

SRP80/8

1061653

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

DOTTORATO DI RICERCA IN INGEGNERIA E SCIENZA DEI  
MATERIALI

Indirizzo tecnologico-farmaceutico

XVII° ciclo

TESI DI DOTTORATO

SISTEMI ALTERNATIVI PER LA VEICOLAZIONE DI  
FARMACI IN FORME FARMACEUTICHE ORALI

Dottoranda:

Erica Franceschinis 174

Università di Trieste

cn

Tutore:

Chiar.mo Prof. Dario Voinovich

Università di Trieste

Co-tutore:

Chiar.mo Dott. Ing. Mario Grassi

Università di Trieste

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Sergio Meriani

Università di Trieste

# INDICE

INDICE	4
CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	6
CAPITOLO 2 – ESTRUSIONE PER FUSIONE	12
2.1. FORMULAZIONI RITARDO E PROCESSO DI ESTRUSIONE	13
2.1.1. Estrusori a vite	14
2.1.2. Estrusori a pistone	17
2.2. PARTE SPERIMENTALE	18
2.2.1. Materiali	18
2.2.2. Apparecchiatura	19
2.2.3. Preparazione degli estrusi	20
2.2.4. Progettazione delle prove sperimentali	21
2.2.5. Caratterizzazione degli estrusi	23
<i>Determinazione della velocità intrinseca</i>	
<i>Studi morfologici</i>	
<i>Test di dissoluzione in vitro</i>	
<i>Analisi della presenza di farmaco in superficie (XPS)</i>	
<i>Modelling del meccanismo di rilascio del farmaco</i>	
<i>Studi in vivo</i>	
<i>Determinazione della teofillina in vivo</i>	
2.3. RISULTATI E DISCUSSIONE	35
CAPITOLO 3 – SISTEMI AUTOEMULSIONANTI	61
3.1. SISTEMI AUTOEMULSIONANTI SOLIDI E GRANULAZIONE AD UMIDO	62

3.2. PARTE SPERIMENTALE	72
3.2.1. Materiali	72
3.2.2. Apparecchiature	72
3.2.3. Preparazione dei granulati	74
3.2.4. Progettazione delle prove sperimentali	76
3.2.5 Caratterizzazione dei granulati	80
<i>Analisi granulometrica</i>	
<i>Studi morfologici</i>	
<i>Determinazione della densità vera e calcolo della porosità</i>	
<i>Test di disaggregazione</i>	
<i>Test di dissoluzione in vitro</i>	
<i>Analisi dell'immagine</i>	
<i>Determinazione della permeazione attraverso membrane (prove ex-vivo)</i>	
<i>Determinazione delle dimensioni delle micelle mediante Laser Light Scattering</i>	
3.3. RISULTATI E DISCUSSIONE	93
CONCLUSIONI	111
BIBLIOGRAFIA	112

## CAPITOLO 1

### INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

La via orale di somministrazione dei farmaci è senza dubbio la via più conveniente per accedere alla circolazione sistemica, infatti presenta numerosi vantaggi rappresentati soprattutto dall' ampia superficie della mucosa intestinale deputata all'assorbimento, dalla possibilità di automedicazione (e quindi dalla elevata compliance da parte del paziente), dalla possibilità di controllare la velocità di rilascio del principio attivo, a seconda delle esigenze farmacologiche e dal minor costo del processo produttivo delle forme orali rispetto a quelle parenterali (Colombo P. et al., 2004). Tuttavia, la somministrazione per via orale presenta anche alcuni svantaggi, che talvolta possono limitarne l'impiego, come ad esempio in presenza di patologie a carico del sistema gastrointestinale o di fenomeni specifici di intolleranza ed in pazienti non coscienti. Inoltre c'è da ricordare che, fattori quali pH del contenuto gastrointestinale, presenza di enzimi, di materiale alimentare, sali biliari, grassi e flora microbica sono in grado di influenzare l'assorbimento dei farmaci. Questa via di somministrazione, inoltre, può comportare una riduzione dell'assorbimento a causa dell'effetto di primo passaggio (first pass epatico) attraverso il fegato.

La maggioranza dei principi attivi solidi, somministrati per via orale, sono composti da molecole sufficientemente piccole in grado di attraversare la membrana intestinale; tuttavia la permeabilità intestinale è l'unico fattore necessario affinché l'assorbimento abbia luogo: deve infatti prima verificarsi la solubilizzazione del principio attivo, nei fluidi gastrointestinali.

Quando la forma farmaceutica è di tipo solido, il processo di assorbimento del farmaco schematizzato in figura 1 può essere suddiviso in due steps fondamentali:

- step 1: dissoluzione del farmaco;
- step 2: passaggio del farmaco attraverso le membrane gastro-intestinali, fino al raggiungimento della circolazione sistemica (figura 1).

Quindi per farmaci poco solubili, lo step che limita l'intero processo di assorbimento è la dissoluzione, mentre per farmaci molto solubili lo step limitante è rappresentato dal passaggio attraverso le membrane.

