materiali vengono a contatto tra loro, avviene un trasferimento elettronico. Questo determina la formazione di un doppio strato di carica elettrica all'interfaccia del materiale bioadesivo e biologico. Si pensa che la forza bioadesiva sia dovuta alle forze attrattive che si esercitano attraverso questo doppio strato elettronico. Questo sistema è analogo ad un condensatore, che è carico quando l'adesivo e il substrato sono a contatto, scarico quando le superfici sono separate.(24)

5.2.2 Teoria dell'adsorbimento

Questa teoria afferma che, dopo un iniziale contatto tra le superfici, il materiale aderisce a causa delle forze di superficie che agiscono tra gli atomi. Le deboli interazioni di van der Waals ed i legami a idrogeno giocano un ruolo fondamentale. Sebbene queste forze siano individualmente deboli, è il numero totale delle interazioni che determina un'intensa forza adesiva. (25)

5.2.3 Teoria della bagnabilità

La capacità del muco di diffondere e provocare un intimo contatto con il corrispondente substrato è uno dei principali fattori coinvolti nella formazione dei legami. La teoria della bagnabilità, sviluppata principalmente per descrivere l'adesione di liquidi ai tessuti biologici, utilizza la tensione

interfacciale per prevedere la diffusione e l'adesione. Quando un sistema adesivo è applicato ad un substrato biologico, il polimero è capace di bagnare la superficie con cui viene a contatto.

Questo fenomeno è forse il più importante nel processo di coesione e le interazioni che avvengono all'interfaccia giocano un ruolo importante nel processo di adesione del polimero al substrato biologico. La polarità dei polimeri adesivi dovrebbe essere simile a quella della mucosa buccale per avere un'elevata mucoadesività.

Allo scopo di formare un intimo contatto tra muco e polimero, quest'ultimo dovrebbe bagnare la superficie mucosale; ciò dipende dalle caratteristiche idrofiliche del polimero. L'interpenetrazione tra polimero e muco avviene solo dopo che si è stabilito un' intimo contatto. Poiché il principale evento nello sviluppo di legami mucoadesivi è l'intimo contatto tra le molecole, il fenomeno della bagnabilità può essere considerato come il fattore limitante per la mucoadesione.

Il lavoro di adesione può essere espresso in termini di superficie e tensione interfacciale (γ), definita come l'energia per cm^2 che si libera all'interfaccia.

Vari ricercatori hanno studiato le interazioni in vitro di cellule endoteliale umane con polimeri che hanno un diverso grado di bagnabilità, in un mezzo di coltura contenente siero. I loro risultati suggeriscono che i polimeri moderatamente bagnabili mostrano un'ottima adesione, diffusione e proliferazione di cellule, mentre l'adesione diminuisce o scompare in quei polimeri molto idrofili o idrofobici. (26)

5.2.4 Teoria della diffusione

Secondo la teoria della diffusione, la compenetrazione delle catene dei polimeri con il muco produce un legame adesivo semipermanente, infatti la forza del legame aumenta all'aumentare del grado di penetrazione delle catene di polimero nello strato di muco. Il materiale bioadesivo e le glicoproteine della membrana biologica sono portati a stretto contatto e le catene del polimero penetrano all'interno del muco. La profondità di penetrazione necessaria per ottenere una sufficiente bioadesione dipende dal coefficiente di diffusione, dal tempo di contatto e da altre variabili sperimentali.

Il coefficiente di diffusione dipende dal peso molecolare e decresce rapidamente all'aumentare della densità dei legami crociati. Questo suggerisce che la flessibilità e la mobilità delle catene del polimero e le molecole glicoproteiche del muco siano parametri importanti che controllano la diffusione.

Durante la compenetrazione le molecole di bioadesivo e la rete di muco vengono a contatto e, a causa del gradiente di concentrazione, le catene del polimero penetrano ad una velocità dipendente dal coefficiente di diffusione delle macromolecole e dal gradiente chimico. Con polimeri aventi legami crociati, la compenetrazione delle catene avviene con grande difficoltà. (27,28)

5.2.5 Teoria della frattura

Questa teoria è sicuramente la più adatta per studiare la bioadesione attraverso misure meccaniche. Fa riferimento alla separazione di due superfici dopo l'adesione.

Lo sforzo di tensione massimo prodotto durante l'allontanamento di due superfici può essere calcolato dal rapporto:

$$S_m = F_m / A_0$$

Dove:

S_m = sforzo massimo di tensione.

F_m = forza di allontanamento.

A_0 = superficie totale coinvolta nell'adesione.

La forza di rottura è equivalente alla forza adesiva, data dalla seguente equazione:

$$\sigma = (E\varepsilon / L)^{1/2}$$

Dove:

E = modulo di elasticità di Young.

ε = energia di rottura.

L = lunghezza critica di rottura quando le due superfici si separano.

L'energia di rottura si ottiene dalla somma del lavoro di adesione reversibile, inteso come l'energia richiesta per produrre una nuova frattura di superficie, e il lavoro di adesione irreversibile, inteso come lavoro richiesto per produrre la deformazione plastica che si verifica al punto di rottura. Per

determinare le proprietà di rottura tra due substrati adesivi è necessario che ci siano pochi legami all'interfaccia bioadesiva.

In ogni caso, è stato dimostrato che la rottura, se si verifica, avviene raramente all'interfaccia, ma si verifica più spesso internamente. Sebbene siano presenti queste limitazioni, la teoria della frattura, poiché si occupa di analizzare la forza adesiva necessaria per la separazione, non richiede la compenetrazione delle catene di polimero, la diffusione e la formazione di un reticolo.

Questa teoria è appropriata per calcolare la forza di rottura di legami adesivi di materiali bioadesivi rigidi o semirigidi, dove le catene del polimero non possono penetrare nello strato di muco.

5.3 I polimeri bioadesivi

I polimeri si ottengono dalla relazione tra monomeri in cui si aggiungono anche agenti reticolanti che formano legami crociati tra i gruppi di monomeri, in modo da ridurre l'idrosolubilità del polimero stesso. Quando il monomero utilizzato è sempre lo stesso, il polimero ottenuto è chiamato omopolimero, mentre quando nella sintesi vengono utilizzati monomeri diversi il polimero sintetizzato è chiamato copolimero.

Per ottenere una buona mucoadesività si deve ottimizzare la polarità della superficie polimerica e la mobilità delle catene in base alla temperatura di transizione vetrosa e all'angolo di contatto acqua-polimero.

L'utilizzo di polimeri mucoadesivi consente di controllare il rilascio di principi attivi per via orale. Questi polimeri devono essere in ogni caso flessibili e di ridotta dimensione per seguire i movimenti delle guance e non causare irritazione.

Nella tabella III si elencano alcuni polimeri bioadesivi in ordine di crescente forza mucoadesiva.

Gli ioni idrogeno sono adatti per creare sistemi mucoadesivi grazie alla loro flessibilità e biocompatibilità. La forza che determina l'adesione è promossa dal grado di similitudine tra polarità superficiale dell'idrogeno e quella del substrato, infatti, è la polarità di superficie che determina i legami interfacciali polimero-mucosa.

La mobilità delle catene del polimero permette la compenetrazione del polimero stesso nello strato mucoso. La temperatura di transizione vetrosa può servire per misurare la mobilità delle catene.

(29)

Tabella III: lista dei polimeri bio (muco) adesivi in ordine di forza mucoadesiva.

Polimeri	Forza adesiva media %	Deviazione standard	Valutazione Qualitativa Della Proprietà Bio(muco)adesiva
Sodiocarbosimetil cellulosa	192.24	12.0	Eccellente
Acidi poliacrilici	185.0	10.3	
Gomma Adragante	154.4	7.5	
Polietilenoossido	128.6	4.0	
Metilcellulosa	128.0	2.4	
Sodio alginato	126.2	12.0	Soddisfacente
Idrossipropilmetilcellulosa	125.2	16.7	
Gomma Karaya	125.2	4.8	
Metiletilcellulosa	117.4	4.2	Discreta
Amido solubile	117.2	3.1	
Gelatina	115.8	5.6	
Pectina	100.0	2.4	Minima
Polivinilpirrolidone	97.6	3.9	
Polietilenglicole	96.0	7.6	
Polivinilalcol	94.8	4.4	
Poliidrossietilmetacrilato	88.4	2.3	
Idrossipropilcellulosa	87.1	13.3	

5.4. Metodi di misura

5.4.1 Tensile test

Si misurano la forza massima di distacco ed il lavoro di adesione relativi al polimero in studio.

Gli studi possono essere condotti secondo due diverse metodiche: metodo interfacciale e metodo "bulk"

Con il metodo interfacciale si confronta il comportamento del polimero quando viene messo a contatto con la mucina, rispetto a quando è utilizzato un tampone. L'esperimento è condotto ponendo una certa quantità del campione in esame su un disco di carta da filtro incollato a un supporto, mentre la soluzione di mucina è applicata su un altro supporto.

La superficie del campione e quella della mucina sono messe a contatto spostando il carrello, si applica, quindi, un precarico scelto in funzione della forza minima necessaria per assicurare l'adesione fra le due superfici.

Dopo un certo tempo il precarico è rimosso e si allontana il carrello mobile ad una velocità costante fino alla completa separazione fra le due superfici. Durante l'operazione il computer elabora le informazioni che giungono dal trasduttore (spostamento) e dalla cella di carico (forza applicata); mettendo in grafico la forza in funzione dello spostamento si possono ricavare la forza massima di distacco e il lavoro di adesione espresso come area sotto la curva.

Con il metodo "bulk" si confronta il differente comportamento di una miscela polimero-mucina rispetto ad una soluzione di solo polimero. In questo caso l'esperimento è condotto ponendo un campione della miscela polimero-mucina sul disco di carta da filtro incollato al primo supporto, applicando la sola carta da filtro al secondo supporto e procedendo, poi, come per il metodo interfacciale.(30,31)

5.4.2 Analisi reologica

Mediante l'utilizzo di un viscosimetro si determina la variazione della viscosità (espressa in Pa.s) di una miscela contenente il polimero e la mucina rispetto alla somma dei singoli contributi dovuti al polimero e alla mucina. Questa variazione, detta sinergismo reologico, è calcolata secondo la seguente formula:

$$\Delta \eta \text{ (miscela)} - [\eta \text{ (polimero)} + \eta \text{ (mucina)}]$$

Dove: $\Delta \eta$ = sinergismo reologico

η (miscela) = viscosità della miscela polimero-mucina

η (polimero) = viscosità della soluzione di polimero

η (mucina) = viscosità della soluzione di mucina

Poiché i valori delle viscosità delle soluzioni di polimero presentano ordini di grandezza differenti, si utilizza il sinergismo reologico normalizzato per rendere i dati confrontabili:

dove $\Delta \eta / \eta$ = sinergismo reologico normalizzato

η = sinergismo reologico

η (polimero) = viscosità della soluzione di polimero

In presenza di interazioni tra polimero e mucina il parametro assume valori positivi. (32)

6. PARTE SPERIMENTALE

6.1 Formulazioni sviluppate

6.1.1 Compresse mucoadesive ad uso buccale

Le compresse ad uso buccale sono una nuova via di somministrazione che prevede l'adesione della forma farmaceutica alla mucosa gengivale per il rilascio controllato nel tempo e localizzato del principio attivo. Esistono diversi tipi di compresse ad uso buccale che possono essere:

- Monostratificate, in cui il tratto interessato all'azione è l'intero cavo orale;
- Bistratificate.

Fra le compresse bistratificate, che sono una forma farmaceutica di nuova concezione, si possono trovare varie tipologie:

Compresse bistratificate ad uso sistemico, in cui uno strato si disintegra velocemente e rilascia il farmaco immediatamente per garantire una dose di carico, mentre il secondo strato rimane adeso alla mucosa e rilascia il farmaco in modo controllato nel tempo, per garantire il mantenimento di livelli sierici ed evitare somministrazioni multiple.

Compresse bistratificate ad uso sistemico, in cui uno strato contiene il principio attivo e l'altro semplicemente mucoadesivo.

I principali eccipienti per compresse mucoadesive utilizzati sono i derivati della cellulosa tra cui la Carbossimetilcellulosa Sodica, la Idrossipropil-, la Idrossipropilmetil- e la Idrossietilcellulosa, che sono in grado di dare una buona mucoadesione a livello della mucosa buccale, rigonfiarsi in ambiente acquoso in maniera tale da garantire un buon controllo del rilascio del principio attivo. L'acido poliacrilico, che in ambiente acquoso è responsabile di un notevole rigonfiamento della compressa e può anche interagire con principi carichi controllandone in questo modo il rilascio in modo più efficace.

6.1.2 Formulazioni tipo gel

I Gel sono formulazioni che si ottengono a partire da dispersioni colloidali di tipo Sol, nelle quali la fase dispersa forma un reticolo tridimensionale che trattiene al suo interno la fase disperdente liquida.

Un Gel, quindi, è una dispersione nella quale si è creata una microstruttura che impartisce al Sol una certa rigidità.

I Gel possiedono un aspetto semisolido ed opalescente.

Il processo della gelificazione è determinato dal fatto che le molecole di grosse dimensioni, costituenti la fase dispersa del Sol, si desolvatano e contraggono, tra loro, legami di tipo ionico, dipolo-dipolo e di van der Waals.

Il reticolo tridimensionale che si viene così a costituire conferisce una determinata struttura e viscosità al Gel.

Affinché si verifichi la gelificazione di un Sol è necessario che venga raggiunto il cosiddetto **punto di gelificazione**: ossia la concentrazione dell' agente gelificante che consente la formazione del reticolo. Al di sotto di tale punto il Gel non si forma.

Il punto di gelificazione è un parametro dipendente dal peso molecolare e dalla struttura della fase dispersa e dalle sue interazioni con la fase disperdente.

Gel costituiti da polimeri ad elevato peso molecolare, aventi, quindi, catene lunghe capaci di ripiegarsi più volte e di formare molti legami intramolecolari ed intermolecolari, presentano bassi punti di gelificazione.

6.1.2.1 Tipi di gel

La classificazione dei Gel dipende dalle caratteristiche delle due fasi costituenti.

La natura dei legami di reticolazione e la percentuale di fase liquida contenuta nella struttura tridimensionale permettono di effettuare una classificazione dei Gel basata sulle loro caratteristiche reologiche:

- 1) **Gel plastici**: sono formulazioni più o meno deformabili dotate di una buona scorrevolezza, se opportunamente sollecitate. Esempi di Gel plastici sono gli idrogeli che si ottengono utilizzando la gelatina, le pectine o i derivati della cellulosa come agenti gelificanti.
- 2) **Gel elastici**: sono formulazioni capaci di ritornare alla loro forma originale in seguito ad una qualsiasi sollecitazione che non implichi la rottura del reticolo tridimensionale.
- 3) **Gel rigidi**: sono formulazioni indeformabili.

I Gel plastici sono quelli che rivestono una maggior importanza nell' ambito farmaceutico.

Inoltre, la F.U. classifica i Gel in base alla natura della fase disperdente, suddividendoli in Gel idrofobi ed in Gel idrofili:

- **Gel idrofobi (oleogel)**: sono preparazioni in cui la fase disperdente è lipofila come, ad esempio, la paraffina liquida oppure un olio grasso.
- **Gel idrofili (idrogel)**: sono preparazioni in cui la fase disperdente è idrofila come, ad esempio, l' acqua, il glicerolo oppure i glicoli.

6.1.2.2 Gli agenti gelificanti

Gli agenti gelificanti sono di varia natura e sono caratterizzati da proprietà specifiche.

- **Le gomme naturali**, in genere estratti vegetali oppure essudati di piante, sono costituite da polisaccaridi naturali. La maggior parte di esse (gomma arabica, gomma xantan, carraghenani) è anionica.
- **Gli alginati** sono polimeri che contengono, in varie proporzioni, Acido Mannuronico ed Acido Guluronico. Il polimero più usato è l' Alginato di Sodio. La gelificazione avviene per modificazione del pH oppure in seguito alla reazione con cationi bivalenti. La diminuzione del pH converte gli anioni carbossilato in gruppi carbossilici liberi, riducendo l' idratazione del polimero e la repulsione tra i segmenti di quest' ultimo, permettendo la gelificazione. A pH neutro i Gel di alginato si formano in presenza di ioni polivalenti e, in questo caso, vengono generalmente usati gli ioni Calcio.
- **Le pectine** formano Gel in ambiente acquoso acido contenente ioni Calcio ed altri agenti.
- **I carbomer** sono polimeri acrilici reticolati con eteri polialchenilici; vengono indicati con il nome commerciale di Carbopol ed identificati con un numero. Quelli designati con la lettera "p" sono gli unici che possono venire a contatto con le mucose ed il cavo orale. Questi polimeri sintetici contengono tra il 56% ed il 68% di gruppi carbossilici (COOH). I carbomer formano, a basse concentrazioni, Gel stabili di tipo plastico: inizialmente si ha la formazione di una dispersione colloidale acida che, in seguito a neutralizzazione, gelifica.

- **Dalla cellulosa** si ottengono diversi derivati mediante trattamenti che portano alla rottura dello scheletro carbonioso o alla eterificazione di alcuni gruppi ossidrilici. La natura dei sostituenti, il grado di sostituzione ed il peso molecolare medio del polimero risultante sono i fattori che più influenzano le caratteristiche reologiche delle cellulose semisintetiche. I derivati della cellulosa più utilizzati sono la Carbossimetilcellulosa Sodica, la Idrossipropil-, la Idrossipropilmetil- e la Idrossietilcellulosa. Tali sostanze formano Gel pseudoplastici e, generalmente, stabili.
- **I poloxamer (copolimeri a blocchi sintetici)** come il Poliossietilene ed il Poliossietilene-Poliossipropilene sono polimeri capaci di gelificare soltanto a temperature superiori a 36°C. Si tratta di gelificanti anomali che passano dall'essere molto fluidi a 25°C all'essere molto viscosi a 37°C. Sono dei veri e propri filmanti e formano Gel aventi proprietà mucoadesive.
- **I polipeptidi**, quali la Gelatina, sono ottimi gelificanti.
- **Il polivinilpirrolidone (PVP) ed il polivinilalcol** sono usati come agenti gelificanti a concentrazioni comprese tra il 10% ed il 20%.

Un agente gelificante per uso farmaceutico dovrebbe essere inerte, sicuro, non tossico, non reattivo nei confronti degli altri componenti della formulazione e dovrebbe portare alla formazione di un prodotto stabile. Polialcoli come, ad esempio, il Sorbitolo ed il Glicerolo possono essere addizionati alla formulazione per aumentare la stabilità dei Gel, impedendo l'evaporazione dell'acqua.

Un agente gelificante dovrebbe, inoltre, conferire alla formulazione, durante la conservazione, una struttura abbastanza rigida, ma tale da essere rotta facilmente se sottoposta a forze di taglio.

6.1.3 Ciclodestrine

6.1.3.1 Struttura delle ciclodestrine

Le ciclodestrine sono oligosaccaridi ciclici con legame α 1,4 glicosidico ottenute per degradazione enzimatica dell'amido. Le ciclodestrine naturali contengono 6, 7 o 8 unità glucopiranosiche e sono denominate rispettivamente α (α -CD), β (β -CD) e γ (γ -CD).

La struttura chimica delle ciclodestrine (Figura 7) mostra la natura ciclica della molecola e la presenza di tre gruppi ossidrilici su ciascuna unità di glucopiranosio; due sono secondari e sono localizzati sul C-2 e sul C-3 mentre il terzo, sul C-6, è primario.

