UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE
SEDE AMMINISTRATIVA DEL DOTTORATO DI RICERCA

XX CICLO
DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DEL FARMACO

PREPARAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI FORME FARMACEUTICHE SOLIDE ORALI A PARTIRE DA MATERIALE COMPOSITO

S.S.D. CHIM/09

DOTTORANDO
BARBARA BELLICH

COORDINATORE DEL COLLEGIO DOCENTI
CHIAR.MO PROF. MAURIZIO PRATO
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

RELATORE
CHIAR.MO PROF. MARIAROSA MONEGHINI
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

1. INTRODUZIONE

La somministrazione per via orale è la preferita per il trattamento farmacologico cronico. Circa il 40% dei nuovi principi attivi, tra i quali numerosi potenti farmaci lipofilici, è caratterizzato da bassa solubilità in acqua e la somministrazione per via orale di tali farmaci è frequentemente associata a bassa biodisponibilità, alta variabilità intra- e inter-soggetto e mancanza di rapporto proporzionale dose-effetto terapeutico [1, 2]. Infatti l'assorbimento di un principio attivo rilasciato da una forma farmaceutica orale dipende essenzialmente da due fattori: la dissoluzione del p.a. nel tratto gastrointestinale e la sua permeabilità attraverso la mucosa.

Sulla base di questi due parametri i principi attivi sono stati distinti in quattro categorie, dando origine così al Biopharmaceutical Classification System (BCS) [3]. Le classi sono:

I alta solubilità/alta permeabilità

II bassa solubilità/alta permeabilità

III alta solubilità/bassa permeabilità

IV bassa solubilità/bassa permeabilità.

In particolare per la seconda classe di composti, la dissoluzione nel lume gastro-intestinale è lo step limitante il processo di assorbimento [1]. Per questa classe, numerosi approcci sono stati proposti allo scopo di aumentarne la biodisponibilità orale come ad esempio il ricorso alla micronizzazione del principio attivo, alla co-precipitazione con polimeri idrofili o non-elettroliti, alla formazione di complessi di inclusione in ciclodestrine, alla veicolazione in micelle e liposomi o, ancora, alla preparazione di microemulsioni e sistemi auto-emulsificanti [4]. Quest'ultimo sistema, definito come SEDDS (self-emulsifying drug delivery systems), ha la capacità di formare emulsioni fini o microemulsioni singole del tipo olio/acqua in seguito a diluizione con la fase acquosa sotto blanda agitazione [1]. Il sistema tende ad autoemulsificarsi rapidamente nel contenuto acquoso dello stomaco, facendo si che il principio attivo in soluzione sia presente sotto forma di piccole goccioline di olio, il cui

diametro è inferiore a 5 μm. Le goccioline di olio dovrebbero rapidamente transitare dallo stomaco e distribuirsi lungo tutto il tratto gastro-intestinale, riducendo così anche i fenomeni di irritazione dovuti alla presenza del principio attivo tal quale [5].

Nel caso di microemulsioni precostituite si parla di soluzioni termodinamicamente stabili composte principalmente da acqua, olio e tensioattivi [6]. Le microemulsioni sono superiori rispetto alle semplici soluzioni micellari in termini di capacità solubilizzante e la loro stabilità termodinamica offre numerosi vantaggi rispetto a sistemi instabili, quali le emulsioni e le sospensioni, dal momento che richiedono un basso apporto di energia [7].

Nonostante il nome, le microemulsioni sono fondamentalmente diverse dalle emulsioni e non devono essere considerate come emulsioni con una dimensione più piccola delle gocce disperse. La differenza infatti tra questi due sistemi è data da alcuni fattori, quali:

1) le microemulsioni sono termodinamicamente stabili e mostrano una stabilità prolungata nel tempo in assenza di degradazione di uno dei componenti. Le emulsioni invece sono termodinamicamente instabili, cioè tendono gradualmente nel tempo a separarsi in fase oleosa e fase acquosa;

2) grazie alla loro stabilità termodinamica, le microemulsioni si formano spontaneamente e quindi nessun lavoro deve essere fatto per prepararle. Le emulsioni invece essendo termodinamicamente instabili necessitano di un apporto di energia, che molto spesso è costituito dall'impiego di omogeneizzatori ad alta pressione;

3) le microemulsioni sono trasparenti, invece le emulsioni hanno un aspetto lattescente. L'aspetto delle emulsioni è infatti determinato dalle dimensioni della fase dispersa: nelle comuni emulsioni, bianche od opache, il diametro delle goccioline emulsionate varia fra 0,5 e 20 μm. Quando le goccioline disperse hanno dimensioni colloidali (fra 1 nm e 1 μm) non si ha più la rifrazione della luce e tali sistemi multifasici appaiono trasparenti (microemulsioni).

4) Nel caso delle emulsioni le gocce di fase dispersa sono più grandi e risulta che l'area superficiale è minore; di conseguenza la quantità di tensioattivo necessaria a formare

un'emulsione è inferiore rispetto a quella utilizzata per la formulazione di una microemulsione [8, 9].

I vantaggi ottenuti dall'impiego di microemulsioni/emulsioni sono un'aumentata solubilizzazione del principio attivo e la protezione dall'idrolisi enzimatica nel caso della veicolazione di farmaci proteici [7].

Rispetto alle classiche emulsioni/microemulsioni, le emulsioni/microemulsioni doppie consistono nella dispersione di un'iniziale emulsione in un'ulteriore fase disperdente ad esempio, un'emulsione del tipo acqua/olio/acqua consiste in globuli di olio dispersi in acqua e contenenti goccioline di acqua più piccole. Grazie a questa struttura di "doppio compartimento", le emulsioni doppie possono essere considerate come un reservoir di sostanze incapsulate che verranno successivamente rilasciate in condizioni fisiologiche variabili lungo il tratto gastro-intestinale [10].

Infine, un nuovo sistema di drug delivery per la via orale è rappresentato dal DAE, cioè "dry adsorbed emulsion". Tale sistema è costituito da un'emulsione acqua/olio in cui le due fasi sono assorbite su due polveri a diversa polarità. La prima polvere assorbe la fase acquosa e la seconda la fase oleosa offrendo così al termine del processo un prodotto solido [11].

Un altro approccio atto a migliorare la solubilità/velocità di dissoluzione di un principio attivo appartenente alla classe II impiega la più semplice tecnologia di veicolazione del principio attivo in presenza di polimeri idrofili [12], mediante la preparazione di dispersioni solide (DS).

Questo metodo, sviluppato per la prima volta da Sekiguci e Obi nel 1961, consiste nella dispersione di uno o più ingredienti attivi in un carrier inerte, determinando la formazione di complessi a maggiore idrofilia accompagnati da riduzione del particle size del principio attivo e la sua completa amorfizzazione [13].

I metodi classici di allestimento delle dispersioni solide sono tre: il metodo della fusione, del solvente e della fusione-solvente.

METODO DELLA FUSIONE: il principio attivo viene disperso/sciolto nel carrier precedentemente portato a fusione, seguito dal raffreddamento della miscela che poi viene macinata e setacciata per ottenere la granulometria desiderata. Questo metodo risulta semplice ed economico, ma presenta alcuni svantaggi come la temperatura di esercizio che, se alta, può determinare la decomposizione del principio attivo incorporato;

METODO DEL SOLVENTE: il principio attivo e il carrier vengono co-precipitati da un solvente comune nel quale sono inizialmente disciolti. Anche questa tecnica presenta però delle limitazioni dovute all'alto costo di lavorazione, alla difficoltà di identificare un solvente comune, alla difficoltà di rimuovere completamente il solvente;

METODO DELLA FUSIONE-SOLVENTE: il metodo consiste nella preventiva dissoluzione del principio attivo in una minima quantità di solvente, che successivamente viene incorporato nel carrier fuso [14-19].

Nonostante la praticità di allestimento delle dispersioni solide, risultano ancora pochi i prodotti commerciali che utilizzano questa tecnica:

1) Gris-PEG® (Novartis), griseofulvina in PEG

2) Cesamet® (Lily), nabilone in PVP.

Un recente metodo di allestimento delle DS si avvale del riscaldamento per mezzo delle microonde sfruttando le proprietà che le sostanze chimiche hanno di assorbire l'energia direttamente dalle onde elettromagnetiche che aumentano l'agitazione termica e quindi la temperatura. Questo tipo di riscaldamento non prevede alcun utilizzo di fluido o solido come trasportatore di calore e l'energia fornita dalle radiazioni viene ceduta direttamente alla sostanza ed in tempi molto brevi [20].

2. SCOPO DEL LAVORO

Oggetto della ricerca sviluppata nel triennio di dottorato, è stato l'allestimento di formulazioni solide orali a pronta biodisponibilità in vitro per l'Ubidecarenone, Ciclosporina, Piroxicam ed Ibuprofene.

L'allestimento del materiale composito è stato ottenuto ricorrendo a due tecnologie e, più precisamente, per la veicolazione dell'Ubidecarenone e Ciclosporina il materiale composito atto alla realizzazione della desiderata forma farmaceutica finale, ci si è avvalsi della tecnologia NEC™ (Nanoemulsified Composites) che consiste nella combinazione di una microemulsione doppia del tipo O/A/O con un carrier microporoso. Per il Piroxicam ed Ibuprofene invece, ci si è avvalsi dell'irraggiamento alle microonde per l'allestimento alternativo di dispersioni solide solvent-free.

All'opportuna selezione degli eccipienti ed all'allestimento dei sistemi farmaco-carrier, ha fatto seguito la caratterizzazione chimico-fisica degli stessi per osservare l'influenza delle tecnologie preparative adottate sullo stato solido dei principi attivi e l'indagine dissolutiva per valutare il raggiungimento dell'obiettivo del lavoro e cioè l'aumento della biodisponibilità dei summenzionati principi attivi appartenenti alla classe II BCS. Prove *in-vivo* sono state eseguite sui compositi a base di Ubidecarenone e Ciclosporina.

3. PRINCIPI ATTIVI POCO SOLUBILI

3.1 UBIDECARENONE

L'ubidecarenone (ubichinone, coenzima Q_{10}) è una sostanza chimicamente definita come 2,3-dimetossi-5-metil benzochinone, particolarmente abbondante nei mitocondri del miocardio. Si tratta di un coenzima che svolge un importante ruolo nella catena respiratoria mitocondriale. La somministrazione di ubidecarenone per via orale può riportare alla norma i tassi di coenzima Q_{10} nei tessuti carenti, con ripristino delle funzioni compromesse.

L'ubidecarenone è quindi un farmaco particolarmente indicato nel trattamento delle alterazioni metaboliche e funzionali del miocardio [21].

L'Ubidecarenone si presenta come polvere cristallina di colore giallo-arancio, con un punto di fusione di circa 50 °C; è praticamente insolubile in acqua e di conseguenza è caratterizzato da un basso assorbimento a livello del tratto gastro-intestinale [22-23].

3.2 CICLOSPORINA

La ciclosporina fu scoperta nel 1971, isolata da un fungo (*Tolypocladium inflatum*), la cui attività terapeutica studiata era di antibiotico anti-fungino. Venne in seguito evidenziato che lo spettro d'azione dell'attività antifungina era molto stretto e non aveva alcuna proprietà antibatterica. Solo nel 1976 fu scoperta la sua attività immunosoppressiva, infatti ad oggi la ciclosporina viene comunemente utilizzata per prevenire il rigetto nei casi di trapianto d'organo e in tutte le malattie a carico del sistema immunitario quali ad esempio l'artrite reumatoide e la psoriasi [24].

Chimicamente la ciclosporina è un undecapeptide ciclico neutro ed è caratterizzata da una bassa biodisponibilità e alta variabilità inter-soggetto [24-26].

Un risultato importante in termini di aumento dell'assorbimento venne ottenuto con la formulazione di una emulsione olio/acqua che si forma spontaneamente a contatto con i fluidi

gastrointestinali (Sandimmune®) e nella quale la ciclosporina era distribuita principalmente all'interno delle goccioline lipidiche. Tuttavia detta preparazione si dimostrò produrre un'elevata variabilità inter- ed intra-soggetto derivante dal fatto che la formulazione necessita di una fase di digestione ad opera dei sali biliari e dei succhi pancreatici e quindi legata a fattori fisiologici quali pH, cibo, flusso biliare. Il problema è stato successivamente ridotto ricorrendo alla formulazione di una microemulsione preconcentrata.[27].

3.3 IBUPROFENE

L'ibuprofene [(±)-2-(-4-isobutilfenil) acido propionico (±)-α-metil-4(2-metil-propil)acido benzeneacetico p-isobutil-acido idratopico] si presenta come un solido cristallino, incolore e poco solubile in acqua. La sintesi della molecola è stata pubblicata nel 1964 ma il farmaco non è entrato in commercio fino al 1974 negli Stati Uniti.

E' commercializzato come miscela racemica ma l'attività farmacologica è presente quasi esclusivamente nell'enantiomero S (+) [28].

L' ibuprofene ha un punto di fusione compreso tra 75° e 77° C. Il suo pKa è di 4,43. E' solubile in solventi organici come alcoli, acetone, etere, diclorometano, ma quasi completamente insolubile in solventi polari e in mezzi acquosi [29].

La scarsa solubilità in mezzi acquosi limita l'entità e la velocità d'assorbimento per via orale che quindi rende il farmaco poco biodisponibile [30].

Per somministrazione orale, a livello del tratto gastro-intestinale, viene assorbito circa l'80% della dose somministrata. Il picco plasmatico si raggiunge dopo circa due ore e più del 98% del farmaco circolante si lega alle proteine plasmatiche (albumine). Una parte del farmaco si distribuisce nei tessuti e negli spazi sinoviali dove raggiunge concentrazioni elevate che permangono. L'assunzione di cibo può ridurre la velocità d'assorbimento dell'ibuprofene, ma non va a sfalsare la sua biodisponibilità e la quantità assorbita.

L'emivita plasmatica del farmaco si verifica intorno alle 2-3 ore, successivamente l'ibuprofene va incontro a biotrasformazioni a livello epatico con formazione di metaboliti coniugati con acido glicuronico e escreti per via renale [29].

L'ibuprofene fa parte della categoria dei farmaci antinfiammatori non steroidei o FANS.

Questa categoria di farmaci presenta tre tipi di effetti terapeutici:

- antinfiammatorio;
- antiflogistico;
- antipiretico.

Sono in genere ben tollerati dall'organismo pur presentando diversi effetti collaterali in quanto questi sono legati alla sintesi delle prostaglandine. Questi farmaci agiscono sulle ciclossigenasi (COX) inibendone la loro attività cioè la conversione dell'acido arachidonico in prostaglandine, le quali vengo rilasciate dall'organismo come risposta ad una grande quantità di stimoli. Le loro azioni sono diverse: vasodilatazione, vasocostrizione, iperalgesia, antiaggregante piastrinica, mediatore della febbre, stimolante l'endometrio dell'utero gravidico a contrarsi in maniera simile alle contrazioni del parto.

L'ibuprofene, come la maggior parte dei FANS, non essendo selettivo nei confronti delle cicloossigenasi determina la comparsa degli effetti collaterali tipici dei FANS [31].

L'ibuprofene è indicato come analgesico nel trattamento della cefalea, nevralgie, dismenorrea, per alleviare dolori lievi e moderati, per i sintomi dell'artrite reumatoide e dell'osteoartrite, per il dolore odontoiatrico. Ha un'azione antipiretica, in quanto alcune prostaglandine prodotte dall'ipotalamo (centro della termoregolazione) con l'intervento dell'AMPc (adenosina monofosfato ciclico) provocano un innalzamento della temperatura [28].

3.4 PIROXICAM

Il piroxicam è un farmaco anti-infiammatorio non steroideo utilizzato per il trattamento dei disturbi reumatici [32-33]. Capostipite della classe degli ossicami, fu introdotto per la prima volta negli Stati Uniti nel 1982 con il nome commerciale Feldene®; sviluppato da Pfizer fu per parecchi anni uno dei cinquanta farmaci più prescritti. Il piroxicam risulta essere circa 200 volte più potente dell'aspirina nei convenzionali studi in vivo [34]. Il piroxicam si presenta come solido cristallino di colore bianco scarsamente solubile in acqua (classe II BCS). Dopo somministrazione per via orale il picco plasmatico viene raggiunto in circa due ore. La presenza di cibo non influenza in maniera marcata la biodisponibilità. Il tempo di semivita abbastanza lungo consente la somministrazione del piroxicam in una singola dose giornaliera. Gli effetti collaterali più rilevanti riguardano disturbi del tratto gastro-intestinale, ma l'incidenza di ulcera peptica è comunque inferiore all'1%. [34]

Il piroxicam è un farmaco che presenta forme polimorfe ed il numero e relativa nomenclatura che si ritrovano in letteratura sono discordanti tra loro e spesso fonte di confusione [35]. Ad esempio, nel 1985 Kozjek et al. descrivono due forme del piroxicam: la forma A che cristallizza sotto forma di aghi di colore bianco e la forma B, caratterizzata da prismi di colore giallo [36]. Successivamente si dimostrò che in realtà la forma B è un monoidrato [35]. Mihalic et al. nel 1986 identificarono due differenti polimorfi cristallini interconvertibili, polimorfo aghiforme e polimorfo cubico, i cui punti di fusione sono rispettivamente a 196-198 °C e a 199-201 °C ed in più uno pseudopolimorfo corrispondente alla forma monoidrata nella quale la molecola di acqua evapora a circa 120 °C mentre resta invariato il punto di fusione del piroxicam. [37].

Un'ulteriore denominazione dei polimorfi del piroxicam proposta da Reck et al nel 1988 è quella di forma α per il polimorfo aghiforme e di forma β per quello cubico [35-38], identificando inoltre una nuova forma α designata come $\alpha 2$ che comportò la rinomina della

forma già nota come α in α1. Tuttavia le forme α1-2 presentano soltanto piccole differenze cristallografiche [35-39].

Infine, nel 1991 Vrečer et al. identificarono 4 polimorfi e uno pseudopolimorfo (monoidrato); dall'analisi DSC risulta che la fusione del polimorfo II è termicamente instabile e dà origine al polimorfo I dopo ricristallizzazione [40]. Nel 2004 altri Autori conclusero che le forme polimorfe sono tre: la forma beta (cubica), la forma aghiforme (alfa), la III ed il monoidrato [35].

4. TECNOLOGIE IMPIEGATE PER LA PREPARAZIONE DI MATERIALE COMPOSITO

4.1 TECNOLOGIA NEC™ NANOEMULSIFIED COMPOSITES

Nell'ambito delle microemulsioni, Remedia srl ha sviluppato una tecnologia brevettata (NEC™, Nanoemulsified Composites) basata sull'incorporazione di una doppia microemulsione (o/a/o) in un carrier solido microporoso [41]. I vantaggi offerti da questa tecnologia sono: semplicità di processo e di condizioni di conservazione, facile dispersione in acqua della polvere e mantenimento nel tempo, con la conservazione, della dimensione delle gocce rilasciate al di sotto del micron. Le dimensioni delle gocce rilasciate sono pari alle dimensioni della microemulsione originale prima del caricamento, a conferma dell'effetto di protezione esercitato dal carrier [42]. La corretta selezione dei materiali da impiegare come fase oleosa associata ad un tensioattivo/cotensioattivo determina un aumento della biodisponibilità di farmaci scarsamente assorbiti perché poco solubili nei fluidi biologici.

La preparazione del prodotto composito avviene studiando innanzitutto la solubilità del principio attivo in diversi olii o miscele oleose; si procede poi alla formulazione della doppia microemulsione o/a/o e al caricamente su carrier microporoso.

4.1.1 Solubilità del p.a. in miscele oleose

Al fine di selezionare il tipo di olio costituente la fase oleosa del prodotto composito sono anzitutto necessarie le misure di solubilità del p.a. in diversi olii o miscele oleose. Tali prove sono di tipo semiquantitativo e cioè una quantità nota di p.a. viene dispersa nel componente oleoso a piccole quote e le aggiunte continuano fino a quando si arriva alla presenza di un corpo di fondo.

4.1.2 Formulazione di una microemulsione doppia

Una volta identificati i possibili olii da utilizzare, si procede allo studio di fattibilità della microemulsione. Anzitutto si procede con la messa a punto della microemulsione interna olio/acqua (O/A) ed a tale scopo è necessario selezionare anche dei tensioattivi e/o cotensioattivi per favorire la formazione e stabilità della microemulsione. Come procedura, la fase dispersa viene aggiunta alla fase disperdente a piccole quote sotto agitazione ed osservandone visivamente il passaggio da uno stato lattescente ad uno trasparente. Ottenuta quindi la microemulsione O/A, questa viene dispersa nella fase oleosa esterna. Il procedimento per l'ottenimento della doppia microemulsione è analogo a quello appena descritto.

4.1.3 Caricamento su carrier

La prova di caricamento su carrier viene fatta utilizzando la microemulsione doppia "bianca" appena descritta. Un approccio preliminare viene eseguito in mortaio addizionando il carrier di piccole quote di microemulsione fino ad ottenere una polvere "caricata" ma ancora lavorabile. Stabiliti quindi i rapporti microemulsione/carrier, si procede all'allestimento della microemulsione doppia contenente il principio attivo e quindi al caricamento su carrier per ottenere il prodotto composito.

Alla preparazione su scala ridotta, segue l'allestimento del composito in granulatore rapido (Rotolab, Zanchetta Romaco).

4.2 ATTIVAZIONE MEDIANTE MICROONDE (MW)

Dati recenti di letteratura propongono l'impiego delle microonde (MW) quale metodo alternativo ed innovativo per la preparazione di dispersioni solide atte a migliorare la biodisponibilità di principi attivi poco solubili. L'uso delle microonde, già noto in tecnica farmaceutica come metodo di essiccamento più efficiente rispetto all'essiccamento in letto fluido [43], ha ampliato moltissimo i campi applicativi dal sintetico a quello tecnologico, grazie anche all'elevato livello tecnologico che la strumentazione ha raggiunto nel tempo [44]. L'uso delle microonde quale fonte di riscaldamento è stata definita "green chemistry" in quanto in alcuni casi le reazioni possono essere condotte senza solvente [20].

Attualmente in letteratura sono presenti soltanto pochi esempi applicativi delle microonde in campo formulativo:

1. Kerc et al. (1998) studiano il sistema binario felodipina (calcio antagonista) – biossido di silicio trattato con le microonde a diversi tempi, in confronto con i tradizionali metodi di riscaldamento e dell'evaporazione del solvente. Le dispersioni solide allestite alle microonde evidenziano l'ottenimento del farmaco in forma amorfa rispetto alle dispersioni solide di riferimento, che si ripercuote in un netto miglioramento della performance dissolutiva in vitro del principio attivo [45].
2. Bergese et al. (2003) caratterizzano lo stato solido di sistemi binari di alcuni farmaci della classe II con crospovidone e ciclodestrine attivati alle MW evidenziando anche in questo caso l'amorfizzazione del principio attivo con conseguente aumento della biodisponibilità in vitro [46-47].
3. Xianghong et al. (2004) riportano l'ottenimento di un complesso di inclusione del carvedilolo (farmaco utilizzato per il trattamento dei disturbi cardiovascolari) con β-ciclodestrina, ottenuto addizionando la miscela di una minima quantità di acqua-etanolo 1:1 e poi trattata alle microonde [48].

4.2.1 Caratteristiche delle microonde

Negli ultimi dieci anni l'uso delle microonde ha trovato numerosi campi di applicazione a livello industriale nei processi che prevedono il riscaldamento di materiali i cui convenzionali meccanismi (conduzione, convezione ed irraggiamento) non consentono un efficace, rapido ed omogeneo aumento di temperatura. Rispetto infatti alla generalità dei metodi di riscaldamento per conduzione tramite fluidi o contatto con corpi solidi caldi o all'irradiazione infrarossa, che procedono dalle superfici alla profondità degli oggetti, i principali vantaggi conclamati e largamente riconosciuti di questa tecnologia sono l'immediata capacità di penetrazione dell'energia con elevatissime velocità di riscaldamento, l'attivabilità e la disattivabilità istantanee, l'eccezionale selettività di riscaldamento di materiali diversi anche a contatto tra loro, i notevoli risparmi energetici conseguenti alla non necessità di riscaldare altra materia, come ad esempio le pareti dei forni tradizionali [49].

Le microonde sono onde elettromagnetiche il cui spettro è compreso tra le radiazioni infrarosse e quelle che usualmente vengono chiamate radiofrequenze. Le lunghezze d'onda sono comprese tra 1 cm ed 1 m e ad esse corrispondono rispettivamente frequenze di 30 GHz e 300 MHz. La regione dello spettro compresa tra 1 cm e 25 cm viene usualmente impiegata nei RADAR civili e militari; i forni a microonde domestici ed industriali operano a frequenze diverse. In particolare sono state scelte quelle pari a 0.900 GHz e 2,450 GHz (lunghezza d'onda di 33,3 cm e12,2 cm) [50].

4.2.2 Riscaldamento mediante microonde

Il riscaldamento per mezzo delle microonde sfrutta le proprietà che le sostanze chimiche hanno di assorbire l'energia direttamente dalle onde elettromagnetiche le quali, come si è detto, sono in grado di aumentare l'agitazione termica, e quindi la temperatura. L'energia fornita dalle radiazioni viene ceduta direttamente alla sostanza ed in tempi molto brevi. Tutte le sostanze caratterizzate da un dipolo, anche minimo, possono assorbire microonde come

tutti i dielettrici polari, i semiconduttori e i materiali magnetici. Fondamentalmente avviene che ogni dipolo diventa un centro ove si accumula energia e questa si trasferisce alle molecole circostanti attraverso gli urti fra il dipolo e queste. Essendo i dipoli uniformemente distribuiti il gradiente di temperatura all'interno di tutta la massa diventa pressoché nullo. Con questa tecnica si evitano i fenomeni di surriscaldamento sulla superficie esterna della massa, contrariamente a quanto avviene impiegando una fonte di calore tradizionale che agisce invece sulla superficie esterna per poi diffondersi all'interno del corpo per conduzione [20].

La natura delle sostanze poste a reagire, influenza notevolmente l'efficacia di riscaldamento. Pertanto se le sostanze/solventi sono apolari risultano trasparenti alle microonde, al contrario se i reagenti sono polari è possibile osservare una netta differenza nell'eseguire la reazione con un riscaldamento per conduzione rispetto a quello con le microonde.

La capacità di un materiale di convertire energia elettromagnetica in calore ad una data frequenza [50] è data dal fattore di dispersione che è definito come $\delta = \tan(\varepsilon''/\varepsilon')$; dove ε' è la costante dielettrica del mezzo e ε'' è la perdita dielettrica. La costante dielettrica ε' rappresenta la tendenza di una molecola ad essere polarizzata dal campo elettrico e la perdita dielettrica ε'' misura l'efficienza con cui l'energia trasportata dalla radiazione elettromagnetica è convertita in calore [20].

In base al fattore di dispersione i diversi materiali possono essere suddivisi in:

-riflettenti, cioè i metalli e le altre sostanze elettroconduttrici, che riflettono l'energia delle microonde e non si riscaldano;

-trasparenti, cioè i materiali isolanti di basso fattore di dispersione che si lasciano attraversare dalle microonde senza assorbire l'energia e quindi non si riscaldano;

-assorbenti, sono invece i dielettrici di alto fattore di dispersione che assorbono le microonde e si riscaldano [20].

Nel caso di formulazioni farmaceutiche, che sono sistemi multi-componenti, le proprietà dielettriche globali per una miscela di due o più sostanze sono funzione della perdita

dielettrica dei componenti e della loro relativa concentrazione; il contributo di ciascun componente al fattore di perdita dielettrica sembra essere proporzionale alla frazione del volume totale che esso occupa nella miscela [51].

Il dispositivo principale che costituisce un moderno forno a microonde è un particolare generatore di onde elettromagnetiche detto magnetron. La potenza può venir erogata in modo continuo o pulsato. Di solito nei forni a microonde domestici l'erogazione della potenza è di tipo pulsato, infatti il magnetron, per motivi tecnici, può operare solo alla sua potenza nominale, quindi la regolazione della potenza non avviene in modo diretto ma attraverso successivi cicli di accensione e spegnimento del magnetron. Questo metodo di erogazione della potenza risulta più che valido per forni a microonde destinati alla cottura dei cibi ma un po' insoddisfacente per l'utilizzo nel campo della ricerca e in ambiti industriali. In questi casi è utile l'uso di reattori a microonde dove la potenza può essere regolata tramite l'accensione in serie di diversi magnetron di piccola potenza il che garantisce un irraggiamento continuo dei prodotti anche a potenze minime [52]. Esistono inoltre reattori a microonde più avanzati (come per esempio quelli commercializzati dalla CEM Corporation) caratterizzati da un'emissione "focalizzata " delle microonde in una camera solitamente cilindrica e dotati di un controllo continuo della temperatura nei contenitori di reazione; è pertanto possibile fissare la temperatura massima raggiungibile mediante un apposito software che modula in continuo la potenza in funzione della temperatura, evitando così reazioni fortemente esotermiche o che escono facilmente fuori controllo [53].

5. PRODOTTI COMPOSITI A BASE DI UBIDECARENONE

5.1. MATERIALI E METODI

5.1.1 Materiali

L'Ubidecarenone è stato ottenuto da Prochifar Srl (Milano-Italia). I componenti delle fasi oleose sono gliceridi poliglicolizzati, forniti da Gattefossé (Milano–Italia) e Natural World (Ravenna-Italia). Come tensioattivo è stato utilizzato il polisorbato 80 acquistato da Sigma Aldrich (Milano-Italia) e come cotensioattivo la lecitina di soia acquistata da Lipoid GMBH (Ludwigshafen-Germania). L'acqua demineralizzata è stata acquistata da Baker (Bergamo-Italia). Il carrier utilizzato è il polivinilpirrolidone polimero reticolato micronizzato, ottenuto da BASF Italia Spa; al carrier è stata addizionata silice colloidale, ottenuta da Eigenmann & Veronelli (Milano-Italia).

Tutti i materiali utilizzati per la preparazione delle microemulsioni e il carrier sono classificati come GRAS (General Recognized As Safe).