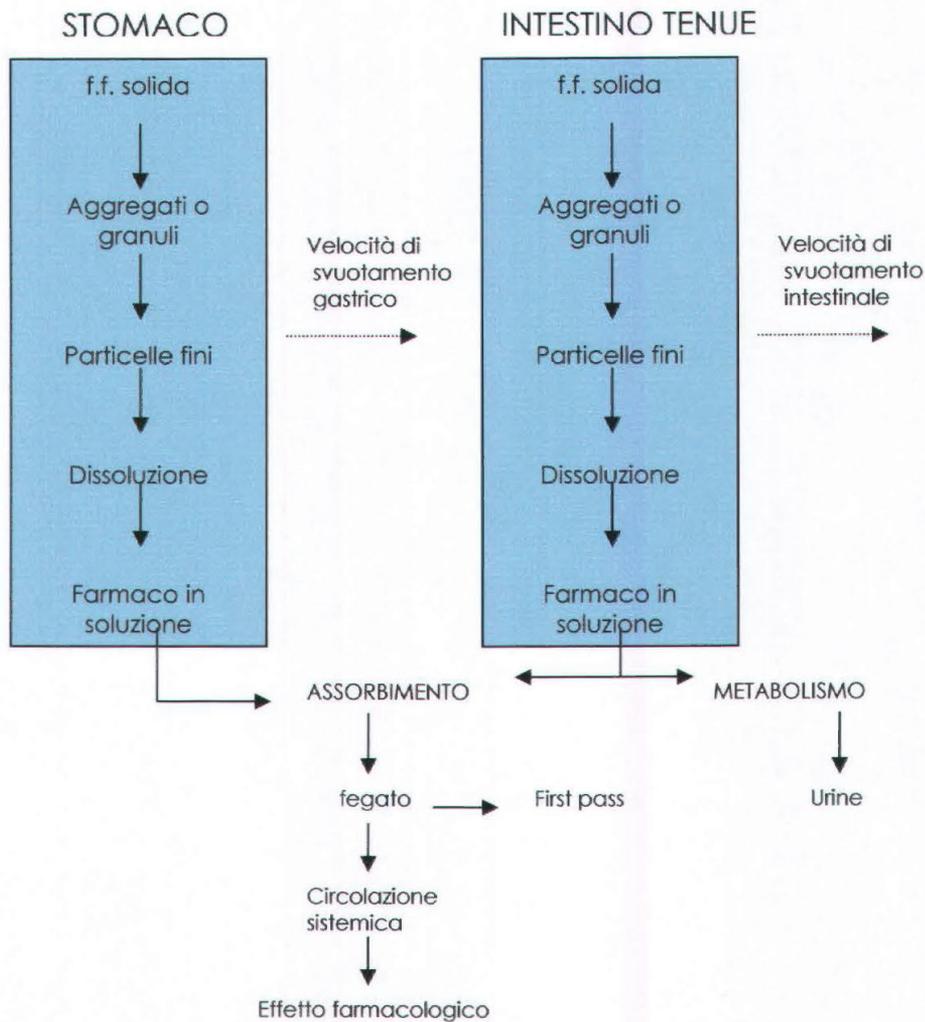


Figura 1. processi coinvolti nell'assorbimento di farmaco somministrato in una forma farmaceutica solida per via orale.

Secondo i due parametri principali che stanno alla base dell'assorbimento per via orale (solubilità in ambiente acquoso e permeabilità attraverso la membrana intestinale), Amidon ha proposto la classificazione dei farmaci in quattro classi (tabella 1 (Amidon G.L. et al., 1995)). Dunque, grazie ad una opportuna scelta del sistema per veicolare i farmaci, si è in grado di migliorare la loro biodisponibilità, ovvero la velocità ed il grado con cui essi vengono assorbiti e resi disponibili nel sito d'azione.

Dati i numerosi vantaggi offerti dalla somministrazione orale, di forme farmaceutiche solide, lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di sviluppare nuovi

approcci per la produzione di forme farmaceutiche solide, quali veicoli per il trasporto di farmaci, da somministrare per via orale. In particolare, si è studiato il processo di estrusione per fusione da utilizzare nella produzione di forme farmaceutiche a rilascio controllato ed il processo di granulazione ad umido in granulatori rapidi per la produzione di sistemi autoemulsionanti solidi.

Tabella 1. Classificazione biofarmaceutica dei farmaci.