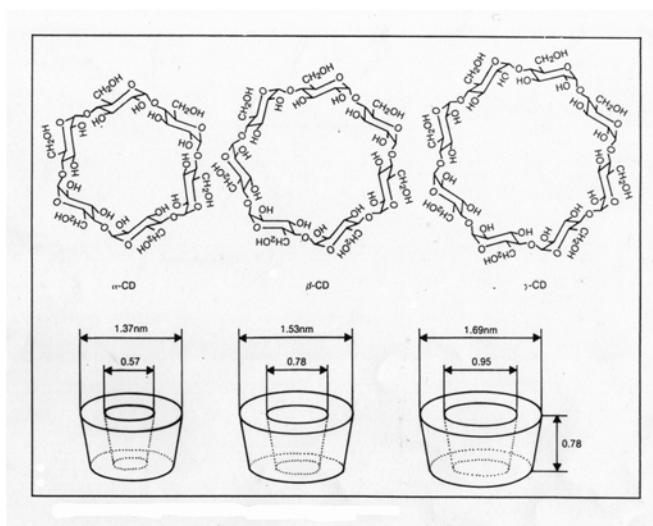


Figura 7: Struttura delle ciclodestrine e loro dimensioni geometriche.

Nelle tre dimensioni hanno una struttura toroide a forma di tronco di cono, dove gli ossidrili primari sono localizzati su una faccia e quelli secondari sull'altra (Figura 8).

L'interno del cono ha una bassa polarità, minore di quella dell'acqua, per la presenza dell'ossigeno etero del legame glicosidico e degli idrogeni al C-3 e al C-5; è all'interno di questa cavità, detta idrofobica, che può essere incluso il farmaco. Le dimensioni delle cavità interne, riportate in Figura 7, variano da 0,57nm dell' α -CD (la più piccola) a 0,95nm della γ -CD (la più grande).

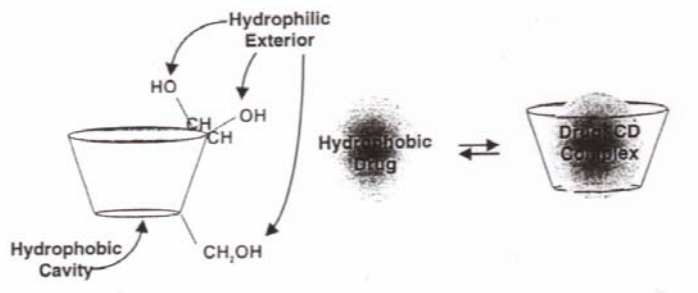


Figura 8: Toroide (tronco di cono) e complessazione del farmaco all'interno della cavità idrofoba delle ciclodestrine

6.1.3.2. Derivati delle ciclodestrine

La presenza di gruppi ossidrilici nella struttura rende le ciclodestrine facilmente modificabili chimicamente, introducendo esteri, metili o anche, con opportuni accorgimenti, gruppi acidi o basici.

Con la derivatizzazione le caratteristiche delle ciclodestrine vengono modificate; alcuni gruppi possono bloccare stericamente l'entrata del farmaco nella cavità, mentre altri possono addirittura estenderla o favorire una migliore complessazione a seconda del numero di gruppi introdotti, della flessibilità e della posizione d'attacco.

6.1.3.3. Effetti dell'uso delle ciclodestrine

La conseguenza primaria della formazione di complessi con le ciclodestrine è l'aumento della solubilità del farmaco, che subendo un'inversione della sua natura una volta inserito nella cavità, da idrofobo diventa idrofilo e facilmente bagnabile.

La maggiore solubilità si ha non solo per l'idrofilicità apportata dal sistema di anelli glicosidici, ma anche come risultato della formazione di un complesso più solubile, che sposta l'equilibrio di saturazione.

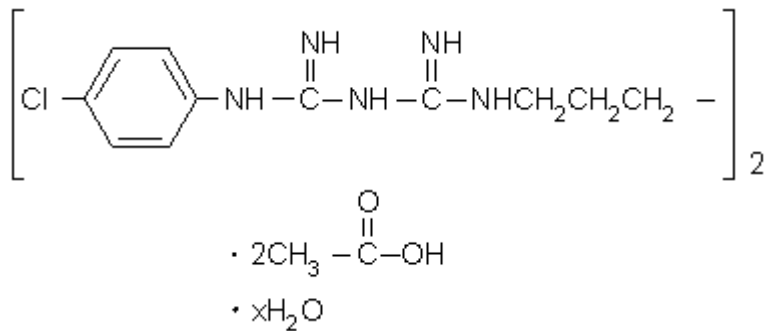
Il complesso farmaco ciclodestina in soluzione acquosa si forma continuamente e si dissocia con un tempo di vita dell'ordine dei millisecondi.

Studi recenti hanno inoltre dimostrato che le ciclodestrine grazie alla presenza di funzioni ossidriliche presentano anche delle buone caratteristiche di bioadesione in quanto capaci di interagire con le glicoproteine della mucina attraverso interazioni elettrostatiche.

Per limitare l'elevata velocità di dissoluzione delle ciclodestrine la ricerca tecnologica si è rivolta allo studio di possibili modifiche strutturali da introdurre sullo scheletro delle ciclodestrine, al fine di aumentarne l'efficacia di controllo del rilascio del principio attivo, mantenendone invariate le caratteristiche di biocompatibilità.

6.2 Materiali

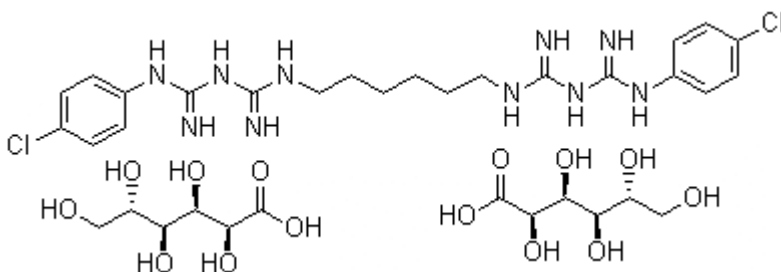
Clorexidina Diacetato



Farmacopea Europea V Ed. pag 1256

Fornitore: SIGMA.

Clorexidina Digluconato Soluzione (20%)

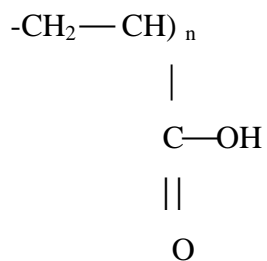


Farmacopea Europea V Ed. pag 1258

Fornitore: SIGMA.

Acido poliacrilico (Carbopol 974 P®)

U.S.P. 23,N.F.,1995, pag. 2226.



Fornitore: FLUKA

Lattosio 200 mesh

Farmacopea Europea V Ed. pag 1886

Fornitore: POLICHIMICA

Talco

Farmacopea Europea V Ed. pag 2531

Fornitore: POLICHIMICA

Idrossipropilmetilcelluosa (METHOCEL)

U.S.P. 23, pag. 774.

Fornitore: EIGENMANN AND VERONELLI

Carbossimetilcellulosa (BLANOSE)

U.S.P. 23, pag. 421.

Fornitore: FLUKA

Idrossipropilcellulosa

Farmacopea Europea V Ed. pag 1773

Sodio acetato

$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

F.U. X ed., pag 1884.

Mucina grezza da stomaco di suino (Tipo II)

Caratteri: Mucina di tipo II legata ad acido sialico.

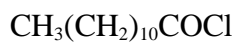
Fornitore: SIGMA.

Ciclodestrine

Farmacopea Europea V Ed. pag 1773

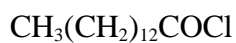
Fornitore: FLUKA

Lauroil cloruro



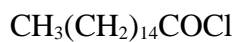
Fornitore: FLUKA

Miristoil cloruro



Fornitore: FLUKA

Palmitoil cloruro



Fornitore: FLUKA

6.3 Apparecchiature

6.3.1 Comprimitrice alternativa

Korsche, modello EKO.

6.3.2 Dissolutore secondo FUX (Paddle method)

Bagno termostato a 37°C.

Recipiente in vetro borosilicato da un litro.

Paletta.

Motore (Mechanical Stirrer; model Quiet S)

6.3.3 Sistema di dissoluzione e permeazione *ex-vivo*

Superficie di rilascio in plastica forata.

2 Beaker da 1000 mL.

Mucosa porcina trattata.

Tampone fosfato a pH 7,4.

Pompa : Gilson.

Flusso: 1,5 mL/min.

Il sistema è costituito da una superficie in polipropilene di 2 cm di diametro su cui è adagiata la mucosa porcina precedentemente trattata. La lastra di propilene è fissata con una angolazione di circa 30° rispetto al piano di lavoro

Sotto la lastra di propilene viene posto un vessel contenente 100 mL di soluzione tampone fosfato pH 7,4 termostata a 37°C e posta sotto agitazione.

La soluzione tampone viene fatta gocciolare sulla mucosa, sulla quale è presente la formulazione da testare, con un flusso costante di 1mL/minuto ed inviata, mediante una pompa peristaltica, ad uno spettrofotometro UV dove vengono effettuate letture ad una predeterminata λ ad intervalli di tempo regolari.

Il Test termina quando il valore delle letture all' UV si mantiene costante per circa 1h.

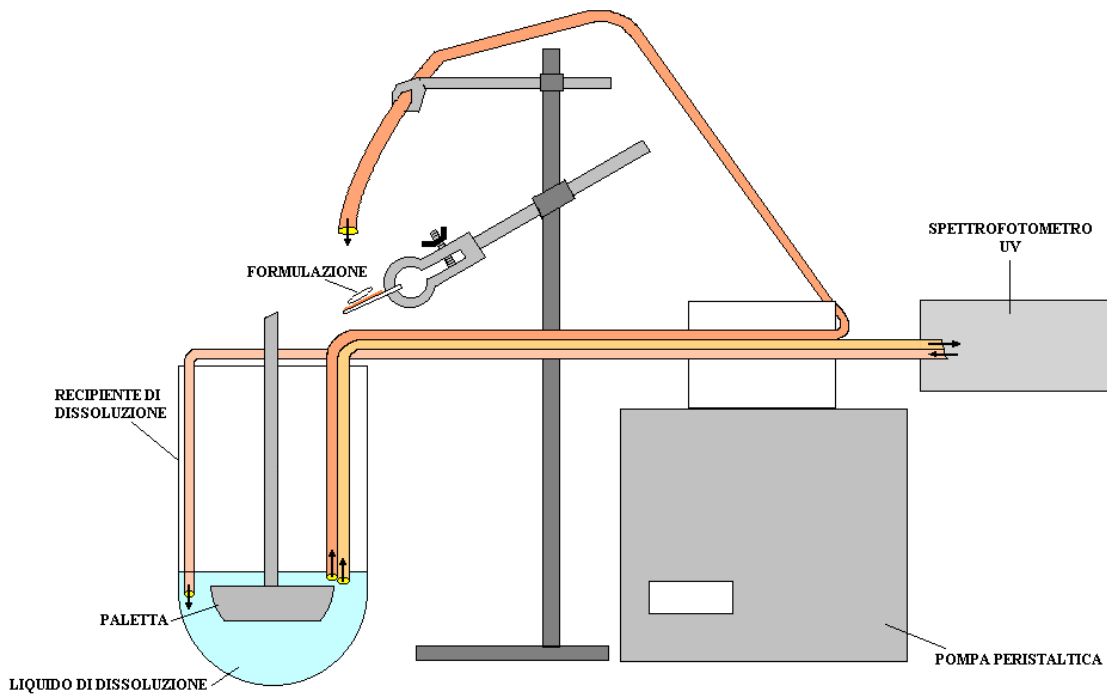


Figura 9: sistema di dissoluzione e permeazione ex-vivo per valutare il rilascio dalle compresse mucoadesive

6.3.4 Celle di Franz

Ciascuna cella è costituita da 2 compartimenti: il comparto superiore ha un diametro di 9 mm, corrispondente ad un'area diffusionale di 64 mm^2 , ed un volume di 2 mL.

Il comparto inferiore ha una capienza di 4,8 mL, esso è circondato da una camicia nella quale scorre acqua termostata a 37°C (Figura 7)

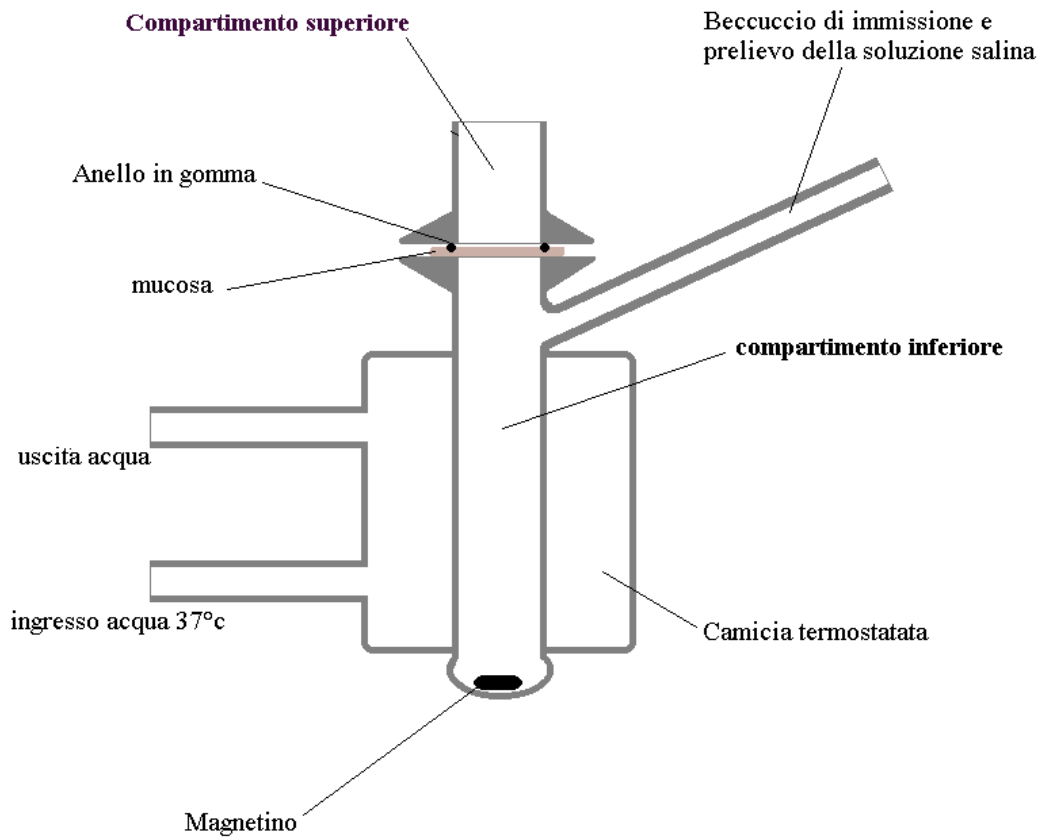


Figura 10: schema di cella di Franz

6.3.5 Sistema UV

Spettrofotometro: Jasco V-530 UV/VIS Spectrophotometer.

Integratore: Spectra manager

6.3.6 Sistema HPLC

Pompa: Dionex P580.

Rilevatore: Dionex UVD 170-S.

Integratore: Chromaleon.

6.3.7 Viscosimetro rotazionale

Produttore: FUNGILAB,S.A

Modello: Viscostar R

Velocità minima: 0,3 rpm

Velocità massima: 200 rpm

Dimensioni rotore min (TR11): Diametro 7,50 mm

Dimensioni rotore max (TR 8): Diametro 16,78 mm.

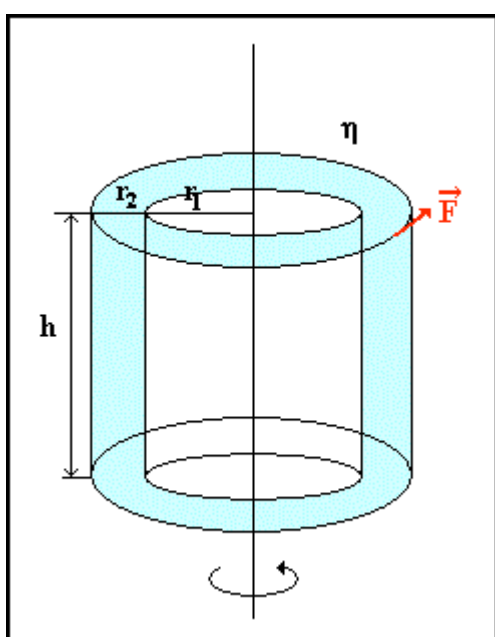


Figura 11: Viscosimetro rotazionale

6.3.8 ^1H – NMR

^1H – NMR

Spettrometro Gemini 600

6.3.9 Bilancia analitica

Produttore: OHAUS

Modello: SPU402

Capacità massima: 240g.

Precisione: 0,01mg

6.3.10 Termometro ad infrarossi

Produttore: Dostmann

Range: -33°C /+220° C

Risoluzione: $\pm 1,5^{\circ}$ C (15/4°C) oltre $\pm 2^{\circ}$ C

Precisione: 0,1° C

Tempo: 500 ms

Emissioni: 0,95

6.3.11 Siringa monouso

Produttore: Cope

Capacità: 1 ml

6.3.12 Calibro digitale DC515

Produttore: MI- System

Portata: 0-150 mm

Risoluzione: 0,01 mm

Precisione: 0,03 mm

Temperatura operativa: 0-40° C

6.4 Metodiche

6.4.1 Preparazione Soluzione Saturata di Clorexidina

1,2 g di clorexidina diacetato, accuratamente pesati sono disciolti in acqua a 37 °C in un matraccio da 100ml.

La soluzione viene posta su un agitatore magnetico, con piastra termica, lasciata ad agitare, per permettere la dissoluzione.

6.4.2 Preparazione della Soluzione Tampone Fosfato PH 7.4 Secondo Fu XI

2,38 g di sodio fosfato monobasico, 0,19 g di potassio fosfato monobasico dodecaidrato e 8,0g di sodio cloruro opportunamente pesati vengono posti in un matraccio da 1000,0 ml. Si aggiunge acqua fino ad ottenere un 1000,0 ml di soluzione. Si verifica il pH. Vedi F.U. X pag. 351 capitolo reattivi

6.4.3 Preparazione delle mucose

La mucosa porcina viene prelevata dall'animale subito dopo che è stato sacrificato presso il mattatoio CLAI di Imola (Bologna). Il prelievo viene eseguito recidendo entrambe le guance esterne dell'animale; tale operazione è eseguita da un Veterinario. Subito dopo il prelievo la guancia è introdotta in tampone fosfato a pH 7.4. La mucosa porcina viene prelevata dalla parte interna della guancia dell'animale, dopo che esso è stato risciacquato dal tampone fosfato 7.4 con acqua distillata.

Il successivo prelievo viene effettuato nella zona ventrale della guancia. In questa zona la mucosa è a contatto con un sottile strato adiposo che lo separa da quello muscolare. Dopo il prelievo la mucosa è separata dagli strati adiposo e muscolare mediante bisturi. Si controlla che lo strato mucosale sia stato isolato dagli altri, posizionando la mucosa su una superficie nera illuminata dal basso. Si ottiene la mucosa che è definita di "primo taglio". Una volta controllata la separazione fra gli strati si prosegue nella eliminazione dalla mucosa di residui adiposi, tramite bisturi, che sono facilmente individuabili perché di colore bianco. Si ottiene così la mucosa di secondo taglio o post lavorazione.

Una volta resa la mucosa omogenea è ritagliata in pezzi quadrati di 2 cm di lato.

6.4.4 Preparazione delle compresse

Si pesano i componenti con la bilancia analitica e si miscelano con la tecnica delle diluizioni geometriche in un mortaio di porcellana con il pestello. Per quanto riguarda la compressa monostratificata, si pesa la quantità di polvere che corrisponde allo strato mucoadesivo, si introduce tale polvere nella matrice della comprimitrice e si comprime.

6.4.5 Preparazione dei gel

L'agente gelificante (un derivato della cellulosa) viene sciolto in acqua calda sotto agitazione. Una volta che il gel risulta formato si aggiunge la soluzione all'1% di Clorexidina digluconato e si lascia in agitazione la formulazione per 24h.