Per la preparazione delle compresse i materiali utilizzati sono i seguenti:

Silice colloidale anidra ottenuta da Grace Davison (Worms-Germania), crospovidone ottenuto da BASF (Bergamo-Italia), calcio fosfato ottenuto da Comifar (Bologna-Italia) magnesio stearato ottenuto da Comifar (Bologna-Italia), talco ottenuto da Comifar (Bologna-Italia), amido pregelatinizzato ottenuto da Kröner Stärke (Ibbenbüren-Germania), miscela 75:25 lattosio e cellulosa microcristallina Microcelac ottenuta da Faravelli (Milano-Italia), cellulosa microcristallina Avicel 101 ottenuta da FMC Biopolymer (Walligstown-Irlanda), lattosio monoidrato Tablettose 100 ottenuto da Faravelli (Milano-Italia), cellulosa microcristallina Microcel 102 ottenuta da Faravelli (Milano-Italia).

5.1.2 Preparazione dei prodotti compositi

Sulla base di preliminari studi formulativi già descritti nel capitolo n. 4, come fase oleosa sono stati scelti tre diversi tipi di gliceridi poliglicolizzati, mentre acqua depurata per quella acquosa. Con ciascun olio selezionato, la microemulsione O/A è stata allestita disperdendo la fase oleosa in acqua unitamente al tensioattivo lavorando sotto agitazione a 300 rpm per 2 ore. La microemulsione doppia è stata successivamente realizzata disperdendo detta microemulsione nella fase oleosa esterna, agitando a 400-500 rpm per circa 2 ore e mezza.

Ognuna delle tre microemulsioni doppie allestite è stata caricata sul carrier mantenuto in agitazione a 200-300 rpm operando in granulatore ad alta efficienza (Rotolab –Zanchetta Romaco) e dando origine così a tre compositi contraddistinti dal n° di lotto A, B e C. Per le successive caratterizzazioni è stata selezionata mediante setacci la frazione granulometrica inferiore a 2000 μm.

5.2 CARATTERIZZAZIONE DEL PRODOTTO COMPOSITO

5.2.1 Contenuto di farmaco

Una quantità esattamente pesata di prodotto composito è stata sospesa in fase mobile e sonicata in bagno ultrasuoni per 30 min. Dopo filtrazione con membrana di cellulosa rigenerata da 0,45 μm, la determinazione quantitativa del principio attivo è stata effettuata mediante analisi HPLC (Spectra System SCM 1000) utilizzando una colonna a fase inversa C-18 Novapack® (3,9 mmx110 mm, 5 μm) ottenuta da Waters Spa (Milano-Italia). La fase mobile era costituita da acetonitrile:tetraidrofurano 80:20 (v/v). L'analisi è stata effettuata impiegando un flusso di 1,5 ml/min e la lettura spettrofotometrica è stata condotta a 275 nm (Spectra Series UV150).

5.2.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

Per la caratterizzazione DSC è stato utilizzato un calorimetro differenziale Mettler DSC Ta 4000 collegato ad una cella calorimetrica Mettler DSC 20. L'analisi è stata eseguita utilizzando campioni contenenti 1 mg di p.a., nell'intervallo di temperatura di 25-140 °C, con una velocità si scansione pari a 10 °C/min.

5.2.3 Raggi X su polvere (PXRD)

Per la caratterizzazione ai raggi X è stato utilizzato un diffrattometro STOE D500, usando la radiazione Cu-Kα monocromatizzata mediante un cristallo di grafite. I campioni sono stati analizzati nell'intervallo di angolo 2θ da 3 a 40°, con un passo di 0,04° di angolo 2θ e con tempi di conteggio pari a 2 secondi. La corrente usata era di 20 mA e il voltaggio di 40 kV.

5.2.4 Termomicroscopia (HSM)

Questi esperimenti sono stati condotti ponendo i campioni su di un vetrino da microscopio collocato in un tavolino riscaldante (Mettler FP 52), collegato ad un apparecchio per il controllo della temperatura (Mettler FP 5). Le transizioni di fase sono state osservate con un microscopio ottico (Reichert Biovar) equipaggiato con oculari e obiettivi 10x (100 ingrandimenti). Il riscaldamento è stato eseguito alla velocità di 3 °C/min e 1 °C/min nell'intervallo di temperatura 25-45 °C.

5.2.5 Cinetica di solubilizzazione in fluido intestinale simulato (pH 7.4)

Prima di analizzare il prodotto composito, il saggio di cinetica di solubilizzazione è stata effettuato sul p.a. commerciale. Una quantità in eccesso di Ubidecarenone è stata dispersa in 50 ml di fluido intestinale simulato termostatato a 37 °C e posta in un bagno scuotitore (Isco-mod. SBH-I). A determinati intervalli di tempo, 5 ml del campione venivano prelevati, filtrati

attraverso membrana filtrante da 0,45 μm ed il p.a. quantizzato mediante HPLC, secondo il metodo descritto sopra.

Nelle stesse condizioni e seguendo la medesima procedura operativa il saggio di cinetica di solubilizzazione è stato effettuato sul prodotto composito. Il prodotto composito pesato conteneva una quantità di Ubidecarenone equivalente a quella utilizzata in cinetica di solubilizzazione per il solo p.a..

5.2.6 Determinazione delle dimensioni della microemulsione rilasciata

La misura delle gocce di microemulsione che vengono rilasciate dal prodotto composito è stata effettuata disperdendo una determinata quantità di prodotto composito nel fluido intestinale simulato termostatato a 37 °C in un bagno scuotitore (Isco-mod. SBH-I). Le condizioni utilizzate per il test erano uguali a quelle già descritte per il saggio di cinetica di solubilizzazione. A determinati intervalli di tempo 5 ml di sospensione acquosa venivano prelevati e centrifugati a 2000 rpm (centrifuga ALC mod. PK110, raggio 0,148 m) per 30' allo scopo di separare il carrier dal surnatante contenente la microemulsione rilasciata. Il surnatante veniva poi filtrato attraverso filtro da 5 μm ed analizzato mediante laser light scattering (Coulter – mod. N4 Plus).

Per confronto, il medesimo esperimento è stato eseguito sulla sola doppia microemulsione.

5.3 STUDI *IN VIVO*

Gli studi di assorbimento sono stati condotti su ratti del tipo Sprague-Dawley del peso di 250-280 g, mantenuti a digiuno per circa 12 ore. Il prodotto composito è stato somministrato in sospensione acquosa alla dose singola di 100 mg/kg per ogni animale. Per confronto, agli animali è stato somministrato un prodotto commerciale .

I campioni di sangue prelevati dall'aorta addominale a diversi tempi sono stati posti in provette eparinizzate. Per ogni tempo è stato utilizzato un gruppo di 5 animali.

La frazione di plasma è stata separata dal sangue per centrifugazione a 2500 rpm (centrifuga ALC mod. PK110, raggio 0,148 m) per 15' e la quantità di farmaco assorbita è stata determinata mediante analisi HPLC.

5.4 PREPARAZIONE DI FORME FARMACEUTICHE SOLIDE ORALI

5.4.1 Preparazione di capsule opercolate

In seguito a verifica della scorrevolezza del composito (saggio FU XI), la scelta della grandezza della capsula è stata verificata mediante misura del volume apparente del composito pari a 30 mg in principio attivo (dosaggio desiderato). Per l'allestimento del lotto da laboratorio ci si è avvalsi di una incapsulatrice di tipo manuale.

5.4.2 Preparazione di compresse

Al fine di ottenere compresse contenenti 30 mg di principio attivo e dal peso finale di 400 mg, è stato effettuato uno studio di fattibilità preparando miscele che contengano una determinata quantità di composito, in funzione del titolo, con silice colloidale (0,5%) in qualità di glidante, crospovidone (3%) in qualità di disgregante, magnesio stearato (1%) o talco (5%) in qualità di lubrificanti e diversi diluenti quali calcio fosfato, amido pregelatinizzato, Microcelac, Avicel, Tablettose utilizzati da soli o in combinazione.

In particolare, per quanto riguarda i diluenti, il calcio fosfato, utilizzato per aumentare la durezza delle compresse, è stato impiegato in quantità variabili dal 23% al 51% (p/p); l'amido pregelatinizzato, impiegato come legante, è stato utilizzato in quantità dal 5% al 20% (p/p); il Microcelac è stato utilizzato in quantità dal 27% al 42% (p/p); l'Avicel 101è stato utilizzato in

quantità dal 12% al 43% (p/p); il Tablettose 100 è stato utilizzato in quantità dal 30% al 46% (p/p); infine il Microcel 102 è stato utilizzato in quantità del 15% (p/p).

La miscelazione delle polveri è stata effettuata in un miscelatore a testa cubica da laboratorio pilota. Sulle diverse miscele allestite sono state effettuate le caratterizzazioni tecnologiche utilizzando le seguenti apparecchiature:

-Pigiatore Giuliani IG/4 per la determinazione del volume apparente secondo saggio F.U.I. vigente

-Pharma test PTG-1 per la determinazione della scorrevolezza secondo saggio F.U.I. vigente

L'Indice di Carr è stato quindi determinato applicando la nota formula:

I.C. (%) = $(D_i-D_0) \times 100 / D_i$, dove D_i indica la densità dopo impaccamento e D_0 la densità iniziale.

Per le prove di compressione diretta è stata utilizzata una comprimitrice rotativa Ronchi serie AM 8 dotata di punzoni dal diametro di 10 mm (la forza di compressione veniva adeguatamente regolata in fase di compressione essendo chiaramente funzione delle caratteristiche tecnologiche della miscela da comprimere).

Per le successive caratterizzazioni tecnologiche si è ricorsi all'uso delle seguenti strumentazioni:

-Erweka TA-VZ per il saggio della friabilità cprs secondo F.U.I. vigente

-Erweka TBH 30 tablet hardness tester per la determinazione del carico di rottura cprs secondo F.U.I. vigente

-Erweka ZT 3 per la determinazione del tempo di disgregazione delle cprs secondo saggio F.U.I. vigente

-Bilancia tecnica per il saggio dell'uniformità di massa secondo FU.

5.5 RISULTATI E DISCUSSIONE

5.5.1 Preparazione dei prodotti compositi

Viene qui di seguito riportata la composizione dei tre lotti allestiti:

Componenti	Prodotto composito		
	A	**B**	**C**
Ubidecarenone	10,40%	16,75%	10,20%
Gliceridi Poliglicolizzati	28,73%	27,54%	18,12%
Lecitina di Soia	5,75%	5,51%	--
Polisorbato 80	0,43%	0,31%	18,14%
Acqua	1,02%	0,71%	6,40%
PVP CLM	52,45%	47,24%	46,18%
Silice colloidale	1,23%	1,90%	0,96%

5.5.2 Contenuto di farmaco

Il contenuto percentuale dell'Ubidecarenone nei diversi prodotti compositi, determinato mediante HPLC, è qui di seguito riportato:

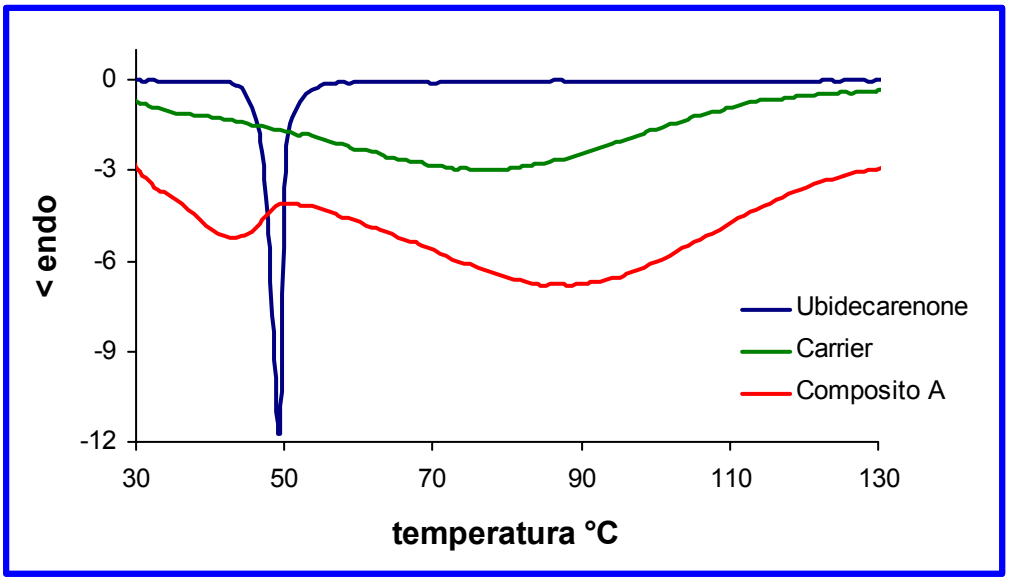
	A	**B**	**C**
Contenuto percentuale	10,39	16,96	10,62

5.5.3 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

Dall'analisi DSC dell'Ubidecarenone commerciale è stato osservata la presenza di un unico evento endotermico a 51.5°C corrispondente al suo punto di fusione. Nel caso del composito A uno shift del punto di fusione alla temperatura di 42,9 °C è stato rilevato unitamente all'abbassamento ed allargamento dell'evento endotermico a testimonianza dell'interazione tra i componenti ed all'avvenuta riduzione in cristallinità del p.a.. La banda di disidratazione del carrier era inoltre evidenziata. I risultati DSC di ciascun composito analizzato sono qui di seguito riportati e posti a confronto col solo principio attivo.

Composito A:

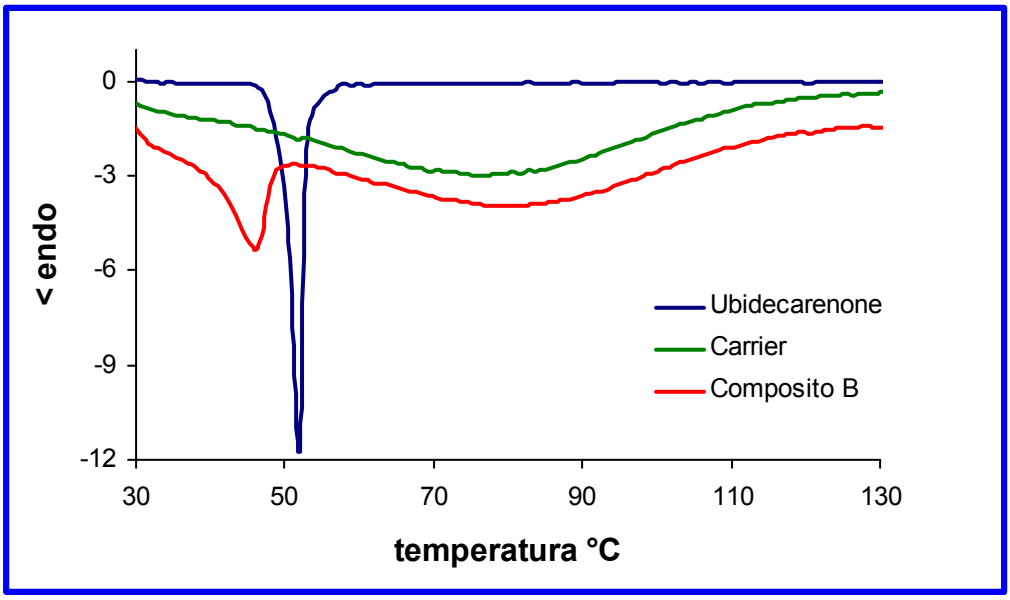
Campione	**Peso (mg)**	**P.to di fusione (°C)**	**ΔH (J/g)**	**Cristallinità residua**
Ubidecarenone	1,19	51,5 °C	144	100%
Composito A	9,67 (1,00 mg p.a.)	42,9 °C	62	43%



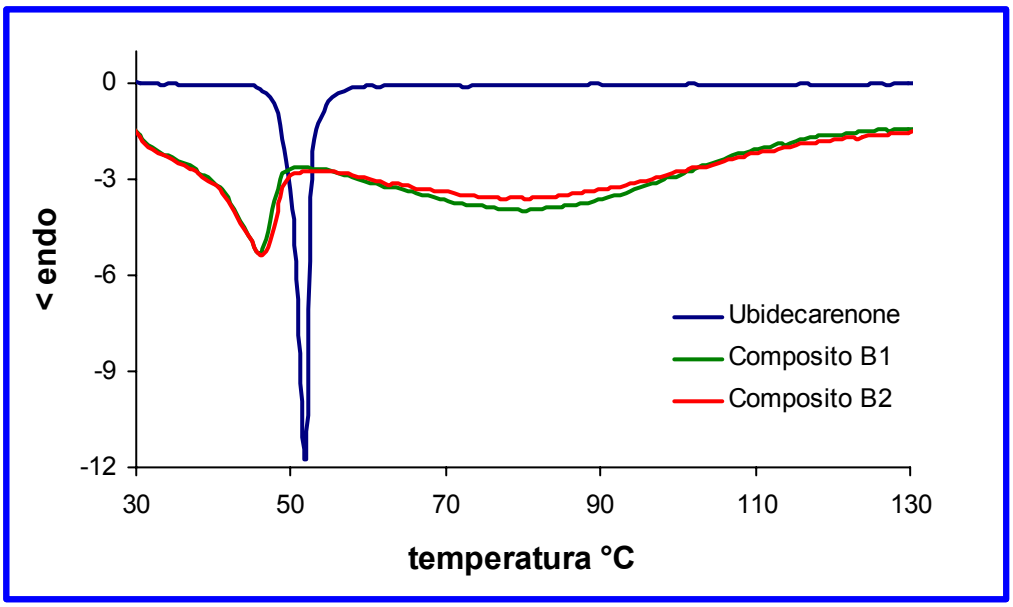
Medesimo fenomeno, sopra descritto, è stato riscontrato anche nel campione B.

Composito B

Campione	Peso (mg)	P.to di fusione (°C)	ΔH (J/g)	Cristallinità residua
Ubidecarenone	1,19	51,5 °C	144	100%
Composito B	6,11 (1,04 mg p.a.)	45,8	78	54%



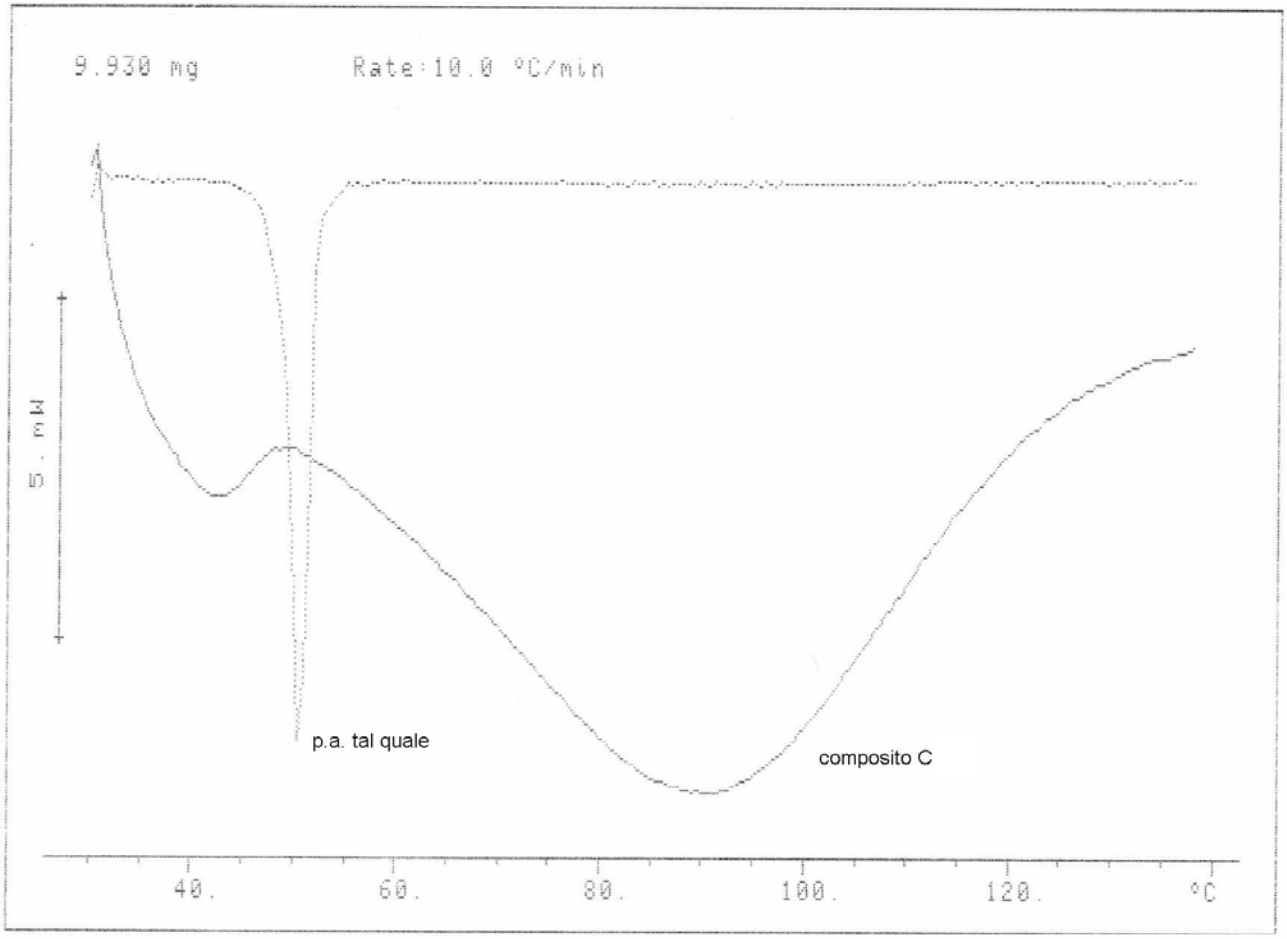
La riproducibilità dei lotti è stata oggetto di indagine e, come qui di seguito esemplificato per il composito B (B1 e B2), è stata evidenziata.



Lo stesso tipo di comportamento descritto per i compositi A e B è stato riscontrato anche nel caso del composito C. Si osserva infatti la riduzione del picco relativo al p.a. e lo spostamento del punto di fusione.

Composito C

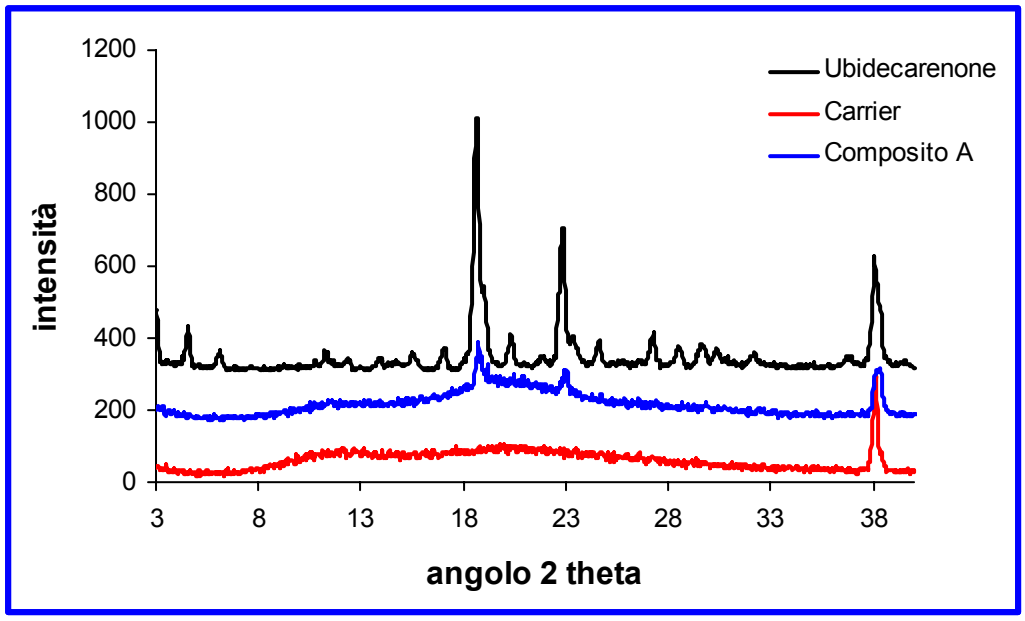
Campione	Peso (mg)	P.to di fusione (°C)	ΔH (J/g)	Cristallinità residua
Ubidecarenone	1,19	51,5 °C	144	100%
Composito C	9,93 (1,05 mg p.a.)	41,7 °C	68	47%

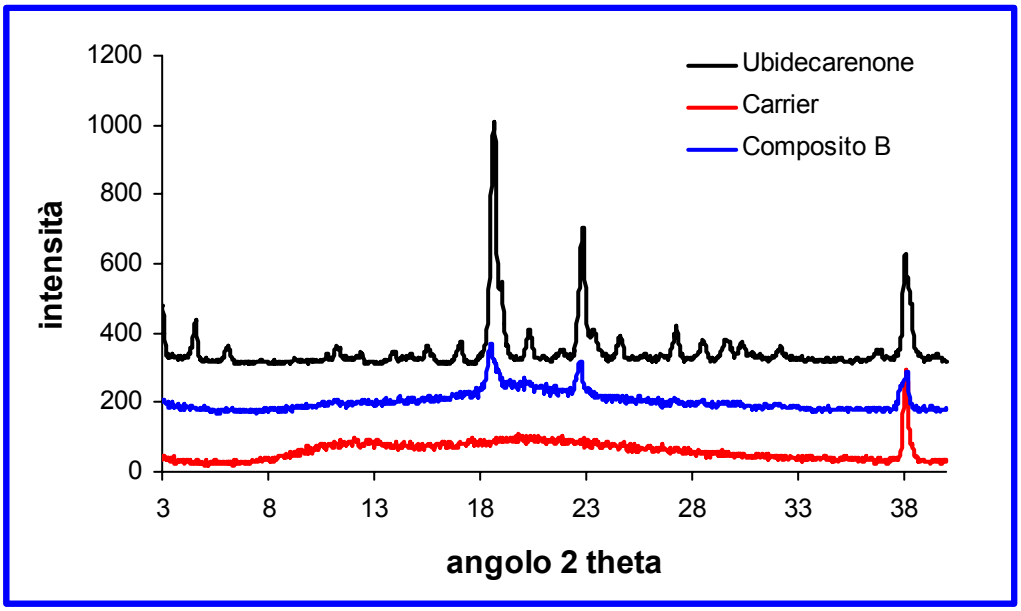


Nei tre lotti considerati, l'allargamento del picco e lo spostamento della temperatura di fusione a valori più bassi sono ascrivibili alla formazione di micro-nanocristalli.

5.5.4 Raggi X su polvere (PXRD)

L'analisi PXRD dell'Ubidecarenone commerciale conferma il suo stato cristallino, analogamente a quanto osservato dalla caratterizzazione in DSC. Sono stati identificati tre principali picchi di riferimento, ai seguenti valori di angolo 2θ: 18,68° - 22,88° e 38,08°. Per i confronti sono stati considerati i valori di angolo pari a 18,68° e 22,88°. A questi valori di angolo selezionati, nel caso del composito A e del composito B è stata osservata una riduzione nell'intensità dei segnali ad indicare una diminuzione della cristallinità del principio attivo veicolato come si evidenzia nella seguente figura:





5.5.5 Termomicroscopia (HSM)

L'Ubidecarenone si presenta sotto forma di cristalli di forma prevalentemente cubica e di dimensione di circa 10-20 μm. La temperatura di fusione è compresa nell'intervallo di temperatura 50,3 – 52,0 °C, valore in linea con quanto osservato in DSC. Dopo raffreddamento si osservano dei cristalli di piccole dimensioni e di forma rotondeggiante.

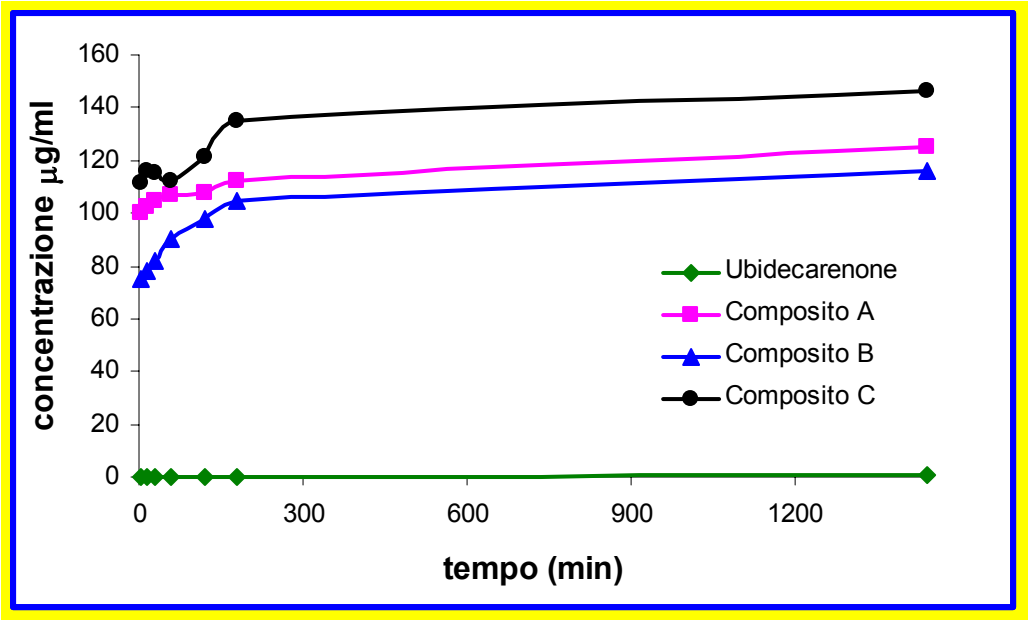
Per una più agevole indagine data l'alta quantità di carrier presente nei compositi, l'osservazione è stata effettuata sulla sola microemulsione doppia ponendola a confronto col solo principio attivo.

Analogamente a quanto evidenziato nell'analisi DSC, anche nelle tre microemulsioni considerate è stata riscontrata la fusione dei cristalli, di aspetto aghiforme, a temperature più basse rispetto al solo principio attivo.