<b>CLASSE I</b>	<b>CLASSE II</b>
Buona solubilità Buona permeabilità	Bassa solubilità Buona permeabilità
<b>CLASSE III</b>	<b>CLASSE IV</b>
Buona solubilità Bassa permeabilità	Bassa solubilità Bassa permeabilità

Il processo di estrusione per fusione, trattato nel capitolo 2, è un metodo relativamente nuovo ed ancora poco studiato per la produzione di forme farmaceutiche solide. Grazie alle sue peculiarità e pregi, sta prendendo sempre più piede nel campo dell'industria farmaceutica, in cui può essere sfruttato per la preparazione di formulazioni ritardo, utilizzando opportuni leganti bassofondenti. Di conseguenza, lo scopo di questa prima parte di lavoro di tesi è quello di dimostrare la potenzialità della tecnica di estrusione per fusione, nella preparazione di forme farmaceutiche orali a rilascio ritardato. Per raggiungere questo obiettivo è stata formulata una miscela costituita da teofillina (farmaco modello), lattosio (diluente), acido stearico e polietilenglicole 6000 come leganti solidi, in quanto in grado di fondere durante il processo per riscaldamento della camicia dell'estrusore stesso. La scelta dell'acido stearico e del polietilenglicole 6000, come leganti, è dovuta al fatto che essi vengono già largamente impiegati in campo farmaceutico, per la preparazione di forme farmaceutiche solide orali. La formulazione ottimale, cioè quella in cui il farmaco presenta il maggior grado di ritardo, è stata selezionata utilizzando tecniche di design sperimentale, allo scopo di ridurre il numero ed il

costo della sperimentazione e valutare l'effetto di ciascun componente, sulla velocità di rilascio del farmaco, permettendo così di individuare gli intervalli di concentrazione dei componenti in cui il ritardo risulti maggiore. I campioni di estrusi così ottenuti sono stati caratterizzati *in vitro* e *in vivo*, effettuando studi morfologici, test di dissoluzione, analisi del farmaco in superficie e modellizzazione del meccanismo di rilascio del farmaco; infine per una migliore formulazione è stata valutata la biodisponibilità *in vivo*.

Le formulazioni lipidiche, trattate nel capitolo 3, vengono comunemente commercializzate, come forme farmaceutiche liquide o confezionate all'interno di capsule di gelatina dura e/o molle. Al fine di ridurre i costi di produzione, gli inconvenienti legati al confezionamento, trasporto, stoccaggio e l'instabilità chimico-fisica di questi sistemi, è stata valutata da alcuni ricercatori (Newton M. et al., 2001; Chiellini E. et al., 2004) la possibilità di supportarli su veicoli solidi, sfruttando diversi processi tecnologici atti ad ottenere una polvere lavorabile dal punto di vista farmaceutico.

In questo contesto, una prima strategia applicata è rappresentata dal processo di estrusione-sferonizzazione, che sebbene abbia portato a buoni risultati per quanto concerne la qualità del prodotto, dal punto di vista industriale presenta numerosi svantaggi legati: alla ridotta capacità di produzione, alle basse rese ponderali delle frazioni di interesse, agli elevati costi a causa dell'utilizzo di più apparecchiature per la realizzazione delle diverse fasi (Newton M. et al., 2001). Di conseguenza, nel capitolo 3 di questo lavoro di tesi, ci si propone di verificare la fattibilità della produzione di sistemi solidi autoemulsionanti, mediante il processo di granulazione ad umido in granulatori rapidi. Per raggiungere questo obiettivo è stata utilizzata una formulazione placebo composta da lattosio, cellulosa microcristallina e una soluzione legante contenente acqua, tensioattivo non ionico e una fase grassa. Si è cercato quindi di valutare gli effetti dei componenti della formulazione, sulle caratteristiche granulometriche, dissolutive e di permeazione attraverso organo isolato dei sistemi auto-emulsionanti. Successivamente, le stesse caratteristiche granulometriche del prodotto sono state confrontate con quelle ottenute

con il processo di estrusione/sferonizzazione. Per ridurre il numero di prove, i tempi e i costi della sperimentazione, è stato progettato un disegno sperimentale per miscele. Infine, l'efficacia nella veicolazione di farmaci liposolubili nei pellets auto-emulsionanti prodotti è stata valutata inserendo un farmaco modello, poco solubile (nimesulide), e caratterizzando i sistemi mediante test di dissoluzione *in vitro* e di permeazione *ex vivo*, attraverso intestino di ratto.

CAPITOLO 2  
ESTRUSIONE PER FUSIONE

## 2.1. FORMULAZIONI RITARDO E PROCESSO DI ESTRUSIONE PER FUSIONE

Il processo di estrusione per fusione è stato inizialmente sviluppato nell'industria delle materie plastiche e nell'ingegneria dei polimeri e solo di recente ha trovato impiego nell'industria farmaceutica per la produzione di forme farmaceutiche dotate di forma e dimensioni omogenee. Si tratta di un processo che sfrutta sia la termoplasticità dei polimeri che il rammollimento o la fusione di carrier polimerici per dare origine a matrici, nelle quali il farmaco può essere disciolto per formare delle soluzioni solide o può trovarsi intrappolato o disperso sottoforma di cristalli. In campo farmaceutico i leganti più utilizzati per realizzare questa tecnica sono polimeri bassofondenti quali: polietilenglicole (PEG) a diversi pesi molecolari, trigliceridi sintetici e vari tipi di cere naturali e sintetiche. Il processo viene realizzato utilizzando delle apparecchiature chiamate estrusori in cui una massa costituita dalla miscela di polimeri (rammolliti o fusi), principio attivo ed eccipienti viene fatta passare attraverso un orificio o uno stampo al fine di ottenere un prodotto di forma e densità uniformi che solidifica rapidamente all'uscita della macchina stessa.