6.4.6 Preparazione e caratterizzazione di nuovi agenti bioadesivi

Gli agenti bioadesivi sono stati preparati esterificando gli ossidrili di tre diverse ciclodestrine (α , β e γ); con acidi grassi a diversa lunghezza di catena, acido laurico, miristico e palmitico utilizzati in forma di cloruri acilici. Le ciclodestrine sono state sciolte in DMSO (Dimetilsolfossido) in presenza dei cloruri degli acidi grassi nei rapporti molari 1:10, 1:15 e 1:20 (moli destrina:moli cloruro). Dopo 24 ore di agitazione a temperatura ambiente i prodotti sono stati precipitati in acqua. Il precipitato è stato raccolto tramite filtrazione e dializzato per 24 h. Le sostituzioni hanno prodotto dei polimeri bioadesivi con struttura semisolida e liquida. Sono stati selezionati i polimeri semisolidi in cui è stata incorporata manualmente la clorexidina diacetato. Il grado di sostituzione del polimero è stato determinato mediante ^1H - NMR (Spettrometro Inova 600). L'analisi elementare rivela che polimeri bioadesivi preparati con rapporto molare 1:10 (CDX: AC. GRASSO) hanno un grado di sostituzione pari a 1; quelli con rapporto molare 1:15 hanno un grado di sostituzione pari a 1,2 e quelli con rapporto molare 1:20 hanno un grado di sostituzione pari a 1,3. Il grado di sostituzione è stato calcolato comparando l'integrale del picco assegnato ai protoni del metile (CH_3) della catena di acido grasso con quello dei (CH_2) del C6 del glucosio.

6.4.7 Metodica UV

Condizioni operative

Cuvetta in quarzo.

Lunghezza d'onda: 239 nm.

Preparazione degli standard

Si pesano 6 mg di Clorexidina e si sciolgono in 100 mL di tampone fosfato pH 7,4 e si lascia in agitazione, dopodiché si effettuano diluizioni successive sempre in tampone fosfato pH 7,4 in un range di concentrazioni che va da 1,54 a 24 µg/mL. Le soluzioni si utilizzano per costruire la curva di taratura da cui si ricava il coefficiente angolare che serva per risalire alle concentrazioni dei campioni incogniti.

Preparazione dei campioni

I campioni prelevati da: a) compartimento inferiore delle celle di Franz; b) dissolutore *ex-vivo*; c) dissolutore a paletta secondo F.U.X vengono filtrati con filtro da 0,45 micron direttamente nella cuvetta in quarzo e si effettua la lettura. I campioni prelevati dal compartimento superiore delle celle di Franz sono letti all'UV direttamente senza filtrare. Nel caso in cui i campioni siano troppo concentrati si effettuano le opportune diluizioni. E' stata eseguita anche una prova in bianco delle compresse contenenti i soli eccipienti. I valori di assorbanza ottenuti sono sottratti ai valori originali.

6.4.8 Metodica HPLC

Condizioni operative

Fase mobile: 30 % Acetonitrile; 70 % Tampone fosfato pH 3.

Flusso: 1 mL/min

Lunghezza d'onda: 239 nm.

Tempo di ritenzione : 14 min.

Colonna: C-18 5 micron Spherisorb.

Preparazione standard

Si pesano 100 mg di Clorexidina e si sciolgono in 100 mL di fase mobile (30% acetonitrile, 70% tampone fosfato pH 3) previamente filtrata e lasciando in agitazione; si effettuano diluizioni successive sempre in fase mobile in modo da ottenere 3 soluzioni standard con un range di concentrazioni compreso tra 10 µg/mL e 100 µg/mL.

Preparazione soluzione tampone fosfato pH 3 secondo F.U. XI

Disciogliere 6,80 g di potassio fosfato monobasico in acqua e diluire a 1000,0 ml con lo stesso solvente. Correggere il pH con acido fosforico .

6.5 Convalida Della Metodica HPLC

Nello convalida della metodica HPLC si sono considerati i seguenti parametri:

Intervallo di validità:

L' intervallo di concentrazione di un analita nel quale si determinano i parametri considerati (U.S.P XXIII, pag.1982). È compreso tra il -20% del valore percentuale più basso e il +20% del valore percentuale più alto ottenuto nei test.

Accuratezza:

Il grado di accordo dei risultati ottenuti e il valore vero si valuta tramite il valore del recupero percentuale.

Si preparano tre campioni per ognuno dei tre livelli di concentrazione prescelti, compresi all'interno del range di calibrazione, aggiungendo quantità note dell'analita al placebo. Si ripete la prova almeno due volte ed in due giorni diversi per una maggiore attendibilità dei risultati, si considera come 100% il punto centrale della curva di calibrazione. Per determinare il principio attivo, si scelgono tre livelli di concentrazione (80-100-120 %) dell'intervallo di lavoro. Utilizzando i valori ottenuti si costruiscono le curve di calibrazione a nove punti riportando sull'asse delle ordinate (y) tutti i singoli valori delle aree e sull'asse delle ascisse (x) le rispettive concentrazioni teoriche dei campioni. Si utilizza il metodo della regressione lineare per calcolare pendenza, intercetta, coefficiente di correlazione (R^2). Per ogni singolo campione analizzato determinare il Recupero (%):

$$\text{Recupero (\%)} = \text{concentrazione misurata}/\text{concentrazione teorica} * 100$$

Criteri di accettabilità:

ogni singolo valore di Recupero (%) deve essere compreso tra 97-103%; per la curva di calibrazione: $R^2 \geq 0.99$.

Precisione:

Indica il grado di accordo tra i risultati sperimentali quando si sono analizzati un elevato numero di campioni.

Procedimento: si effettuano 5 prelievi uguali a partire dalla stessa soluzione madre di clorexidina diacetato; successivamente si diluiscono equamente tali campioni e di ognuno si legge il valore delle aree, alla lunghezza d'onda selezionata. Si ripete la prova almeno due volte e in due giorni diversi per una maggiore attendibilità dei risultati. Si confrontano i valori ottenuti con quello di uno standard di clorexidina a concentrazione nota.

La precisione viene generalmente espressa mediante il Coefficiente di Variazione (C.V% o R.S.D.%) calcolato come:

$$C.V.\% = (\text{deviazione standard}/\text{valore medio}) * 100$$

Per valutare se i risultati delle due serie di dati, ottenuti in condizioni diverse, presentano differenze significative e se il metodo può considerarsi preciso, si effettua il TEST "F" o confronto tra le due stime di varianze, calcolando:

$$F = S^2/s^2$$

Dove S^2 = varianza della serie di dati con deviazione standard (S) maggiore,

s^2 = varianza della serie di dati con deviazione standard (s) minore.

I criteri di accettabilità per la precisione nella determinazione di un principio attivo sono:

$$C.V.\% \leq 3\%$$

$$F \leq 5.05 (\alpha = 0.05)$$

Linearità:

Indica la capacità di un metodo analitico di dare risultati che siano direttamente proporzionali o legati da una ben definita relazione matematica, alla concentrazione di analita, in un determinato range di concentrazioni (vedi pag. 46).

Si preparano cinque soluzioni standard di clorexidina diacetato a diverse concentrazioni, comprese nell'intervallo di validità scelto, a partire da un'unica soluzione madre (100µg/ml) e di ognuna si legge il valore dell'area alla lunghezza d'onda selezionata. Si ripete almeno due volte la prova della linearità e in due giorni diversi, per una maggiore attendibilità dei risultati. Si costruiscono le curve di calibrazione riportando sull'asse delle ordinate (y) l'area dell'analita e sull'asse delle ascisse (x) la sua concentrazione teorica. Si utilizza il metodo della regressione lineare nell'analisi della curva di calibrazione per calcolare la pendenza e coefficiente di correlazione R^2 . Per la determinazione di un principio attivo, il criterio di accettabilità delle curve di calibrazione consiste nell'ottenere un $R^2 \geq 0.99$.

7. SVILUPPO DEL LAVORO

7.1 Test effettuati

7.1.1 Misura dello spessore

Lo spessore delle mucose è stato valutato su trenta mucose di forma rettangolare dopo il primo e il secondo taglio attraverso l'utilizzo di un calibro.

È stato misurato su mucose aventi area di 24 cm^2 , in cinque punti corrispondenti ai vertici del rettangolo e ai punti di intersezione delle due diagonali come mostrato in Figura 12. Per facilitare la misura la mucosa è stata posta su una lamina di plexiglas con area di 24 cm^2 .

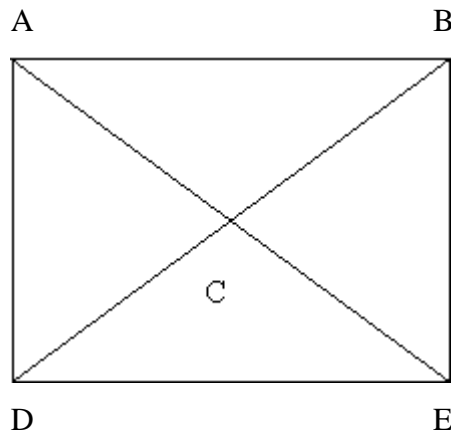


Figura 12: Disegno del rettangolo utilizzato per misurare lo spessore delle mucose

7.1.2 Misura del peso del volume della soluzione

Si è prelevato con una siringa un ml di soluzione proveniente dal compartimento ricevente della cella di Franz. Il contenuto della siringa è stato versato in un becher posto su una bilancia analitica. Si è proceduto così alla misura del peso del volume di soluzione prelevato dalla cella di Franz. Questa procedura è stata ripetuta per 3 volte.

7.1.3 Misura della temperatura

La misura della temperatura ottenuta inserendo all' interno della cella di Franz, attraverso l'apertura del compartimento inferiore, un termometro elettronico. La misura è stata ripetuta in triplicato.

7.1.4 Test di permeabilità della soluzione satura di clorexidina in tampone pH 7,4

Si posiziona la mucosa orale porcina tra il compartimento donatore e la camera recettoriale con la superficie mucosale rivolta verso il compartimento superiore. Si inserisce la soluzione da testare all'interno del compartimento donatore.

La camera ricevente è riempita con tampone fosfato a pH 7,4. Ad intervalli regolari di tempo, si prelevano dalla camera recettoriale 2 mL di soluzione.

Dopo ogni prelievo, si ripristina il volume iniziale con tampone fosfato a pH 7,4 termostatato a 37°C. I campioni prelevati si conservano in frigo a 4 °C fino al momento dell'analisi quantitativa. Ogni prova è ripetuta tre volte.

7.1.5 Test di solubilità

Le formulazioni semisolide, gel e polimeri bioadesivi, si centrifugano per 30 minuti a 4000 rpm. Successivamente si preleva 1 ml di surnatante dalla formulazione e si diluiscono a 100 ml con fase mobile in un matraccio tarato. I campioni così diluiti vengono filtrati attraverso filtri Millipore® da 0.45 µm e analizzati secondo la metodica HPLC.

7.1.6 Test di dissoluzione secondo F.U. XI

Il test è eseguito secondo F.U. XI, inserendo la formulazione nel recipiente contenente la soluzione tampone termostatata a 37 °C e prelevando, ad intervalli di tempo regolari, 3 mL di soluzione. Il volume è immediatamente ripristinato reinserendo la soluzione prelevata dopo l'analisi. Ogni prova è effettuata in triplicato. I campioni prelevati sono stati analizzati con metodica UV.

7.1.7 Test di rilascio in vitro delle formulazioni studiate

Si adagia la formulazione sulla mucosa porcina e si posiziona il tutto sulla superficie di rilascio in polipropilene forata. Si aziona la pompa a membrana che fa gocciolare la soluzione tampone con un flusso di 1 mL/min ad una distanza di 3 cm dalla formulazione. Ad intervalli di tempo regolari si effettuano letture all'UV, le quali avvengono in continuo mediante la pompa, senza necessità di prelievi. Le letture continuano fino a quando non si ha il completo rilascio della clorexidina nella soluzione tampone.

7.1.8 Test bilaterale di permeabilità e rilascio

Si fa aderire la compressa in esame alla superficie della mucosa porcina e si posiziona il tutto tra compartimento superiore (fase di permeabilità) e compartimento inferiore (fase di rilascio) con la compressa rivolta verso il compartimento inferiore in modo che essa sia immersa nella fase ricevente, riempita con tampone fosfato a pH 7,4. Nella camera superiore si introducono 2 mL di tampone fosfato a pH 7,4. Ad intervalli di tempo di 30 minuti, 1, 2, 4, 6 ed 8 ore si preleva l'intero contenuto del compartimento superiore e 1 mL di soluzione dal compartimento inferiore. (I prelievi sono necessari per non saturare la soluzione).

Dopo ogni prelievo si ripristina il volume iniziale con tampone fosfato a pH 7,4 termostatato a 37°C. I campioni prelevati sono conservati in frigo a 4 °C fino al momento dell'analisi quantitativa. Ogni prova è effettuata in triplicato.

7.1.9 Test di mucoadesione “in vivo” per le compresse mucoadesive

Si applica la compressa sulla gengiva di volontari sani, esercitando una pressione adeguata dall'esterno per 10 secondi. Se si ottiene adesione, il giudizio è eccellente. Se la compressa si stacca, si esercita ancora una pressione per 10 secondi e, se si ottiene adesione, il giudizio è buono. Se la compressa si stacca si esercita una ulteriore pressione per 10 secondi e, se si ottiene adesione, il giudizio è sufficiente. Se la compressa si stacca si esercita per un'ultima volta una pressione di 10 secondi e, se si ottiene adesione, il giudizio è scarso. Se non si ottiene adesione dopo 4 tentativi la compressa è da scartare.

Si valuta inoltre il tempo di permanenza ogni 10 minuti; ad ogni controllo si considerano:

- ◆ Distacco: quando la compressa o una parte di essa, parzialmente o totalmente gelificata, corrispondente ad almeno i 2/3 della massa, si stacca dalla mucosa, o scivola su di essa e finisce tra i denti.

Disgregazione: quando la compressa si riduce di volume rimanendo nella posizione iniziale, si considera tempo di completa disgregazione il momento in cui la compressa scompare o si riduce a circa 1/3 della massa.

7.1.10 Misure reologiche

7.1.10.1 Preparazione delle miscele polimero-mucina

Si preparano dispersioni di mucina alle concentrazioni dell'1%, 2%, 3% p/v in acqua distillata. Le miscele polimero-mucina (1:1) si ottengono addizionando le dispersioni di mucina alle formulazioni da testare.

I geli così ottenuti vengono analizzati al viscosimetro e la loro viscosità viene confrontata con quella dei corrispondenti geli di riferimento senza aggiunta di mucina.

7.1.10.2 Metodi di misurazione

Lo strumento di misura utilizzato è di preferenza un viscosimetro rotazionale rispetto ad uno capillare; la scelta viene effettuata in base alla viscosità della formulazione da analizzare. Si sceglie un viscosimetro capillare di Ostwald per formulazioni a bassa viscosità (per lo più soluzioni), nel caso di gel invece, anche se di bassa viscosità, è più opportuno l'utilizzo di un viscosimetro rotazionale.

7.2 Formulazioni Sviluppate

7.2.1 Sviluppo di compresse mucoadesive

Sei lotti di compresse (M1-M6) sono stati preparati usando differenti percentuali di componenti.

Tutte le compresse contengono 2,5 mg di Clorexidina diacetato monoidrato perché si è calcolato che questa è la quantità di principio attivo contenuta in 2,5 g di un gel ad uso buccale, che è la massima quantità di formulazione applicabile a livello dell'arcata gengivale superiore.

Le compresse sono preparate aggiungendo i diversi componenti in un mortaio secondo il metodo delle diluizioni geometriche. La miscela fisica viene poi compressa con una comprimitrice Korsch a singolo punzone. In tabella V sono riportati alcuni dei parametri tecnologici delle compresse sviluppate.

Tabella IV: Composizione (mg) delle compresse mucoadesive sviluppate

Componenti (mg)	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Clorexidina diacetato	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Carbopol 974 P	/	/	/	1.5	4	12
Idrossipropilmetilcellulosa	9	12	20	10.5	8	/
Talco	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Lattosio monoidrato	47.3	44.3	36.3	44.3	44.3	44.3

Parametri	Formulazioni					
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Diametro (mm)	7.04±0.3	7.08±0.7	7.14±0.6	7.02±0.9	7.03±0.4	7.03±0.8
Spessore (mm)	1.19±0.6	1.22±0.4	1.13±0.3	1.17±0.5	1.24±0.7	1.15±0.9
Peso Totale (mg)	58.6±1.67	59.1±2.04	57.2±1.88	57.5±2.13	59.2±2.24	55.8±2.41

Tabella V: Principali parametri tecnologici delle formulazioni sviluppate

7.2.2 Sviluppo di gel mucoadesivi

Sono state preparate nove formulazioni con quantità di polimero tali da ottenere gel contenenti dal 3% al 5% di materiale polimerico.

I differenti derivati della cellulosa sono stati preparati utilizzando sia un singolo agente gelificante in una percentuale pari al 3%, che combinandolo con un altro agente al 2%.

Tabella VI: Composizione % dei gel sviluppati

Composizione %	GEL1	GEL2	GEL3	GEL4	GEL5	GEL6	GEL7	GEL8	GEL9
Clorexidina digluconato(CHX)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Carbossimetilcellulosa	3	/	/	3	3	2	/	2	/
Idrossipropilmetil cellulosa	/	3	/	2	/	3	3	/	2
Idrossipropil cellulosa	/	/	3	/	2	/	2	3	3
Acqua (qba)	100								

7.2.3 Sviluppo di ciclodestrine anfifiliche bioadesive

Sono state preparate formulazioni bioadesive per parziale sostituzione di ciclodestrine con acidi grassi a diversa lunghezza di catena. Le ciclodestrine sono state sciolte in DMSO (Dimetilsolfossido) in presenza dei cloruri degli acidi grassi in rapporti molari 1:10, 1:15 e 1:20 (moli ciclodestrina:moli cloruro). Dopo 24 ore di agitazione a temperatura ambiente i prodotti sono stati precipitati per addizione di acqua. Il precipitato è stato raccolto tramite filtrazione e dializzato per 24 h. Le sostituzioni hanno prodotto dei polimeri bioadesivi con struttura semisolida e liquida. Sono stati selezionati i polimeri semisolidi riportati in Tabella VII in cui è stata incorporata manualmente la clorexidina di acetato in maniera tale da avere formulazioni contenenti l'1% di Principio Attivo

Tabella VII: Polimeri bioadesivi sviluppati

Polimero	Costituenti
γ-CD L10	γ -Ciclodestrina:Laurico (1:10)
α-CD L15	α -Ciclodestrina-Laurico (1:15)
β-CD L20	β -Ciclodestrina-Laurico (1:20)
α-CD M10	α - Ciclodestrina:Miristico (1:10)
β-CD P10	β - Ciclodestrina:Palmitico (1:10)
β-CD P15	β - Ciclodestrina:Palmitico (1:15)

8. RISULTATI E COMMENTI

8.1 Convalida della metodica HPLC usata nel test di permeazione mucosale

La determinazione del principio attivo è stata effettuata mediante HPLC, applicato un metodo opportunamente convalidato per il test di permeazione, prendendo come campione di analisi la soluzione satura di Clorexidina.

8.1.1 Linearità

Per la determinazione della linearità è stata utilizzata la metodica precedentemente descritta. I valori ottenuti sono riportati nella seguenti tabelle.

LINEARITA' 1		
Campioni	Conc. teorica	Aree
1	20,4	16,48
2	40,8	29,59
3	61,2	50,4
4	81,6	68,05
5	102	83,43

Tabella VIII: 1° linearità

LINEARITA' 2		
Campioni	Conc. teorica	Aree
1	20,4	15,51
2	40,8	29,51
3	61,2	49,81
4	81,6	67,94
5	102	89,27

Tabella IX: 2° linearità

È evidenziato l'andamento lineare delle retta di calibrazione per i due set di valori nelle figure 13 e 14.