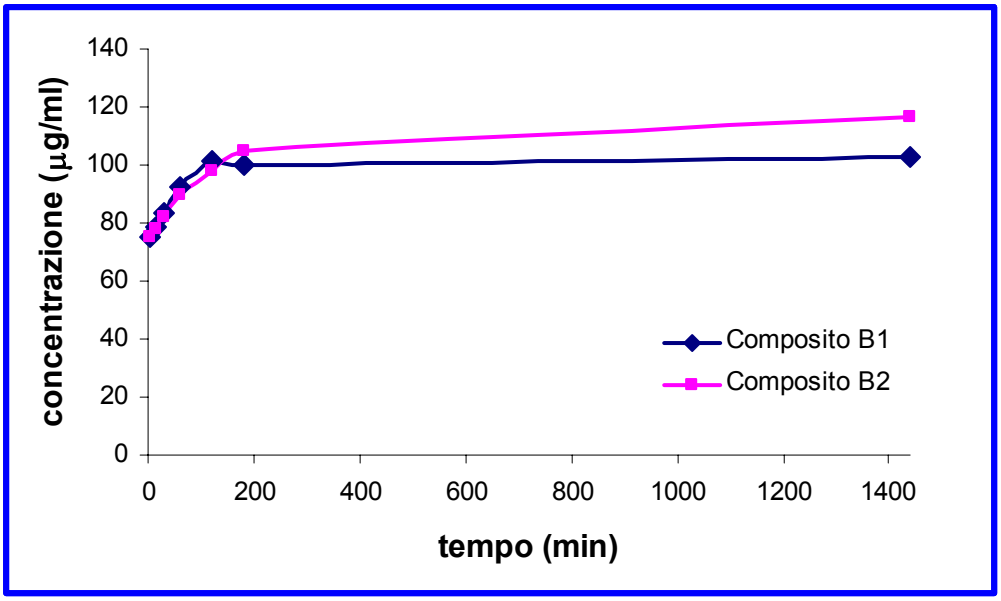
5.5.6 Cinetica di solubilizzazione in fluido intestinale simulato (pH 7.4)

La cinetica di solubilizzazione di ciascun composito è stata confrontata con quella del solo principio attivo. La solubilità all'equilibrio dell'Ubidecarnone commerciale determinata mediante HPLC è risultata pari a 0,72 μg/ml.

Nel caso del composito A è stato osservato un aumento della solubilità dell'Ubidecarenone alla 24a ora pari a 170 volte maggiore rispetto al principio attivo tal quale. Ai medesimi tempi, l'aumento di solubilità dell'Ubidecarenone nei compositi B e C è risultata essere rispettivamente di 160 e 200 volte maggiore. Tale risultato è ascrivibile alla formazione di micro-nanocristalli come evidenziato nell'analisi DSC.

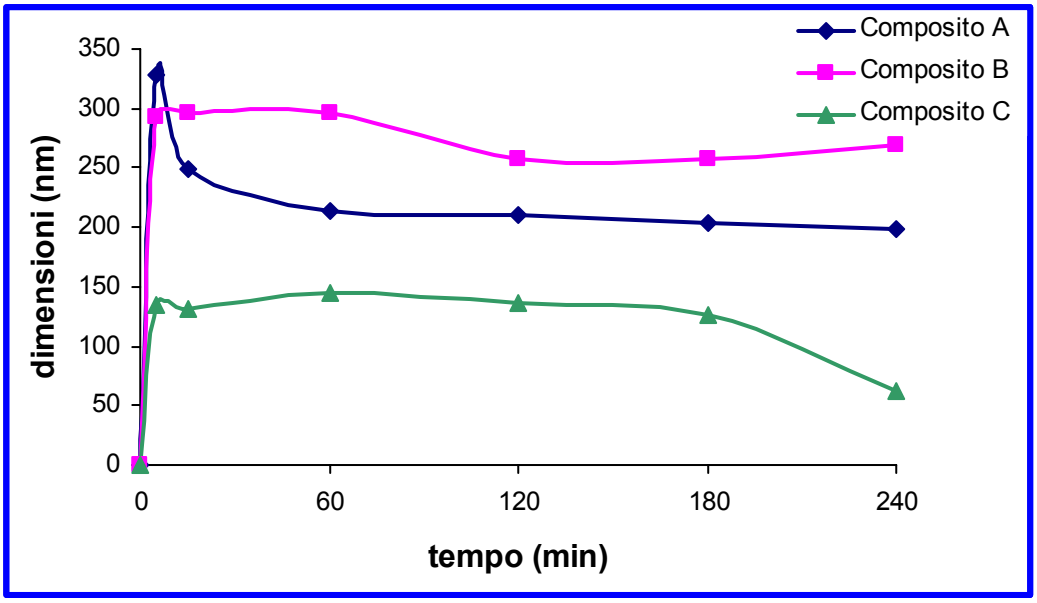


Come qui di seguito evidenziato, la riproducibilità dei lotti B1 e B2 è stata confermata.

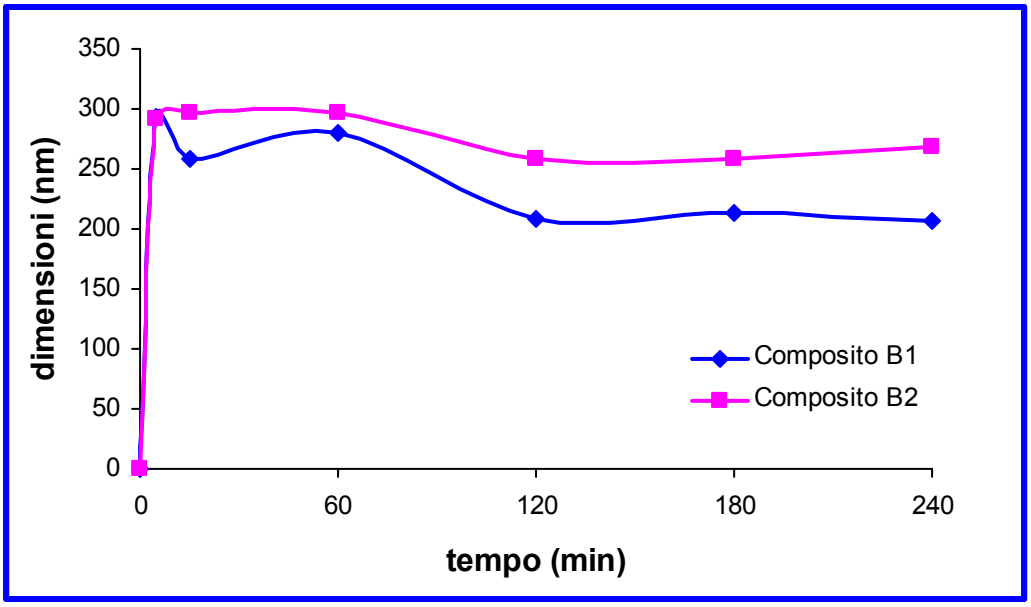


5.5.7 Determinazione delle dimensioni della microemulsione rilasciata

La misura delle dimensioni delle gocce di microemulsione rilasciata dai prodotti compositi, effettuata nelle stesse condizioni del saggio di cinetica di solubilizzazione (pH=7.4), evidenzia che per tutti e tre i prodotti compositi le dimensioni delle gocce di microemulsione sono comprese in un intervallo tra 150 e 300 nm con un andamento piuttosto costante nel tempo.



Inoltre dal confronto dei due lotti del composito B, risulta evidente la buona riproducibilità delle dimensioni della microemulsione rilasciata.



5.6 STUDI *IN VIVO*

Gli studi *in vivo* su ratti hanno evidenziato un aumento della concentrazione plasmatica dell'Ubidecarenone dopo la somministrazione di tutti i compositi considerati. A titolo esemplificativo, vengono di seguito riportati i risultati relativi alla somministrazione del composito A dai quali si evince una migliore attività rispetto al prodotto commerciale di riferimento. Inoltre la Cmax rilevata per il prodotto composito è risultata essere circa 10 volte quella dell'Ubidecarenone basale, mentre il prodotto commerciale di riferimento era di circa 5 volte.

	Composito A	**Prodotto commerciale**
AUC (μg·h/ml)	0,980 ± 0,525	0,33 ± 0,209
Cmax (μg/ml)	1,605 ± 0,340	0,78 ± 0,240
Tmax (h)	2	2

5.7 PREPARAZIONE DI FORME FARMACEUTICHE SOLIDE ORALI

Per l'allestimento delle forme farmaceutiche è stato selezionato il composito B anche se dalle precedenti caratterizzazioni tecnologiche, tutti i compositi allestiti sono risultati essere buoni candidati.

5.7.1 Preparazione di capsule opercolate

Dall'analisi del volume apparente corrispondente a 300 mg di composito è stata scelta la capsula 0. Sono state quindi facilmente allestite 100 capsule senza la necessità di ricorrere all'uso di ulteriori eccipienti, quali diluenti o lubrificanti.

Il saggio dell'uniformità di massa è stato eseguito ed è risultato essere conforme ai limiti previsti dalla Farmacopea Ufficiale.

5.7.2 Preparazione di compresse

Le miscele utilizzate per la preparazione di compresse avevano indice di Carr compreso tra 16 e 25%. Dalle prove di compressione è risultato che, dal punto di vista tecnologico, la miscela ottimale, in termini di massa, aspetto e durezza, ha la composizione riportata nella seguente tabella:

Componente	Percentuale
COMPOSITO B	47,5%
SILICE COLLOIDALE	0,5%
CROSPOVIDONE	3%
MAGNESIO STEARATO	1%
AMIDO PREGELATINIZZATO	5%
CALCIO FOSFATO	28%
MICROCEL 102	15%

E' necessario però tenere presente che la massima durezza ottenuta era di 50 N (saggio FU), probabilmente a causa dell'elevata quantità di fase oleosa presente.

5.8 CONCLUSIONI

La tecnologia preparativa adottata unitamente alla selezione dei componenti, hanno dimostrato il raggiungimento dell'obiettivo del presente lavoro e cioè l'aumento della biodisponibilità in vivo dell'Ubidecarenone. Le caratteristiche tecnologiche del materiale composito hanno permesso un'agevole realizzazione di capsule rigide ma, con un'ulteriore selezione di eccipienti per compressione diretta, si potrà realizzare anche la forma di dosaggio in compresse.

6. PRODOTTO COMPOSITO A BASE DI CICLOSPORINA

6.1 MATERIALI E METODI

6.1.1 Materiali

La ciclosporina è stata ottenuta da Poli Industria Chimica (Milano-Italia). I componenti della fase oleosa sono gliceridi a catena media (Karlshamn-Svezia) e olio vegetale comune. Come tensioattivo è stato utilizzato il Polisorbato 80 acquistato da Sigma Aldrich (Milano-Italia). L'acqua demineralizzata è stata acquistata da Baker (Milano-Italia). Il carrier utilizzato è il polivinilpirrolidone polimero reticolato micronizzato, ottenuto da BASF (Bergamo-Italia).
Tutti i materiali utilizzati per la preparazione delle microemulsioni e il carrier sono classificati come GRAS (General Recognized As Safe).

6.1.2 Preparazione del prodotto composito

Una volta selezionato il componente oleoso o la miscela oleosa nella quale il p.a. risulta essere maggiormente solubile come riportato nel capitolo n. 4, è stata preparata la microemulsione O/A disperdendo la fase oleosa in acqua in combinazione con tensioattivo sotto agitazione a 350 rpm per 1 ora. La dispersione della microemulsione o/a nella fase oleosa esterna è stata effettuata agitando a 400 rpm per circa 2 ore e mezza. Il prodotto composito oggetto di studio è stato preparato su scala ridotta in mortaio.

6.2 CARATTERIZZAZIONE DEL PRODOTTO COMPOSITO

6.2.1 Contenuto di farmaco

Una quantità esattamente pesata di prodotto composito è stata sospesa in fase mobile e sonicata in bagno ultrasuoni per 30 min. Dopo filtrazione con membrana di cellulosa rigenerata da 0,45 μm la determinazione quantitativa del principio attivo è stata effettuata

mediante analisi HPLC (Spectra System SCM 1000.) utilizzando una colonna a fase inversa Supelco Discovery HS C18 (25 cm x 4,6 mm, 5 μm ottenuta Sigma-Aldrich (Milano). La fase mobile utilizzata era costituita da acqua:acetonitrile:acido fosforico:1,1 dimetiletere 500:500:1:70 (v/v). L'analisi è stata effettuata utilizzando un flusso di 1,1 ml/min con lettura è stata condotta a 210 nm, termostatando a 75°C (Spectra Series UV150).

6.2.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

Per la caratterizzazione DSC è stato utilizzato un calorimetro differenziale Mettler DSC Ta 4000 collegato ad una cella calorimetrica Mettler DSC 20. L'analisi è stata eseguita utilizzando campioni contenenti 1 mg di p.a., nell'intervallo di temperatura di 25-200 °C, con una velocità di scansione di 50 °C/min. La medesima procedura è stata seguita anche per il p.a. tal quale e il carrier.

6.2.3 Raggi X su polvere (PXRD)

Per la caratterizzazione ai raggi X è stato utilizzato un diffrattometro STOE D500, usando la radiazione Cu-Kα monocromatizzata mediante un cristallo di grafite. I campioni sono stati analizzati nell'intervallo di angolo 2θ da 3 a 40 ° con un passo di 0,04 gradi di 2θ e con tempi di conteggio di 2 secondi. La corrente usata era di 20 mA e il voltaggio di 40 kV.

6.2.4 Cinetica di solubilizzazione in fluido intestinale simulato (pH 7.4)

Prima di analizzare il prodotto composito, il saggio di cinetica di solubilizzazione è stato effettuato sul p.a. commerciale. Una quantità di principio attivo è stata dispersa in 100 ml di fluido intestinale termostatato a 37 °C e posta in un bagno scuotitore (Isco-mod. SBH-I). A determinati intervalli di tempo, 5 ml del campione venivano prelevati, centrifugati a 2000 rpm (centrifuga ALC mod. PK110, raggio 0,148 m) per 30' e filtrati con filtro a siringa da 0,45

μm. La determinazione quantitativa del p.a. è stata fatta mediante HPLC, secondo il metodo descritto al paragrafo precedente.

Nelle stesse condizioni e seguendo la medesima procedura operativa il saggio di cinetica di solubilizzazione è stato condotto sul prodotto composito. Il prodotto composito pesato conteneva una quantità di principio attivo equivalente a quella utilizzata in cinetica di solubilizzazione per il solo p.a..

6.2.5 Determinazione delle dimensioni della microemulsione rilasciata

La misura delle gocce di microemulsione rilasciate dal prodotto composito è stata effettuata disperdendo una determinata quantità di prodotto composito nel fluido a pH=7.5 termostatato a 37°C in un bagno scuotitore (Isco-mod. SBH-I). Le condizioni utilizzate per il test sono uguali a quelle già descritte per il saggio di cinetica di solubilizzazione. A determinati intervalli di tempo 5 ml di sospensione acquosa venivano prelevati e centrifugati a 2000 rpm (centrifuga ALC mod. PK110, raggio 0,148 m) per 30' allo scopo di separare il carrier dal surnatante contenente la microemulsione rilasciata. Il surnatante veniva poi filtrato con filtro a siringa da 5 μm e poi analizzato mediante laser light scattering (Coulter – mod. N4 Plus). Per confronto, il medesimo esperimento è stato eseguito sulla sola doppia microemulsione.

6.3 STUDI *IN VIVO*

Gli studi di assorbimento sono stati condotti su ratti maschi del tipo Wistar del peso di 320-340 g, mantenuti a digiuno per circa 12 ore, ma con la possibilità di bere acqua. Il prodotto composito è stato somministrato in sospensione acquosa con un gavage alla dose singola di 40 mg/kg per ogni animale. Tutto l'esperimento è stato condotto mantenendo gli animali in anestesia. Per ogni tempo è stato utilizzato un gruppo di 5 animali.

I campioni di sangue prelevati dalla giugulare a diversi tempi sono stati posti in provette contenenti una soluzione di eparina bovina. La frazione plasmatica è stata addizionata di etere etilico e dopo estrazione è stato prelevato il surnatante, portato a secco e risospeso in fase mobile. La concentrazione di ciclosporina è stata determinata mediante analisi HPLC.

6.4 RISULTATI E DISCUSSIONE

6.4.1 Preparazione del prodotto composito

Il prodotto composito preparato è indicato con la lettera D e la composizione percentuale è la seguente:

Componenti	Prodotto composito D
Ciclosporina	10,00%
Gliceridi a catena media	13,31%
Olio vegetale	25,08%
Polisorbato 80	0,98%
Acqua	0,73%
PVP CLM	49,91%

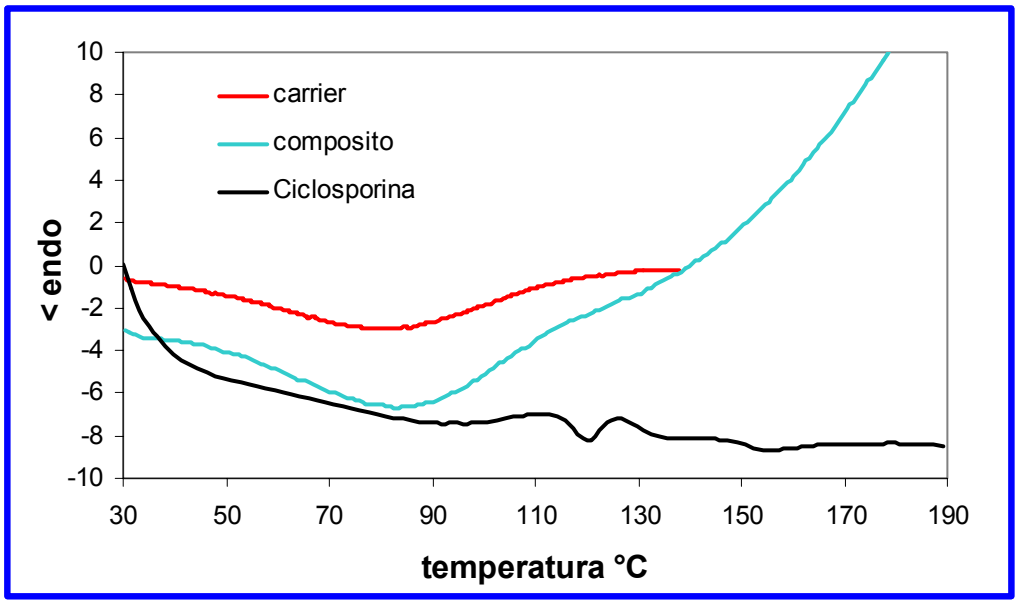
6.4.2 Contenuto di farmaco

Il contenuto percentuale di ciclosporina nel prodotto composito, determinato mediante HPLC, è risultato pari a 9,9% rispetto ai 10 teorici.

6.4.3 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

Il termogramma DSC della ciclosporina commerciale evidenzia una discontinuità nel flusso di calore a partire da 100°C, probabilmente associata alla transizione vetrosa del principio attivo. Questo fenomeno descritto nello stesso intervallo anche da Passerini e Craig [54], indica la

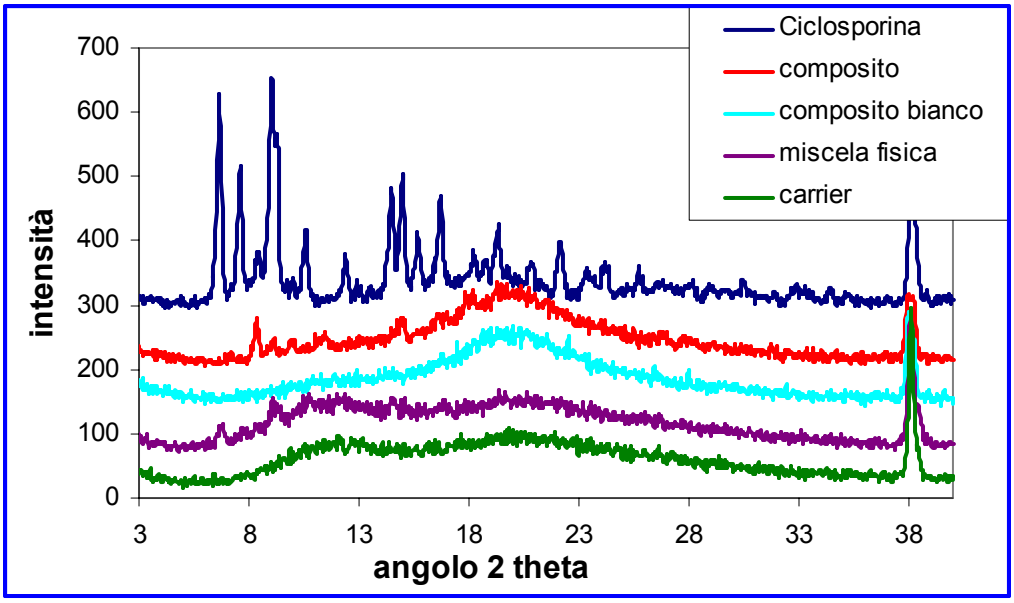
presenza di un certo grado di stato amorfo del p.a. nativo. A 145°C il p.a. fonde mentre a partire dai 170°C si osserva un intenso effetto esotermico dovuto probabilmente alla sua degradazione termica [54]. Il termogramma del crospovidone è caratterizzato da un'ampia endoterma con un massimo a 80°C, dovuto all'acqua assorbita dal polimero igroscopico. La curva DSC del prodotto composito evidenzia soltanto due eventi endotermici: la disidratazione del carrier seguita dalla degradazione termica della ciclosporina. Inoltre, nel termogramma qui di seguito riportato, non è stata rilevata né l'endoterma di rilassamento in corrispondenza della transizione vetrosa del p.a., a causa della sovrapposizione con la banda di disidratazione del carrier, né la fusione del p.a..



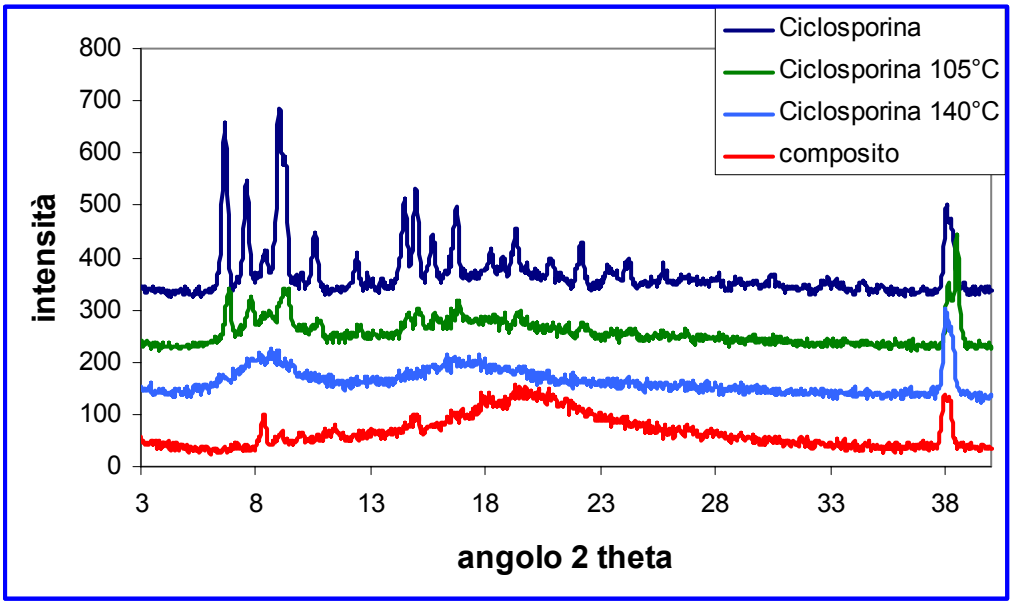
6.4.4 Raggi X su polvere (PXRD)

Il diffrattogramma del p.a. commerciale, simile a quello riportato da Young et al. [55], ne evidenzia la presenza in uno stato semicristallino caratterizzato da numerosi picchi ad alta intensità. Il crospovidone evidenzia un profilo PXRD tipico di una sostanza completamente amorfa, privo pertanto di picchi ben definiti. Il diffrattogramma del sistema composito presenta una forte riduzione dell'intensità dei picchi del p.a. e pertanto la ciclosporina è

presente in forma cristallina solo in tracce. Al fine di confermare questo dato, l'effetto di diluizione del carrier sull'intensità del segnale del p.a. puro è stato studiato analizzando una semplice miscela fisica. Da tale confronto è risultato che il grado di cristallinità della ciclosporina è inferiore al 20%. Inoltre è stata indagata la banda allargata compresa nell'intervallo di angolo 2 theta tra 16 e 24 gradi, confrontando il prodotto composito con un composito analogo bianco (avente cioè la stessa composizione ma privo del p.a.). I diffrattogrammi sono risultati sovrapponibili nell'intervallo succitato confermando che la banda allargata è dovuta ai componenti oleosi presenti nella formulazione e non all'amorfizzazione della ciclosporina. In particolare proprio in questo range i trigliceridi mostrano la loro tipica banda, chiamata "short spacing"[56].

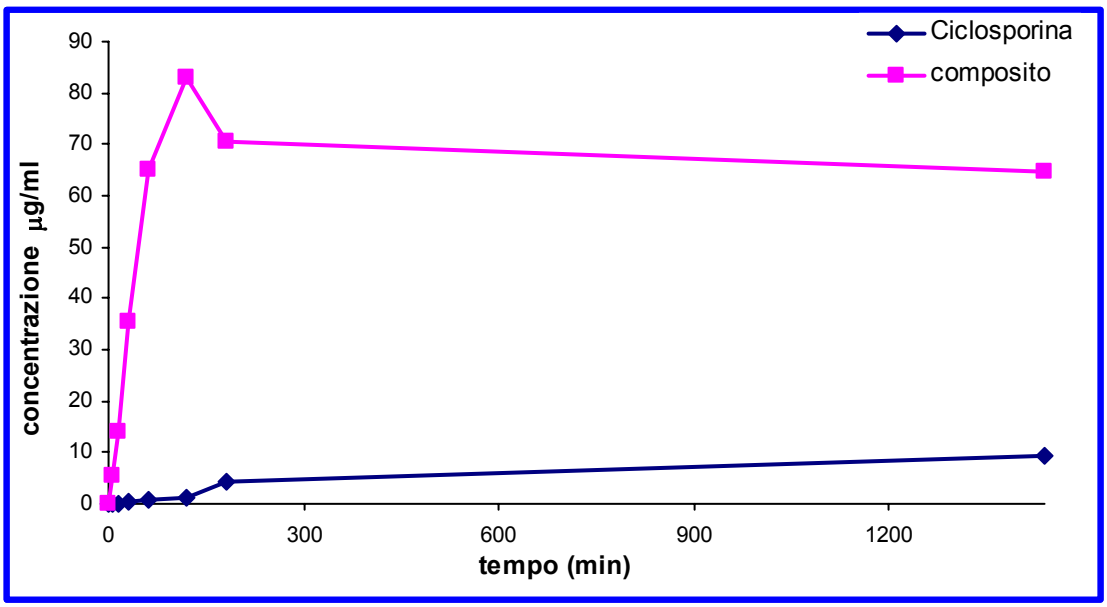


Infine il prodotto composito è stato confrontato con campioni di ciclosporina amorfa ottenuta scaldando a 140 °C per 30 minuti. Quest'ultimo evidenziava un intenso fenomeno di scattering e due bande tra 6 e 9 e tra 13 e 20 gradi di angolo 2 theta: tale diffrattogramma non corrisponde con quello ottenuto per il prodotto composito come riportato nella successiva immagine. Pertanto è stato confermato che la ciclosporina nel prodotto NEC non è presente allo stato amorfo ma è molecolarmente dispersa nella fase oleosa della doppia microemulsione. L'assenza di fenomeni di ricristallizzazione è stata anche confermata.


Ciclosporina
Ciclosporina 105°C
Ciclosporina 140°C
composito
intensità
800
700
600
500
400
300
200
100
0
3
8
13
18
23
28
33
38
angolo 2 theta

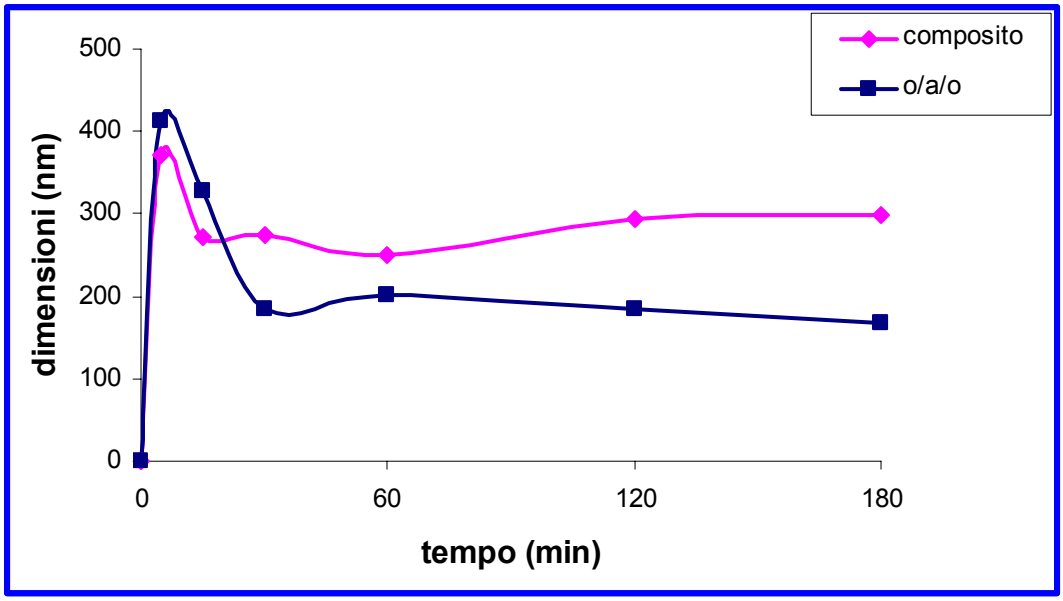
6.4.5 Cinetica di solubilizzazione in fluido intestinale simulato (pH 7.4)

La cinetica di solubilizzazione del prodotto composito descritto evidenzia che la concentrazione di ciclosporina rilasciata dal composito è notevolmente maggiore rispetto al principio attivo come quale. All'equilibrio (dopo 24 h) la concentrazione di ciclosporina solubilizzata nel caso del prodotto composito era circa 7 volte maggiore. Inoltre il profilo della cinetica di solubilizzazione evidenzia il mantenimento dell'effetto di sovrasaturazione per un tempo abbastanza lungo (24 h circa) indicando pertanto l'assenza di una massiccia ricristallizzazione come qui di seguito illustrato.