Gli estrusori sono costituiti essenzialmente di due parti: un *sistema di trasporto*, che trasporta il materiale e talvolta è in grado di miscelarlo, e uno *stampo*, che dà al materiale la forma richiesta al prodotto finito. A seconda del *design* dello stampo impiegato, il prodotto finale può assumere sia la forma di un film, come pure di un granulo, o semplicemente di un cilindretto (Doelker M. et al., 1971; Follonier N. et al., 1994; Aitken-Nichol C., 1996;. Repka M. A e McGinity J.W., 2001; Neumann J. et al., 1999; Forster A. et al., 2001a; Forster A. et al., 2001b; Breitenbach J., 2002; Henrist D. e Remon J. P., 1999; Zhang F. e McGinity J. W., 1999; Ndindayino F. et al, 2002).

Si tratta di un processo che offre numerosi vantaggi:

- vantaggi di tipo *economico-produttivo*, in quanto si tratta di un processo *one-step* in cui numerosi fasi vengono realizzate all'interno della stessa apparecchiatura che lavora in continuo con la possibilità di provvedere ad una

elevata automazione e ridurre notevolmente i costi di produzione rispetto ai metodi tradizionali;

- vantaggi di tipo *tecnologico-formulativo* in quanto permette di produrre forme farmaceutiche a rilascio controllato senza l'utilizzo di solventi (processo solvent-free) e offre la possibilità di poter incrementare la biodisponibilità di alcuni farmaci poco solubili con conseguente diminuzione della quantità di principio attivo impiegata ed incremento della sicurezza per il paziente (Grunhagen H.H. e Knoll AG O.M, 1995).

Gli estrusori possono essere di diversi tipi ma in campo farmaceutico vengono utilizzati soprattutto gli *screw-extruders* o *estrusori a vite* e i *ram extruders* o *estrusori a pistone*.

### 2.1.1. Estrusori a vite

La caratteristica fondamentale degli estrusori a vite o *screw-extruder* (figura 2) è la presenza di una vite all'interno della camera di estrusione che dista dalle pareti di quest'ultima circa 0,1-0,2 mm ed il cui passo ed angolo determinano la velocità di rotazione e la portata dell'estrusore stesso. In questo tipo di estrusori il calore necessario per la fusione o il rammollimento del carrier viene fornito per più dell'80% dalla frizione delle parti meccaniche con la massa da estrudere mentre il calore addizionale può essere fornito da alcune resistenze elettriche montate a diretto contatto con la camera di estrusione.

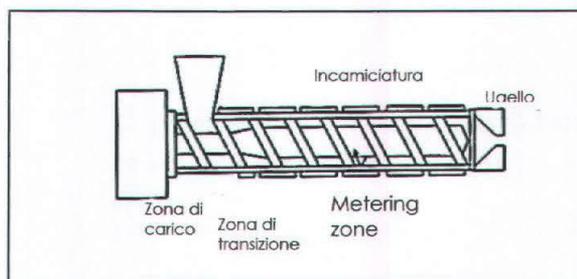


Figura 2. Estrusore a vite.

La camera di estrusione negli estrusori a vite è convenzionalmente divisa in tre zone:

- una *zona di carico*, in cui il materiale giunge direttamente mediante una tramoggia;
- una *zona di transizione*, in cui i materiali vengono mescolati, compressi, fusi e plasticizzati ed in cui la compressione della massa è ottenuta diminuendo il passo e tenendo costante la profondità della filettatura della vite o viceversa con conseguente incremento della pressione mano a mano che il materiale si muove lungo la camera di estrusione;
- una *metering zone* che provvede a mantenere costante il flusso di massa ed a evitare la presenza di zone stagnanti conferendo all'estruso una densità uniforme.

I *twin screw extruder* (figura 3) si differenziano dagli estrusori tradizionali in quanto sono dotati di due viti montate sullo stesso asse in grado di ruotare nello stesso senso (co-rotazione), oppure nel senso opposto (contro-rotazione), realizzando lo strofinamento dei due elementi tra di loro e con le pareti dell'estrusore ed eliminare le zone stagnanti assicurando un ristretto e ben definito tempo di residenza nell'estrusore.

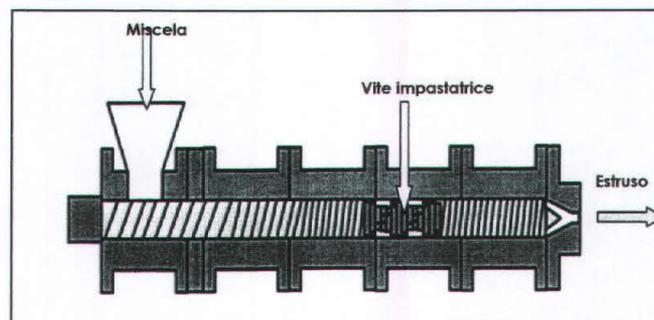


Figura 3. Twin screw extruder.