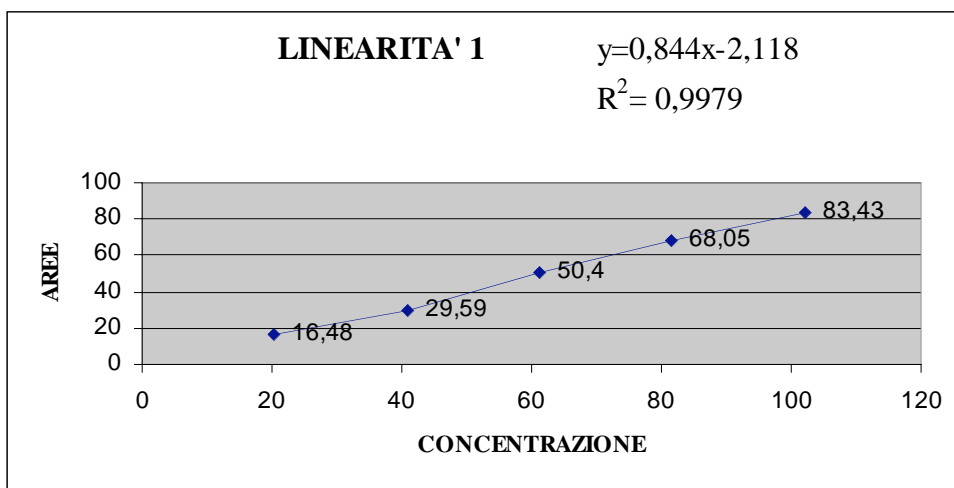


Figura13: Retta di calibrazione ottenuta con i valori della linearità 1

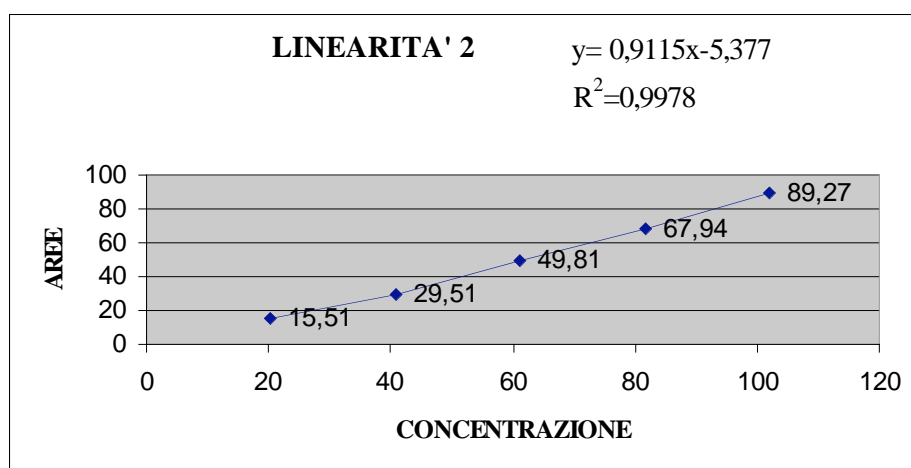


Figura 14: retta di calibrazione ottenuta con i dati della linearità 2

La relazione concentrazione/ area del picco è risultato in entrambe le rette maggiore o uguale a 0,99.

8.1.2 Precisione

La precisione del metodo è stata determinata con la metodica descritta precedentemente. I valori ottenuti, confrontati a quello di uno standard di clorexidina a concentrazione nota, sono riportati nelle seguenti tabelle ed i risultati espressi come Recupero %

Tabella X: Precisione 1

Campioni	Conc. Teorica	Aree	Conc Reale	Recupero %
standard	4,08	6,22	4,11	100,73
1	4,08	6,21	4,07	99,75
2	4,08	6,39	4,1	100,49
3	4,08	5,98	4,01	98,28
4	4,08	6,21	4,07	99,75
5	4,08	6,09	4,02	98,53
media	4,08	6,18	4,054	99,59
DS	0	0,15	0,038	1,00
CV%	0	2,48	0,93	1,00

Tabella XI: Precisione 2

Campioni	Conc. Teorica	Aree	Conc Reale	Recupero %
standard	4,08	6,24	4,12	100,98
1	4,08	6,32	4,19	102,69
2	4,08	6,01	4,06	99,51
3	4,08	5,39	3,99	97,79
4	4,08	5,95	4	98,04
5	4,08	6,29	4,15	101,71
media	4,08	6,056	4,108	100,12
DS	0	0,40	0,105	2,00
CV%	0	6,67	2,56	1,99

I dati ottenuti nella valutazione della precisione del metodo analitico sono meglio evidenziati nella tabella XII in cui si confrontano i recuperi %.

Tabella XII: Confronto dei valori che dimostrano la precisione del metodo

Campioni	Recupero % 1	Recupero % 2
1	99,75	101,69
2	100,49	99,34
3	98,28	97,79
4	99,75	98,03
5	98,52	101,71
Media	99,358	98,98
DS	0,929	1,91
CV%	0,935	1,92

Per meglio valutare la bontà dei risultati è stato applicato un calcolo statistico, il TEST F, che, nel caso della determinazione di un principio attivo, deve risultare minore o uguale a 5,05

$$F = S^2 / s^2 = 4,19$$

Dove S^2 = varianza della serie dei dati con deviazione standard maggiore

s^2 = varianza della serie dei dati con deviazione standard minore

Il metodo si è rivelato preciso in quanto il valore del test F è conforme ai limiti previsti e il valore CV% delle singole serie di dati è minore di 3.

8.1.3 Accuratezza

Per determinare l' accuratezza del metodo è stata utilizzata la metodica descritta precedentemente. I valori ottenuti, confrontati a quello di uno standard di clorexidina diacetato a concentrazione nota, sono riportati nelle seguenti tabelle. Sono espressi come Recupero%.

Tabella XIII: Accuratezza 1

Campioni	Conc teorica	Aree	Conc. Reale	Recupero%
standard	81,6	85,98	81,69	100,11
80%	61,2	59,28	60,91	99,53
100%	71,4	71,42	71,6	100,28
120%	81,4	85,72	81,55	100,18

Tabella XIV: Accuratezza 2

Campioni	Conc teorica	Aree	Conc. Reale	Recupero%
standard	81,6	84,72	81,01	99,28
80%	61,2	59,69	61,05	99,75
100%	71,4	68,42	70,5	98,74
120%	81,4	79,83	80,64	99,07

Di seguito sono evidenziati gli andamenti delle rette di calibrazione delle tabelle XIII (vedi fig.15) e XIV (vedi fig. 16).

Figura 15: 1° retta di calibrazione per l' accuratezza del metodo

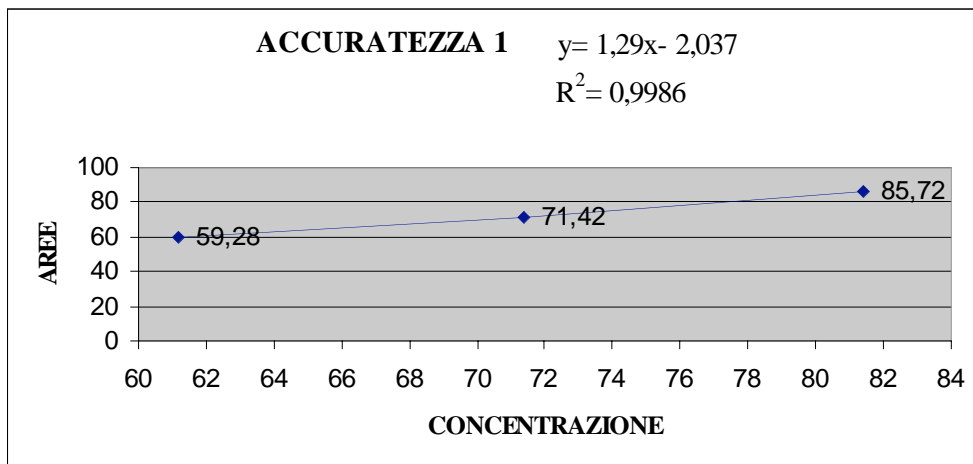
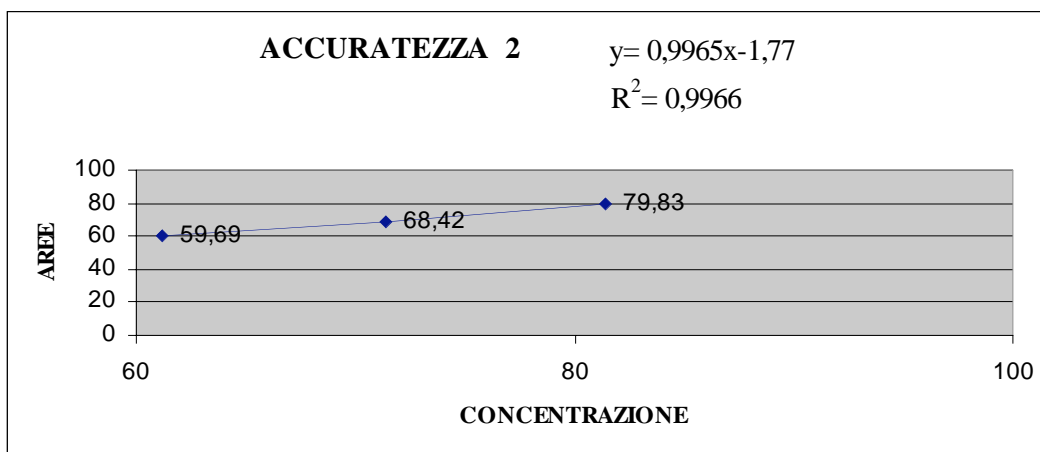


Figura 16: 2° retta di calibrazione per l' accuratezza del metodo



Il metodo si è dimostrato accurato in quanto il coefficiente di correlazione R^2 per le due curve di calibrazione, è risultato maggiore a 0,99 e ogni singolo valore di recupero % è compreso tra 97-103%.

8.1.4 Spessore e peso delle mucose

Nella tabella XV sono riportati i valori medi di spessore delle mucose, di sezione rettangolare e aventi tutte un' area di 24 cm², nei 5 punti misurati e le relative deviazioni standard, mentre in tabella XVI sono riportate le medie dei pesi delle mucose misurati sia al primo taglio, in cui si separa lo strato connettivo dal muscolare, sia al secondo taglio in cui la mucosa viene raffinata e si eliminano gli eventuali residui muscolari.

Si è scelto di misurare lo spessore ai 4 lati del rettangolo, A,B,D,E e nella parte centrale, C, della mucosa per avere così chiaro come può variare lo spessore mucosale dal centro verso i vertici della mucosa stessa.

Tabella XV: Media dei valori di spessore misurati al I taglio e dopo lavorazione.

	MEDIA PRIMO TAGLIO (mm)	MEDIA DEV. ST 1° TAGLIO(mm)	MEDIA SPESSORE POST LAVORAZIONE(mm)	DEV. ST MEDIA POST LAVORAZIONE(mm)
PUNTO A	2,72	0,24	2,36	0,19
PUNTO B	2,75	0,18	2,10	0,15
PUNTO C	2,96	0,26	2,11	0,21
PUNTO D	2,76	0,16	2,05	0,17
PUNTO E	2,66	0,2	2,12	0,17

Dai risultati ottenuti, è possibile osservare che lo spessore centrale della mucosa è in media 0,24 mm superiore rispetto ai lati della mucosa stessa dopo il primo taglio; mentre la differenza di spessore tra la parte centrale e i vertici a seguito della lavorazione è di 0,06 mm. Questo sta ad indicare che la seconda lavorazione rende omogeneo lo spessore della mucosa in ogni suo punto. Infatti anche i valori di deviazione standard della misura dello spessore, dopo la seconda lavorazione, sono inferiori rispetto alla prima, ad indicare una minore variazione dello spessore misurato per le 30 mucose rispetto al valore medio.

Tabella XVI: Media dei valori di peso misurati al I taglio e dopo lavorazione.

MEDIA PESO 1 TAGLIO (g)	MEDIA DEV.ST 1° TAGLIO (g)	MEDIA PESO POST LAV (g)	MEDIA DEV.ST POST-LAV (g)
5,17	0,22	3,23	0,12

In tabella XVI sono riportati i valori relativi alla media dei pesi dopo il primo taglio in cui lo strato connettivo della mucosa viene separato da quello muscolare e dopo successiva lavorazione in cui

dalla mucosa sono eliminati gli eventuali residui muscolari presenti. In questo caso la differenza di peso tra la media del peso delle mucose dopo il primo taglio e a seguito della lavorazione è di 1,94 g, mentre le deviazioni standard e differiscono fra loro di un valore numerico pari a 0,1.

Questo risultato indica che, sia in seguito al primo taglio che alla seconda lavorazione, la deviazione standard dai valori medi dei pesi delle 30 mucose lavorate è bassa.

8.1.5 Temperatura e peso del volume della soluzione proveniente dalla cella di Franz.

In tabella XVII sono riportati i valori medi della temperatura della soluzione presente nel compartimento ricevente della cella di Franz, la relativa deviazione standard e il peso del volume di soluzione prelevati tramite siringa dalla cella di Franz. Dai risultati ottenuti risulta che la temperatura media è di 37,1 °C. Il basso valore di deviazione standard, 0,16, indica che non c'è stata grande differenza di valori trovati nelle 30 misure eseguite. Infatti il risultato ottenuto per 14 misure è di 37 °C; per 3 misure è di 37,2 °C per due misure è di 37,3 °C . Gli altri valori misurati sono singoli risultati che oscillano intorno a questi valori ripetuti fatta eccezione per una misura che è di 38 °C e una che è di 36,8 °C. Per quanto riguarda la media del peso del volume di soluzione prelevato, questo è il risultato che si avvicina in media, più degli altri al valore ideale pari a 1 g e che possiede, anche rispetto alle misure precedentemente effettuate il più basso valore di deviazione standard. Questo è semplicemente dovuto all'utilizzo di una siringa ben tarata e quindi capace di prelevare in maniera precisa 1 ml di soluzione dal compartimento inferiore della cella di Franz. Entrambi questi risultati indicano come le celle di Franz possiedano un buon sistema di termostatazione e che la siringa utilizzata per effettuare i prelievi possiede una buona tenuta.

Tabella XII: Risultati relativi alla medie delle misure della T e del peso del volume di soluzione prelevato dalla cella di Franz

T	DEV. ST	PESO DI 1 ML DI SOLUZIONE (g)	DEV. ST.
37,1	0,16	1,08	0,005

8.1.6 Permeazione mucosale

In tabella XVIII sono riportati i valori di J e Kp relativi agli studi di permeazione effettuati sia sulla mucosa fresca che dopo congelamento, prendendo come riferimento da analizzare tramite metodica HPLC, una soluzione satura di clorexidina diacetato.

Tabella XVIII: Risultati di J e Kp relativi allo studio di permeazione attraverso sia la mucosa fresca che congelata.

	J mg/cm²*h	Kp cm/h
Fresca	0,92	7,69*10⁻⁵
Dopo 1 giorno di congelamento	0,94	7,92*10⁻⁵
Dopo 1 settimana di congelamento	0,93	7,66*10⁻⁵
Dopo 2 settimane di congelamento	2,36	1,97*10⁻⁴
Dopo 3 settimane di congelamento	2,27	1,189*10⁻⁴
Dopo 4 settimane di congelamento	2,97	2,48*10⁻⁴

Dai risultati si vede che la mucosa fresca, dopo 1 giorno e 1 settimana di congelamento presenta valori paragonabili sia di J che Kp. Infatti, dopo un giorno di congelamento e 1 settimana a -21 °C, i valori di flusso tra la mucosa fresca e la congelata da 1 giorno e da una settimana differiscono rispettivamente di 0,02 e 0,01 mg/cm²*h, mentre i valori di Kp mantengono lo stesso ordine di grandezza di 10⁻⁵. Andando invece ad osservare i risultati di J e Kp misurati attraverso lo studio di permeazione mucosale della soluzione satura di clorexidina diacetato, dopo 2, 3 e 4 settimane di congelamento si osserva che il flusso del farmaco attraverso la mucosa dopo 1 settimana di congelamento, aumenta considerevolmente passando da valori inferiori ad 1 mg/cm²*h ha valori superiori a 2 mg/cm²*h, in media di 1.44 mg/cm²*h, mentre la Kp che rappresenta il coefficiente di permeazione mucosale del farmaco attraverso la mucosa porcina orale aumenta di 1 ordine di grandezza passando così da 10⁻⁵ a 10⁻⁴. Questo risultato è ben visibile anche in figura 9 dove si riportano i profili di permeazione della soluzione satura di clorexidina diacetato attraverso le mucose dopo i vari periodi di congelamento. Dal grafico si osserva quindi che mucosa fresca e mucose conservate a -21 °C per 1 giorno e 1 settimana presentano profili di permeazione paragonabili, con una permeazione alla 24 h compresa tra i 10 e i 20 µg/ml. Mentre analizzando i

profili di permeazione della clorexidina diacetato attraverso le mucose conservate a -21°C per 2, 3 e 4 settimane si osserva che la quantità di clorexidina che permea la mucosa è pari a più del doppio rispetto a quella che si misura per le mucose fresche di 1 giorno e 1 settimana di congelamento. Da questi risultati, quindi, si deduce che è possibile conservare la mucosa a -21° per 1 settimana, che rappresenta il tempo massimo di conservazione della mucosa in condizioni tali da garantire un profilo di permeazione paragonabile a quella della mucosa fresca.

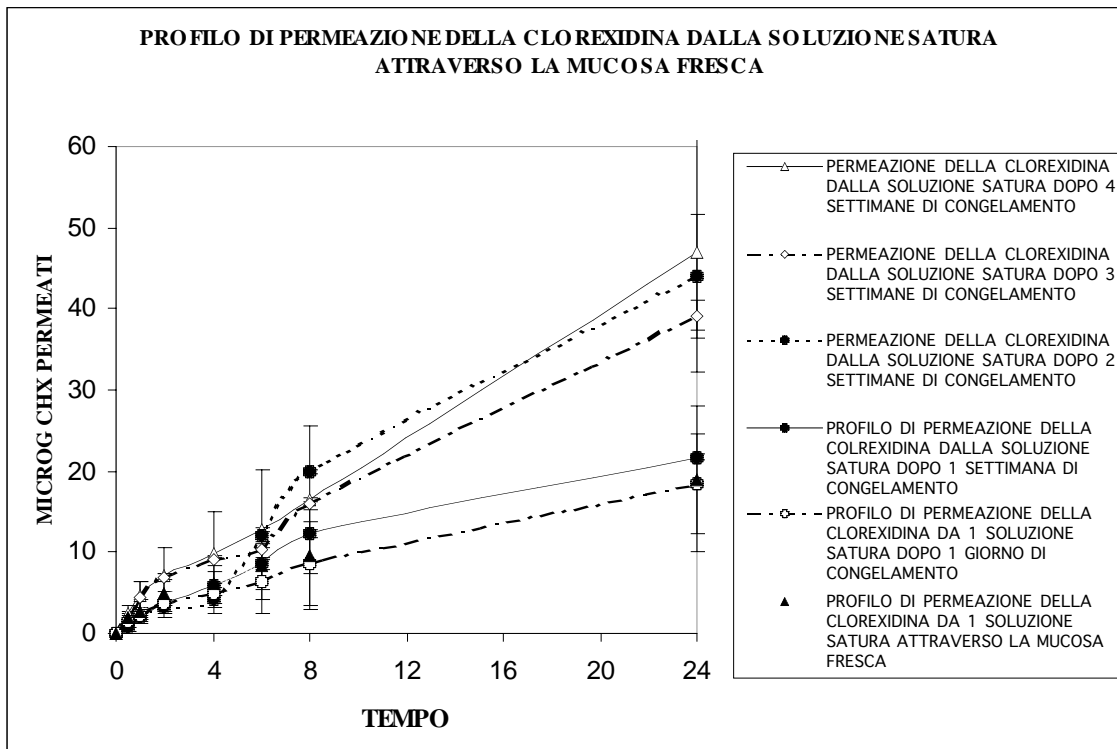


Figura 17 : Profili di permeazione di clorexidina diacetato attraverso la mucosa fresca e quella conservata a -21°C per diversi periodi di tempo.