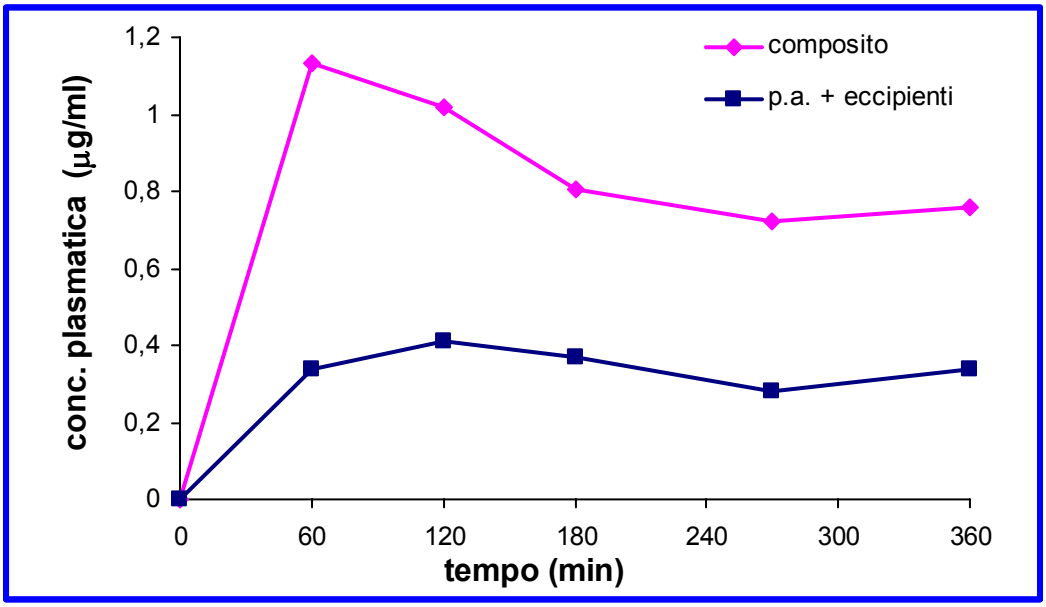
6.4.6 Determinazione delle dimensioni della microemulsione

La dimensione delle gocce di microemulsione rilasciate dal sistema NEC si attestavano intorno ai 300-400 nm nei tempi iniziali e fino a 30 minuti, per poi ridursi a 200 nm e rimanere costante in tutto l'intervallo considerato. La dimensione delle gocce rilasciate è risultato simile a quella della microemulsione doppia di partenza prima di essere caricata sul carrier polimerico, attestando pertanto il mantenimento della doppia microemulsione di partenza.



6.5 STUDI *IN VIVO*

Il profilo farmacocinetico ha evidenziato un aumento della biodisponibilità della ciclosporina formulata come composito NEC, rispetto alla miscela del p.a. con tutti i componenti della formulazione. Ciò indica che il forte aumento di biodisponibilità riscontrato è dovuto alla tecnologia NEC adottata e non all'effetto della somma degli eccipienti. In particolare il valore di AUC espresso in μg/ml*h è pari a 48.5 nel caso del composito e 19.2 per il sistema costituito dal principio attivo addizionato degli eccipienti; pertanto l'aumento di biodisponibilità è pari a 2,5 volte.



6.6. CONCLUSIONI

Il prodotto composito preparato è dunque risultato essere in grado di aumentare la biodisponibilità in vivo della ciclosporina rispetto alla materia prima commerciale.

7. PRODOTTI COMPOSITI A BASE DI IBUPROFENE

7.1 MATERIALI E METODI

7.1.1 Materiali

L' ibuprofene è stato fornito dalla ditta Comifar (Treviso). Sono stati impiegati i seguenti eccipienti: Polivinilpirrolidone/vinilacetato 60/40 w/w PVP/VA 64 (BASF – Milano) e idrossipropil-β-ciclodestrina (Carvasol W7 HP Pharma- Germania). L'etanolo utilizzato era di grado analitico (Carlo Erba, Milano).

7.1.2 Esperimenti preliminari

Al fine di uniformare il metodo preparativo delle DS alle MW, il lavoro sperimentale è iniziato attuando uno screening su: potenze e tempi di attivazione (600/900 W e da 1 a 15min), quantità di sistema binario da irradiare, rapporto farmaco:polimero (1:1 –1:2 - 1:3 p/p IBU:PVP/VA e 1:1 – 1:2 M IBU:HP-β-CD).

Questo iniziale screening è stato eseguito valutando l'aspetto finale del campione attivato e quindi la sua lavorabilità, unitamente allo studio mediante DSC dello stato solido del p.a. in seguito a trattamento con microonde (MW)

Sono stati pertanto selezionati i seguenti parametri di processo:

- Rapporti principio attivo:carrier: 1:1 p/p IBU:PVP/VA; 1:2 M IBU:HP-β-CD.
- Potenza: 600 W.
- Tempi d'attivazione: 6 minuti per i campioni IBU:PVP/VA; 15 minuti per i campioni IBU:HP-β-CD.

La posizione del campione all'interno della camera riscaldante del forno a microonde è stata studiata con un indicatore d'irraggiamento, che consiste in una lampada a basso voltaggio (inferiore a 1,5 volt) il cui filamento si illumina quando viene eccitato dalle microonde. Dopo

aver verificato così la posizione più adatta per collocare il campione, questa è stata mantenuta costante per l'attivazione di tutti i campioni analizzati.

7.1.3 Preparazione dei sistemi farmaco-polimero

Le miscele principio attivo:polimero sono state attivate mediante MW ottenendo i sistemi chiamati dispersioni solide (DS). Per le successive caratterizzazioni parte delle miscele non trattate sono state tenute quale campione di confronto e denominate miscele fisiche (MF). Per osservare l'influenza delle MW anche sui materiali di partenza, sempre per le successive caratterizzazioni sono state preparate anche delle MF a partire dai materiali singolarmente trattati (MFT).

Il forno a microonde impiegato è un Samsung mod. CE297DN.

Le DS così ottenute sono state polverizzate in molino da laboratorio (Janke & Kunkel IKA Labortechnik mod A10 – Germania) e quindi selezionata la frazione granulometrica 80-250 μm per le successive analisi. Il medesimo intervallo granulometrico è stato adottato anche per le MF e MFT.

7.2 CARATTERIZZAZIONE DEI SISTEMI

7.2.1 Contenuto di farmaco

Per determinare il contenuto d'ibuprofene nei sistemi binari è stata allestita una retta di taratura in etanolo. 50 mg di principio attivo sono stati sciolti in 100 ml di etanolo e da questa soluzione sono state preparate altre 6 a diverse concentrazioni, successivamente analizzate spettrofotometricamente a 220 nm (Biochrom mod Libra S12).

Una quantità esattamente pesata di ciascun sistema farmaco:polimero è stata sciolta in etanolo ed il contenuto di farmaco è stato determinato spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 220 nm (Biochrom mod Libra S12).

7.2.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

Per la caratterizzazione DSC è stato utilizzato un calorimetro differenziale Mettler DSC Ta 4000 collegato ad una cella calorimetrica Mettler DSC 20. L'analisi è stata eseguita utilizzando campioni di sistemi attivati e di miscele fisiche contenenti l'equivalente di circa 2 mg di ibuprofene, nell'intervallo di temperatura compreso tra 30-130 °C, con una velocità di scansione pari a 10 °C/min.

7.2.3 Raggi X su polvere (PXRD)

Per la caratterizzazione ai raggi X è stato utilizzato un diffratometro STOE D500, usando la radiazione Cu-Kα monocromatica mediante un cristallo di grafite. I campioni sono stati analizzati nell'intervallo di angolo 2θ da 3 a 40°, con un passo di 0,05 gradi di 2θ e con tempi di conteggio di 1 secondo per passo.

I campioni del solo ibuprofene trattato e non trattato sono stati analizzati anche nell'intervallo di angolo 2θ da 2 a 30°, con un passo di 0,05 gradi di 2θ e con tempi di conteggio di 4 secondo per passo.

7.2.4 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

La forma e superficie delle materie prime e sistemi binari trattati e non trattati alle MW sono state esaminate mediante SEM. I campioni sono stati rivestiti tramite spruzzo di Au/Pd sotto vuoto spinto (Edwards, Milano, Italia) ed esaminati impiegando un microscopio elettronico a scansione Philips 500 (Eindhoven, Olanda) al voltaggio di 10 kV.

7.2.5 Test dissolutivi in vitro

Per i successivi studi dissolutivi in vitro, è stata allestita una retta di taratura dell'ibuprofene in acqua. 50 mg di principio attivo sono stati sciolti in 100 ml di etanolo e da questa soluzione sono state preparate altre 6 a diverse concentrazioni diluite in acqua, successivamente analizzate spettrofotometricamente a 220 nm (Biochrom mod Libra S12).

Gli studi dissolutivi sono stati eseguiti utilizzando quale mezzo di dissoluzione acqua depurata [57-58]. 900 ml del mezzo sono stati posti nel dissolutore a paletta previsto dalla F.U. XI ed. (Erweka mod.DT-1), termostatati a 37°C ± 0,5°C e posti sotto agitazione con una velocità della pala di 100 rpm. Si è operato in "sink conditions" (20% della solubilità massima del principio attivo) introducendo una quantità di campione di DS, MF e MFT equivalente a 20 mg di ibuprofene. Per confronto, la stessa prova dissolutiva è stata eseguita anche sul solo principio attivo.

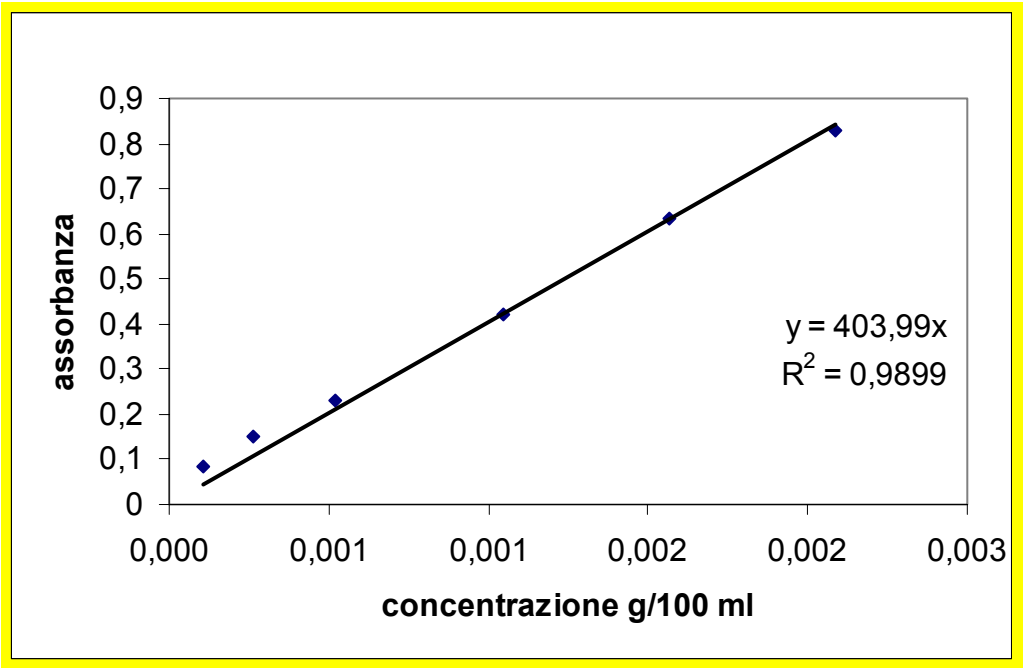
A regolari intervalli di tempo, venivano prelevati e filtrati prima di procedere alla lettura a 220 nm.

Per ciascun campione sono state eseguite almeno tre determinazioni (SD ≤5).

7.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

7.3.1 Contenuto di farmaco

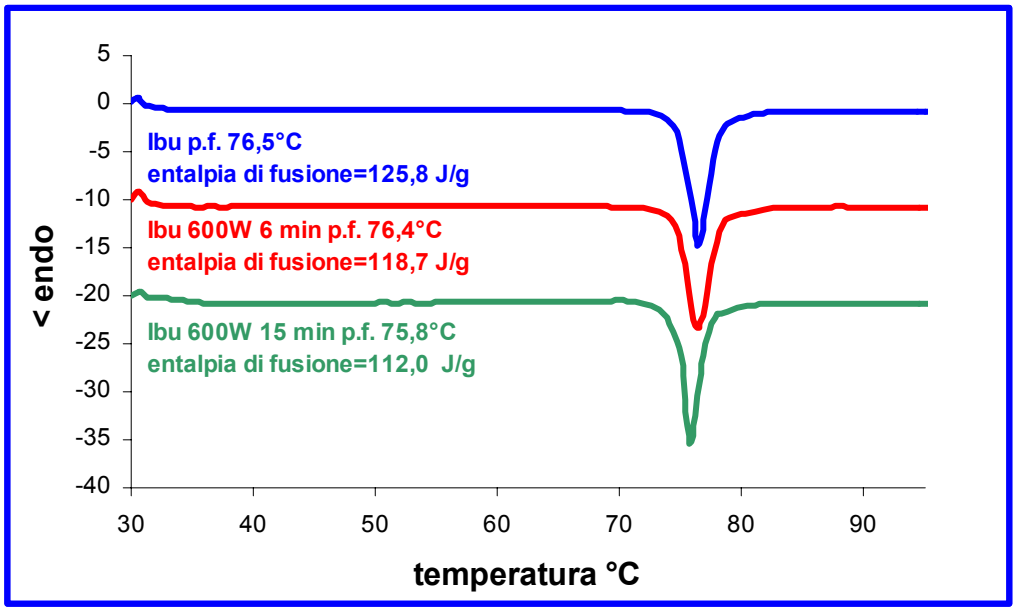
Il contenuto di farmaco, determinato sulla base della retta di taratura sotto riportata, è risultato essere compreso tra il 95% ed il 98% rispetto al teorico in tutti i campioni analizzati.



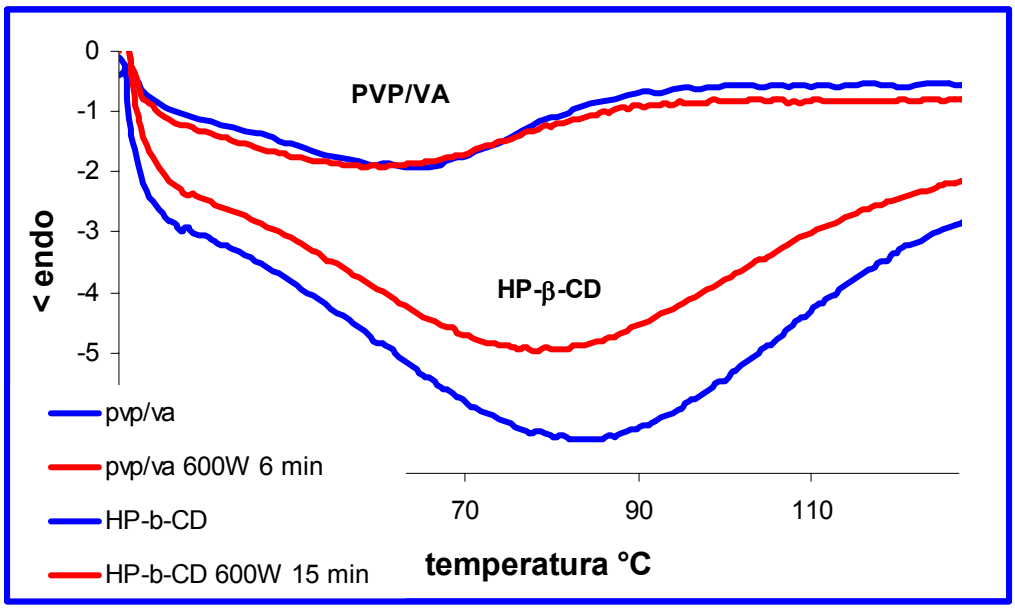
7.3.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

In accordo con i dati di letteratura, il termogramma relativo all'ibuprofene commerciale rivela un singolo evento endotermico attribuibile alla sua fusione, con un massimo a 76,5°C ed un'entalpia di 125,8 J/g [59].

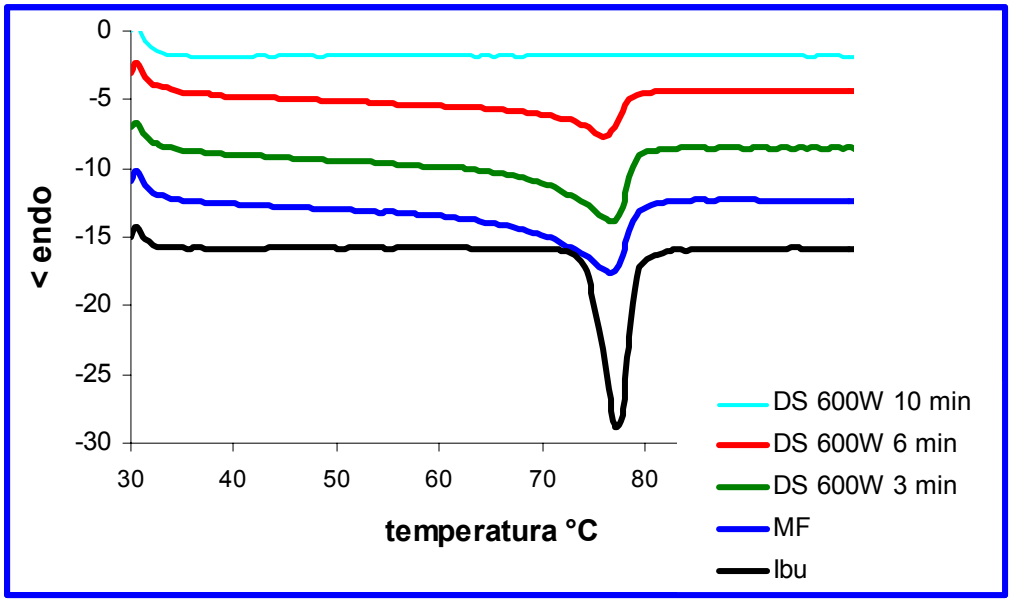
Come si può notare nel termogramma qui di seguito riportato, in seguito a trattamento con MW per 6 e 15 min si osserva un lieve shift del picco di fusione unitamente ad una riduzione dell'entalpia di fusione, ascrivibile ad una diminuzione delle dimensioni delle particelle collegata al tempo d'irraggiamento.



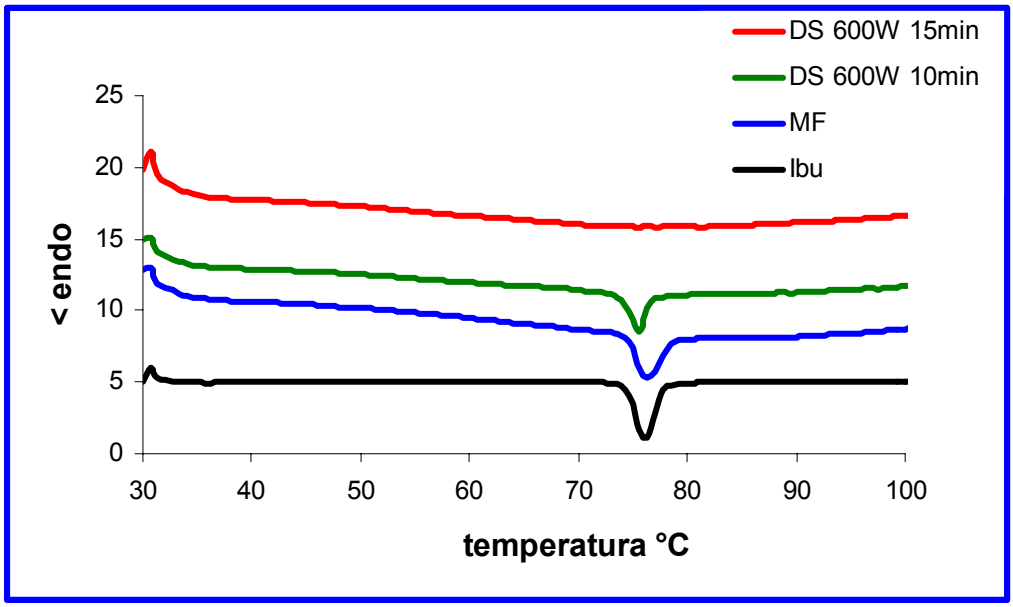
I termogrammi del PVP/VA e dell'HP-β-CD commerciali e trattati a 600 W rispettivamente per 6 e 15 min, sono qui di seguito riportati e, come si può notare, nessuna modificazione è osservabile in seguito a trattamento con le MW se non l'entalpia di evaporazione dell'acqua nell'intervallo di temperatura considerato.



Qui di seguito sono riportati i termogrammi delle DS con PVP/VA trattati alle MW a tempi diversi ed allestiti in fase di screening dei tempi d'attivazione. Dall'analisi della DS IBU:PVP/VA 1:1 p/p si evince che dopo soli 6 minuti di trattamento alle MW, l'ibuprofene è presente in forma quasi amorfa. Un trattamento prolungato a 10 minuti permette di raggiungere il completo stato amorfo dell'ibuprofene pur tuttavia dando origine ad una polvere "appiccicosa".

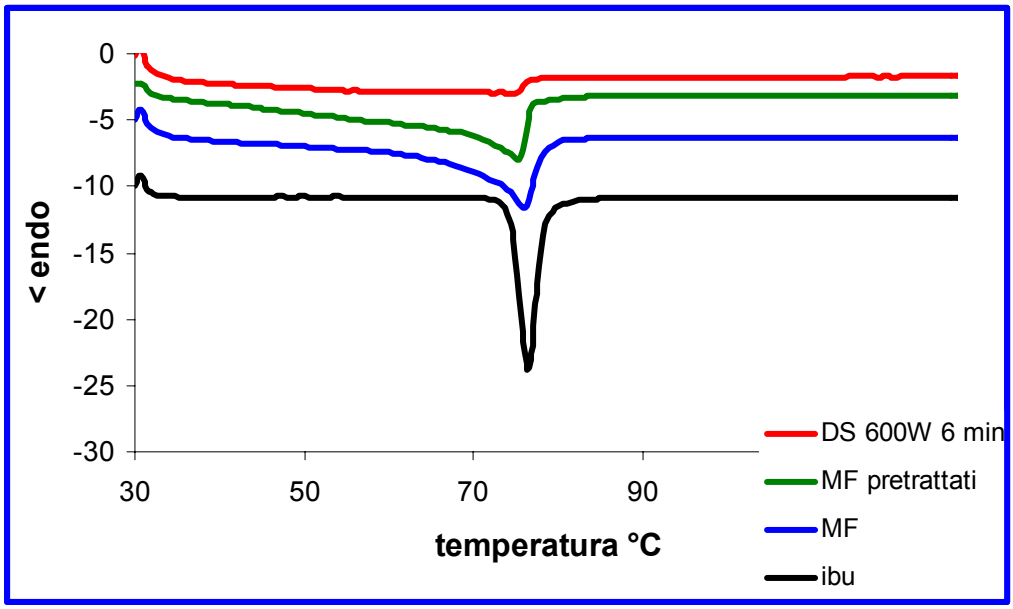


Nel caso riguardante la DS IBU:HP-β-CD 1:2 M, dopo 15 min di trattamento a 600 W è stato possibile osservare il principio attivo in forma amorfa. Nonostante i lunghi tempi di attivazione, la polvere ottenuta era lavorabile. I termogrammi indicati nella figura successiva corrispondono rispettivamente a 10 e 15 minuti di trattamento alle MW sempre a 600 W.

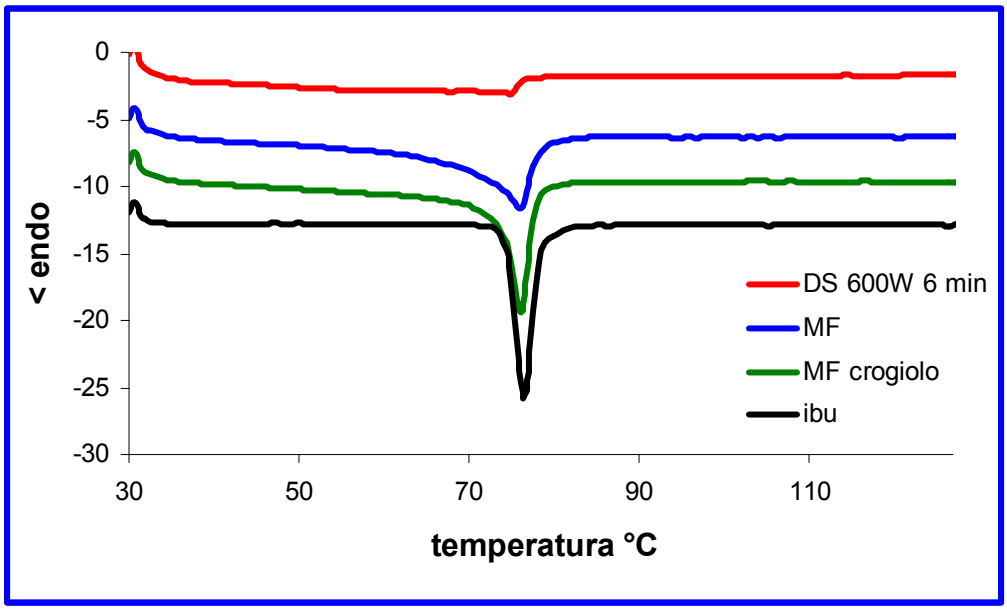


Nelle miscele fisiche ibuprofene:PVP/VA 1:1 ottenute per miscelazione delle sostanze commerciali (MF) e nelle miscele fisiche ibuprofene:PVP/VA 1:1 ottenute a partire dai singoli materiali di partenza pretrattati alle microonde (MF pretrattati), è ancora evidente nell'immagine successiva l'evento endotermico corrispondente alla fusione dell'ibuprofene a testimonianza della sua presenza ancora in forma cristallina. Solamente uno spostamento del picco di fusione ed una diminuzione dell'entalpia di fusione sono osservabili a dimostrazione della presenza di interazioni farmaco-carrier in accordo con quanto osservato in letteratura .

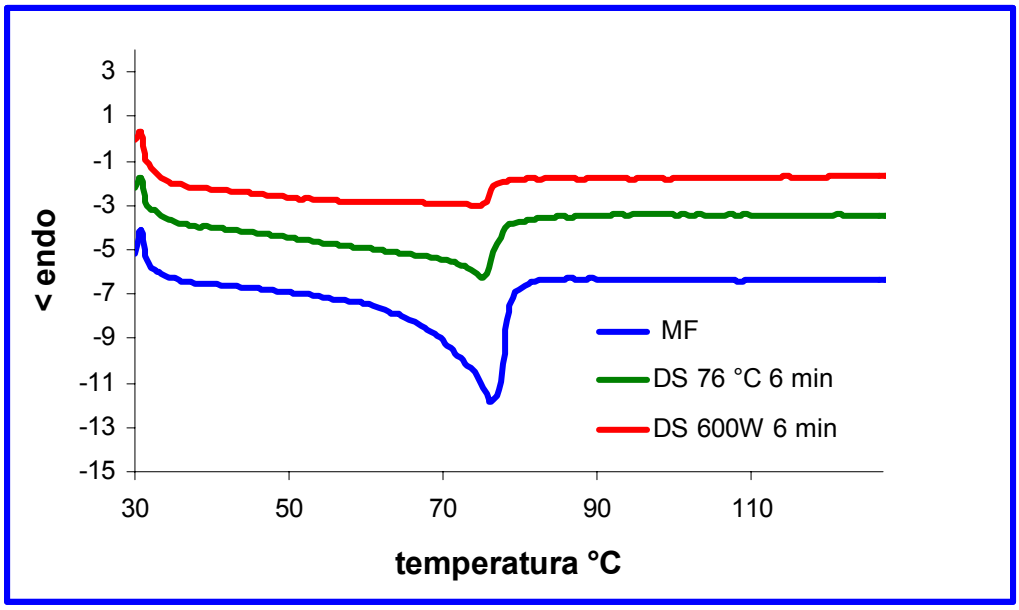
E' infatti dimostrato che il PVP, che rappresenta il 60% del nostro copolimero, è capace di promuovere interazioni solido-solido in fase di miscelazione proprio con l'ibuprofene [60] .



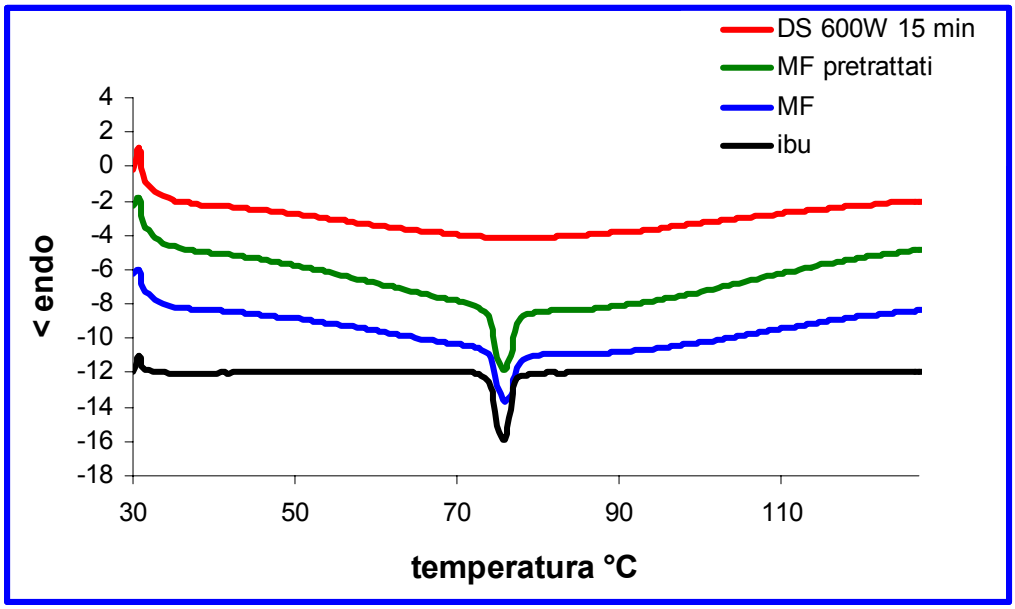
Allo scopo di confermare il fenomeno appena descritto, è stata effettuata un'analisi DSC dei due materiali di partenza pesati direttamente nel crogiolo di alluminio e cioè senza preventivamente sottoporli a miscelazione. Il termogramma qui di seguito riportato attesta quanto riportato in letteratura e cioè l'interazione farmaco-polimero.