I principali vantaggi di questo tipo di estrusori sono: il basso tempo di residenza del materiale all'interno della camera (circa due minuti) e la minimizzazione del quantitativo di materiale residuo nella stessa (Nakamichi K. et al, 2001).

Un'ulteriore modifica agli estrusori a vite tradizionali è stata effettuata per realizzare le tecniche di *injection molding* e di *film extrusion*.

Nella *injection molding* la massa fusa viene iniettata ad alta pressione in uno stampo preformato da cui, dopo raffreddamento, si ottengono delle compresse (figura 9a) (Wacker S. et al., 1971; Cuff G. e Raouf F., 1999).

Nella la tecnica di *film extrusion* il materiale fuso è fatto passare attraverso un ugello a fessura e successivamente tra due rulli preformati raffreddati che plasmeranno il foglio dell'estruso in diverse forme farmaceutiche quali capsule, compresse o pellets (figura 4a) (Breitenbach J., 2002). La tecnica di film extrusion è stata utilizzata per preparare estrusi di diversi principi impiegando come carriers polimerici polietilenglicole, polivinilpirrolidone, acido poliacrilico, poliidrossietilmetacrilato, polimetossietilmetacrilato, idrossipropil cellulosa, idrossipropilmetil cellulosa, idrossietilmetil cellulosa e sodio carbossimetil cellulosa (Follonier N. et al., 1995; Hülsmann S. et al., 2000; BASF Pharma Knoll AG., 2002).

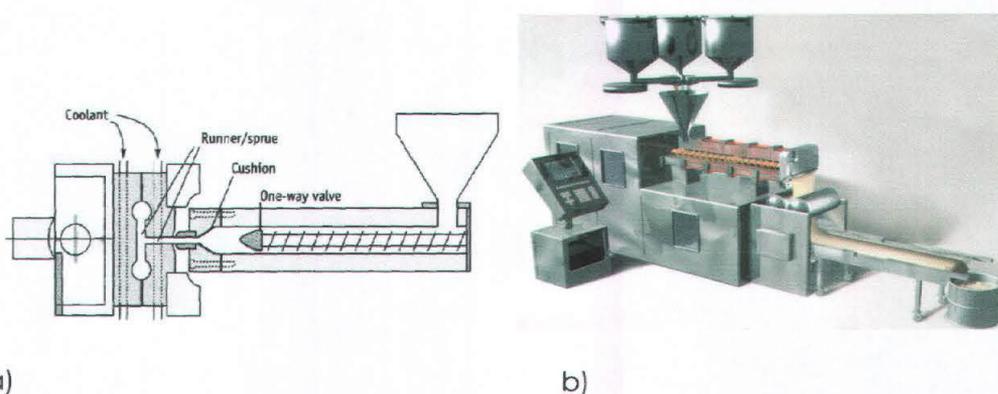


Figura 4. a) Tipico estrusore a vite per il processo di *injection molding*; b) Tipico estrusore a vite per il processo di *film extrusion*.

Il rilascio di farmaci da queste forme farmaceutiche viene realizzato con il contributo di diversi meccanismi quali la diffusione e/o la lenta erosione della matrice in

seguito alla formazione di uno strato gelatinoso attorno alla superficie della matrice stessa. Il grado di ritardo che si può ottenere e il meccanismo con cui il farmaco viene rilasciato varia a seconda della composizione e della densità dell'estruso.

Sebbene i numerosi tentativi di applicare questa tecnologia in campo farmaceutico gli unici dati relativi alla biodisponibilità in vivo di principi attivi veicolati in queste forme farmaceutiche sono forniti dalla tedesca Knoll GmbH che ha brevettato questa tecnologia con la denominazione MELTRESX® ed immesso in commercio due specialità contenenti verapamile (*Isoptin® SR-E 240*) e nifedipina (*Nifedipine-Meltrex®*) (figura 5) (BASF Pharma Knoll AG., 2002).

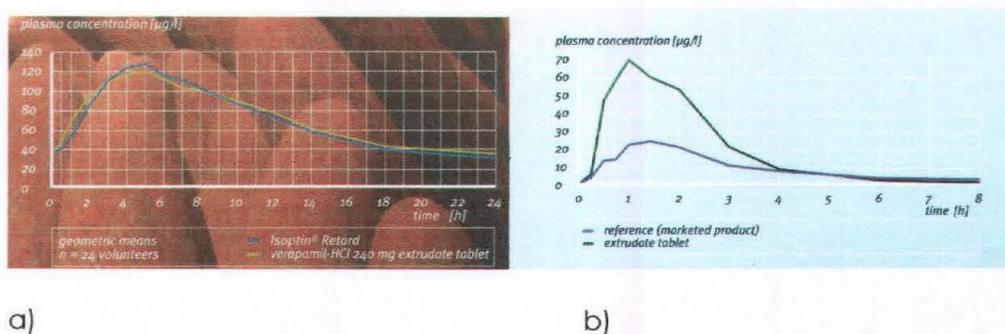


Figura 5. a) Confronto tra la bioequivalenza dell'Isoptin® Retard rispetto a quella dell'estruso Verapamil-HCl 240 mg; b) Aumento della biodisponibilità della nifedipina somministrata come estruso.