8.2 Solubilità della clorexidina nelle formulazioni sviluppate.

La solubilità della clorexidina è stata valutata esclusivamente nei gel e nelle ciclodestrine anfifiliche biodesive. Il test si basa sulla centrifugazione del campione a 4000 rpm per 30 minuti e successivo prelievo del surnatante che viene analizzato tramite metodica HPLC, a seguito di un'opportuna diluizione con fase mobile.

In tabella XIX sono riportati i valori di solubilità del principio attivo nelle formulazioni sviluppate e nelle figure 18 e 19 gli istogrammi relativi ai valori di solubilità della clorexidina rispettivamente dei gel e nei polimeri bioadesivi.

Tabella XIX: Solubilità della clorexidina nelle formulazioni sviluppate a 25 °C

	GEL1	GEL2	GEL3	GEL4	GEL5	GEL6	GEL7	GEL8	GEL9	γ -CD L10	α -CD L15	β -CD L20	α -CD M10	β -CD P10	β -CD P15
CHX $\mu\text{g/ml}$	472.3	462.8	547.7	571.9	605.8	550.3	468.0	523.1	429.2	845.0	821.1	802.0	798.0	805.2	777.3

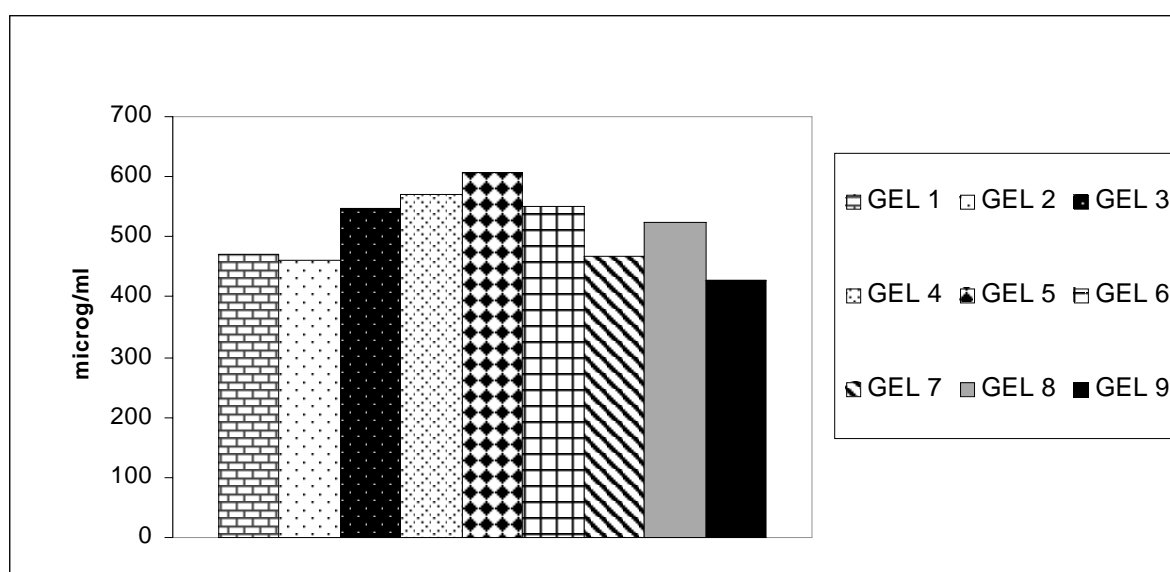


Figura 18: Istogrammi relativi alla solubilità della CHX nei gel sviluppati

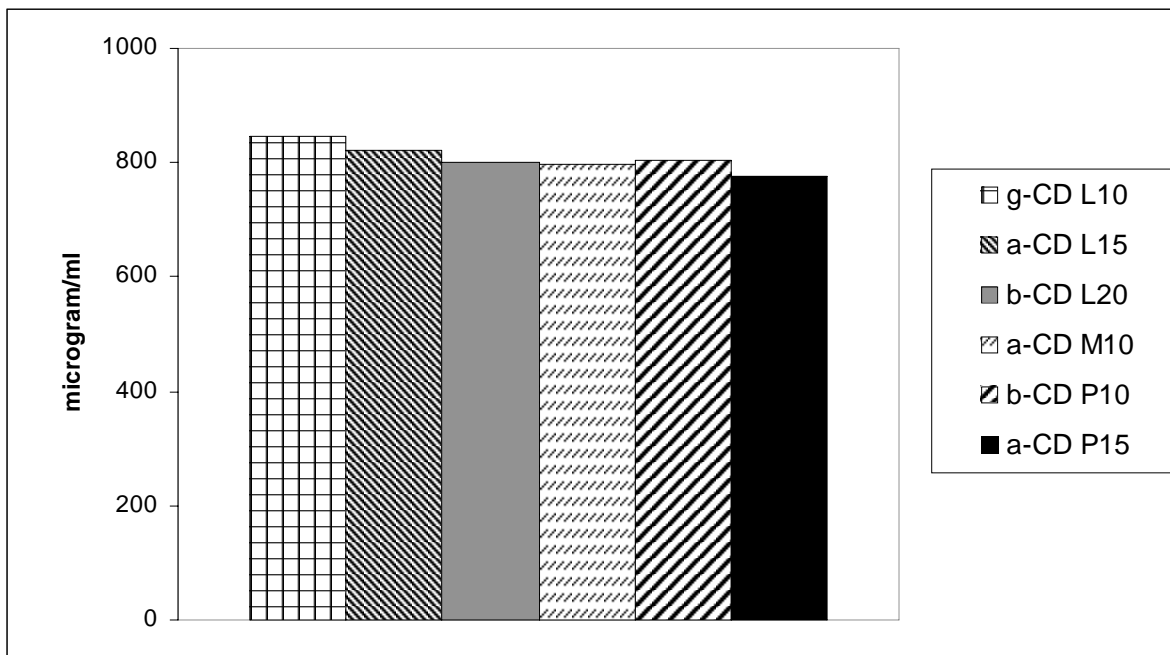


Figura 19: Istogrammi relativi alla solubilità della CHX nelle ciclodestrine anfifiliche sviluppate

Dai risultati ottenuti è possibile osservare che tutte le formulazioni sviluppate presentano una buona efficacia solubilizzante nei confronti del principio attivo.

Il GEL 1 e il GEL 2, costituiti rispettivamente dal 3% di CMC e dal 3% di HPMC; presentano dei valori di solubilità paragonabili fra loro, mentre il GEL 3, costituito dal 3% di HPC, è quello che presenta la più efficace azione solubilizzante nei confronti della clorexidina.

Andando ad osservare i gel ottenuti dalle combinazioni di due diversi polimeri bioadesivi utilizzati in miscela uno al 2% e l'altro al 3%, si osserva che tutte le combinazioni fra i polimeri provocano un aumento della solubilità del principio attivo nella formulazione sviluppata.

In particolare è possibile osservare che la CMC combinata in differenti percentuali con gli altri due derivati della cellulosa, HPC e HPMC, fa aumentare la solubilità del principio attivo. Tale risultato può essere riconducibile ad una possibile interazione tra le cariche negative della CMC e la clorexidina, presente in forma cationica a pH 7,4.

Altrettanto buoni sono i valori di solubilità della clorexidina osservati nei polimeri bioadesivi sviluppati per sostituzione di ciclodestrine con acidi grassi a diversa catena.

In questo caso è possibile osservare che i due polimeri che contengono l'acido laurico come sostituito idrofobico, presentano i due più elevati valori di solubilità.

Tale risultato è riconducibile sia alla solubilità intrinseca delle ciclodestrine (γ -CD > α -CD > β -CD) ma anche alla natura del sostituito lipofilo, che fra i tre è quello che possiede la catena lipofila più breve.

8.3 Test di dissoluzione secondo F.U. della clorexidina dalle formulazioni sviluppate.

Questo test è stato eseguito secondo F.U.XI su tutte e tre le formulazioni sviluppate: compresse, geli e polimeri bioadesivi.

In tabella XX sono riportati i valori dell' esponente diffusionale n e della costante cinetica di rilascio K per le formulazioni studiate.

Nelle seguenti figure sono riportati i profili di dissoluzione della clorexidina dalle compresse, dai geli e dai polimeri bioadesivi sviluppati.

Tabella XX: Valori di n e $K(\text{cm}^3\text{h}^{-1})$ calcolati per il Test di dissoluzione della CHX secondo FU nelle varie formulazioni studiate

	M 1	M2	M3	M4	M5	M6	γ -CD L10	α -CD L15	β -CD L20	α -CD M10	β -CD P10	β -CD P15	GEL1	GEL2	GEL3	GEL4	GEL5	GEL6	GEL7	GEL8	GEL9	
Test disso- luz- seco- ndo FU XI	n	0.9	0.8	0.5	0.8	0.7	0.9	0.7	0.5	0.6	0.8	0.8	0.9	0.6	0.5	0.5	0.5	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5
	k	$2.8^* 10^{-4}$	$2.5^* 10^{-4}$	$2.9^* 10^{-4}$	$3.5^* 10^{-5}$	$7.2^* 10^{-5}$	$2.8^* 10^{-4}$	$4.2^* 10^{-5}$	$2.5^* 10^{-6}$	$3.1^* 10^{-5}$	$6.9^* 10^{-7}$	$8.6^* 10^{-7}$	$6.6^* 10^{-7}$	$9.1^* 10^{-5}$	$7.5^* 10^{-5}$	$1.11^* 10^{-4}$	$2.4^* 10^{-5}$	$2.26^* 10^{-4}$	$1.47^* 10^{-5}$	$4.93^* 10^{-4}$	$4.82^* 10^{-5}$	$7.95^* 10^{-4}$

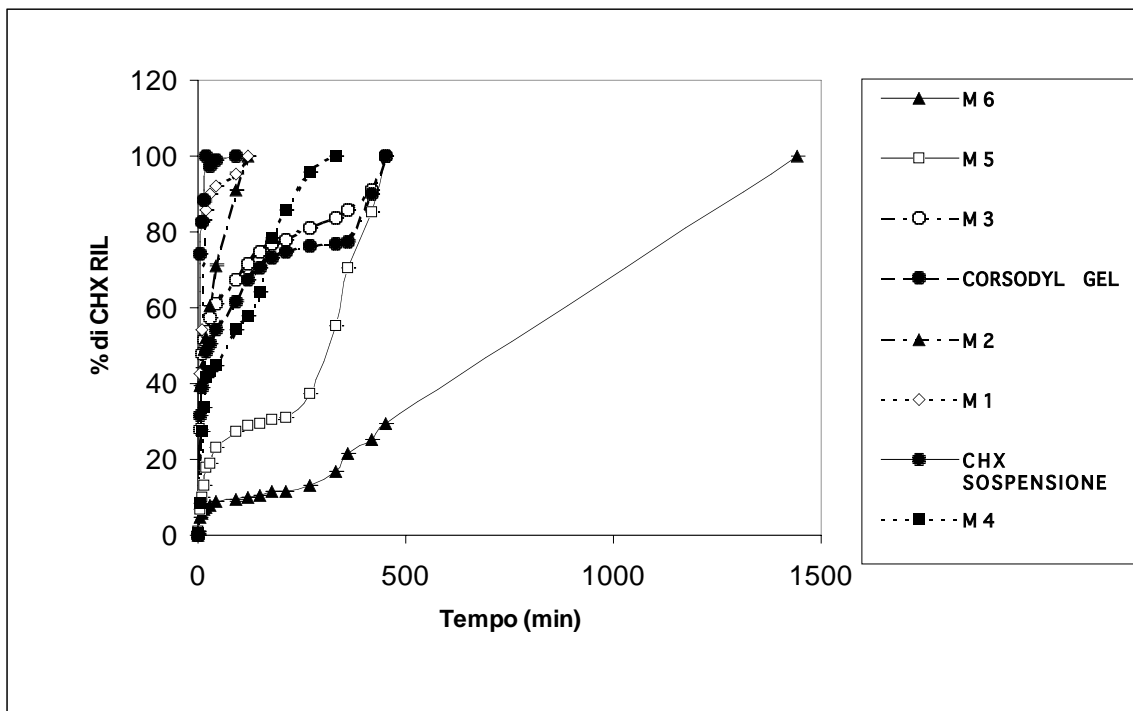


Figura 20: Profilo di dissoluzione della CHX dalle compresse mucoadesive sviluppate

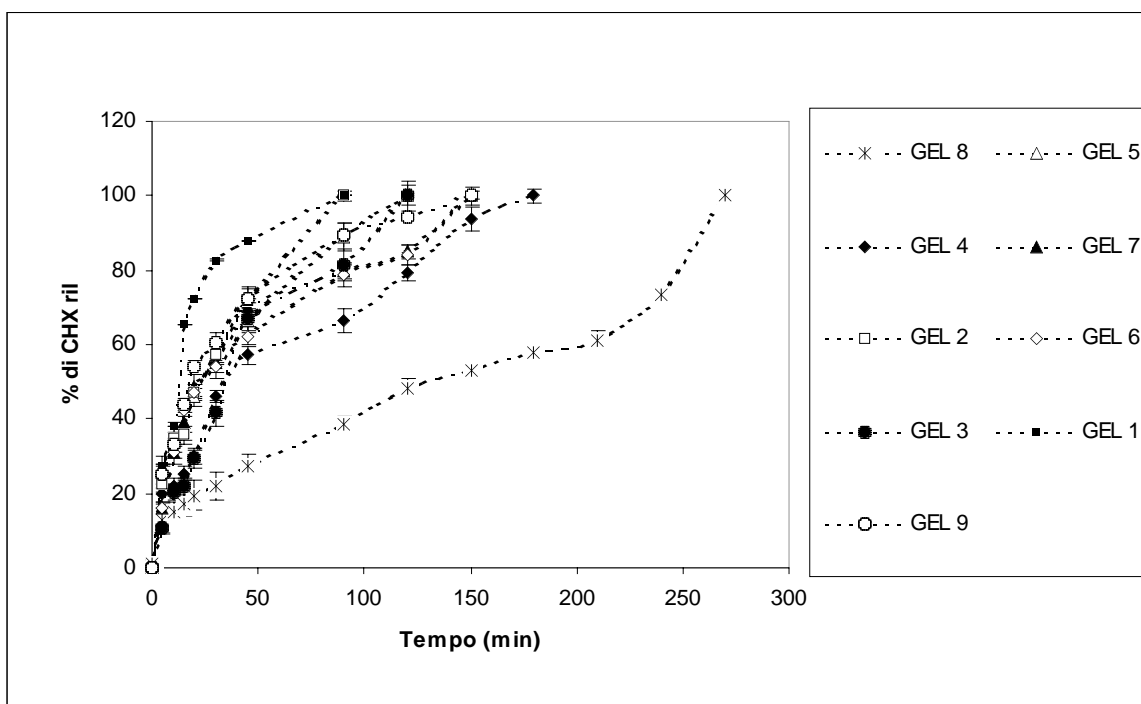


Figura 21: Profilo di dissoluzione della clorexidina dai gel sviluppati

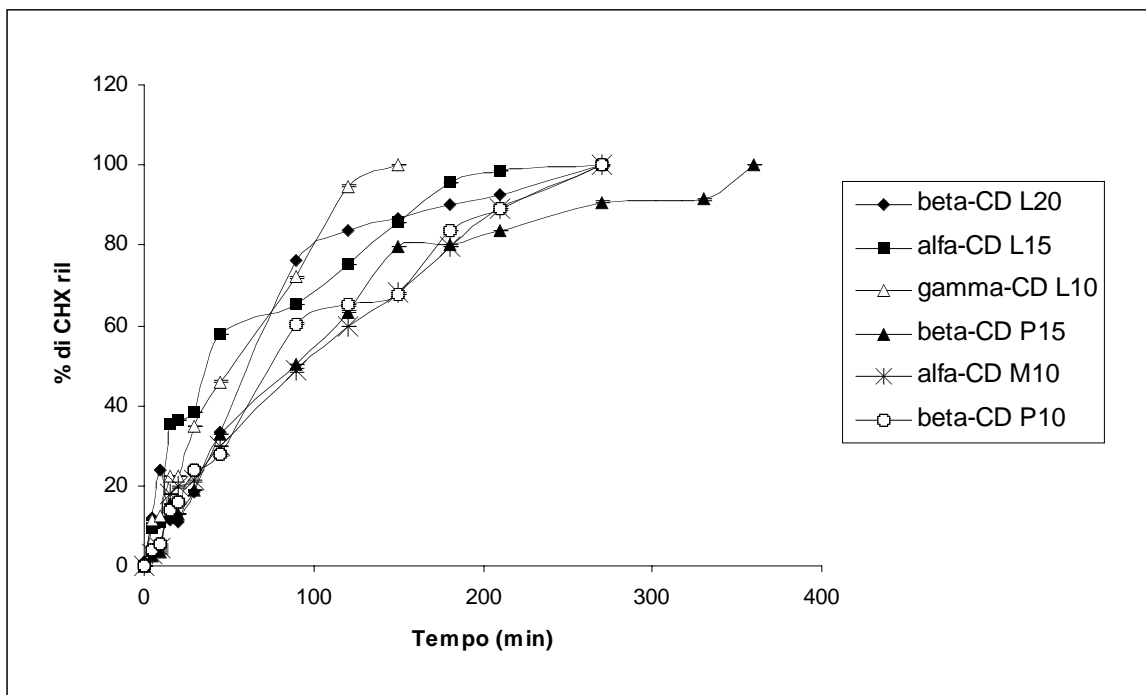


Figura 22: Profilo di dissoluzione della clorexidina dai polimeri bioadesivi sviluppati

Dai profili di dissoluzione della clorexidina dalle compresse mucoadesive sviluppate emerge che queste sono delle formulazioni in grado di controllare in maniera efficace la dissoluzione e di conseguenza il rilascio del farmaco nella cavità orale.

E' noto che sia il Carbopol 974P che la HPMC presentano buone capacità mucoadesive ed inoltre il loro meccanismo di rigonfiamento polimerico, a seguito di un contatto con l'ambiente acquoso, fa sì che esse siano in grado di effettuare un altrettanto efficace controllo del rilascio del principio attivo. I valori degli esponenti diffusionali, ottenuti dal test di dissoluzione delle compresse mucoadesive sviluppate, suggeriscono che le formulazioni contenenti un unico eccipiente mucoadesivo, M3 ed M6, contenenti rispettivamente HPMC e Carbopol 974, mostrano una cinetica di rilascio di tipo fickiano, mentre le altre compresse presentano dei valori di n che sono propri di un meccanismo di rilascio di tipo anomalo, che è frequentemente associato ai sistemi idrofilici polimerici in cui si ha un rilascio di farmaco contemporaneo al rigonfiamento delle catene polimeriche. (6)

I gel mucoadesivi sviluppati presentano tutti dei valori di esponente cinetico diffusionale n pari a circa a 0,5, valore che approssima una cinetica di tipo Fickiano. Dai profili di dissoluzione è inoltre possibile osservare come i geli che possiedono un solo agente gelificante in quantità pari al 3% sono quelli che hanno il più breve tempo di dissoluzione, che aumenta per i geli caratterizzati dalla presenza di due polimeri.

Inoltre i più lenti profili di dissoluzione sono propri del Gel 6, CMC 2% e HPMC 3%, Gel 4, costituito da CMC 3% e HPMC 2%, e del Gel 8, costituito da CMC 2% e HPC 3%.

Tale risultato può essere spiegato in relazione alla capacità posseduta dalla carbossimetilcellulosa di legare in maniera stabile il farmaco, tramite interazioni elettrostatiche e andarne così a controllare il rilascio in maniera efficace. La carbossimetilcellulosa è infatti presente in tutti e tre i geli che hanno la più lenta velocità di dissoluzione, anche se in differenti percentuali.

Il GEL 8, in particolare, mostra di possedere un lento profilo di dissoluzione che, oltre alla presenza nella formulazione della CMC, può essere spiegato in relazione alla presenza del 3% di HPC.