Dalle analisi DSC delle DS, le positive influenze dei polimeri sullo stato solido del farmaco sono state dunque confermate osservandone la quasi totale amorfizzazione. Allo scopo di accertare anche la validità della tecnologia preparativa adottata rispetto al tradizionale metodo della "agglomerazione per fusione", sono state preparate e quindi analizzate delle DS IBU:PVP/VA 1:1 p/p allestite a bagnomaria e trattate con gli stessi parametri T°-tempo delle DS allestite in MW e cioè per 6 min dal raggiungimento della temperatura di fusione dell'ibuprofene. Infatti, dal termogramma qui di seguito riportato si può notare la presenza del farmaco ancora in forma cristallina attestando così la validità della tecnologia MW da noi adottata.

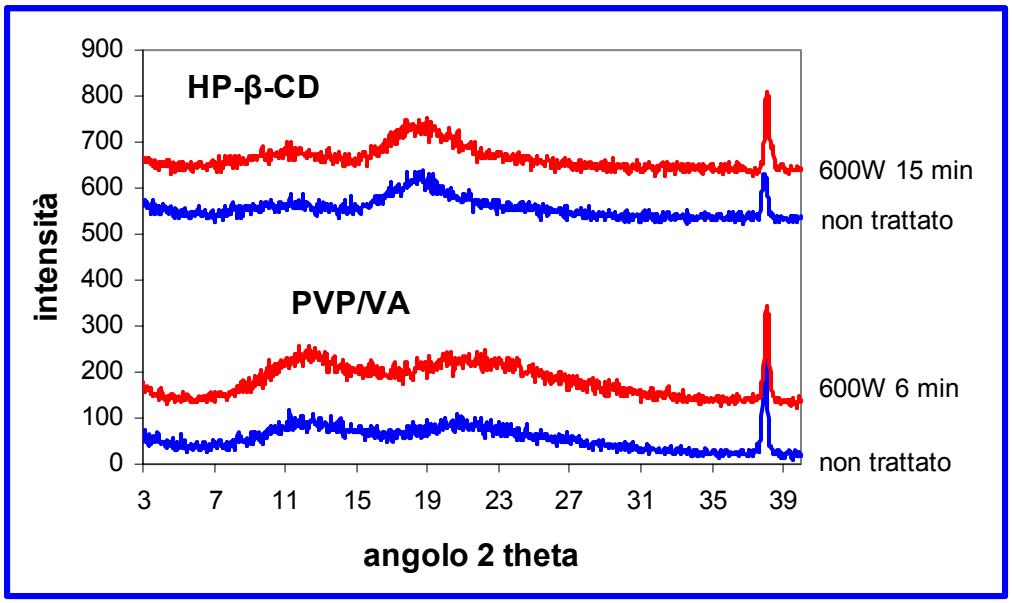


I termogrammi delle dispersioni solide contenenti HP-β-CD qui di seguito riportati, confermano lo stato amorfo dell'ibuprofene mentre le corrispondenti miscele fisiche, trattate e non trattate, evidenziano ancora picchi caratteristici del principio attivo.

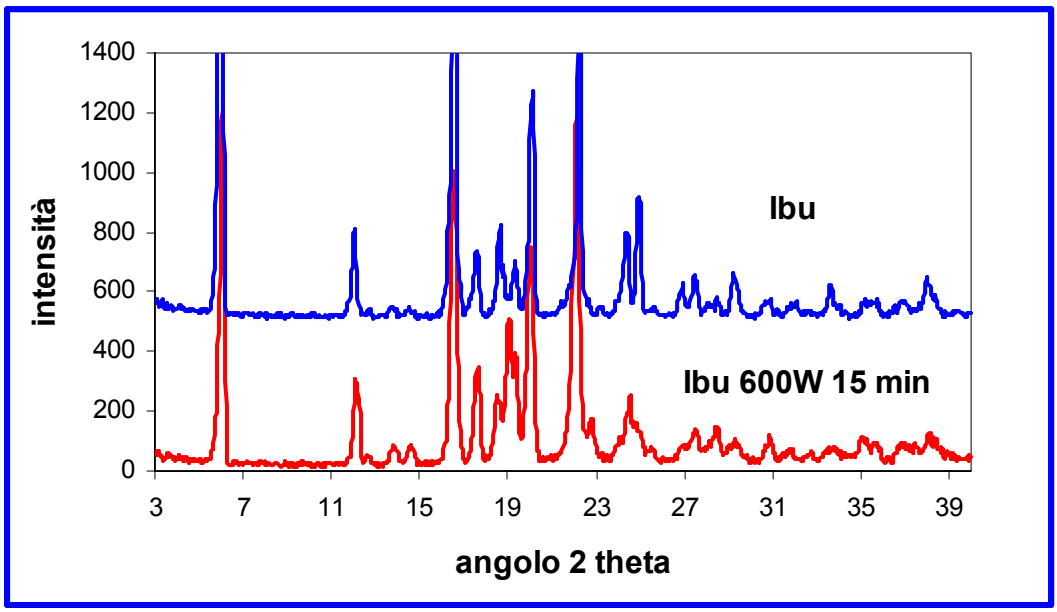


7.3.3 Raggi X su polvere (PXRD)

I diffrattogrammi relativi ai singoli polimeri MW trattati e non, confermano quanto rilevato in DSC e cioè l'ininfluenza del trattamento sullo stato solido degli stessi.

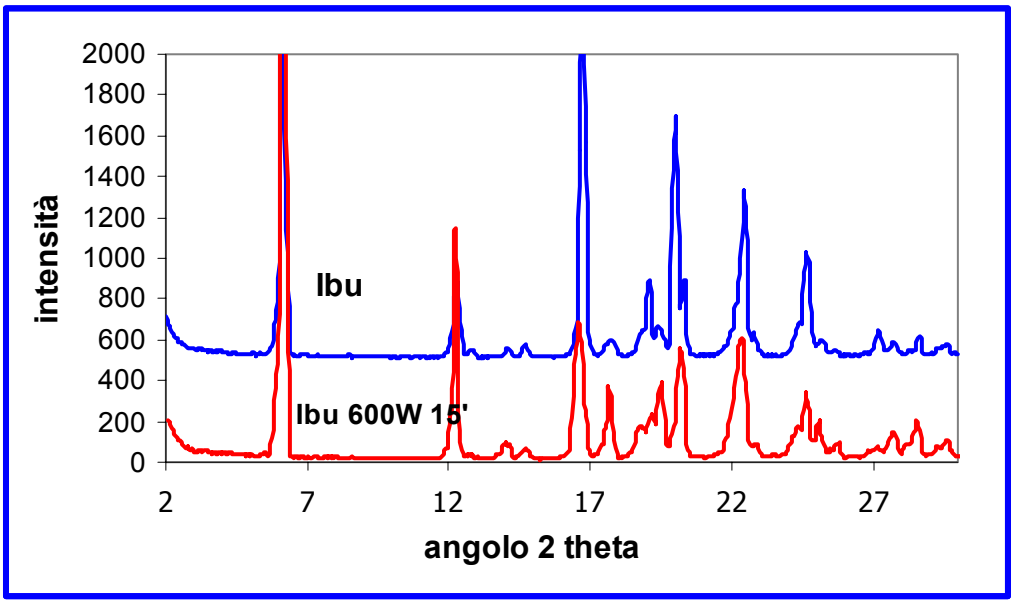


Per quanto riguarda l'ibuprofene trattato e non trattato, si osserva una sostanziale sovrapposizione dei picchi caratteristici del principio attivo nel range di angolo 2θ compreso tra 3 e 40 e una lieve variazione dell'intensità del segnale nel campione trattato.



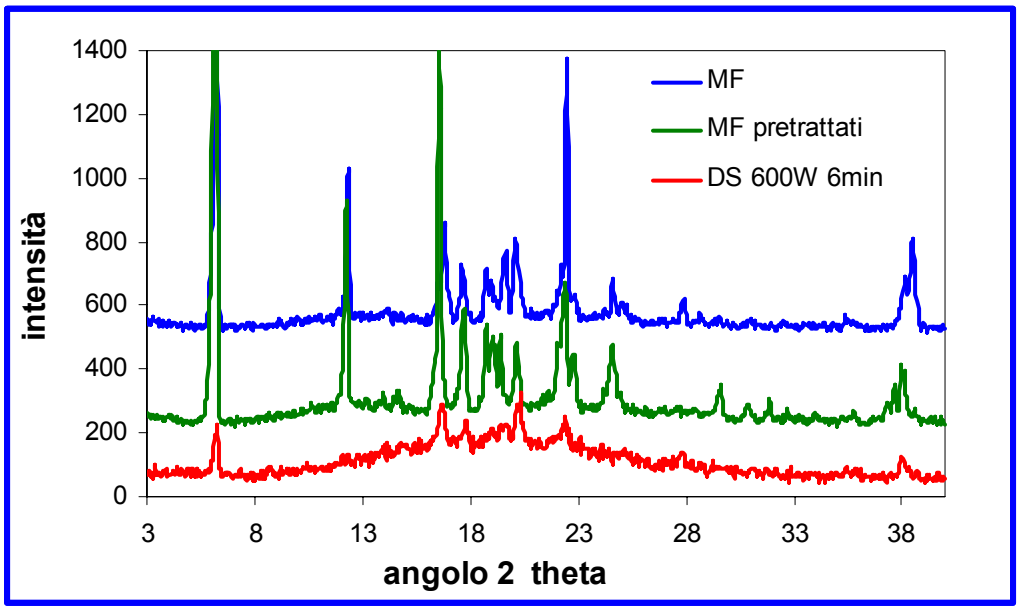
Allo scopo di comprendere se tale fenomeno sia ascrivibile alla formazione di una differente forma polimorfica o alla riduzione del particle size, è stata eseguita un'ulteriore analisi impiegando nuove condizioni sperimentali: angolo 2θ tra 2 e 30 gradi, passo di 0,05° e un conteggio di 4 sec/passo. In generale, quando i diffrattogrammi di due forme cristalline sono identici in termini di posizione dei picchi, questi presentano la stessa struttura cristallina interna, mentre se i patterns sono diversi, allora i cristalli hanno una differente struttura interna e quindi sono riconosciuti come polimorfi [61]. Le differenze nelle relative intensità dei picchi sono dovute o a variazioni dell'habitus cristallino, perché la relativa abbondanza dei piani esposti alla sorgente dei raggi X è diversa, o a differenze nelle dimensioni dei cristalli. Recenti dati di letteratura confermano il comportamento descritto riportando che, successivamente ad un trattamento con ultrasuoni, l'habitus cristallino dell'ibuprofene era modificato senza però osservarne modificazioni polimorfiche [62]. Come evidenziato

nellafigura qui di seguito riportata, alle differenti condizioni sperimentali adottate viene confermata la variazione dell'habitus cristallino e dimensioni e l'assenza di modificazioni polimorfiche, a riprova di quanto osservato all'analisi DSC.

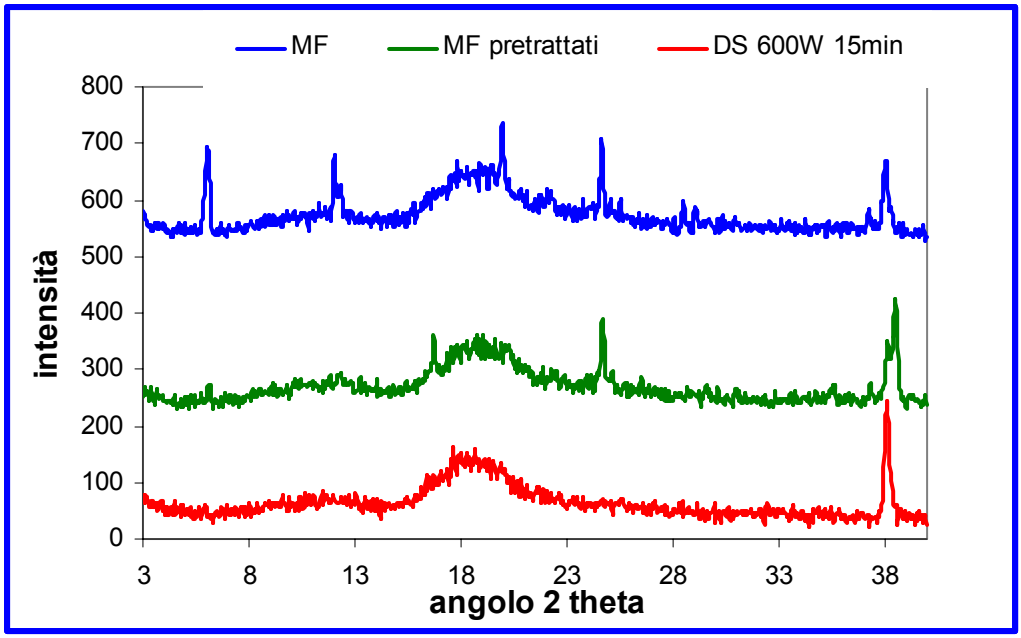


I diffrattogrammi di tutti i sistemi attivati (DS) dell'ibuprofene evidenziano che il principio attivo è presente allo stato amorfo, mentre nelle miscele fisiche e miscele fisiche trattate l'ibuprofene si trova ancora allo stato cristallino e il segnale PXRD corrisponde a quello del principio attivo di partenza, come già evidenziato dai termogrammi DSC. Questi dati inoltre attestano che né la presenza dei carrier né la tecnologia impiegata per la preparazione dei sistemi attivati, comporta una riorganizzazione di un differente stato polimorfo del farmaco.

SISTEMI IBU:PVP/VA 1:1 p/p

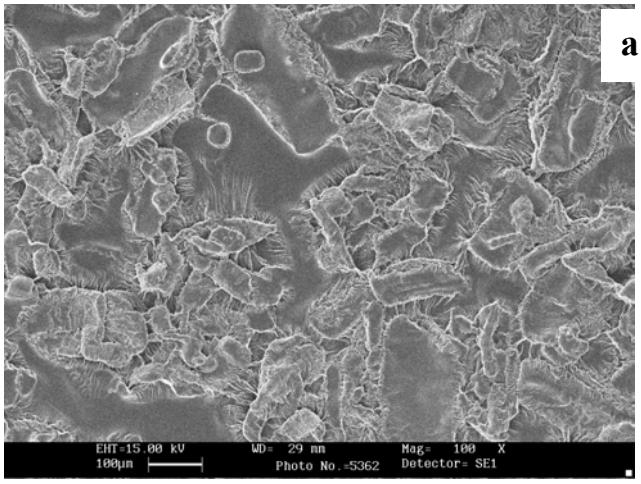


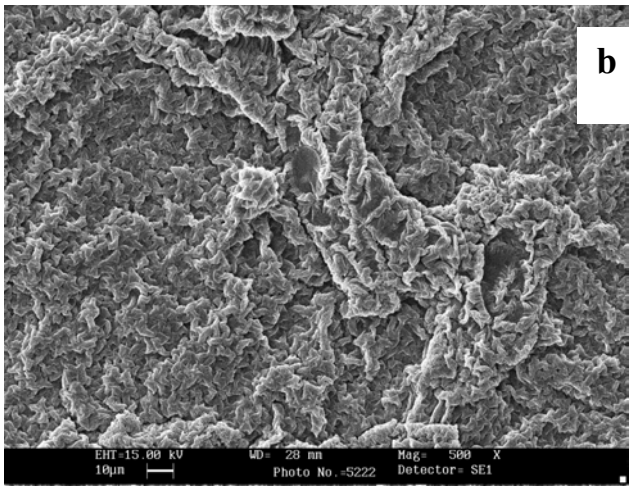
SISTEMI IBU:HP-β-CD 1:2 M

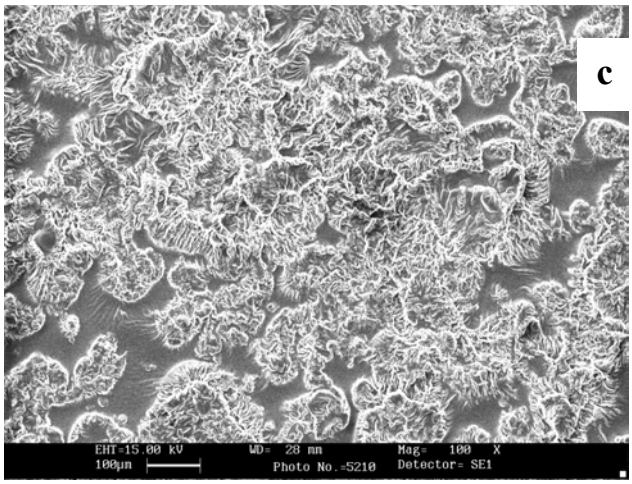


7.3.4 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Di seguito sono riportate le immagini SEM rispettivamente dell'ibuprofene commerciale (a), MW trattato per 6 min (b) e 15 minuti (c). Dall'iniziale aspetto a scaglie dalla superficie liscia, in seguito a trattamento la superficie assume un aspetto rugoso.



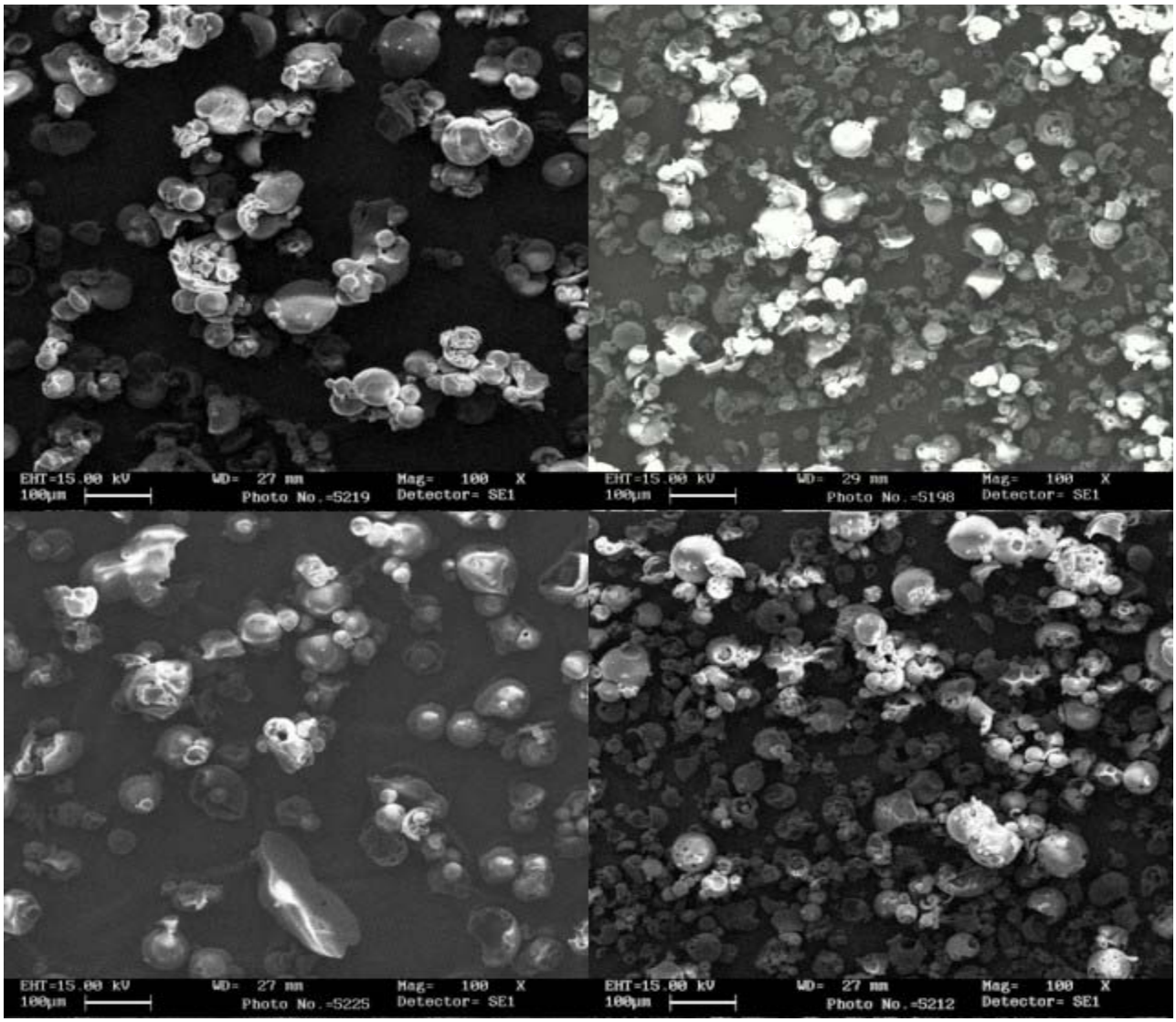




Le immagini dei due carrier commerciali e trattati a 600 W per 6 minuti (PVP/VA) e a 600W per 15 minuti (HP-β-CD) sono di seguito riportate.

Come si può osservare, il trattamento alle microonde non determina modifiche nella forma e nelle superfici.

PVP/VA commerciale **HP-β-CD commerciale**

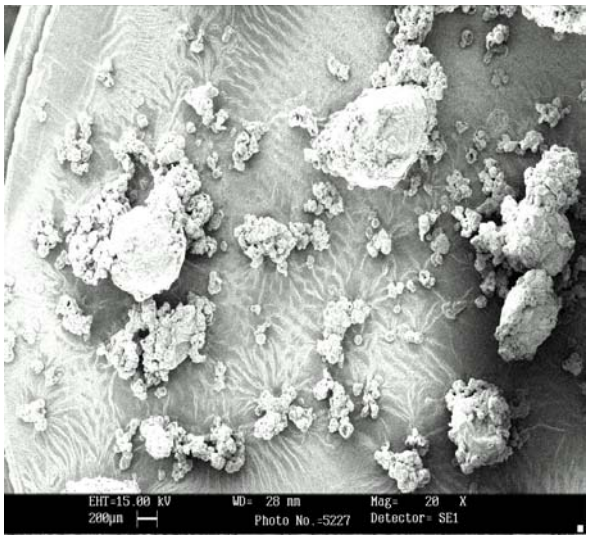


PVP/VA 600 W 6 min **HP-β-CD 600 W 15 min**

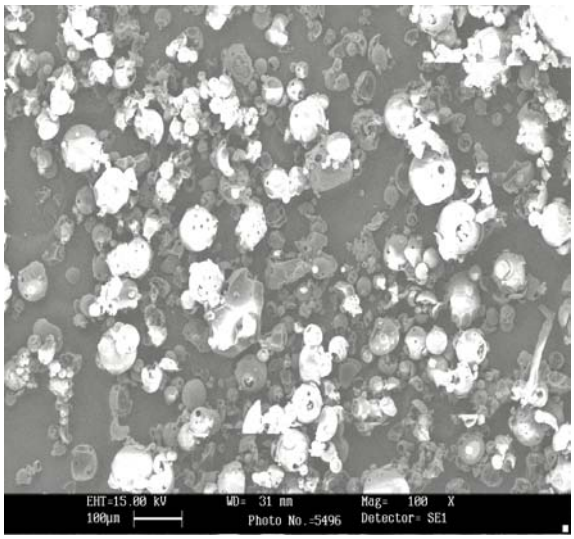
Nella miscela fisica non trattata di IBU:PVP/VA, oltre la presenza dei singoli componenti, si può scorgere un'iniziale formazione di agglomerati che indica la presenza di interazioni tra i componenti. Una completa interazione farmaco-polimero si osserva invece nella relativa DS.

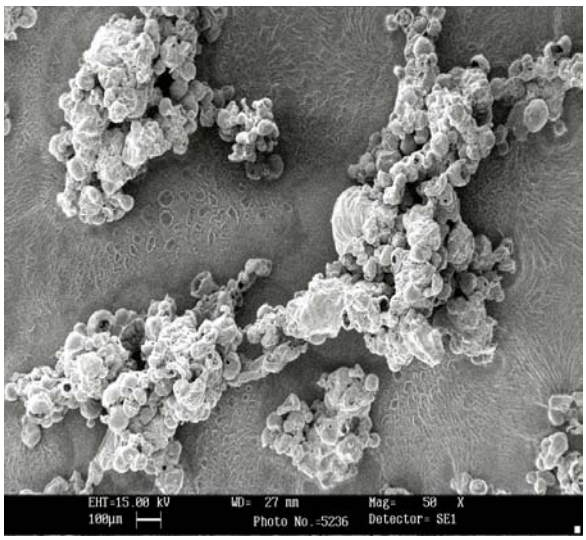
Nel sistema binario IBU:HP-β-CD, l'analisi SEM della miscela fisica rivela che i due componenti mantengono le loro strutture originali, mentre si nota la presenza di una forte aggregazione nei sistemi attivati.

MF IBU:PVP/VA

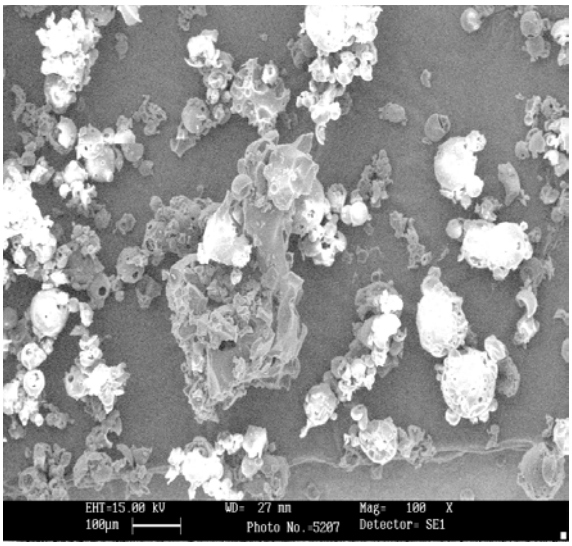


MF IBU:HP-β-CD





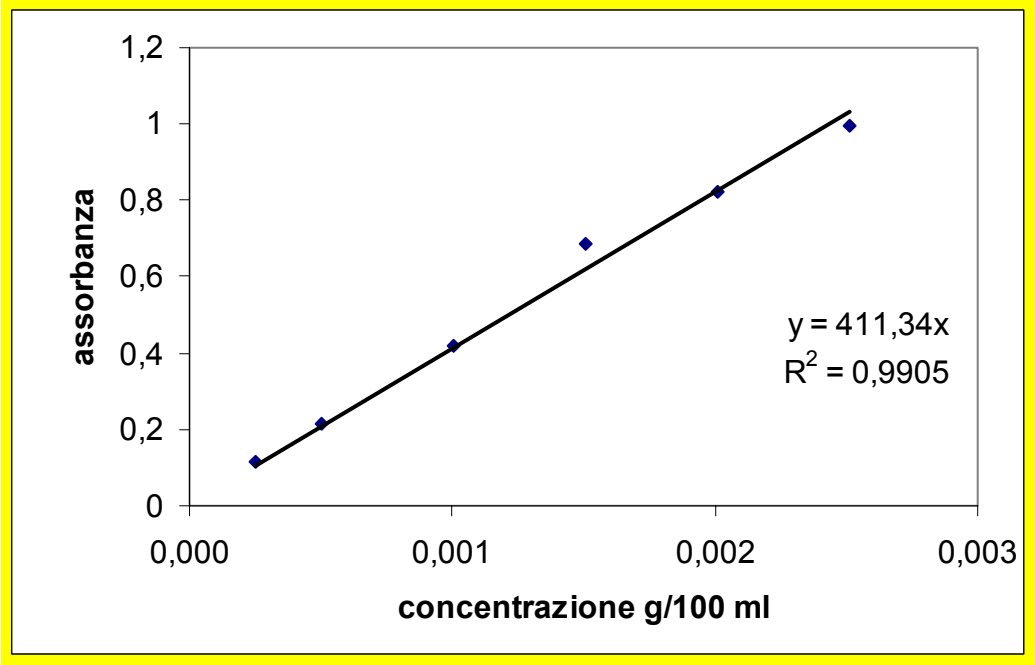
DS IBU:PVP/VA



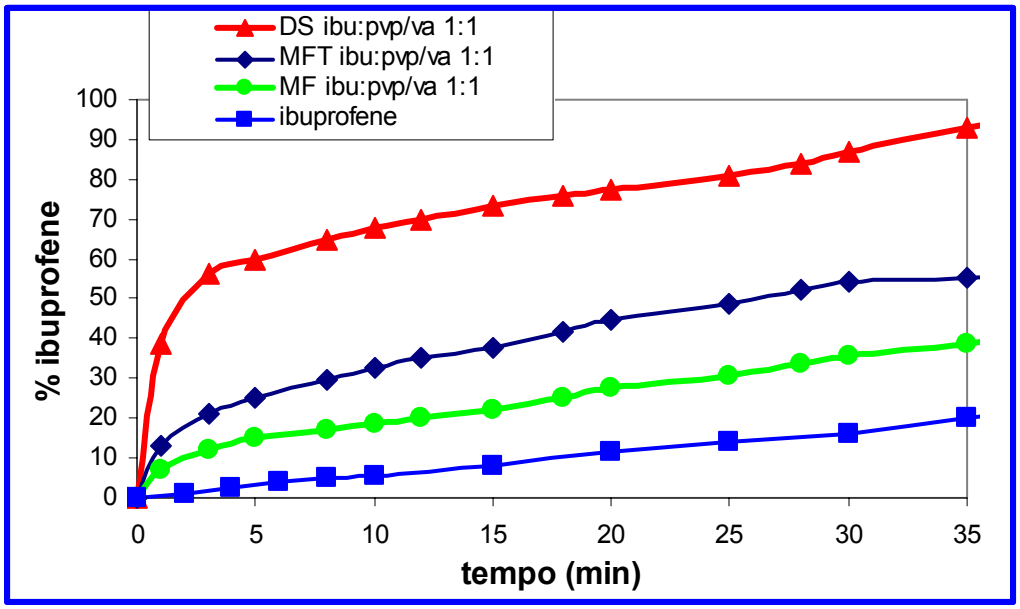
DS IBU:HP-β-CD

7.3.5 Test dissolutivi in vitro

La retta di taratura dell'ibuprofene in acqua ottenuta a 220 nm è qui di seguito rappresentata.