### 2.1.2. Estrusori a pistone

Gli *estrusori a pistone* (figura 6) sono caratterizzati dal fatto che il materiale viene estruso attraverso un ugello di forma e dimensioni variabili grazie alla pressione esercitata da un pistone per effetto di una pompa idraulica. All'uscita dall'apparecchiatura l'estruso viene frammentato da un dispositivo dotato di coltelli in piccoli segmenti la cui lunghezza può essere regolata variando la velocità di rotazione del coltello stesso. In questo tipo di estrusori tutto il calore necessario al rammollimento o alla fusione del polimero viene fornito da una incamiciatura esterna ed il processo di estrusione che si realizza è di tipo discontinuo.

Quest'ultima tecnica è stata recentemente utilizzata per aumentare la velocità di dissoluzione di farmaci poco solubili (quali la carbamazepina), utilizzando il polietilenglicole 4000 (Perissutti B. et al., 2002).

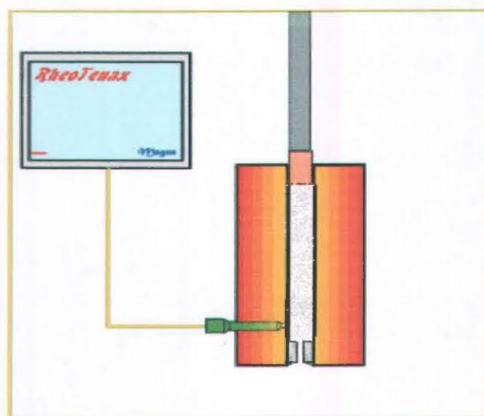


Figura 6. Estrusore a pistone.

## 2.2. PARTE SPERIMENTALE

### 2.2.1. Materiali

Le materie prime impiegate nella preparazione degli estrusi sono state le seguenti: teofillina monoidrata (Faravelli, Milano); acido stearico (Edenor L2 SM, Henkel, Milano.); lattosio monoidrato Granulac 200 (Meggles, Wasserburg, Germany); polietilenglicole 6000 (PEG 6000, Veronelli, Milano).

Le dimensioni particellari dei materiali di partenza sono state determinate con analisi microscopica mediante microscopio Olympus BH-2 (manca ditta), equipaggiato di sistema per l'analisi dell'immagine Optomax V (Cambridge, Inghilterra) nome ditta. I valori di diametro medio sono:  $56 \pm 18.00 \mu\text{m}$  per la teofillina,  $16 \pm 11.30 \mu\text{m}$  per il lattosio,  $204 \pm 20.10 \mu\text{m}$  per l'acido stearico ed infine  $25 \pm 14 \mu\text{m}$  per il polietilenglicole.

Il punto di fusione dell'acido stearico (58.3°C) e del PEG (65°C) sono stati determinati mediante calorimetro differenziale a scansione (DSC, Mod. TA 4000, Mettler, Greifensee, Svizzera) equipaggiato con una cella di misurazione DSC 20 Mettler. (capacità)

La densità vera dei materiali è stata valutata con il picnometro ad elio (Multipicnometro, Quantachrome Corporation/Nordest srl, provenienza) Quest'ultima è risultata essere: 1.1806 g/cm<sup>3</sup> per il PEG 6000, 1.2630 g/cm<sup>3</sup> per la teofillina, 1.4286 g/cm<sup>3</sup> per il lattosio e 0.9288 g/cm<sup>3</sup> per l'acido stearico.

### 2.2.2. Apparecchiatura utilizzata

Gli estrusi sono stati preparati utilizzando un estrusore a pistone (Thalassia® ram extruder, Trieste) (figura 7). L'apparecchiatura è costituita da un cilindro oleodinamico alimentato da una pompa elettrica e dotato di comando manuale. All'estremità inferiore dell'asta del cilindro è legato il pistone in grado di entrare nella camera di estrusione di capacità 66 cm<sup>3</sup> e diametro interno di 25 mm esercitando una pressione massima di 150 bar. All'estremità della camera si trova un ugello intercambiabile sistemato in un supporto a cassetto scorrevole. I quattro ugelli intercambiabili sono fatti di ottone nichelato con diametro rispettivamente di 1.5, 2, 2.5 e 3 mm e spessore di 0.837 cm. Camera ed ugello sono riscaldati da una serie di resistenze elettriche a bassissima tensione che permettono di raggiungere la temperatura massima di esercizio di 120°C (± 2°C).

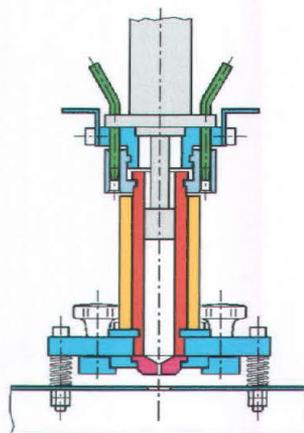


Figura 7. Particolare della camera termostata.