Infatti fra i geli sviluppati contenenti un solo polimero al 3%, quello che ha il più lento rilascio è appunto quello costituito dal 3% di HPC, che è anche il derivato polimerico che presenta la più efficace azione solubilizzante nei confronti della clorexidina.

Quest'ultimo non deve essere considerato un risultato in contraddizione con quello ottenuto dal test di dissoluzione: è necessario tener presente che, se è vero che una buona solubilità di un farmaco all'interno del veicolo ne garantisce un buon rilascio, è altrettanto vero che un'eccessiva solubilità del principio attivo nella formulazione può provocare una diminuzione della velocità di rilascio del farmaco dallo stesso veicolo, perché ne abbassa l'attività termodinamica.

Per quanto riguarda i prodotti bioadesivi ottenuti per parziale sostituzione di ciclodestrine con catene di acidi grassi a differente lunghezza, i valori dell'esponente diffusionale mostrano che solo il derivato α -CD L15 presenta una cinetica di tipo fickiano, mentre tutti gli altri derivati hanno valori che descrivono una cinetica di tipo anomalo in cui, come nel caso delle compresse mucoadesive, il rilascio del principio attivo appare essere contemporaneo al rigonfiamento delle catene polimeriche.

Dai profili di dissoluzione ottenuti è possibile osservare che tutti e sei i polimeri bioadesivi sviluppati presentano dei profili di dissoluzione paragonabili: in particolare la più lenta dissoluzione è data dal polimero β -CD P15 mentre la più rapida si osserva per γ -CD L10. Tali risultati possono essere correlati sia alla presenza di due catene di acidi grassi a differente lunghezza e in differenti rapporti molari con la ciclodestrina: l'acido palmitico infatti ha una catena a 16 atomi di C ed il rapporto molare con la ciclodestrina è di 1:15. L'acido laurico ha la più corta catena rispetto al palmitico, C 12, e il rapporto molare è di 1:10. Inoltre è noto che la β -ciclodestrina è quella che presenta la più alta capacità complessante fra quelle studiate e quindi probabilmente all'interno del sistema complessa in maniera più efficace la clorexidina e di conseguenza ne controlla il rilascio.

(33,34)

8.4 Test di rilascio in vitro delle formulazioni studiate

Questo test è stato eseguito utilizzando un apparecchio costruito in maniera tale da rendere riproducibile ciò che avviene quando la formulazione farmaceutica bioadesiva viene introdotta nella cavità buccale a livello dell'arcata gengivale superiore.

Con quest'apparecchiatura si è cercato infatti di riprodurre le stesse condizioni che si hanno all'interno della bocca: la mucosa porcina opportunamente trattata è stata infatti adagiata su una membrana di polietilene e orientata di circa 45°, corrispondente circa alla pendenza della arcata gengivale superiore.

Sulla mucosa inclinata è stata posta la formulazione bioadesiva e successivamente si è fatto gocciolare del tampone fosfato a pH 7,4 proveniente dal vessel tramite una pompa peristaltica in maniera tale da mantenere la velocità di flusso costante a 1 ml/min e il circuito operante in modo continuo.

In tabella XXI sono riportati i valori dell'esponente diffusionale n e della costante cinetica di rilascio K per le formulazioni studiate.

Nelle seguenti figure sono riportati i profili di rilascio della clorexidina dalle compresse, dai geli e dai polimeri bioadesivi sviluppati.

Tab XXI: Valori di n e $K(\text{cm}^*\text{h}^{-1})$ calcolati per il Test di rilascio della CHX secondo FU nelle varie formulazioni studiate

	M 1	M2	M3	M4	M5	M6	γ -CD L10	α -CD L15	β -CD L20	α -CD M10	β -CD P10	β -CD P15	GEL1	GEL2	GEL3	GEL4	GEL5	GEL6	GEL7	GEL8	GEL9	
Tets di rilascio in vitro	n	1	0.6	0.5	0.9	0.7	0.7	0.8	0.8	0.7	0.9	1.0	0.9	1.0	0.5	0.5	0.8	1.0	0.7	0.5	0.8	1.0
	k	$1.9^* 10^{-4}$	$2.6^* 10^{-4}$	$1.9^* 10^{-4}$	$3.9^* 10^{-5}$	$8.4^* 10^{-5}$	$6.6^* 10^{-5}$	$7.5^* 10^{-6}$	$1.5^* 10^{-6}$	$6.5^* 10^{-6}$	$5.3^* 10^{-6}$	$3.1^* 10^{-6}$	$4.5^* 10^{-6}$	$8.4^* 10^{-5}$	$6.7^* 10^{-4}$	$1.11^* 10^{-4}$	$6.0^* 10^{-5}$	$2.4^* 10^{-5}$	$2.9^* 10^{-5}$	$1.03^* 10^{-4}$	$2.07^* 10^{-5}$	$2.06^* 10^{-5}$

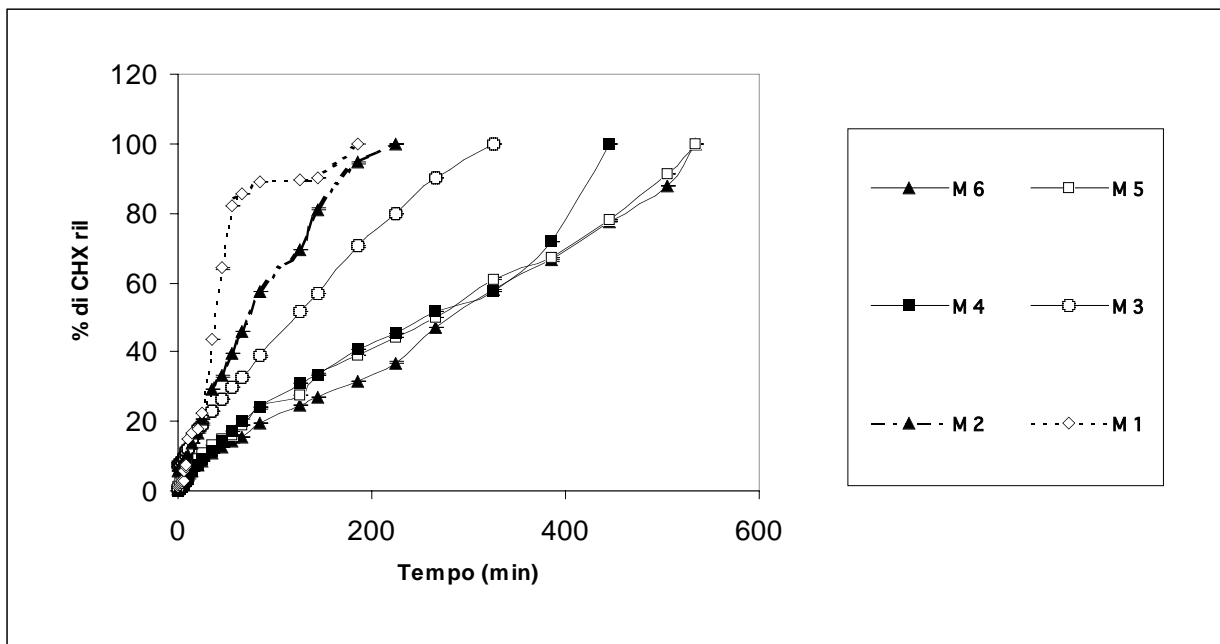


Figura 23: Profilo di rilascio della CHX dalle compresse mucoadesive sviluppate

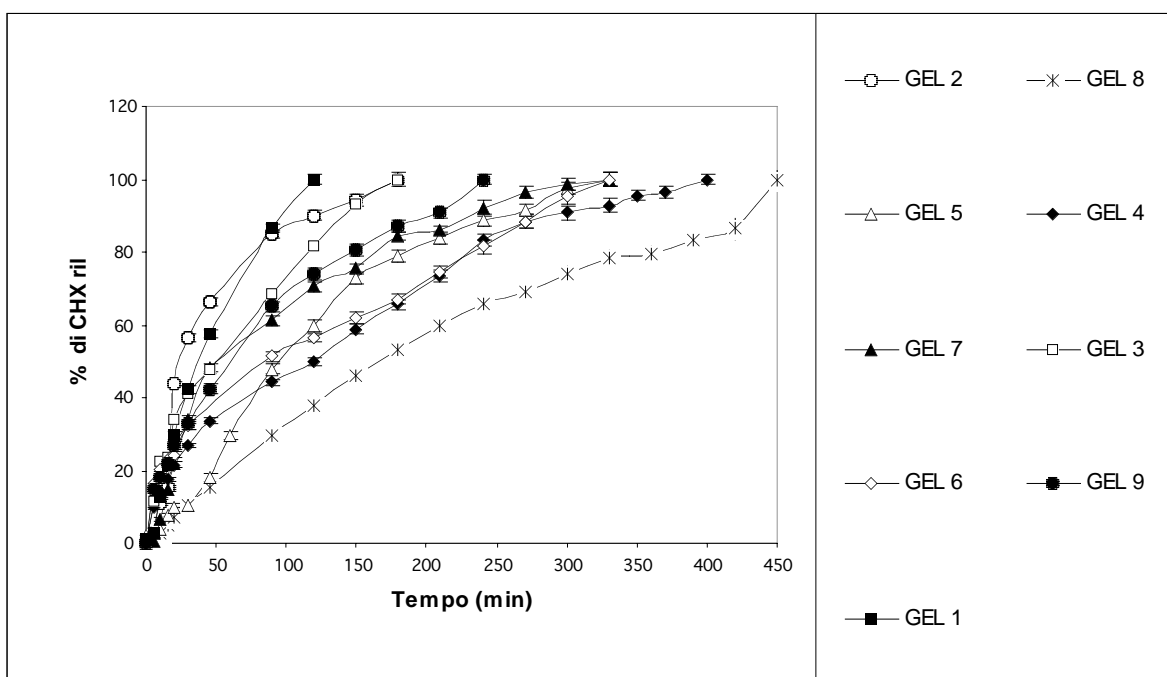


Figura 24: Profilo di rilascio della CHX dai gel mucoadesivi sviluppati

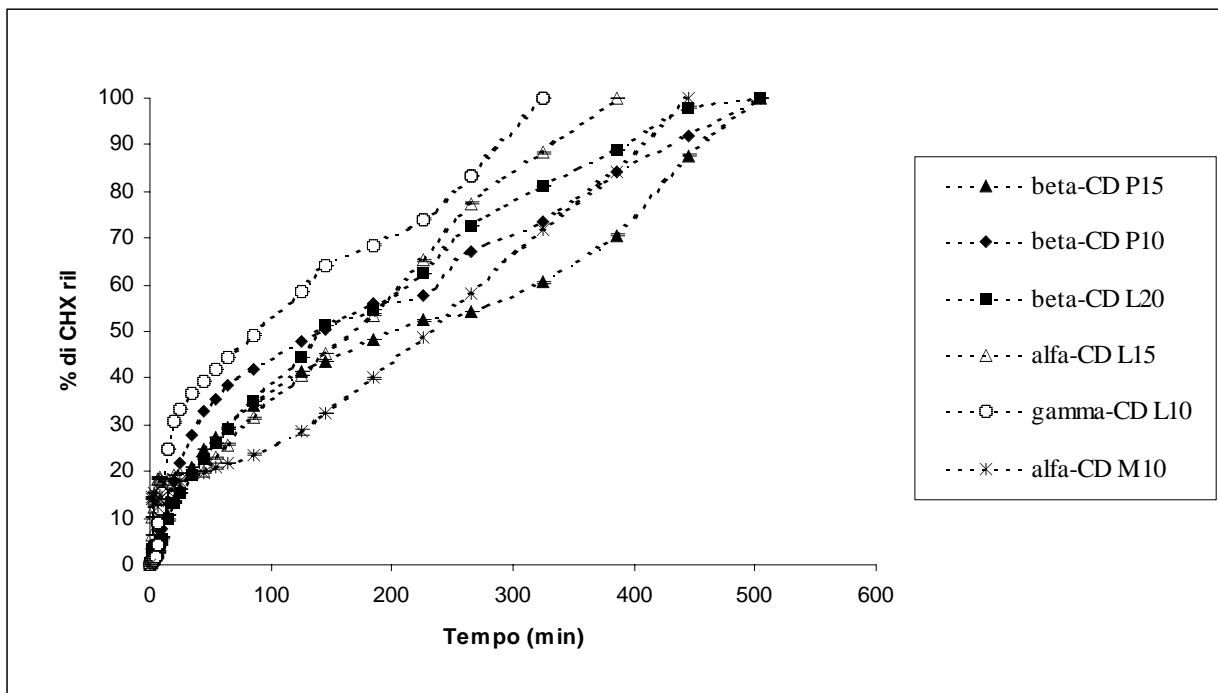


Figura 25: Profilo di rilascio della CHX dai sistemi di ciclodestrine anfifiliche

Dal test di rilascio in vitro eseguito sulle compresse mucoadesive i profili appaiono essere regolari e in accordo con quelli di dissoluzione, ottenuti dal test di dissoluzione secondo Farmacopea XI. Da questo test di rilascio, inoltre, è possibile osservare come i profili di rilascio appaiano essere quasi funzioni lineari del tempo.

I lotti di compresse M1 ed M2 non presentano un efficace controllo dal rilascio: dalla figura 23 infatti è possibile notare che il 100% del principio attivo viene rilasciato in circa 150 minuti.

Quello che è interessante notare per le compresse M1, M2 ed M3 è che l'aumentare della quantità di HPMC all'interno della formulazione provoca una diminuzione della percentuale di rilascio nel tempo. Tale risultato è riconducibile alle proprietà viscosizzanti proprie della HPMC: all'aumentare della concentrazione del polimero, infatti cresce anche la viscosità della matrice gelificata che si viene a formare, quando la formulazione viene a contatto con il flusso che mima la saliva.

Le formulazioni che contengono il Carbopol come eccipiente mucoadesivo, indipendentemente dalla sua concentrazione di tale polimero presentano il più elevato controllo del rilascio: questo risultato è riconducibile alla struttura chimica del Carbopol, caratterizzata dalla presenza di gruppi carbossilici capaci di ionizzarsi a pH 7,4. Se quindi le proprietà rigonfianti del Carbopol possono da un lato favorire il rilascio della clorexidina, dall'altra parte la presenza di cariche negative alla superficie può favorire l'instaurarsi di interazioni di tipo ionico con la clorexidina carica positivamente (6).

I valori dell'esponente cinetico diffusionale n oscillano in un range di valori compreso fra 0,5 e 1. Ciò significa che l'aumento della HMPC (in M1, M2 ed M3) e del Carbopol (in M4, M5 ed M6) possono modificare il meccanismo di rilascio. Il valore di n tende a diminuire all'aumentare della concentrazione del polimero all'interno della formulazione, evidenziando la presenza di un predominante meccanismo di diffusione nel rilascio della clorexidina per le compresse M3 ed M6, dove si ha la più elevata concentrazione polimerica.

Probabilmente i polimeri mucoadesivi utilizzati sono in grado, anche a basse concentrazioni, di garantire alle compresse una buona stabilità di tipo meccanico. Inoltre per i lotti di compresse, che presentano un valore di n che approssima quello di una cinetica di ordine zero, si può pensare ad un meccanismo di rilascio per erosione matriciale della compressa stessa.

I risultati di rilascio in vitro ottenuti per i gel mucoadesivi sviluppati mostrano degli andamenti, Fig. 23, perfettamente concordi con quelli ottenuti dal precedente test di dissoluzione.

Infatti anche in questo caso i più lenti profili di rilascio della clorexidina sono posseduti dai Gel 6, CMC 2% e HPMC 3%, Gel 4, costituito da CMC 3% e HPMC 2%, e del Gel 8, costituito da CMC 2% e HPC 3%. Anche in questo caso l'elevato controllo del rilascio può essere attribuito alla capacità posseduta dalla Carbossimetilcellulosa sodica di stabilire delle interazioni di tipo elettrostatico con la clorexidina. Questi gel presentano inoltre dei valori di esponente diffusionale n propri di una cinetica di tipo anomalo non-fickiano, che sta ad indicare come il meccanismo di rilascio del farmaco dal sistema polimerico sia associato al contemporaneo rigonfiamento delle catene in ambiente acquoso.

Per quanto riguarda i gel costituiti da un unico eccipiente mucoadesivo è possibile osservare che il Gel 1, CMC 3%, è l'unico ad avere un andamento di rilascio che approssima una cinetica di ordine zero, mentre per i Gel 2 e 3 i valori di n sono propri di una cinetica di tipo Fickiano. Questo può essere ricondotto alle più elevate proprietà viscosizzanti possedute dalla HPMC e dalla HPC.

Dal test di rilascio in vitro eseguito sui polimeri bioadesivi sviluppati si osserva come tutti i polimeri approssimano una cinetica di tipo lineare. Tutti i polimeri presentano un buon controllo del rilascio del principio attivo e anche per questi sistemi a rilascio controllato, come per i geli, i risultati di rilascio in vitro ottenuti sono concordi con quelli provenienti dal test di dissoluzione secondo FU XI.

I più lenti e gradualmente profili di rilascio sono posseduti dai polimeri β -CD P15, β -CD P10 e β -CD L20

Questi risultati sono correlabili in primo luogo alla superiore capacità complessante della β -ciclodestrina rispetto alle due altre ciclodestrine utilizzate. Inoltre questo risultato può essere anche ricondotto da una parte alla presenza dell'acido palmitico come sostituito in due delle

formulazioni, che è l'acido grasso fra quelli utilizzati a più lunga catena e per quanto riguarda invece il polimero β -CD L20, il risultato si può ricondurre al rapporto di sostituzione (1:20) che fa diminuire il numero di gruppi ossidrilici liberi a livello dello scheletro delle ciclodestrine.

8.5 Misure reologiche sui gel e sui polimeri bioadesivi sviluppati.

Le misure reologiche eseguite sui geli e sui derivati delle ciclodestrine, sono importanti per valutare le proprietà bioadesive dei sistemi sviluppati.

E' stata misurata la viscosità dei sistemi formati da una miscela di uguali volumi di formulazione da testare e soluzioni di mucina a tre diverse percentuali: 1%, 2% e 3% p/v. Dalle figure di seguito riportate è possibile osservare che solo alcune delle formulazioni sviluppate hanno mostrato variazioni positive del sinergismo reologico: ovvero all'aumentare della concentrazione di mucina si ha un aumento della viscosità collegata alla presenza di polimero e catene glicoproteiche, che rivela l'efficacia bioadesiva del polimero.