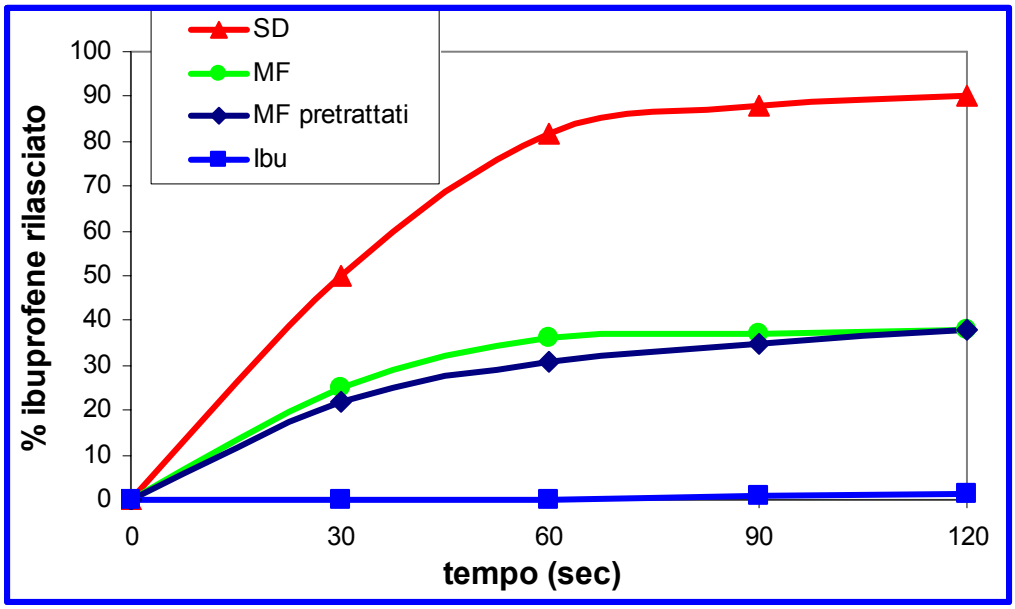


Come si può notare dai profili qui di seguito, con la DS a base di PVP/VA risulta un incremento del grado di dissoluzione dell'ibuprofene sia rispetto al farmaco commerciale, sia rispetto alla miscela fisica trattata e non trattata. Osservando, infatti i tempi dissolutivi, si evince che dopo 35 min si ottiene il 90% del rilascio dalla DS, rispetto al 55%, 38% e 20% dalla miscela fisica trattata, miscela fisica semplice e farmaco puro. La motivazione è ascrivibile alla progressiva riduzione dello stato cristallino dell'ibuprofene significativa nel sistema attivato, meno evidente nella miscela fisica trattata e, ancora meno, nella miscela fisica semplice, come già evidenziato dalle precedenti caratterizzazioni DSC e PXRD.



Qui di seguito sono riportati i profili dissolutivi dei sistemi binari con HP-β-CD posti a confronto tra loro e con il prodotto commerciale. Dai risultati si può osservare che nel brevissimo tempo di 2 minuti, dalla DS viene rilasciato il 90% del farmaco rispetto al 48 e 41% rilasciato dalle miscele fisiche ed il 4% dal principio attivo commerciale.

Anche in questo caso, il fenomeno è riconducibile alla presenza del farmaco in forma amorfa nei sistemi attivati rispetto alle miscele fisiche. Le due miscele fisiche considerate presentano dei profili dissolutivi sovrapponibili data l'alta percentuale di carrier presente.



7.4 CONCLUSIONI

Dai risultati appena descritti si può concludere che la tecnica utilizzata e i polimeri scelti hanno portato ad un grado di amorfizzazione del farmaco tale da essere responsabile dell'incremento del profilo di dissoluzione in vitro delle dispersioni solide (IBU:PVP/VA e IBU: HP-β-CD) rispetto ai campioni di confronto.

8. PRODOTTI COMPOSITI A BASE DI PIROXICAM

8.1 MATERIALI E METODI

8.1.1 Materiali

Il piroxicam è stato fornito dalla ditta Galeno (Prato – FI). Sono stati impiegati i seguenti carrier: PVP K29/32 (BASF- Milano), PVP/VA 64 (BASF – Milano), croscarmellosio sodico (Giusto Faravelli – Milano), amido sodio glicolato Explotab (donato da Remedia srl), PVP CLM (BASF – Milano). Il metanolo utilizzato era di grado analitico (Carlo Erba, Milano).

8.1.2 Preparazione dei sistemi farmaco-polimero

Una quantità fissa di miscela farmaco:carrier veniva posizionata in un punto predefinito del forno/reattore per ottenere il sistema disperso (SD), mentre un'altra quota veniva conservata per le successive caratterizzazioni quale campione di confronto e chiamata miscela fisica (MF).

Per la preparazione dei sistemi attivati sono stati utilizzati due tipi di forni microonde: uno di tipo domestico (Samsung – mod CE 297 –DN), ed un reattore di tipo single-mode ad emissione focalizzata delle microonde (Discover® – CEM).

Nel caso del forno Samsung la posizione del campione all'interno della camera riscaldante del forno a microonde è stata studiata con un indicatore d'irraggiamento, che consiste in una lampada a basso voltaggio il cui filamento si illumina quando viene eccitato dalle microonde. Dopo aver verificato così la posizione più adatta per sistemare il campione questa è stata mantenuta costante per l'attivazione di tutti i campioni analizzati.

Il primo sistema analizzato è stato quello a base di PVP. Più esattamente i rapporti farmaco:polimero vagliati erano pari a 1:1, 1:2 p/p ed attivati in forno domestico Samsung a 300 e 600W a diversi tempi (5', 10', 15' e 30'). Tali prove sono state effettuate con lo scopo

di saggiare le condizioni operative ottimali ad ottenere campioni lavorabili e contenenti il p.a. in forma amorfa.

Ancora allo scopo di verificare l'influenza dell'acqua sull'attivazione alle MW del campione il sistema 1:1 p/p è stato addizionato di percentuali variabili di acqua (15%, 30%, 70% e 90%). In questo caso è stato sempre operato nel forno domestico ma alla potenza prefissata di 300W e per 5 minuti.

Il campione 1:1 p/p è stato anche allestito nel reattore a MW focalizzate CEM per valutarne le potenzialità dello strumento. La potenza iniziale era 200W e lavorando in modulazione di potenza la temperatura del campione era arrivata a 200 °C in 2 minuti. Oltre al PVP il piroxicam è stato veicolato in altri carrier quali il croscarmellosio sodico, il polivinilpirrolidone-vinilacetato (PVP/VA 60/40), l'amido sodio glicolato e il polivinilpirrolidone reticolato micronizzato (PVP-CLM), sostanze queste spesso utilizzate per la preparazione di dispersioni solide a pronta biodisponibilità del p.a.

In questo caso i rapporti ponderali erano stati 1:1 e 1:5 farmaco:polimero, attivati a 600W per 15 e 30 minuti nel forno Samsung ed a 25-100-200-300 W per 2 - 15 minuti nel reattore CEM. Anche in questo caso l'influenza dell'acqua sull'attivazione alle MW è stata valutata (dal 10% al 50%).

Tutte le DS allestite prima della loro caratterizzazione sono state macinate in molino da laboratorio (Janke & Kunkel IKA Labortechnik mod A10 – Germania) e quindi è stata selezionata la frazione granulometrica 80-250 μm mediante setacci.. Il medesimo intervallo granulometrico è stato adottato anche per le corrispondenti miscele fisiche (MF).

8.2 CARATTERIZZAZIONE DEI SISTEMI FARMACO:POLIMERO

8.2.1 Contenuto di farmaco

Per determinare il contenuto di piroxicam nei sistemi binari, 50 mg di principio attivo sono stati sciolti in 100 ml di metanolo e da questa soluzione sono state preparate altre 4 a diverse

concentrazioni, successivamente analizzate spettrofotometricamente a 334 nm (Biochrom mod Libra S12). Una quantità esattamente pesata di ciascun sistema è stata sciolta in metanolo ed il contenuto di farmaco è stato determinato spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 334 nm (Biochrom mod Libra S12).

8.2.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

Per la caratterizzazione DSC è stato utilizzato un calorimetro differenziale Mettler DSC Ta 4000 collegato ad una cella calorimetrica Mettler DSC 20. L'analisi è stata eseguita utilizzando campioni di sistemi attivati e di miscele fisiche contenenti l'equivalente di 1-2 mg di piroxicam, nell'intervallo di temperatura compreso tra 30-230 °C, con una velocità di scansione pari a 10°C/min.

8.2.3 Raggi X su polvere (PXRD)

Per la caratterizzazione ai raggi X è stato utilizzato un diffratometro STOE D500, usando la radiazione Cu-Kα monocromatica mediante un cristallo di grafite. I campioni sono stati analizzati nell'intervallo di angolo 2θ da 3 a 40°, con un passo di 0,05 gradi di 2θ e con tempi di conteggio di 1 secondo per passo.

8.2.4. Microscopia elettronica a scansione (SEM)

La forma e superficie delle materie prime e sistemi binari trattati e non trattati alle MW sono state esaminate mediante SEM. I campioni sono stati rivestiti tramite spruzzo di Au/Pd sotto vuoto spinto (Edwards, Milano, Italia) ed esaminati impiegando un microscopio elettronico a scansione Philips 500 (Eindhoven, Olanda) al voltaggio di 10 kV.

8.2.5 Test dissolutivi in vitro

Per i successivi studi dissolutivi in vitro, è stata allestita una retta di taratura del piroxicam in fluidi g.i. simulati a pH=1,2 e 7,4. 50 mg di principio attivo sono stati sciolti in 100 ml di metanolo e da questa soluzione sono state preparate altre 7 a diverse concentrazioni diluite in fluido g.i. ai due diversi pH e successivamente analizzate spettrofotometricamente a 334 nm nel caso del pH=1,2 e 354 nm nel caso del pH=7,4 (Biochrom mod Libra S12).

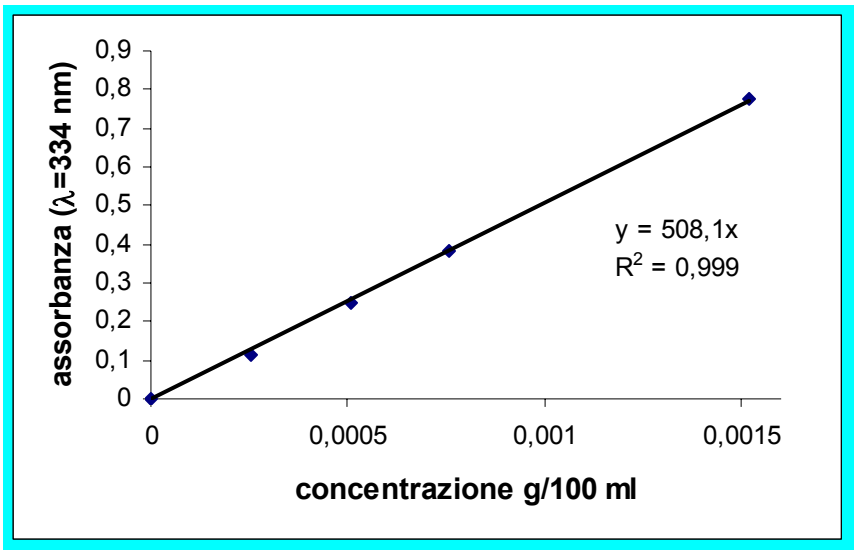
Inizialmente è stata determinata la solubilità all'equilibrio (non sink conditions) nei fluidi g.i. ai due pH selezionati. Per quanto riguarda gli studi dissolutivi 900 ml del mezzo sono stati posti nel dissolutore a paletta previsto dalla F.U. XI ed. (Erweka mod.DT-1), termostatati a 37°C ± 0,5°C e posti sotto agitazione con una velocità della pala di 100 rpm. Si è operato in "sink conditions" (20% della solubilità massima del principio attivo) introducendo una quantità di campione di DS e MF equivalente a 10 mg di piroxicam, condizioni queste corrispondenti al sink conditions. Per confronto, la stessa prova dissolutiva è stata eseguita anche sul solo principio attivo.

A regolari intervalli di tempo, i campioni venivano prelevati e filtrati prima di procedere alla lettura a 334 nm e 352 nm. Per ciascun campione sono state eseguite almeno tre determinazioni (SD ≤5).

8.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

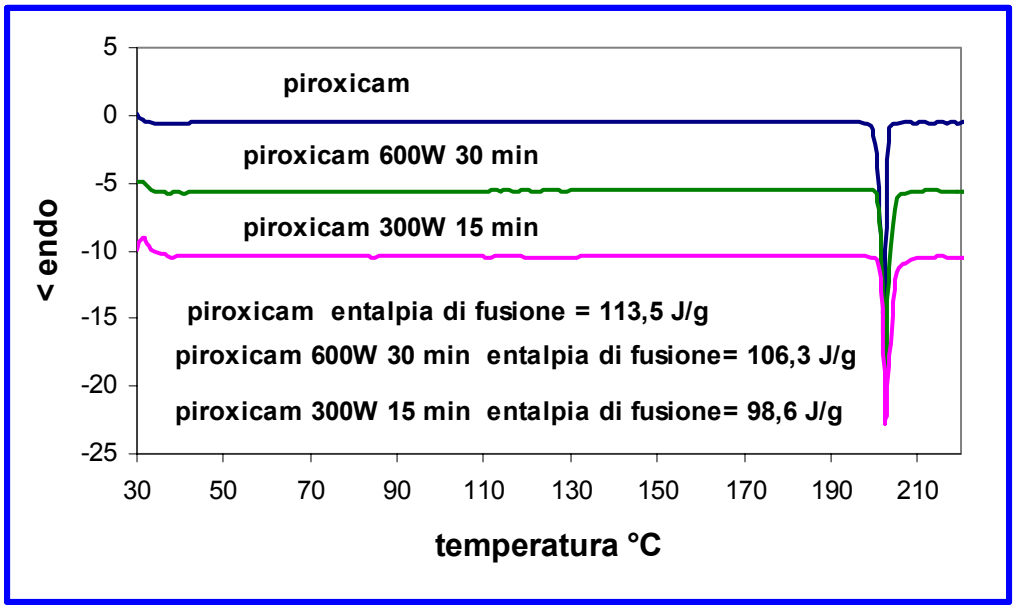
8.3.1 Contenuto di farmaco

Il contenuto di farmaco è stato determinato utilizzando la retta di taratura del piroxicam (figura 1) in metanolo alla lunghezza d'onda di 334 nm. In tutti i campioni analizzati il contenuto del farmaco era compreso tra il 95% ed il 98% rispetto al teorico.

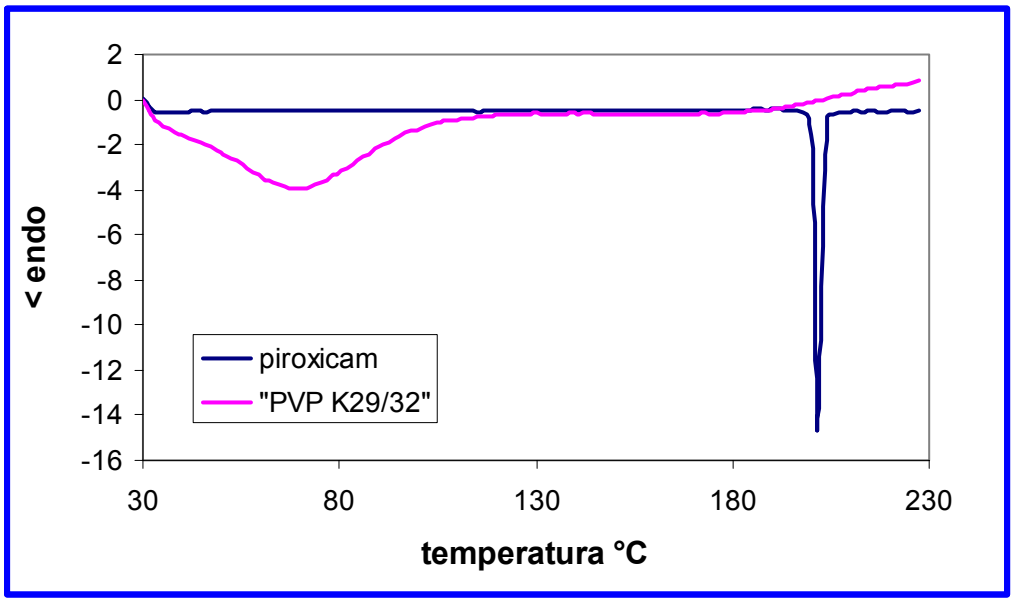


8.3.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

Il piroxicam commerciale è caratterizzato da un punto di fusione intorno a 201,8 °C. Per anzitutto valutare l'influenza del trattamento alle microonde sullo stato solido del solo principio attivo, sono state eseguite delle analisi DSC sul piroxicam tal quale e sullo stesso trattato alla potenza massima di 600W per 30 min nel forno domestico ed a 300W per 15 min nel reattore CEM. Dall'analisi DSC qui di seguito riportata, si osserva la corrispondenza del punto di fusione ad indicare l'assenza di variazioni della forma polimorfa; la lieve riduzione dell'entalpia di fusione è riconducibile ad un'iniziale diminuzione della cristallinità del principio attivo.

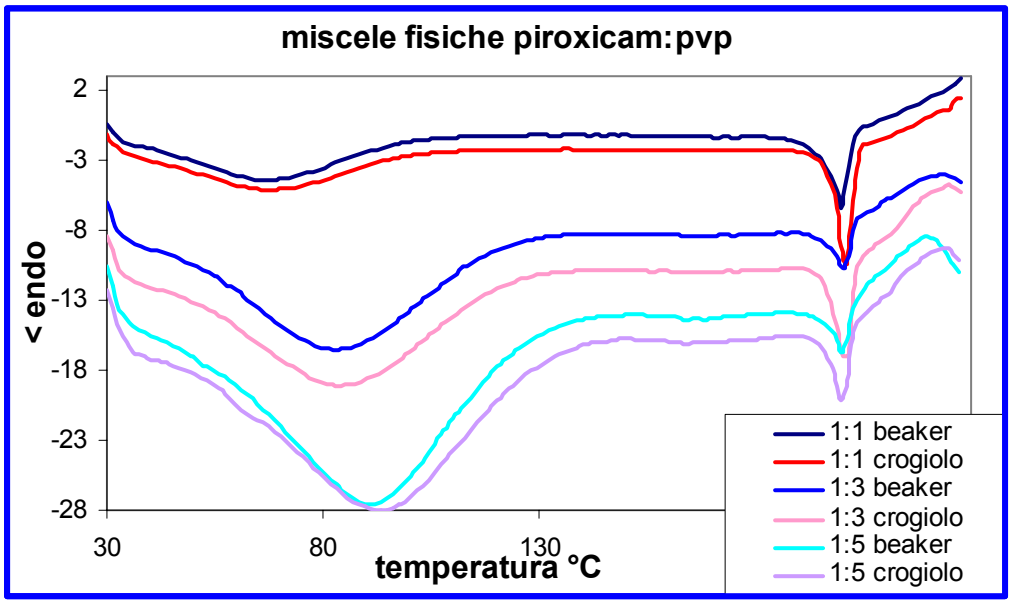


Il primo carrier considerato (PVP) commerciale evidenzia soltanto una banda allargata tra 50 e 80 °C, ascrivibile alla disidratazione del carrier e dopo i 200 °C si osserva l'inizio di un evento esotermico che potrebbe essere riconducibile ad un'iniziale degradazione del PVP.

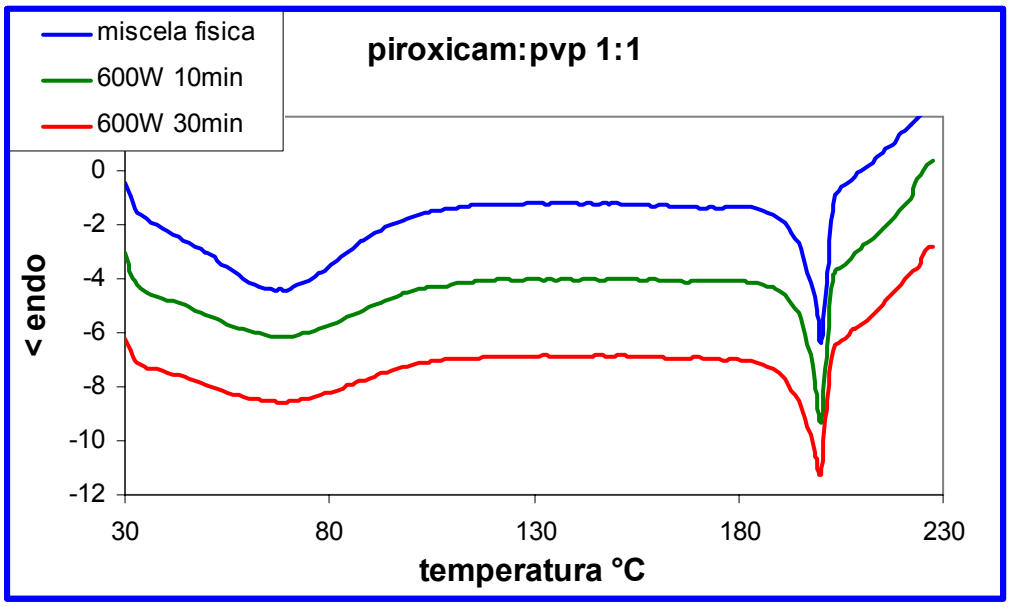


All'analisi dei sistemi binari con detto carrier è stato notato che il termogramma dei sistemi attivati e delle miscele fisiche erano quasi sovrapponibili. Il fenomeno è ascrivibile al PVP che come da dati di letteratura già in fase di miscelazione con p.a. determina la formazione di

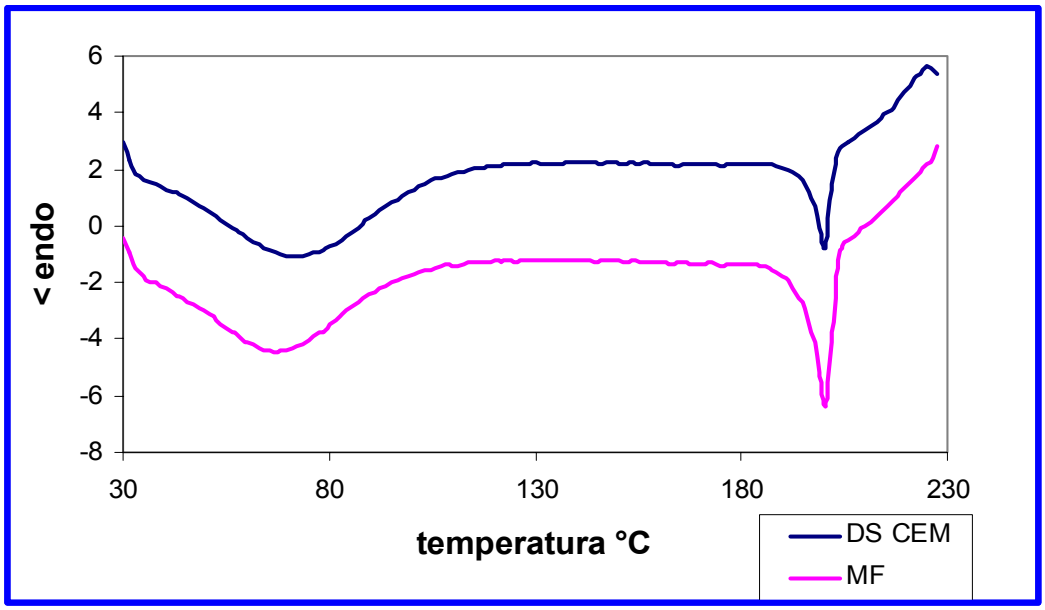
favorevoli interazioni [63-64]. A riprova di ciò sono state analizzate diverse miscele fisiche allestite direttamente nel crogiolo da DSC e come si può notare dalla figura successiva il picco relativo al p.a. è maggiormente riconoscibile rispetto alla analoghe miscele fisiche classiche.



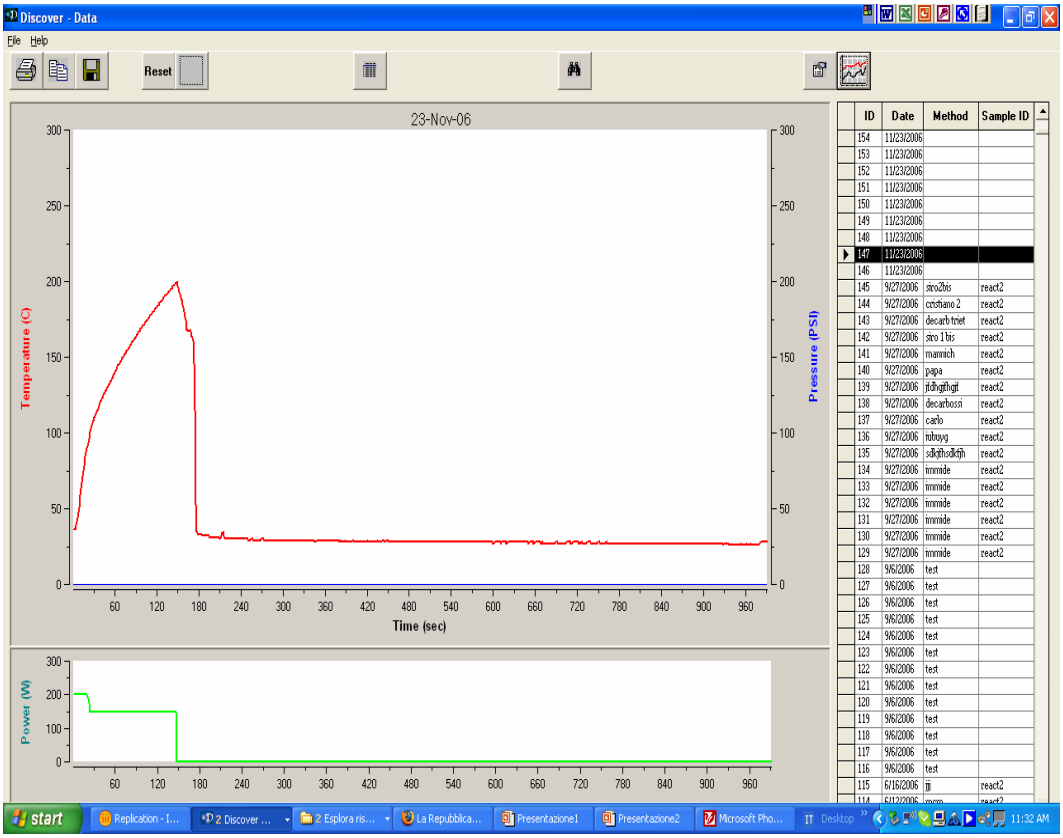
Il termogramma della DS piroxicam:pvp 1:1 p/p attivate in forno domestico è risultato essere praticamente sovrapponibile con la relativa MF allestita in beaker con solamente un lieve shift del picco di fusione del piroxicam.



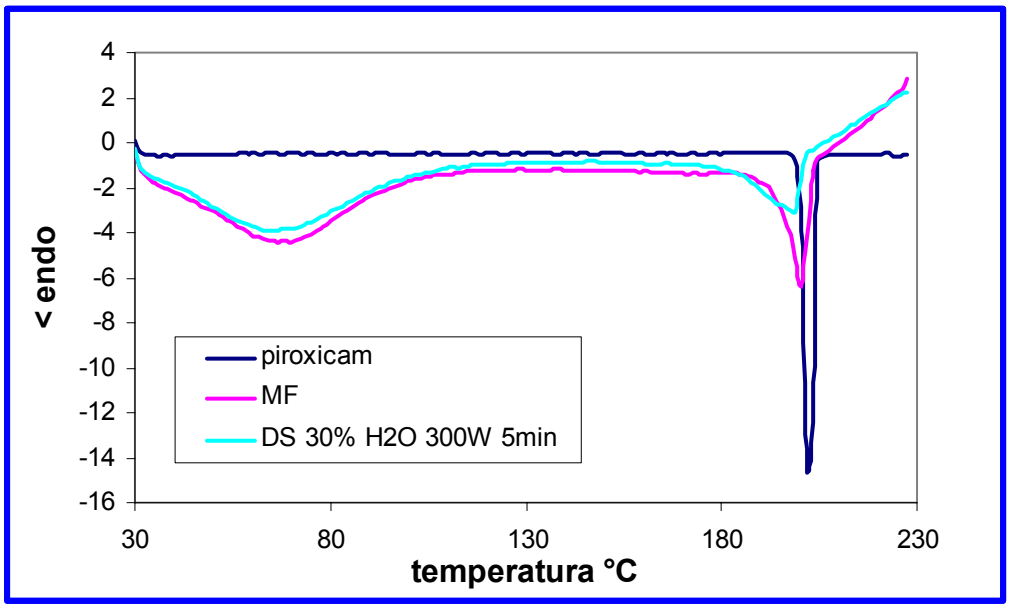
Risultati incoraggianti sono stati invece evidenziati dall'analisi DSC della corrispondente DS allestita nel reattore CEM, dove è possibile osservare la riduzione in cristallinità del principio attivo rispetto alla miscela fisica (MF).



Tale comportamento è dovuto al fatto che nel forno ad uso domestico le microonde sono diffuse in tutto il volume della camera, mentre nel caso del reattore CEM le microonde sono emesse in una camera di volume notevolmente inferiore rispetto al forno domestico e sono focalizzate direttamente sul campione. Infatti dalla figura si osserva che alle condizioni operative adottate la temperatura raggiunge i 200 °C in soli 2' 30".