### 2.2.3. Preparazione degli estrusi

Per la preparazione degli estrusi tutti i componenti della formulazione (300 g) sono stati prima miscelati in un miscelatore granulatore rapido (Rotolab da 2 l, Zanchetta, Lucca) per 10 minuti ad una velocità di 120 rpm, nelle proporzioni riportate in seguito nel piano sperimentale. 20 g della miscela vengono prelevati dal vessel del miscelatore, immessi nella camera calda termostata dell'estrusore ed impaccati manualmente. La temperatura di esercizio è stata determinata con gli esperimenti preliminari e fissata a 53°C. La miscela viene lasciata all'interno della camera per 20 minuti al fine di assicurarne una temperatura omogenea e solo successivamente viene estrusa attraverso un ugello di 3 mm di diametro con una velocità costante. All'uscita dell'apparecchio l'estruso viene raccolto in un becker, lasciato raffreddare a temperatura ambiente e tagliato in cilindri di 3 mm di diametro e 5 mm di lunghezza. Il diametro dell'estruso è stato selezionato in base a considerazioni di carattere geometrico in quanto la cinetica di rilascio del farmaco è influenzata dall'area superficiale del cilindro. In particolare se si definisce il fattore di forma  $K$  come rapporto tra l'altezza del cilindro  $Z_c$  ed il suo raggio  $R_c$ , l'area della superficie totale del cilindro  $A_c$  è data da:

$$A_c = 2\pi R_c^2(1+K) \quad (\text{eq. 1})$$

A questo punto si può studiare come varia l'area superficiale del cilindro in funzione del fattore di forma  $K$ , e quindi del raggio e del diametro, mantenendo costante il volume e rielaborando l'equazione 1:

$$R_c = \sqrt[3]{\frac{V_c}{\pi K}} \quad A_c = 2\sqrt[3]{\pi V_c^2} \frac{1+K}{K^{2/3}} \quad (\text{eq. 2})$$

La derivata di  $A_c$  rispetto a  $K$  può essere scritta come:

$$\frac{dA_c}{dK} = \frac{2\sqrt[3]{\pi V_c^2}}{3} \left( \frac{K-2}{K^{5/3}} \right) \quad (\text{eq. 3})$$

In queste condizioni si può verificare che la funzione  $A_c(K)$  diminuisce nell'intervallo  $0 < K < 2$ , ed ha un minimo per  $K=2$  (figura 8).

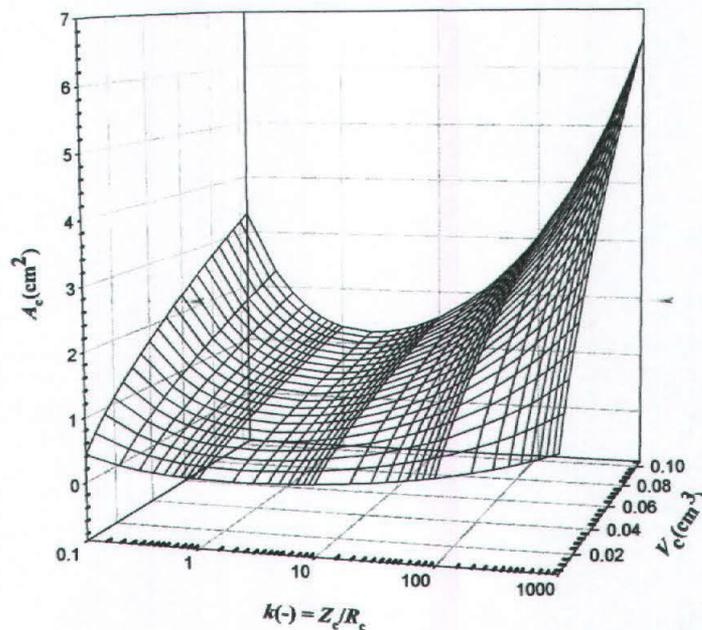


Figura 8. Andamento dell'area della superficie esterna del cilindro  $A_c$  in funzione del fattore di forma  $K$  ( $=Z_c/R_c$ ) a volume costante. In figura è considerato il grafico di tale funzione nel caso di diversi valori di  $V_c$ . Quale che sia il valore di  $V_c$ ,  $A_c(K)$  ha un minimo per  $k=2$ .

Dalla figura 12 si può individuare facilmente che indipendentemente dal valore di  $V_c$ , l' $A_c$  è minore per valori di  $K$  compresi tra 1.5 e 3.5. Di conseguenza, in base a queste considerazioni e tenendo conto delle esigenze di tipo meccanico legate all'estrusore, si è scelto di preparare estrusi di diametro 3 mm e lunghezza 5 mm, in modo da avere un fattore di forma  $K=3.3$ .