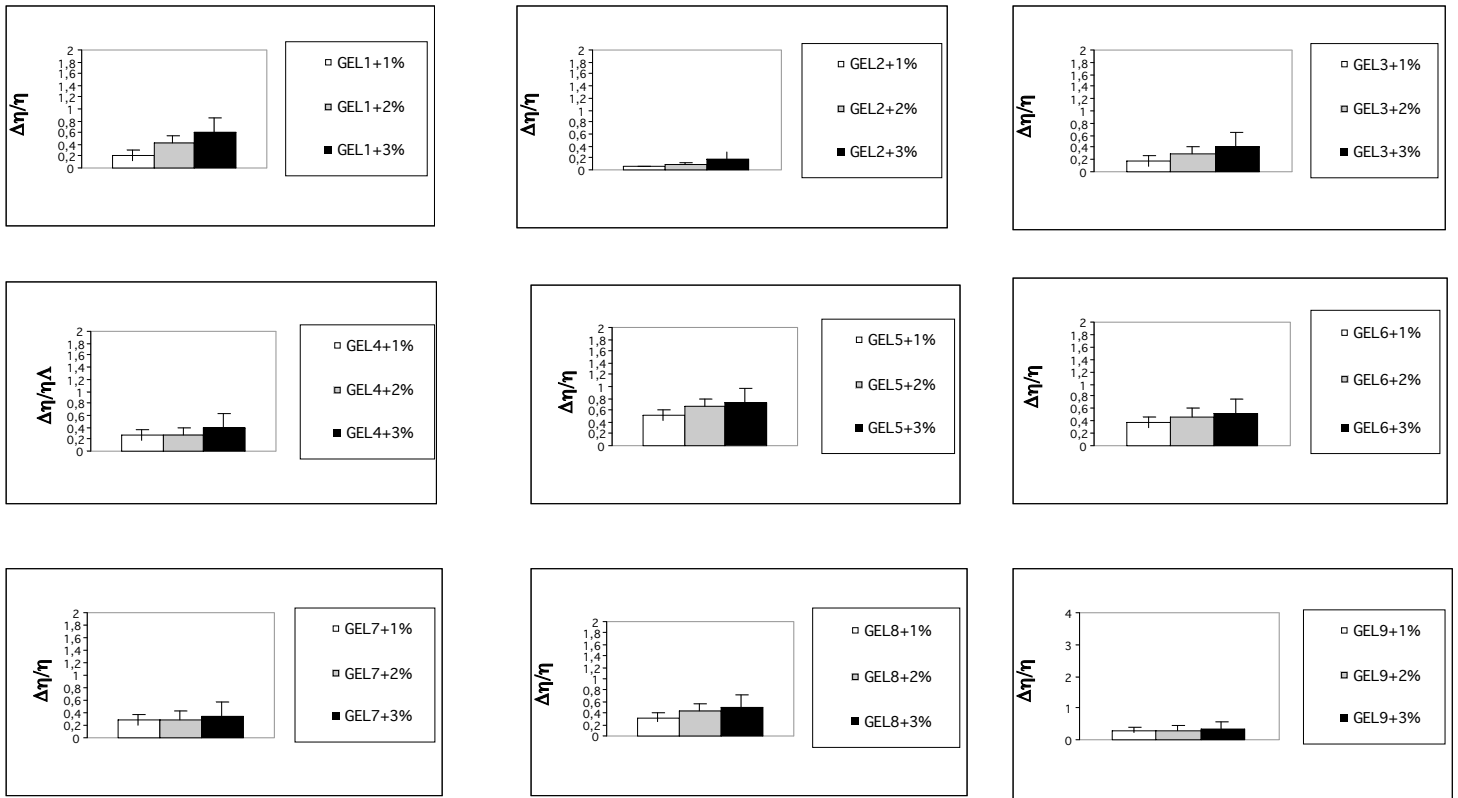


Figura 26: Istogrammi relativi ai valori di sinergismo reologico normalizzato registrati per i geli sviluppati

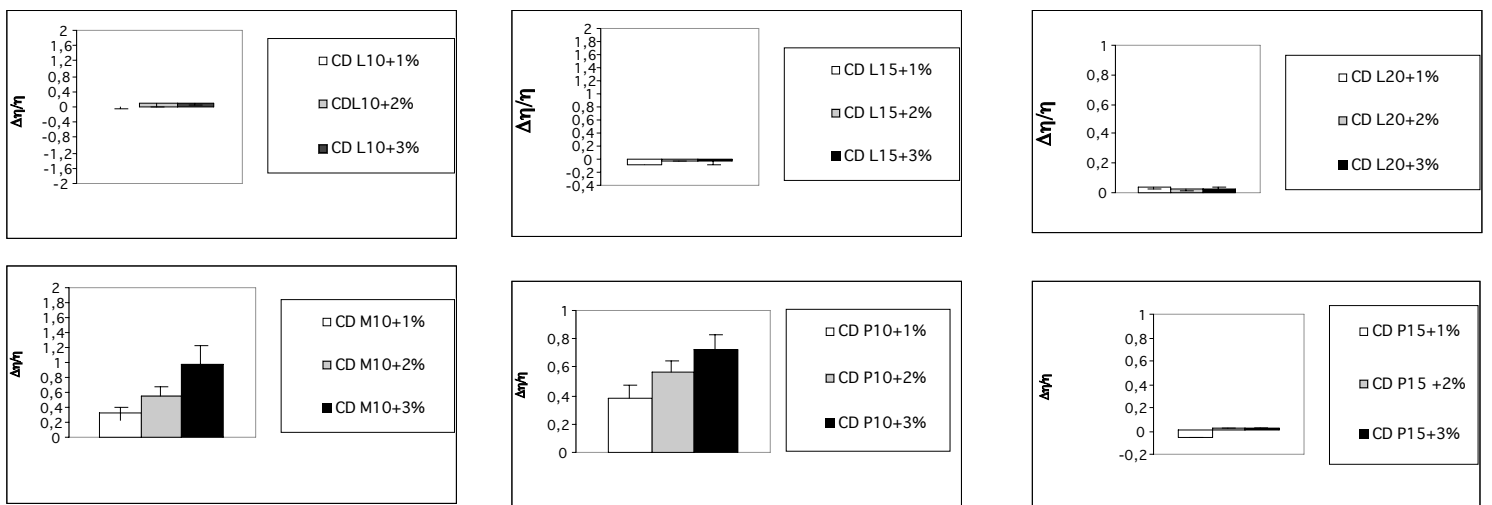


Figura 27: Istogrammi relativi ai valori di sinergismo reologico normalizzato registrati per i sistemi bioadesivi sviluppati con i derivati delle ciclodestrine

Dai risultati del test di mucoadesione eseguito sul gel bioadesivi sviluppati è possibile osservare che in generale tutte le formulazioni sviluppate presentano delle buone capacità mucoadesive, ma, fra tutti i gel quelli che hanno dei valori di sinergismo, che tendono ad aumentare in modo proporzionale col crescere della concentrazione di mucina, sono il Gel 1, il Gel 5, il Gel 6 e il Gel 8.

In particolare la migliore bioadesività è posseduta dal Gel 5, costituita dal 3% di CMC e dal 2% di HPC. Tale risultato può essere spiegato anche considerando il fatto che il Gel 1, costituito dal 3% di CMC è quello, fra i tre che hanno al loro interno un solo polimero bioadesivo, che però presenta le migliori caratteristiche di bioadesione, dovute alle note proprietà mucoadesive della Carbossimetil cellulosa. Dalla figura 25 è poi possibile osservare che anche il Gel 3, costituito dal 3% di HPC, presenta delle buone caratteristiche di bioadesione.

A tale risultato, dovuto alle capacità bioadesive proprie dei singoli polimeri, è riconducibile anche la buona proprietà bioadesiva posseduta dal Gel 8, costituito dal 2% di CMC e dal 3% di HPC.

Nonostante la HPMC risulti essere, fra i tre polimeri utilizzati, quella che presenta, se usata singolarmente, la minore proprietà bioadesiva, è però possibile osservare che l'utilizzo di quest'ultima al 3% in combinazione con il 2% di CMC, come avviene nel Gel 6, è in grado di conferire buone capacità mucoadesive alla formulazione sviluppata.

Dai risultati di sinergismo reologico ottenuti per i gel mucoadesivi sviluppati, emerge che la CMC può essere considerato l'eccipiente con le migliori proprietà mucoadesive e che il suo utilizzo, in modo combinato con gli altri derivati della cellulosa produce un aumento delle proprietà bioadesive delle formulazioni sviluppate.

Diverso è il risultato ottenuto per i polimeri bioadesivi derivati dalle ciclodestrine: dagli istogrammi riportati in figura 26 è possibile osservare che solo due dei sei sistemi bioadesivi sviluppati danno risultati positivi al test di mucoadesione eseguito ed in particolare i derivati polimerici α -CD M10 e β -CD P10. Tale risultato può essere ricondotto al rapporto molare di 1:10 utilizzato di questi due derivati: è infatti probabile che tale rapporto sia quello ideale per garantire la presenza di un certo numero di funzioni ossidriliche necessarie ad interagire con le catene glicoproteiche della mucina e a permettere in questo modo l'instaurarsi di forze di interazioni deboli, sufficienti però ad una stabile interazione. Inoltre si può anche supporre che la lunghezza delle catene dell'acido miristico e palmitico siano quelle ideali per garantire una perfetta compenetrazione con quelle glicoproteiche della mucina, mentre l'acido laurico possiede invece una catena non abbastanza lunga permettere una efficace interazione coi componenti del muco.

8.6 Test bilaterale di permeabilità e rilascio

Questo test è stato eseguito sia sulle compresse che sui geli e polimeri bioadesivi, al fine di investigare quali fra le formulazioni sviluppate fossero le più efficaci nell'associare un efficace rilascio del principio attivo ad una ridotta permeazione mucosale. Questo studio non è stato però eseguito su tutte le formulazioni: nel caso delle compresse mucoadesive si è scelto di effettuare questo test solo su tre lotti di compresse, M1, M3 ed M6, perché queste tre formulazioni hanno mostrato di avere diverse capacità di controllo di rilascio. La compressa M1 rilascia la clorexidina nel minor tempo, la M6 nel tempo più lungo fra tutte le formulazioni sviluppate e la M3 ha dimostrato di avere un controllo di rilascio intermedio.

Per quanto riguarda, invece, le formulazioni semisolide, ovvero geli e polimeri bioadesivi, il test bilaterale di permeabilità e rilascio è stato eseguito esclusivamente sulle formulazioni che avevano dato risultati positivi durante le misure reologiche eseguite per valutare le proprietà bioadesive delle formulazioni stesse.

Nelle seguenti figure sono riportati i profili di permeazione e rilascio per le formulazioni studiate.

In Tabella XXII sono riportati i valori di n e K relativi al rilascio della clorexidina mentre in Tabella XXIII sono riportati i valore del coefficiente di permeazione Papp calcolato.

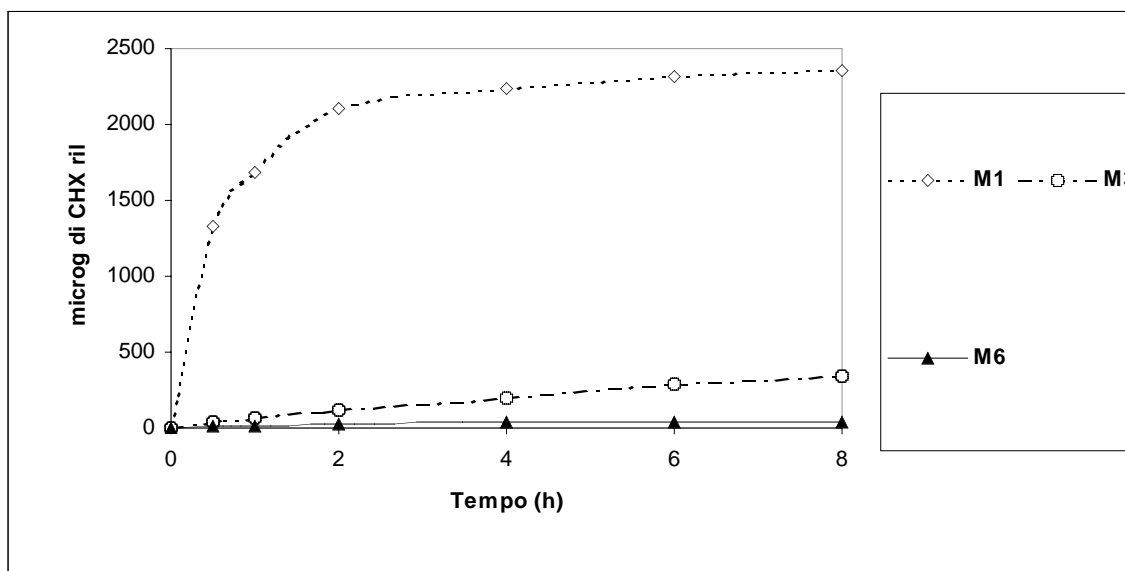


Figura 28: Profilo di rilascio della clorexidina dalle compresse nella cavità orale simulata con Cella di Franz

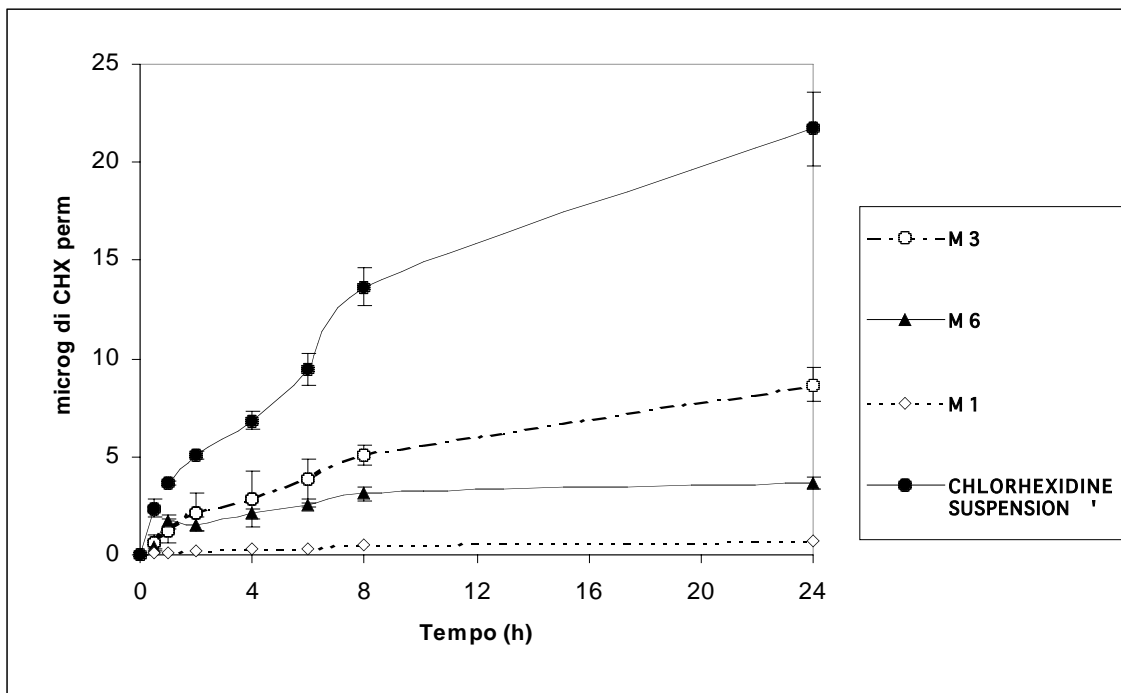


Figura 29: Profilo di permeazione della clorexidina dalle compresse e dalla soluzione satura.

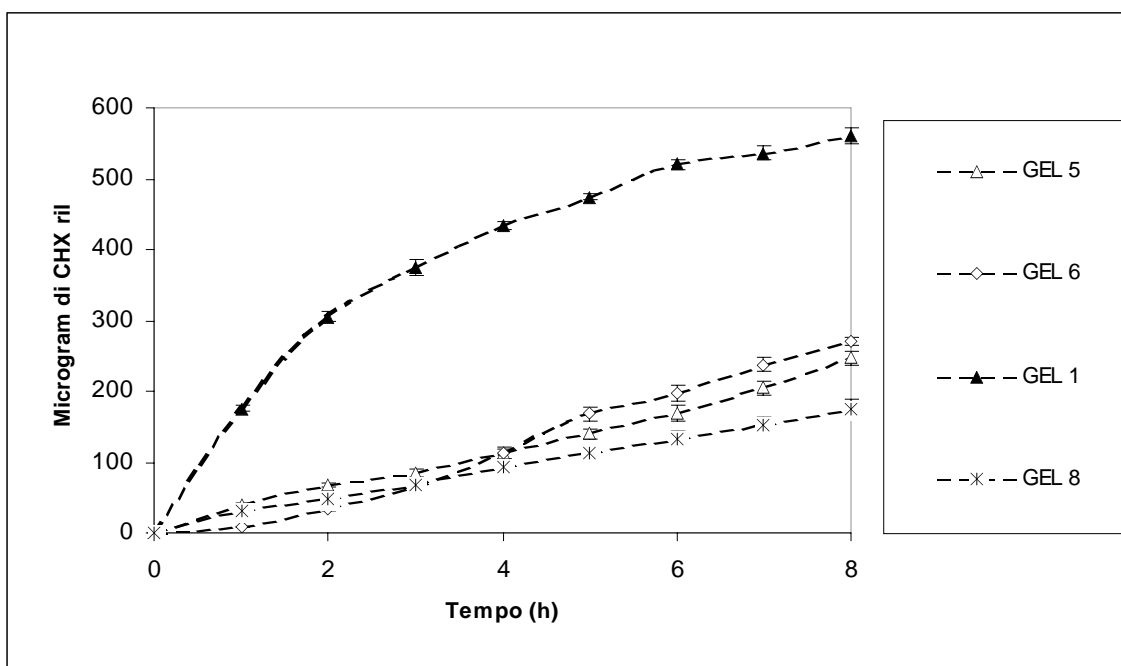


Figura 30: Profilo di rilascio della clorexidina dai gel nella cavità orale simulata con Cella di Franz

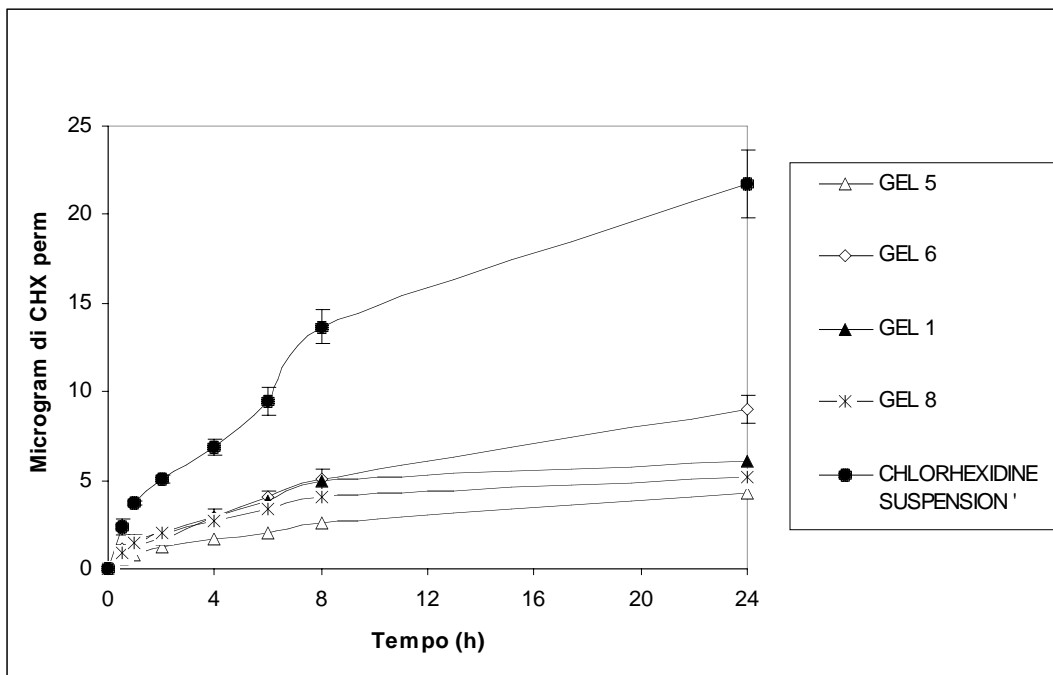


Figura 31: Profilo di permeazione della clorexidina dai gel e dalla soluzione satura.