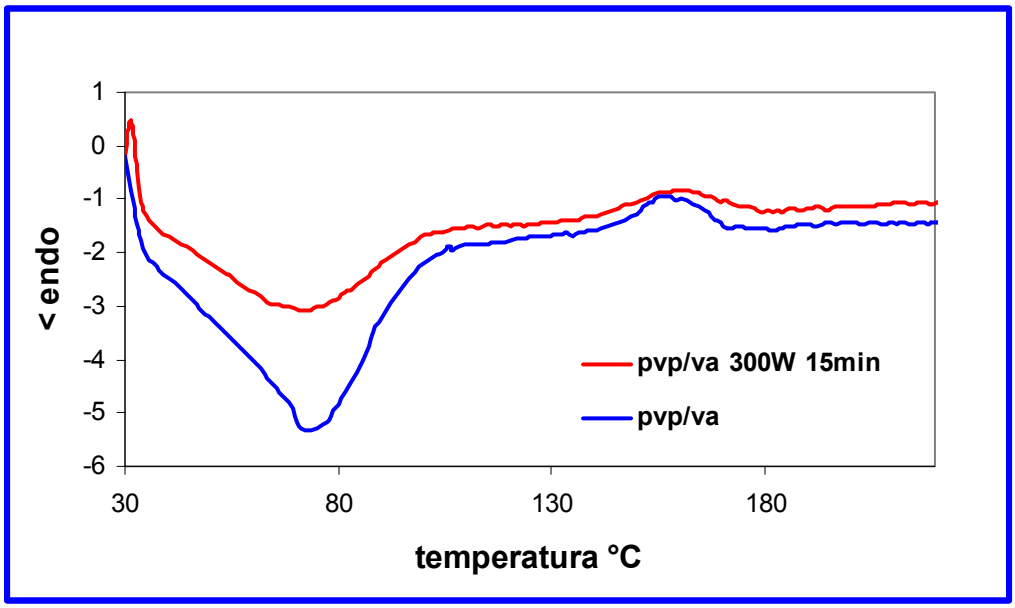
Il favorevole contributo dell'acqua sull'attivazione è stato osservato in tutti i campioni idratati, ma ininfluente è stata la percentuale di acqua addizionata. Di seguito è riportato a titolo esemplificativo il termogramma del campione piroxicam:PVP 1:1 p/p addizionato del 30% di acqua. Tuttavia il campione prodotto non era facilmente lavorabile poiché si otteneva un agglomerato di consistenza compatta.



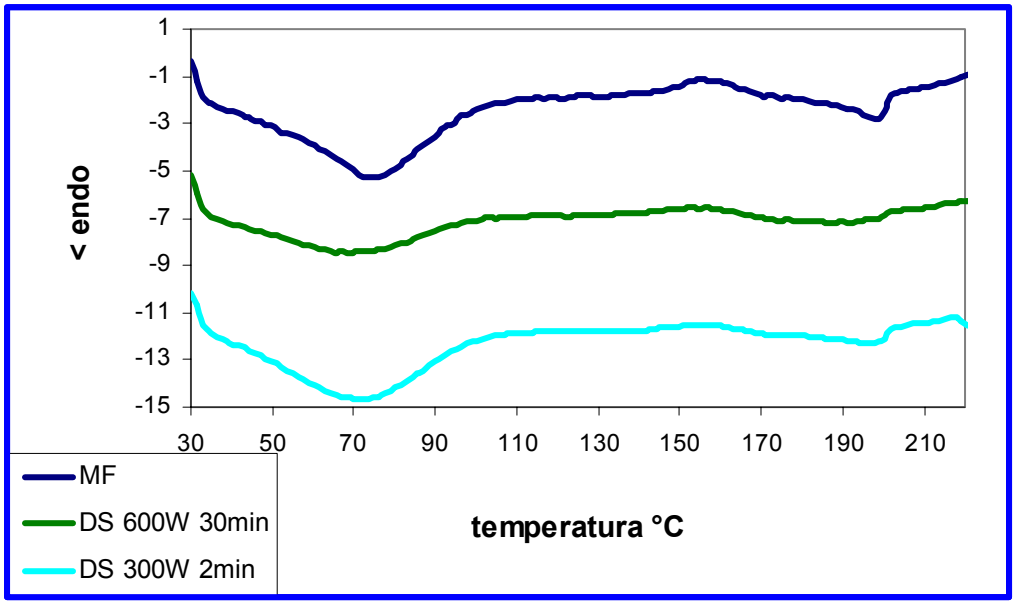
L'aumento della quantità di PVP in rapporto farmaco:polimero 1:2 e trattando la miscela a 600W per 30 minuti (forno domestico) non ha dato alcun miglioramento in termini di amorfizzazione del principio attivo.

Relativamente agli ulteriori polimeri considerati (croscarmellosio sodico, PVP/VA 60/40, amido sodio glicolato e PVP-CLM), si è ottenuto un risultato soddisfacente in termini di amorfizzazione e ottenimento di un prodotto lavorabile solo nel caso del PVP/VA 60/40, in rapporto p.a.:carrier 1:5 p/p, allestito in entrambi i microonde. Pertanto l'attenzione è stata focalizzata proprio su quest'ultimo carrier.

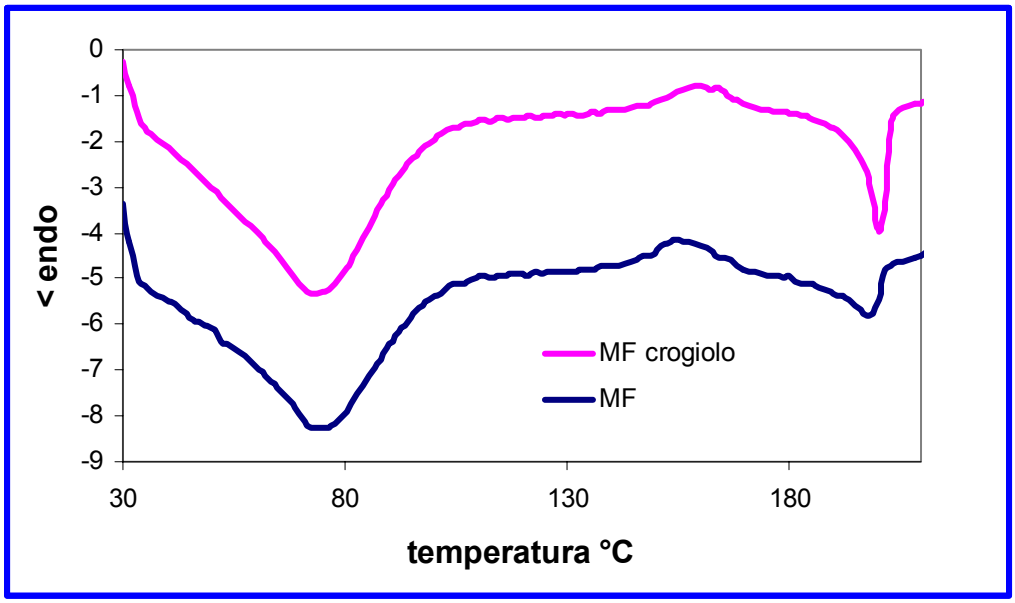
Nella figura qui di seguito è riportato il termogramma di questo copolimero sia trattato alle MW (CEM 300W 15 min) che non trattato. Relativamente al PVP/VA commerciale si può notare solamente una banda allargata corrispondente alla disidratazione del carrier e una transizione dello stato solido del polimero intorno ai 160°C. L'analisi DSC del PVP/VA MW trattato ha evidenziato la corrispondenza dello stato solido del polimero prima e dopo trattamento alle MW . L'ininfluenza del trattamento MW Samsung sul p.a. era già stata accertata.



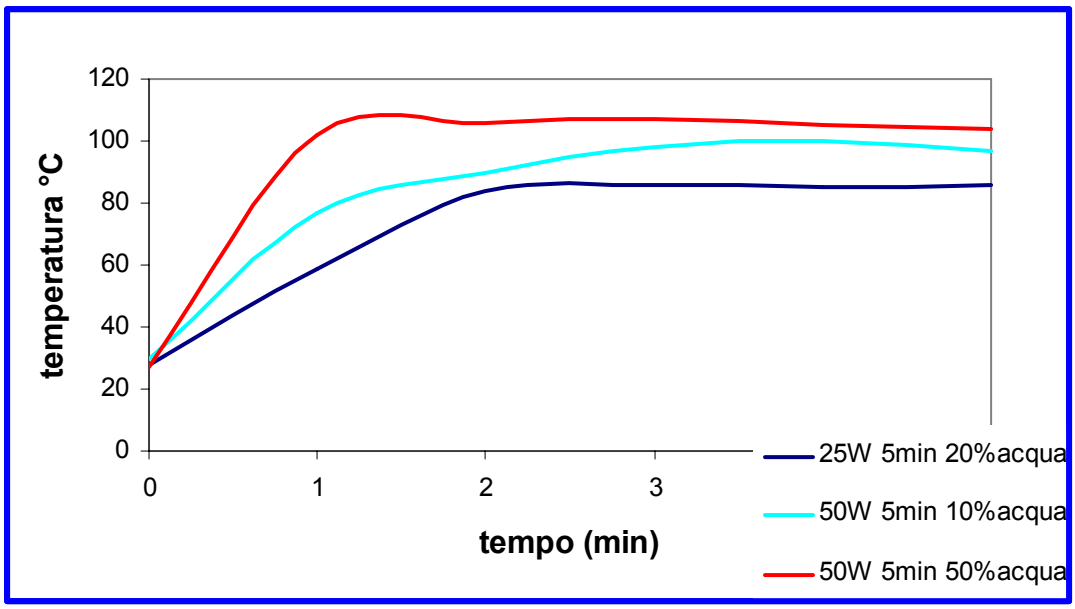
La caratterizzazione DSC delle DS, poste a confronto con le corrispondenti miscele fisiche (MF), ha evidenziato che solamente nella DS 1:5 attivata nel forno domestico Samsung per 30 minuti e nella DS 1:5 attivata nel reattore CEM a 300W per 2 min, si otteneva la quasi totale amorfizzazione del principio attivo. Nella miscela fisica corrispondente era presente il picco di fusione caratteristico del piroxicam, attestando così la presenza dello stesso in forma cristallina.



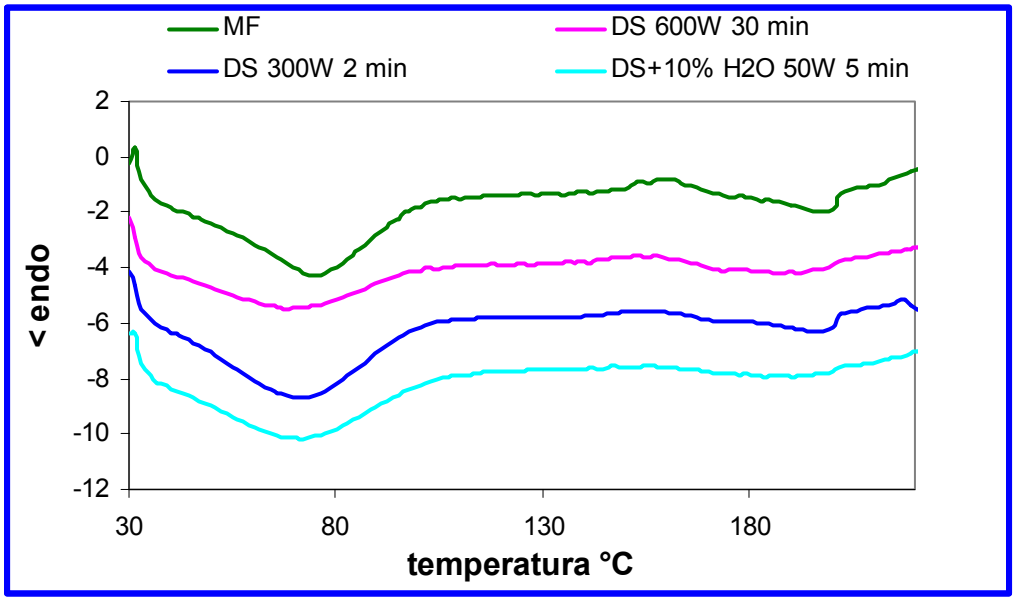
Tuttavia anche nel caso del PVP/VA, già in fase di miscelazione si è osservata una parziale riduzione della cristallinità, ad indicare un'iniziale interazione come già descritto in letteratura relativamente a tale polimero e probabilmente imputabile alla frazione PVP come già evidenziato per altri principi attivi con PVP [63-64] .



E' stata nuovamente osservata l'influenza positiva dell'aggiunta di acqua sull'attivazione nei campioni attivati nel CEM. La motivazione risiede nel fatto che l'acqua, essendo altamente "rispondente" alle MW, produce un rapido incremento della temperatura dei campioni irradiati a parità di potenza utilizzata.



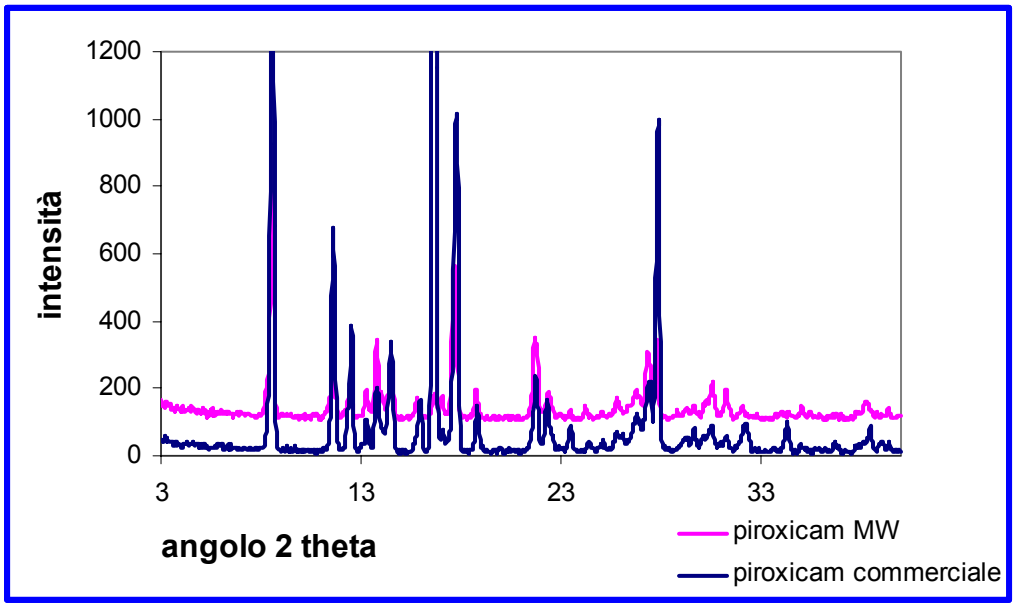
Qui di seguito sono riportati il termogramma della DS addizionata di acqua e posta a confronto con la DS 600 W 30 min in Samsung e la DS 300 W 2 min in CEM.



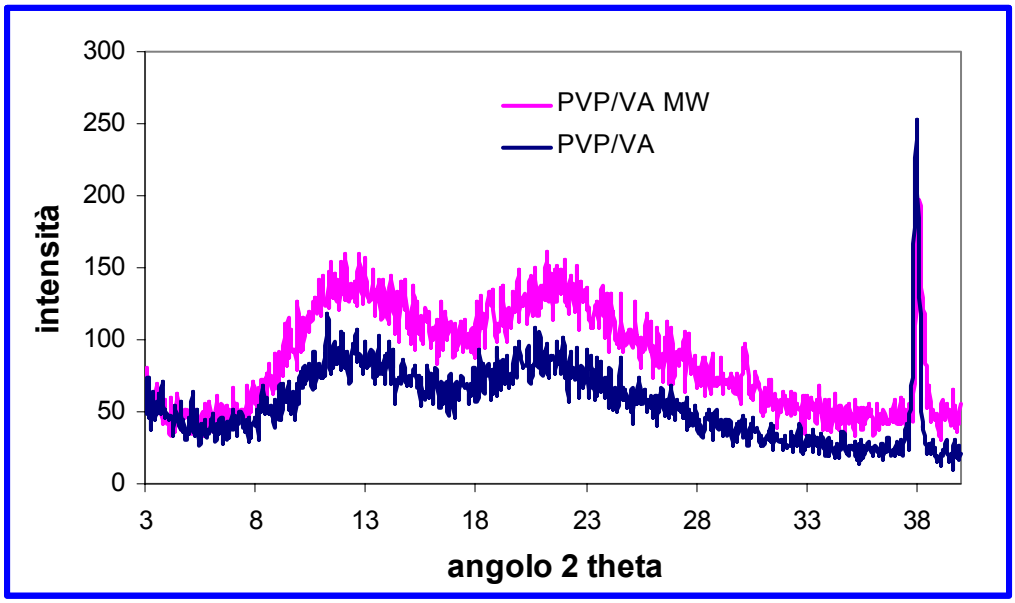
Nonostante il favorevole contributo dell'acqua sull'attivazione alle MW, i campioni erano poco lavorabili.

8.3.3 Raggi X su polvere (PXRD)

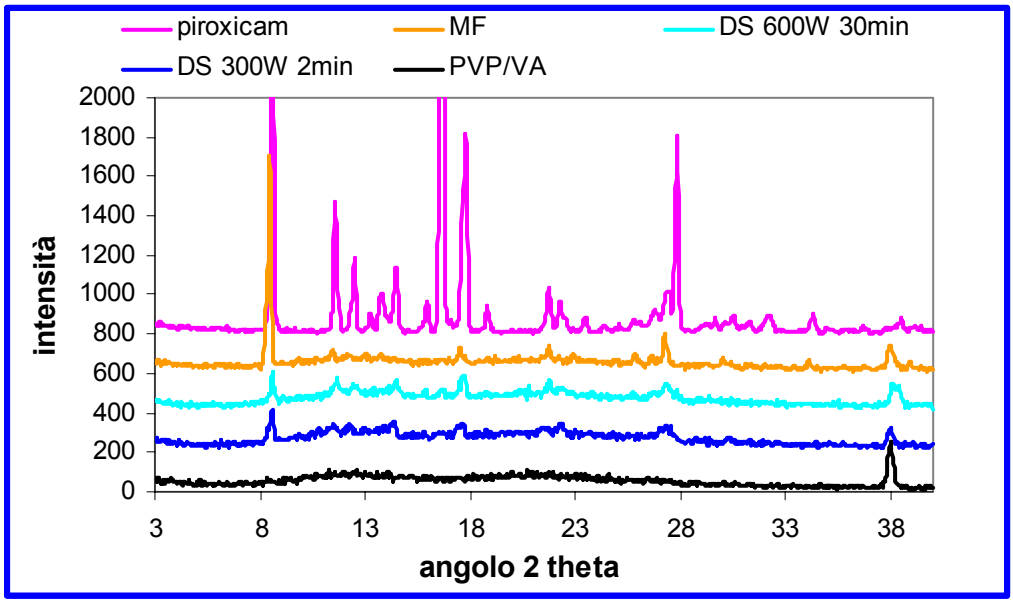
Un'ulteriore indagine per verificare l'influenza delle microonde sullo stato solido del principio attivo e del polimero è stata effettuata mediante raggi X su polvere. I diffrattogrammi ai raggi X confermano i dati delle DSC. Relativamente al piroxicam, si osserva una piena corrispondenza della posizione dei picchi a conferma del mantenimento della forma cristallina iniziale.

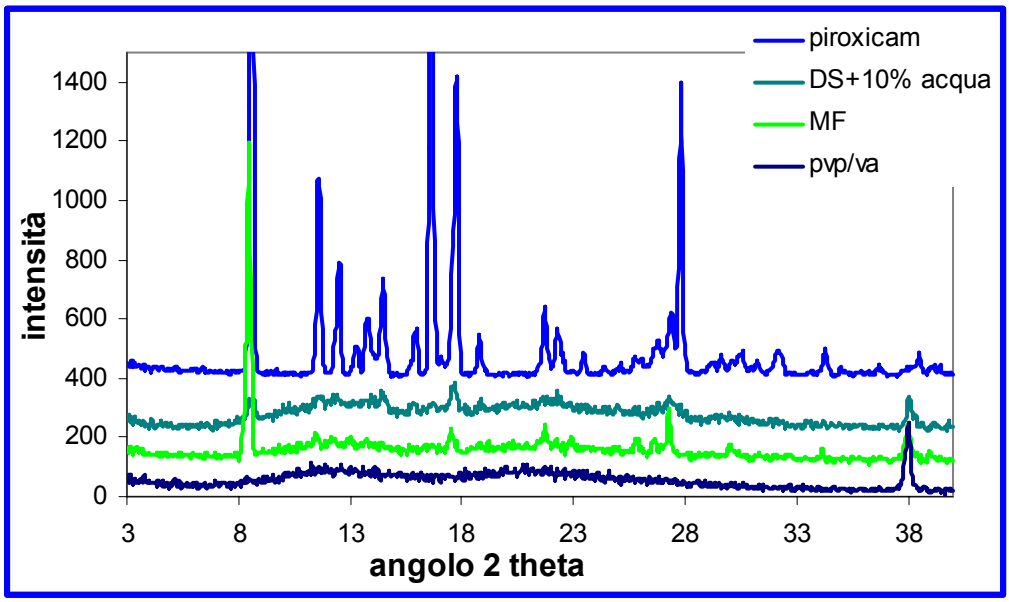


Nessuna modificazione è stata osservata nel caso del PVP/VA.



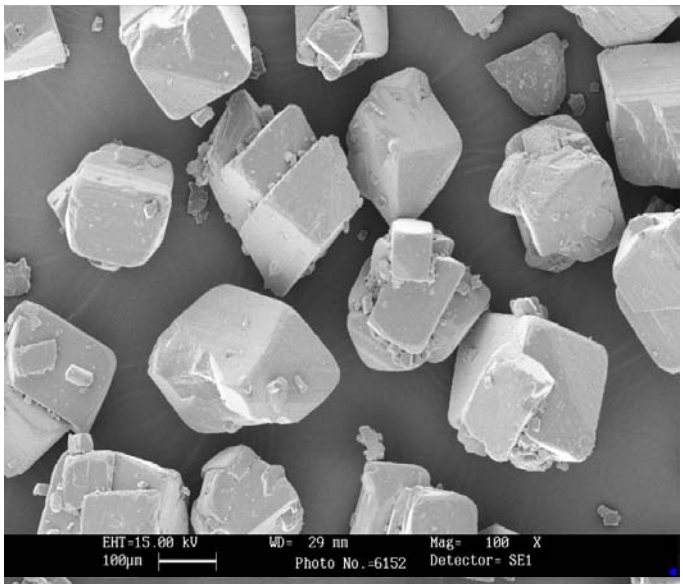
Nel caso delle DS con e senza acqua è stata rilevata l'avvenuta amorfizzazione del principio attivo dopo trattamento mediante MW e la presenza di picchi caratteristici del piroxicam ancora in forma cristallina nella miscela fisica di confronto.



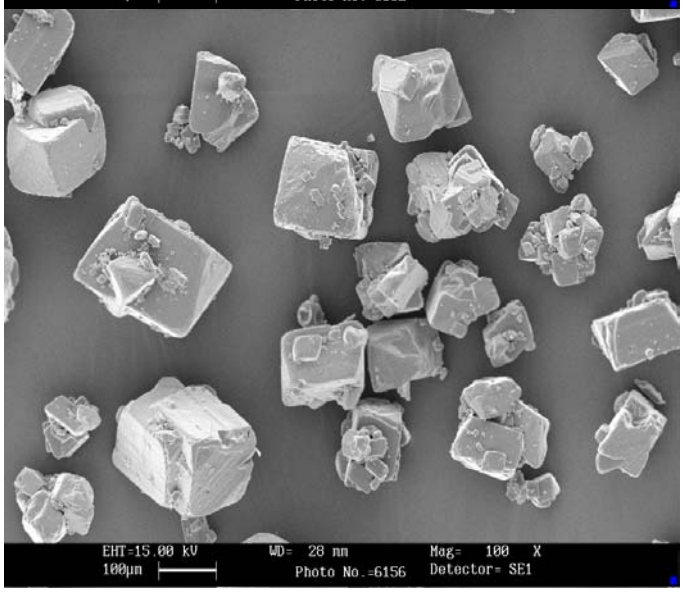


8.3.4 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Dalle immagini relative al piroxicam commerciale si osserva la presenza del p.a. sotto forma di cristalli cubici, come da letteratura. In seguito a trattamento MW si nota il mantenimento della forma e soltanto una parziale riduzione della dimensione dei cristalli.

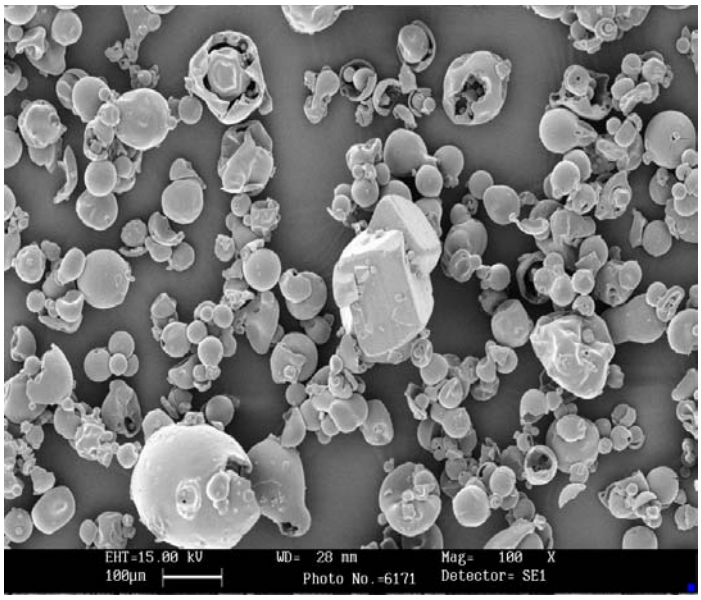


Piroxicam commerciale

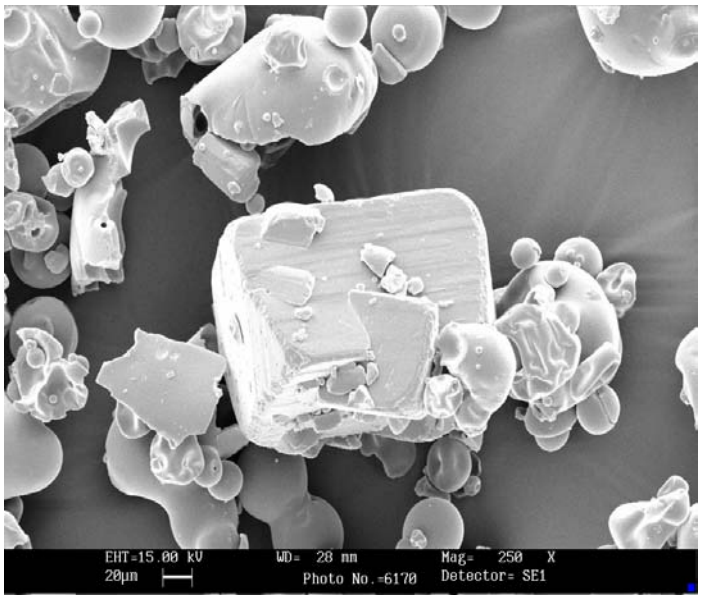


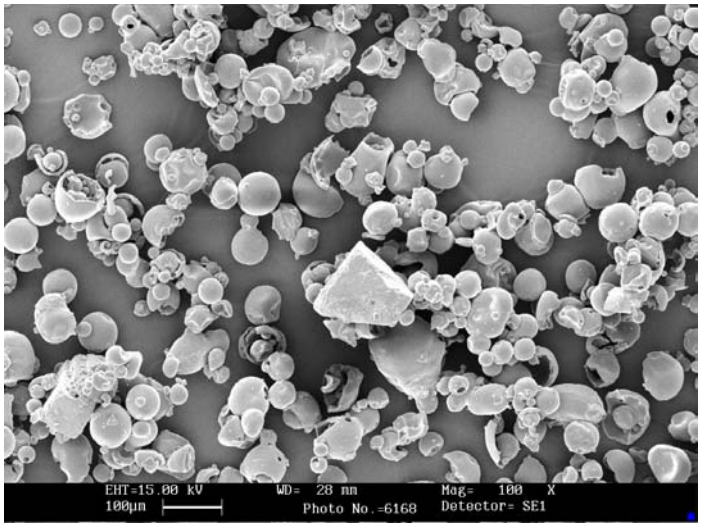
Piroxicam MW

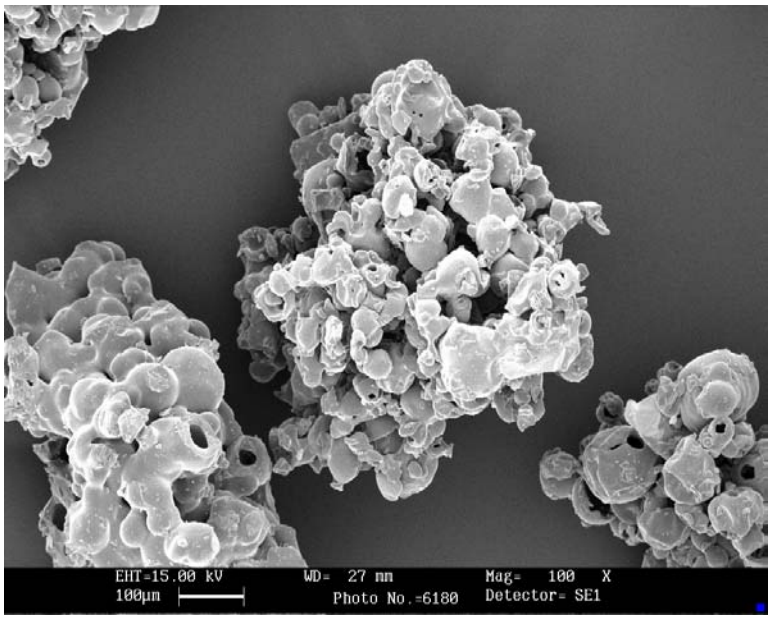
Nel caso della miscela fisica piroxicam:PVP/VA 1:5 è facilmente distinguibile il carrier e la presenza del farmaco ancora in forma cristallina e non si osservano interazioni tra i due. La corrispondente dispersione solida invece evidenzia la formazione di agglomerati e non è più distinguibile la presenza del principio attivo.