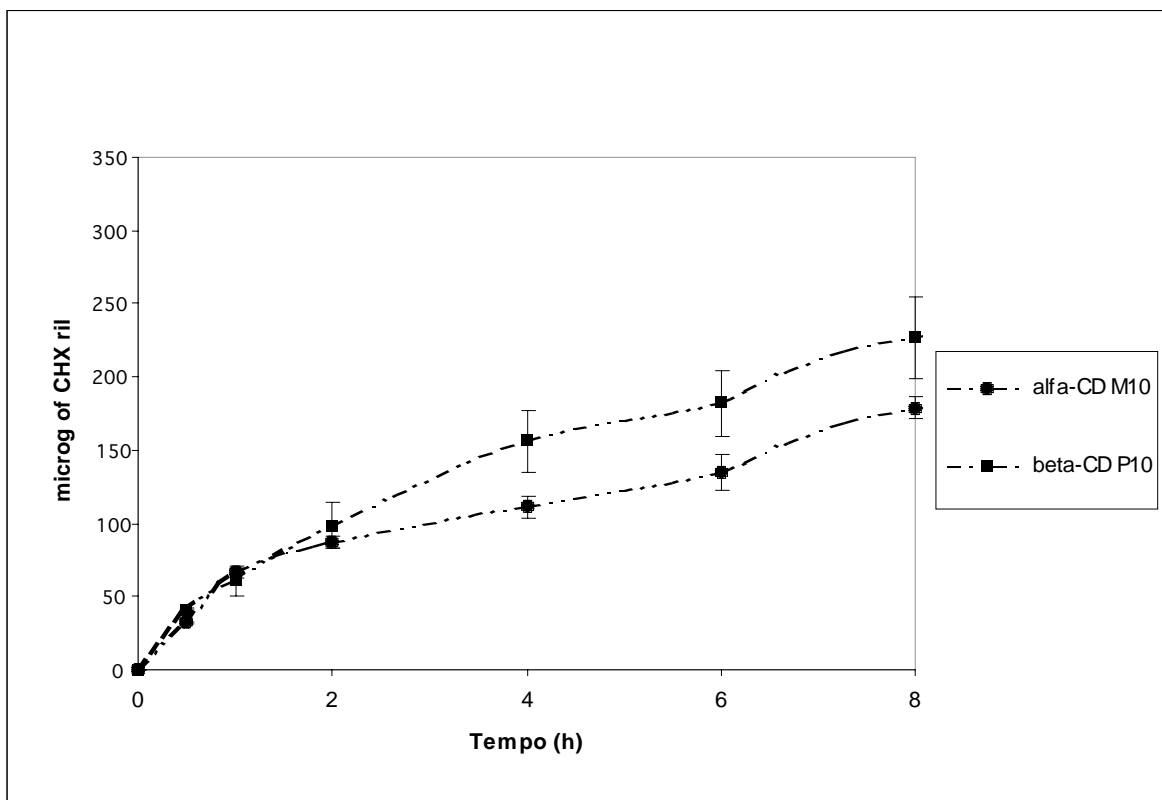


Figura 32: Profilo di rilascio della clorexidina dai polimeri bioadesivi nella cavità orale simulata con Cella di Franz

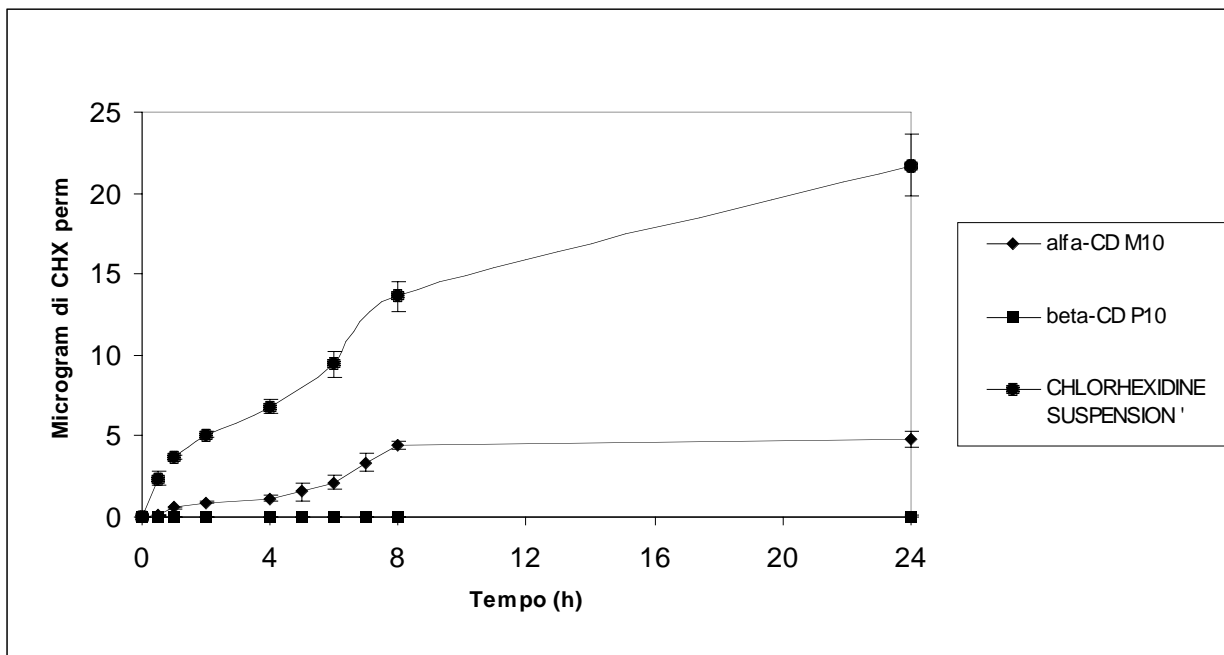


Figura 33: Profilo di permeazione della clorexidina dai polimeri bioadesivi e dalla soluzione satura.

Tab XXII: Valori di n e K per il rilascio di CHX delle formulazioni studiate nella cavità orale simulata con Cella di Franz

		M1	M3	M6	GEL1	GEL5	GEL6	GEL8	α-CD M10	β-CD P10
Tets bilaterale Permeaz-rilascio	n	0.94	0.79	0.76	0.54	1.08	0.89	0.86	0.51	0.52
	k cm ³ h ⁻¹	5.84*10 ⁻¹	3.37*10 ⁻¹	4.24*10 ⁻⁵	3.69*10 ⁻²	2.69*10 ⁻³	8.94*10 ⁻³	0.84*10 ⁻³	4.81*10 ⁻³	6.32*10 ⁻³

Tab XXIII: Valori di Papp per la permeazione di CHX delle formulazioni studiate nella cavità orale simulata con Cella di Franz

		M1	M3	M6	GEL1	GEL5	GEL6	GEL8	α-CD M10	β-CD P10
Tets bilaterale Permeaz-rilascio	Papp (cm/s)	1.4.10 ⁻⁸ ± 0.36	2.1*10 ⁻⁷ ± 0.89	3.0.10 ⁻⁸ ± 0.97	3.61*10 ⁻⁷ ± 0.36	2.73*10 ⁻⁷ ± ±0.19	8.12*10 ⁻⁷ ± 0.27	4.5*10 ⁻⁷ ± ±0.13	1.07*10 ⁻⁸ ± 0.22	4.25*10 ⁻⁸ ± 0.39

Dai risultati ottenuti dal test di permeabilità e rilascio eseguiti utilizzando una cella di Franz modificata è possibile osservare che tutte le formulazioni studiate presentano una ridotta permeazione mucosale, associata a un buon controllo del rilascio.

Andando in particolare ad osservare i risultati ottenuti per le compresse mucoadesive studiate è possibile notare che la formulazione M1 è quella che rilascia il farmaco in modo completo nell'arco delle 24 h. M6 risulta essere la compressa che rilascia la minor quantità di principio attivo, mentre la compressa M3 propone un profilo di rilascio intermedio. Tale risultato è simile a quello osservato nel Test di dissoluzione descritto in precedenza. I valori di coefficiente di permeazione apparente (Papp) ottenuti per tale formulazione mostrano che gli eccipienti possono essere considerati efficaci nel controllare la permeazione della CHX attraverso la mucosa.

Inoltre il più basso valore di Papp è posseduto dal lotto di compresse M6, che contengono Carbopol, quale eccipiente mucoadesivo, che dimostra anche in questo caso di essere in grado di interagire con il principio attivo e andare a rallentare il rilascio e a controllarne la permeazione mucosale

La compressa M1 risulta essere la formulazione capace di rilasciare in un breve intervallo di tempo un'elevata quantità di principio attivo e per questo può essere considerata una formulazione utilizzabile quando è necessario un rapido rilascio della CHX nella cavità orale.

I profili di rilascio ottenuti per i gel bioadesivi sviluppati mostrano che il GEL 1, CMC 3%, è quello che garantisce il più elevato rilascio del principio attivo nella cavità orale, associato a una controllata permeazione mucosale. Tale risultato è concorde con i risultati di dissoluzione precedentemente visti e può essere spiegato anche in relazione alla presenza di un unico polimero quale eccipiente mucoadesivo, che rende meno elevata la viscosità della formulazione e di conseguenza più veloce la diffusione del farmaco attraverso la matrice polimerica a seguito del rigonfiamento. Gli altri gel studiati, costituiti da due differenti polimeri bioadesivi, combinati fra loro in diversa percentuale mostrano profili di rilascio paragonabili fra loro e associati a controllate permeazioni mucosali. In particolare il Gel 5, CMC 3% e HPC 2%, è quello che presenta il più basso profilo di permeazione della CHX, con un valore di Papp di $2.73 \cdot 10^{-7}$. Tale risultato appare essere soddisfacente e permette di associare a un buon controllo del rilascio posseduto da tale formulazione anche ridotta permeazione mucosale del principio attivo.

Delle ciclodestrine anfifiliche sviluppate solo due hanno mostrato di possedere delle proprietà bioadesive.

Dal test bilaterale di permeabilità e rilascio eseguito su queste due formulazioni è possibile osservare che entrambi i polimeri possiedono un buon controllo del rilascio del principio attivo, associato ad una controllata permeazione della clorexidina attraverso la mucosa orale.

In particolare fra le due ciclodestrine anfifiliche si osserva che la formulazione β -CD P10 è quella che ha un più elevato rilascio di clorexidina associato a una quasi assente permeazione mucosale. Questo può dovuto essere alla più elevata capacità complessante posseduta dalla β -ciclodestrina rispetto alla α -ciclodestrina, che riesce per questo a complessare in maniera più efficace il principio attivo e a limitarne di conseguenza la permeazione attraverso la mucosa. In generale comunque entrambi i polimeri bioadesivi hanno un buon controllo della permeazione mucosale, sottolineato anche dalla presenza di un coefficiente di permeazione apparente dell'ordine di 10^{-8} cm/s.

9. CONCLUSIONI

Lo studio, in primo luogo, è stato eseguito per convalidare la metodica di permeazione mucosale di un principio attivo con celle di Franz. Nella prima parte sono stati studiati i principali parametri di trattamento della mucosa, a partire dal prelievo da parte del Veterinario, fino alla sua completa lavorazione da parte dell'operatore. Tutti i passaggi che portano all'ottenimento della mucosa da utilizzare nella cella di Franz sono stati valutati con cura: si è ottenuto come risultato una mucosa di spessore e peso medi pari a 2,1 mm e 3,24 g. Poi sono stati controllati i parametri riferiti alla fase ricevente delle celle di Franz: temperatura e peso del volume della soluzione prelevata dalla cella stessa. Dai test eseguiti si è ottenuto un risultato medio di temperatura di 37,1 °C e peso del volume di 1,08 g. Infine sono stati stabiliti i tempi per una giusta conservazione della mucosa a -21 °C, analizzando i risultati di permeazione mucosale del principio attivo utilizzato a differenti tempi di conservazione, a confronto con quelli ottenuti dalla permeazione dello stesso principio attivo sulla mucosa fresca. Dai risultati di permeazione ottenuti e confrontando i rispettivi parametri cinetici si può arrivare a concludere che, a seguito degli opportuni trattamenti, è possibile utilizzare la mucosa, una volta congelata, fino a 7 giorni dopo la sua lavorazione, affinché i risultati di permeazione siano paragonabili a quelli ottenuti con la mucosa fresca.

Si sono quindi studiati differenti lotti di tre specifiche formulazioni bioadesive ad uso buccale contenenti clorexidina: compresse, geli e polimeri, al fine di individuarne la migliore nel garantire un efficace controllo di rilascio del principio attivo, associato a una ridotta permeazione mucosale.

Dai risultati è stato possibile ottenere per ciascuna dei tre diversi tipi di formulazioni studiate, compresse, geli e polimeri bioadesivi, un prototipo formulativo utilizzabile per il controllo del rilascio della clorexidina nella cavità orale.

Si è infatti formulata una compressa mucoadesiva M1, contenente come eccipiente mucoadesivo HPMC, capace di garantire un rilascio del 100% del principio attivo in circa 2h. Questo tipo di formulazione potrebbe essere utilizzata nelle procedure pre-operatorie, se necessaria una rapida disinfezione della cavità orale.

Fra i gel sviluppati il GEL 5, 3% CMC e 2% HPC, è sicuramente una formulazione ottimale quando è necessario associare un controllo del rilascio del principio attivo ad una ridotta permeabilità mucosale del principio attivo. Il Gel 5 risulta essere inoltre la formulazione con le migliori proprietà bioadesive fra quelle studiate. Tale caratteristica fa sì che tale gel possa essere considerato una formulazione adatta per una disinfezione diurna del cavo orale, perché l'elevata bioadesione

garantisce una permanenza “in situ” della formulazione, nonostante le innumerevoli sollecitazioni cui può essere sottoposto durante il periodo di residenza nella cavità orale.

Fra le ciclodestrine anfifiliche sviluppate il β -CD P10 presenta un efficace controllo del rilascio del principio attivo e associato a buone proprietà mucoadesive e a ridotta permeazione mucosale. Il lento rilascio della clorexidina rende tale sistema utilizzabile soprattutto nelle procedure post-operatorie in cui è preferibile un controllato e duraturo rilascio del principio attivo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) A.D. Woolfson, K. Malcolm, P.A. Mc Carron and D.S. Jones, in 'Polymeric Biomaterials' edited by S. Dumitriu. (Marcel Dekker, 2002), pp. 1063-1083.
- 2) N. Salamat-Miller, M. Chittchang and T. P. Johnston The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery.
Advanced Drug Delivery Reviews, 2005 Nov; 57 (11): 1666-1691
- 3) D. S. Jones, C. R. Irwin, A. D. Woolfson, J. Djokic and V. Adams. Physicochemical characterization and preliminary in vivo efficacy of bioadhesive, semisolid formulations containing flurbiprofen for the treatment of gingivitis.
J. Pharm. Sci. 1999; 88(6): 592-598
- 4) D. S. Jones, C. R. Irwin, C. R. Irwin, A. F. Brown, A. D. Woolfson, W. A. Coulter and C. McClelland. Physicochemical characterization and preliminary in vivo efficacy of bioadhesive, semisolid formulations containing flurbiprofen for the treatment of gingivitis.
J. Cont. Rel. 67; 2000 (2): 357-359
- 5) R. Anders, and H.P. Merkle. Evaluation of laminated muco-adhesive patches for buccal drug delivery.
Int. J. Pharm, 49; 1989 : 231-240,.
- 6) G C Ceschel, V. Bergamante, V. Calabrese, S. Biserni, C. Ronchi and A. Fini.
Design and evaluation in vitro of controlled release mucoadhesive tablets containing chlorhexidine.
Drug Dev Ind Pharm. 2006; 32(1):53-61.
- 7) P. Maffei, S. Lombardi Borgia, A. Sforzini, V. Bergamante, G.C. Ceschel, A. Fini and C. Ronchi
Mucoadhesive tablets for buccal administration containing sodium nimesulide.
Drug Deliv. 2004 ;11(4):225-30.
- 8) M.A. Attia, I. El-Gibaly, S.E. Shaltout and G.N. Fetih. Transbuccal permeation, anti-inflammatory activity and clinical efficacy of piroxicam formulated in different gels.
Int J Pharm. 2004; 19(1-2):11-28.

- 9) E. Memisoglu, A. Bochot, M. Ozalp, M. Sen, D. Duchene and AA Hincal. Direct formation of nanospheres from amphiphilic beta-cyclodextrin inclusion complexes.
Pharm Res. 2003 ;20(1):117-25.
- 10) M. Raveendra Pa, D. Leelavathi, N. Acharya, Udupa. "Evaluation of antiplaque activity of *Azadirachta indica* leaf extract gel: a 6- week clinical study.
Journal of Ethnopharmacology 2004; (90): 99-103.
- 11) A.P. Negrelo Newton, S.M. S.C. Cadena, M.E. Merlin Rocha, E.G. Skare Carnieri, M.B. Martinelli de Oliveira. "New data on biological effects of chlorhexidine: Fe²⁺ induced lipid peroxidation and mitochondrial permeability transition".
Toxicol Lett. 2004 1;151(3):407-16.
- 12) A. P. Colucci, R. Gagliano-Candela " Validity of the analytical data of the chemical-clinical and toxicological laboratory"
Bollettino per le Farmacodipendenze e l'alcolismo 2004(3-4)
- 13) L. Ballati, G. Bonacchi, S. Cavalieri, V. Giacomelli, M. Mazzoni, C. Scarpi "Criteri Di Validazione Dei Dati E Qualita' Dei Dati" Rti Ctn_Aim 4./2000 (<http://www.sinanet.anpa.it>)
- 14) M. Oehme "Concetto di «Quality Assurance» Analitica di PAK, PCB e diossine nel suolo"
Università di Basilea
- 15) Direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati [notificata con il numero C(2002) 3044]
- 16) "Qualifica e convalida" Gruppo di lavoro "Controllo dei medicinali e ispezioni" Versione finale dell'allegato 15 della Guida alle norme di buona fabbricazione (NBF) dell'UE
- 17) Convalida Di Metodi Analitici. In Conformita' Alle. Linee Guida Ich ... Ich Q2a."...
www.farmacia.unifi.it/4.1_Convalida_metodi_ICH.pdf - Pagine

18) M.C. Schmidt, D. Simmen, M. Hilbe, P. Boderke, G. Ditzinger, J. Sandow, S. Lang, W. Ruba and H.P., Merkle “Validation of excised bovine nasal mucosa as in vitro model to study drug transport and metabolic pathways in nasal epithelium.”

J Pharm Sci. 2000 ;89(3):396-407.

19) <http://www.eastman.ucl.ac.uk/cal/ulcerspath/healthy.htm>

20) R. Cozzi, P. Protti, T. Ruaro, “Analisi chimica moderni metodi strumentali” Bologna : Zanichelli, 1996

21) E. Michael Swartz, S. Ira Krull “Analytical method development and validation” New York ; Basel : Marcel Dekker, 1997.

22) D.A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler “Chimica analitica : una introduzione” edizione italiana a cura di Luigia Sabbatini . 3. ed. - Napoli : EdiSES, c1996. – XXIV.

23) “Enciclopedia of pharmaceutical tecnology” James Swarbrick, James C. Boyland. New York Marcel Decker 1989

24) B.V. Deriaguin, V.P. Smilga, “Adhesion: fundamentals and practise”, Maclare, London, 1969.

25) Kembal, “Adhesion” D.D. Eley, Oxford university Press, Londra, 1961.

26) P.C. Hiemenz, “Principles of colloid and surface chemistry”, marcel Dekker, New York, 1977.

27) C.T. Reinhart, N.A. Peppas, J. Membrane Si. 1984; (18): 227-232,.

28) H. Park, J.R. Robinson J. Controlled Release 1985; (2): 47-53,.

;

29) R.B. Gandhi, J.R. Robinson, “Bioadhesion in drug delivery”, Indian J. Pharm. Sci. 1988; 50(3): 145-152,.

30) S. Rossi, MC Bonferoni, G Lippoli, M Bertoni, F Ferrari, C Caramella and Conte U.

Influence of mucin type on polymer-mucin rheological interactions.

Biomaterials. 1995;16(14):1073-9.

31) C. Caramella, M.C. Bonferoni, S. Rossi, F. Ferrari, "Rheological and tensile tests of the assessment of polimer-mucine interactions".

Eur. J. Pharm. Biopharm. 40(4), 213-217, 1994.

32) S. Rossi, F. Ferrari, M.C. Bonferoni and C. Caramella.

Characterization of chitosan hydrochloride-mucin interaction by means of viscosimetric and turbidimetric measurements.

Eur J Pharm Sci. 2000;10(4):251-7.

33) D. Duchene, D. Wouessidjewe and G. Ponchel.

Cyclodextrins and carrier systems.

J Control Release. 1999 ;62(1-2):263-8.

34) E. Memisoglu, A. Bochot, M. Ozalp, M. Sen, D. Duchene, A.A. Hincal.

Direct formation of nanospheres from amphiphilic beta-cyclodextrin inclusion complexes.

Pharm Res. 2003; 20(1):117-25.