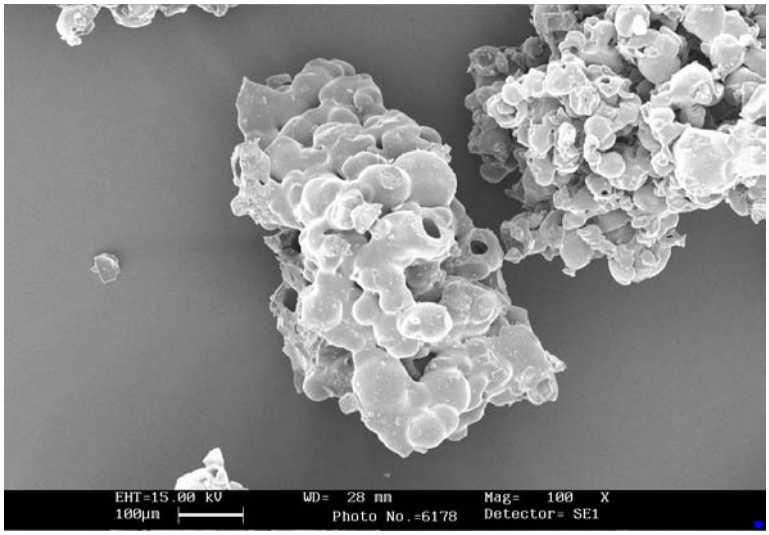
Miscela fisica piroxicam:PVP/VA 1:5

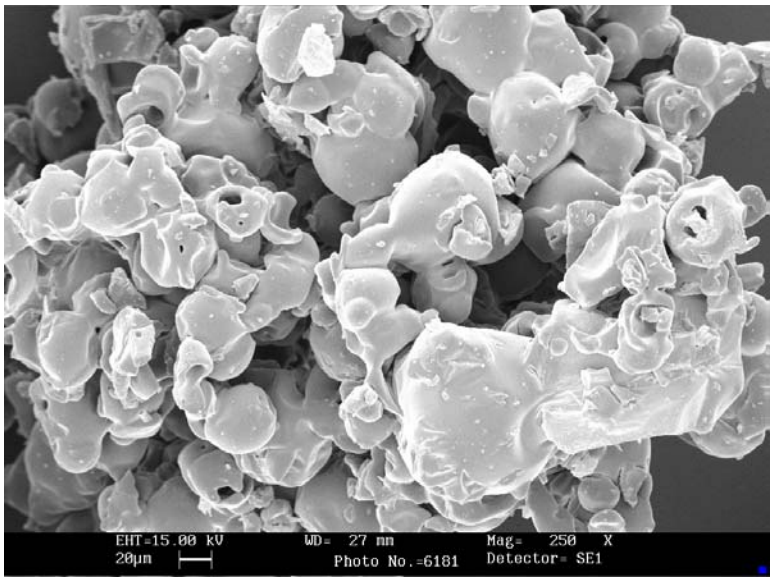






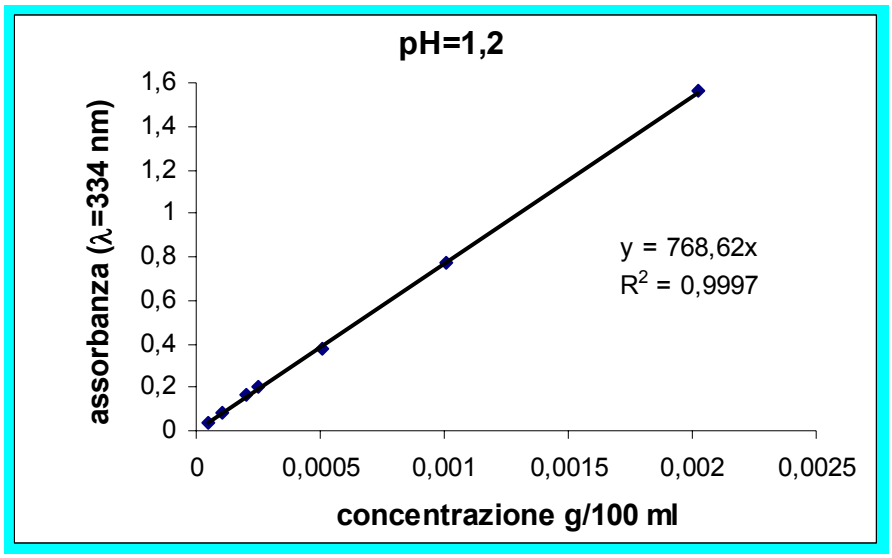
Dispersione solida piroxicam:PVP/VA 1:5

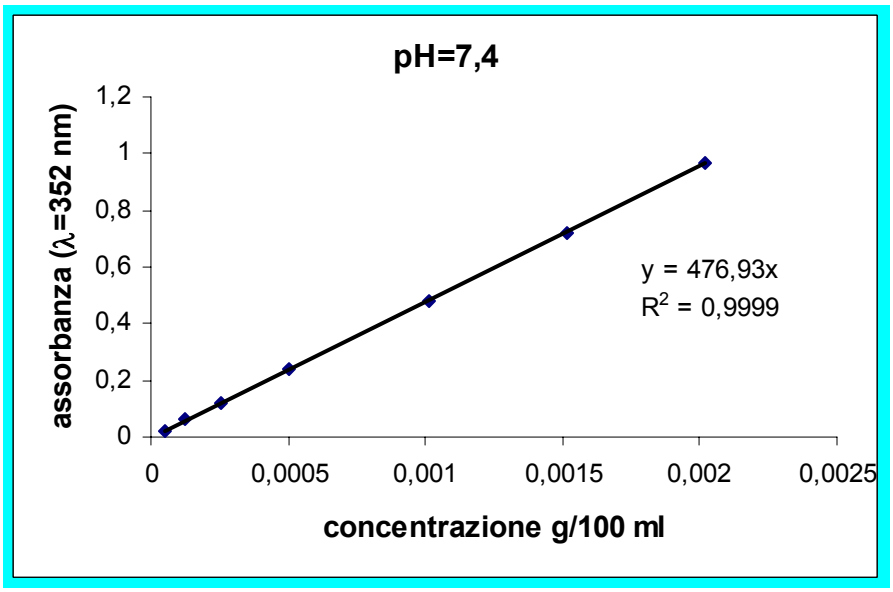




8.3.5 Test dissolutivi in vitro

Di seguto sono riportate le rette di taratura del piroxicam a pH 1,2 e 7,4.

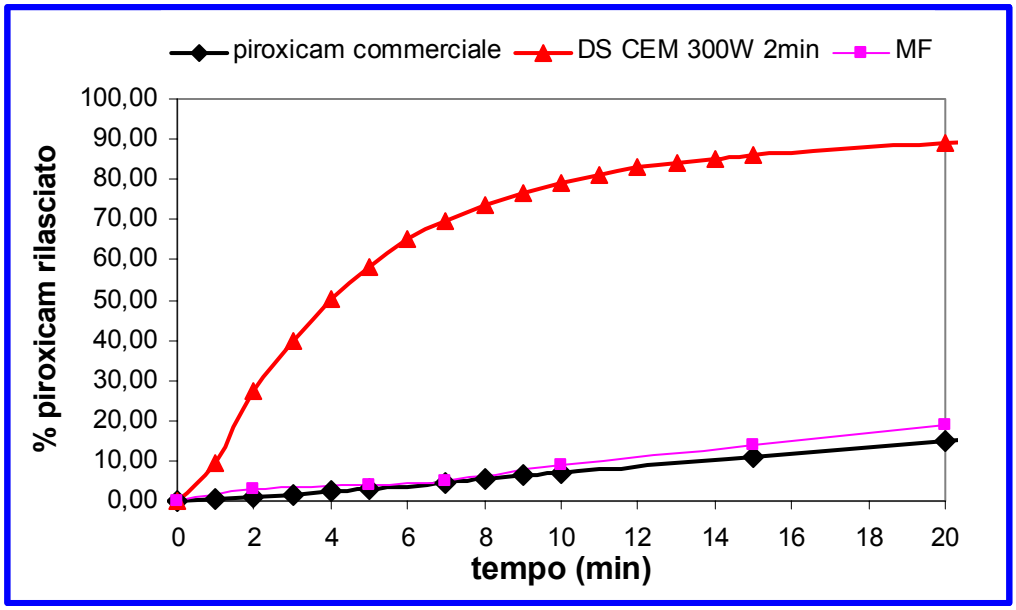




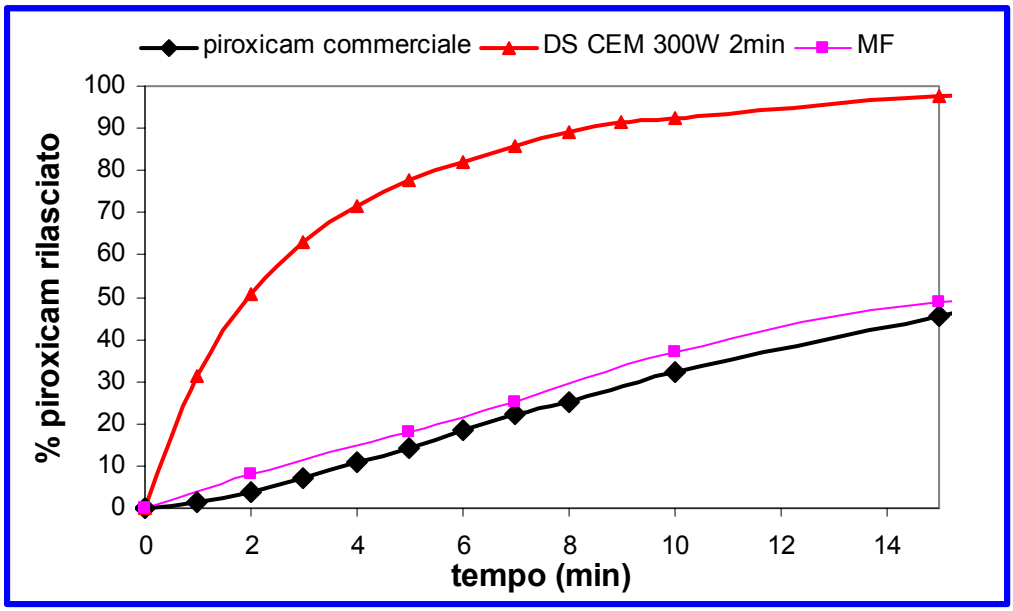
Le prove dissolutive sono state eseguite solamente sul sistema piroxicam:PVP/VA 1:5 p/p ottenuto in reattore CEM, visti i buoni risultati ottenuti dalle caratterizzazioni chimico-fisiche.

Come si può notare dai grafici sotto riportati un deciso aumento della performance dissolutiva del piroxicam dalla DS analizzata è stato ottenuto rispetto ai campioni di confronto ad entrambi i valori di pH

DRT pH 1.2



DRT pH 7.4



8.4 CONCLUSIONI

Anche in questo studio è stato possibile verificare l'applicabilità delle MW alla creazione di sistemi dispersi solvent-free. Gli indiscussi vantaggi al ricorso ad un reattore a MW focalizzate (CEM) in termini di tempi e potenze applicate sono stati verificati. Il raggiungimento dell'obiettivo del lavoro e cioè l'aumento della biodisponibilità in vitro del piroxicam è stato ottenuto associando alla tecnologia adottata il polimero PVP/VA 64.

CONCLUSIONI

L'obiettivo del lavoro sviluppato in questo triennio ha principalmente riguardato l'aumento della biodisponibilità di principi attivi poco solubili attraverso l'applicazione di nuove tecnologie preparative. Più esattamente, le tecnologie adottate sono state la NEC (nanoemulsified composites), brevettata dalla ditta Remedia srl, con la collaborazione della quale è stato sviluppato il presente lavoro, e una tecnologia formulativa recentemente proposta in letteratura e cioè la preparazione di sistemi dispersi mediante l'applicazione delle microonde.

Più esattamente, mediante tecnologia NEC sono stati preparati dei prodotti compositi a base di Ubidecarenone e Ciclosporina. Le caratterizzazioni chimico-fisiche effettuate hanno evidenziato la formazione di micro-nanocristalli o la riduzione in cristallinità. Le microemulsioni studiate avevano dimensioni inferiori ad 1 μm. Gli studi in vivo condotti su ratto hanno rivelato l'aumento di biodisponibilità dei principi attivi considerati rispetto ad un sistema di riferimento. I risultati ottenuti hanno confermato la validità della tecnologia NEC.

Relativamente all'impiego delle microonde, è stato necessario effettuare numerosi studi preliminari di messa a punto delle condizioni operative. Mediante tale tecnologia sono state preparate dispersioni solide a base di Ibuprofene e Piroxicam. Anche in questo caso le caratterizzazioni chimico-fisiche hanno evidenziato la totale o quasi totale amorfizzazione del p.a. offrendo risultati positivi in termini di profili dissolutivi.

Pertanto tale tecnologia permette l'ottenimento in tempi brevi di attivazione di sistemi dispersi solvent-free.

Bibliografia

[1] Gershanik, T., Benita, S., (2000). Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs. Eur. J. Pharm. Biopharm. 50, 179-188.

[2] Kommuru, T.R., Gurley, B., Khan, M.A., Reddy, I.K. (2001). Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q_{10}: formulation development and bioavailability assessment. Int. J. Pharm. 212, 233-246.

[3] Löbenberg, R., Amidon, G.L., (2000). Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classficaton system. New scientific approaches to international regulatory standards. Eur. J. Pharm. Biopharm. 50, 3-12.

[4] Schwarz, J., Lee, M. (2000). Self-emulsifying controlled release tablet: new type of delivery system for hydrophobic drugs. Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 27. Controlled Release Society, Inc.

[5] Charman, S.A., Charman, W.N., Rogge, M.C., Wilson, T.D., Dutko, F.J., Pouton, C.W. (1991). Self-emulsifying drug delivery systems: formulation and biopharmaceutical evaluation of an investigational lipophilic compound. Pharm. Res. 9(1), 87-93.

[6] Kawakami, K., Yoshikawa, T., Moroto, Y., Kanaoka, E., Takahashi, K., Nishihara, Y., Masuda, K., (2002). Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs. I Prescription design. J. Controlled Release 81, 65-74.

[7] Costantinides, P.P., (1995). Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. Pharm. Res. 12(11), 1561-1572.

[8] Malmsten, M. (2002). Surfactants and polymers in drug delivery, pp. 133-159. Marcel Dekker, New York Inc.

[9] Amorosa, M. (1998). Principi di tecnica farmaceutica e cenni di legislazione sanitaria per l'esercizio della professione di farmacista. Libreria Universitaria L. Tinarelli – Bologna.

[10] Pays, K., Giermanska-Khan, J., Pouligny, B., Bibette, J., Leal-Calderon, F., (2001). Double emulsions: how does release occur?. J. Controlled Release 79, 193-205.

[11] Chambin, O., Bellone, C., Champion, D., Rochat-Gonthier, M.H., Pourcelot, Y. (2000). Dry adsorbed emulsion: 1. Characterization of an intricate physicochemical structure. J. Pharm. Sci. 89(8), 991-999.

[12] Florence A. T., Attwood D., (2002). Le basi chimico fisiche della tecnologia farmaceutica. Macmillian Press. LTD Napoli.

[13] Sekiguchi K. and Obi. N., (1961). Studies on Absorption of Eutectic Mixture of Sulfathiazole and that of Ordinary Sulfathiazole in Man. Chem. Pharm. Bull., **9**, 866-872.

[14] Chiou W. L., Riegelman S., (1971). Pharmaceutical applications of solid dispersion systems. J. Pharm. Sci., 60, 1281-1302.

[15] Craig D. Q., (2002). The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers. Int. J. Pharm., 231(2),131-44.

[16] Ford J. L., (1986). The current status of solid dispersions. Pharm. Acta Helve., 61, 69-88.

[17] Block D. W., Speiser P. P., (1987). Solid dispersion, fondamental and examples. Pharm. Acta Helv., 62, 23-27.

[18] Wells J. I., (1988). In: Pharmaceutical preformulation: the pysicochemical properties of drug substances. Ellis Horwood, Chichester, pp. 25-28.

[19] Carstensen J. T., (1993). Pharmaceutical principles of solid dosage forms. Ed. Thechnomic Publisching Co., Inc. Usa.

[20] Santagata V., Caliendo G., (2003). Peptidi e Peptidomimetici, 647 – 684, Piccin Padova.

[21] Merck Index 12a edizione p. 1679.

[22] Kommuru, T.R., Ashraf, M., Khan, M.A., Reddy, I.K. (1999). Stability and bioequivalence studies of two marketed formulations of coenzyme Q_{10} in beagle dogs. Chem. Pharm. Bull. 47(7), 1024-1028.

[23] Greenberg, S. and Fishman, W.H., (1990). Coenzyme Q10: a new drug for cardiovascular disease. J. Clin. Pharmacol. 30, 590–608.

[24] Upton, H. (2001). Origin of drugs in current use: the cyclosporin story. www.world-of-fungi.org/Mostly_Medical/ Harriet_Upton/Harriet_Upton.htm

[25] Ran, Y., Zhao, L., Xu,Q., Yalkowsky, S.H. (2001). Solubilization of cyclosporin A. AAPS PharmSciTech 2(1) article 2.

[26] Lindholm, A., Henricsson, S., Lind, M., Dahlquivist, R. (1988). Intra-individual variability in the relative systemic availability of cyclosporine after oral dosing. Eur. J. Clin. Pharmacol. 34(5), 461-464.

[27] Meinzer, A., Mueller, E., Vonderscher, J. (1995). Microemulsion – A suitable galenical approach for the absorption enhancement of low soluble compounds. B.T. Gattefossé N°88,21-26.

[28] Foye's (2005). Principi di chimica farmaceutica, David A. Williams, Thomas L. Lemke, 771-772 Padova.

[29] Higgins J. D., Gilmor T. P., Martellucci S. A., Bruce R. D., Brittain H. G., (2001). Ibuprofene in: Analytical profiles of drug substances and excipientes. Accademic Press, 27, 265-300.

[30] Potthast H., Dressman J. B., Junginger H. E., Midha K. K., Oeser H., Shah V. P., Vogelpoel H., Barends D. M., (2005). Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: ibuprofen, Wiley Iterscience (www. Interscience.wiley.com). D01 10.1002/jps.20444.

[31] Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., Moore P.K., (2005). Farmacologia, Ed. Ambrosiana Milano.

[32] Jug, M., Bečirevič-Lačan, M. (2004). Influence of hydroxypropyl-b-cyclodextrin complexation on piroxicam release from buccoadhesive tablets. Eur. J. Pharm. Sci. 21, 251-260.

[33] Ayşegül, K., Nilüfer, Y., Tamer, B. (2005). Improved solubility and dissolution rate of piroxicam using gelucire 44/14 and labrasol. Il Farmaco 60, 777-782.

[34] Borne R.F. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Principles of medicinal chemistry (fourth edition). Editors: W.O. Foye, T.L. Lemke, D.A. Williams. pp. 567-569. A Lea & Febiger Book, Williams & Wilkins.

[35] Sheth, A.R., Bates, S., Muller, F.X., Grant, D.J.W. (2004). Polymorphism in piroxicam. Crystal growth and design 4(6), 1091-1098.

[36] Kozjek, F., Golič, L. (1985). Physico-chemical properties and bioavailability of two crystal forms of piroxicam. Acta Pharm. Jugosl. 35, 275-281.

[37] Mihalič, M., Hofman, H., Kuftinec, J., Krile,B., Čaplar, V., Kajfež, F., Blaževič, N. (1986). Piroxicam. Analytical Profiles of Drug Substances – Ed. Florey vol.15 pp.509-531.

[38] Reck, G., Dietz, G., Laban, G., Günther, W., Bannier, G., Höhne, E. (1988). X-ray studies on piroxicam modification. Pharmazie 43,477-481.

[39] Reck, G., Laban, G. (1990). Prediction and establishment of a new crystalline pyroxicam modification. Pharmazie 45, 257-259.

[40] Vrečer, F., Srčič, S., Korbar, J.Š. (1991). Investigation of piroxicam polymorphism. Int. J. Pharm. 68, 35-41.

[41] Carli, F., Chiellini, E.E. (2003). Int. Pat. Appl. WO03/013421.

[42] Carli, F., Chiellini, E.E., Bellich, B., Macchiavelli, S., Cadelli, G. (2005). Ubidecarenone nanoemulsified composite systems. Int. J. Pharm. 291, 113-118.

[43] Colombo, P., Catellani, P.L., Gazzaniga, A., Menegatti, E., Vidale, E. (2004). Principi di tecnologie farmaceutiche. Casa Editrice Ambrosiana.

[44] http://www.lswn.it/node/256/print.

[45] Kerč, J., Srčič, S., Kofler, B. (1998). Alternative solvent-free preparation methods for felodipine surface solid dispersions. Drug Dev. Ind. Pharm. 24(4), 359-363.

[46] Bergese, P., Colombo, I., Gervasoni, D., Depero, L.E. (2003). Microwave generated nanocomposites for making insoluble drugs soluble. Mat. Sci. Eng. 23, 791-795.

[47] Colombo, I., Gervasoni, D. (2006). Stabilised solid drug dispersion in an organic carrier and a process for preparing the same. PATENT US 2006/0051422 A1

[48] Xianhong, W., Fei, T., Zhijun, J., Ziuyang, L. (2004). Preparation and study the 1:2 inclusion complex of carvedilol with β-cyclodextrin. J. Pharm. Biomed. Analysis 34, 517-523.

[49] http://www.expomo.com/azienda/dettaglio.asp?id=3325&lgn=2

[50] http://www.fineprint.com.

[51] McLoughlin, C.M., McMinn, W.A.M., Magee, T.R.A. (2003). Physical and dielectric properties of pharmaceutical powders. Powder Technology 134, 40-51.

[52] http://www.geocities.com/ingegnerechimico/reazionimicro.htm?200625.

[53] http://www.cem.com/synthesis/disc_features.asp.

[54] Passerini, N., Craig, D.Q.M. (2002). Characterization of cyclosporin A loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres using modulated temperature differential scanning calorimetry. J. Pharm. Pharmacol. 54, 913-919.

[55] Young, T.J., Johnston, K.P., Pace, G.W., Mishra, A.K. (2003). Phospholipid-stabilised nanoparticles of Cyclosporine A by rapid expansion from supercritical to aqueous solution. AAPS PharmSciTech 5(1) article 11.

[56] Chauhan, B., Shimpi, S., Paradkar, A. (2005). Preparation and Characterization of Etoricoxib Solid Dispersions Using Lipid Carriers by Spray Drying Technique. AAPS PharmSciTech.; 6(3): E405-E412.

[57] Passerini, N., Albertini, B., González-Rodríguez, M. L., Cavallari C., Rodriguez, L. (2002). Preparation and characterisation of ibuprofen–poloxamer 188 granules obtained by melt granulation. Eur. J. Pharm. Sci. 15, 71-78.

[58] Mallick, S., Pattnaik, S., Swain, K., De, P.K., Saha, A., Ghoshal, G., Mondal, A.(2008). Formation of physically stable amorphous phase of ibuprofen by solid state milling with kaolin. Eur. J. Pharm. Biopharm. 68, 346-351.

[59] Rasenack N., Müller B. W., (2002). Crystal habit and tableting behaviour. Int. J. Pharm. 244, 45-57.

[60] Cirri M., Mura P., Rabasco A. M., Gines J. M., Moyano J. R., Gonzalez-Rodriguez M. L., (2004). Characterization of Ibuproxam Binary and Ternari Dispersions with Hydrophilic Carriers. Drug Dev. Ind. Pharm. 30(1) 65-74.

[61] Garekani H. A., Sadeghi F., Badiee A., Mostafa S. A., Rajabi-Sishboomi A. R., (2001). Crystal habit Modifications of Ibuprofen and their physicomechanical characteristics. Drug Dev. Ind. Pharm. 27(8) 803-809.

[62] Manisch M., Harshal J., Anant P., (2005). Melt sonocrystallization of ibuprofen: effect on crystal properties. Eur. J. Pharm. Sci. 25 41-48.

[63] Marini A., Berbenni V., Moioli M., Bruni G., Cofrancesco P., Margheritis C., and Villa M.,(2003). Drug – Excipient Compatibility Studies by Physico – Chemical techniques; the case of indomethacin. J. Therm. Anal. Cal. 73, 529 – 545.

[64] Marini M., Berbenni V., Pegoretti M., Bruni G., Cofrancesco P., Sinistri C., and Villa M., (2003). Drug – Excipient Compatibility Studies by Physico – Chemical techniques; the case of atenolol. J. Therm. Anal. Cal. 73, 547 - 561.

1. **INTRODUZIONE** pag. 1

2. SCOPO DEL LAVORO pag. 5

3. PRINCIPI ATTIVI POCO SOLUBILI pag. 6

3.1 UBIDECARENONE pag. 6

3.2 CICLOSPORINA pag. 6

3.3 IBUPROFENE pag. 7

3.4 PIROXICAM pag. 9

4. TECNOLOGIE IMPIEGATE PER LA PREPARAZIONE DI MATERIALE COMPOSITO pag. 11

4.1 TECNOLOGIA NEC™ NANOEMULSIFIED COMPOSITES pag. 11

4.1.1 Solubilità del p.a. in miscele oleose pag. 11

4.1.2 Formulazione di una microemulsione doppia pag. 12

4.1.3 Caricamento su carrier pag. 12

4.2 ATTIVAZIONE MEDIANTE MICROONDE (MW) pag. 13

4.2.1 Caratteristiche delle microonde pag. 14

4.2.2 Riscaldamento mediante microonde pag. 14

5. PRODOTTI COMPOSITI A BASE DI UBIDECARENONE pag. 17

5.1. MATERIALI E METODI pag. 17

5.1.1 Materiali pag. 17

5.1.2 Preparazione dei prodotti compositi pag. 18

5.2 CARATTERIZZAZIONE DEL PRODOTTO COMPOSITO pag. 18

5.2.1 Contenuto di farmaco pag. 18

5.2.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC) pag. 19

5.2.3 Raggi X su polvere (PXRD) pag. 19

5.2.4 Termomicroscopia (HSM) pag. 19

5.2.5 Cinetica di solubilizzazione in fluido intestinale simulato (pH 7.4) pag. 19

5.2.6 Determinazione delle dimensioni della microemulsione rilasciata pag. 20

5.3 STUDI IN VIVO pag. 20

5.4 PREPARAZIONE DI FORME FARMACEUTICHE SOLIDE ORALI pag. 21

5.4.1 Preparazione di capsule opercolate pag. 21

5.4.2 Preparazione di compresse pag. 21

5.5 RISULTATI E DISCUSSIONE pag. 23

5.5.1 Preparazione dei prodotti compositi pag. 23

5.5.2 Contenuto di farmaco pag. 23

5.5.3 Calorimetria a scansione differenziale (DSC) pag. 24

5.5.4 Raggi X su polvere (PXRD) pag. 28

5.5.5 Termomicroscopia (HSM) pag. 29

5.5.6 Cinetica di solubilizzazione in fluido intestinale simulato (pH 7.4) pag. 30

5.5.7 Determinazione delle dimensioni della microemulsione rilasciata pag. 32

5.6 STUDI IN VIVO pag. 33

5.7 PREPARAZIONE DI FORME FARMACEUTICHE SOLIDE ORALI pag. 34

5.7.1 Preparazione di capsule opercolate pag. 34

5.7.2 Preparazione di compresse pag. 34

5.8 CONCLUSIONI pag. 35

6. PRODOTTO COMPOSITO A BASE DI CICLOSPORINA pag. 36

6.1 MATERIALI E METODI pag. 36

6.1.1 Materiali pag. 36

6.1.2 Preparazione del prodotto composito pag. 36

6.2 CARATTERIZZAZIONE DEL PRODOTTO COMPOSITO pag. 36

6.2.1 Contenuto di farmaco pag. 36

6.2.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC) pag. 37

6.2.3 Raggi X su polvere (PXRD) pag. 37

6.2.4 Cinetica di solubilizzazione in fluido intestinale simulato (pH 7.4) pag. 37

6.2.5 Determinazione delle dimensioni della microemulsione rilasciata pag.38

6.3 STUDI IN VIVO pag. 38

6.4 RISULTATI E DISCUSSIONE pag. 39

6.4.1 Preparazione del prodotto composito pag. 39

6.4.2 Contenuto di farmaco pag. 39

6.4.3 Calorimetria a scansione differenziale (DSC) pag. 39

6.4.4 Raggi X su polvere (PXRD) pag. 40

6.4.5 Cinetica di solubilizzazione in fluido intestinale simulato (pH 7.4) pag. 43

6.4.6 Determinazione delle dimensioni della microemulsione pag. 44

6.5 STUDI IN VIVO pag. 45

6.6. CONCLUSIONI pag. 45

7. PRODOTTI COMPOSITI A BASE DI IBUPROFENE pag. 46

7.1 MATERIALI E METODI pag. 46

7.1.1 Materiali pag. 46

7.1.2 Esperimenti preliminari pag. 46

7.1.3 Preparazione dei sistemi farmaco-polimero pag. 47

7.2 CARATTERIZZAZIONE DEI SISTEMI pag. 47

7.2.1 Contenuto di farmaco pag. 47

7.2.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC) pag. 48

7.2.3 Raggi X su polvere (PXRD) pag. 48

7.2.4 Microscopia elettronica a scansione (SEM) pag. 48

7.2.5 Test dissolutivi in vitro pag. 49

7.3 RISULTATI E DISCUSSIONE pag. 50

7.3.1 Contenuto di farmaco pag. 50

7.3.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC) pag. 50

7.3.3 Raggi X su polvere (PXRD) pag. 56

7.3.4 Microscopia elettronica a scansione (SEM) pag. 60

7.3.5 Test dissolutivi in vitro pag. 63

7.4 CONCLUSIONI pag. 65

8. PRODOTTI COMPOSITI A BASE DI PIROXICAM pag. 66

8.1 MATERIALI E METODI pag. 66

8.1.1 Materiali pag. 66

8.1.2 Preparazione dei sistemi farmaco-polimero pag. 66

8.2 CARATTERIZZAZIONE DEI SISTEMI FARMACO:POLIMERO pag. 67

8.2.1 Contenuto di farmaco pag. 67

8.2.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC) pag. 68

8.2.3 Raggi X su polvere (PXRD) pag. 68

8.2.4. Microscopia elettronica a scansione (SEM) pag. 68

8.2.5 Test dissolutivi in vitro pag. 69

8.3 RISULTATI E DISCUSSIONE pag. 69

8.3.1 Contenuto di farmaco pag. 69

8.3.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC) pag. 70

8.3.3 Raggi X su polvere (PXRD) pag. 78

8.3.4 Microscopia elettronica a scansione (SEM) pag. 80

8.3.5 Test dissolutivi in vitro pag. 84

8.4 CONCLUSIONI pag. 86

CONCLUSIONI pag. 87

BIBLIOGRAFIA pag. 88