#### 2.2.4. Progettazione delle prove sperimentali

Le prove iniziali hanno permesso di compiere uno screening ed individuare le limitazioni quantitative superiori ed inferiori per i quattro componenti della formulazione (tabella 2) che permettono di ottenere un prodotto dotato di omogeneità interna e superficiale ed isolare un dominio sperimentale di forma irregolare evidenziato in figura 9. Per determinare l'effetto dei singoli componenti sulla velocità di rilascio del farmaco e

determinare quindi per ciascuno di essi l'intervallo di concentrazione nel quale il ritardo risulta maggiore, si è utilizzato un design assiale-secondo Cox (Mathieu D. et al., 1999).

Tabella 2. Limitazioni superiori ed inferiori selezionate per i quattro componenti presi in esame.

COMPONENTE	LIMITAZIONE INFERIORE	LIMITAZIONE SUPERIORE
Teofillina ( $X_1$ )	10%	75%
Acido Stearico ( $X_2$ )	25%	90%
Lattosio ( $X_3$ )	0%	15%
PEG 6000 ( $X_4$ )	0%	15%

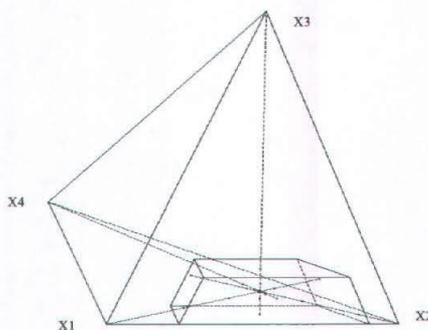


Figura 9. rappresentazione grafica del dominio sperimentale isolato mediante le prove preliminari.

Questo tipo di design prevede una serie di punti sperimentali posizionati a intervalli regolari su assi lungo i quali le proporzioni relative di tutti i componenti, tranne uno, rimangono costanti. Il design assiale per quattro componenti è riportato in tabella 2 ed i punti sperimentali sono rappresentati in figura 10.

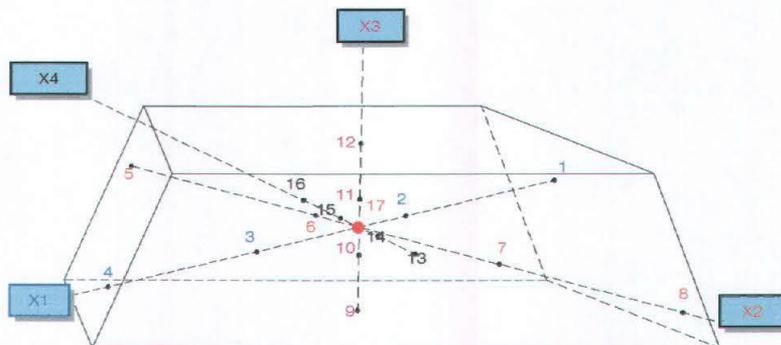


Figura 10. Rappresentazione grafica dei punti sperimentali appartenenti al disegno sperimentale assiale secondo Cox.

Tabella 3. Design sperimentale per la miscela a quattro componenti sottoposta a delle limitazioni (vedi Tabella 2).

N°	COMPONENTI			
	X1 (%)	X2 (%)	X3 (%)	X4 (%)
1	10.05	69.19	10.38	10.38
2	29.09	54.55	8.18	8.18
3	48.13	39.40	5.98	5.98
4	67.17	25.25	3.79	3.79
5	52.46	25.05	11.24	11.24
6	38.37	45.19	8.22	8.22
7	24.28	65.32	5.20	1.04
8	10.18	85.45	2.18	2.18
9	37.81	54.01	0.08	8.10
10	35.94	51.34	5.03	7.70
11	34.06	48.66	9.97	7.30
12	32.19	45.99	14.92	6.90
13	37.81	54.01	8.10	0.08
14	35.94	51.34	7.7	5.03
15	34.06	48.66	7.30	9.97
16	32.19	45.99	6.90	14.92
17	35.00	50.00	7.50	7.50

Come si può osservare in figura 10, i punti del design si trovano sui quattro assi che partono ciascuno da un vertice e passando attraverso il baricentro terminano nella faccia opposta della sotto-regione. Ad esempio, i punti 3 e 2 giacciono sull'asse che congiunge il vertice corrispondente al componente al componente X<sub>1</sub> con faccia opposta. Lungo questo asse la frazione del componente 1 diminuisce mentre le proporzioni degli altri tre componenti rimangono invariate l'una rispetto alle altre.

## 2.2.5. Caratterizzazione degli estrusi

### *Determinazione della velocità di dissoluzione intrinseca (IDR)*

La tecnica di determinazione della velocità di dissoluzione intrinseca consente di misurare il coefficiente di diffusione di un farmaco in un dato solvente (in questo caso, della teofillina in acqua) misurando la velocità di dissoluzione del farmaco stesso. La prova di dissoluzione può essere eseguita con diversi metodi (Lieberman H.A. et al., 1989), qui di seguito si riporta il metodo del *rotating disc* utilizzato in questo lavoro (figura 11).

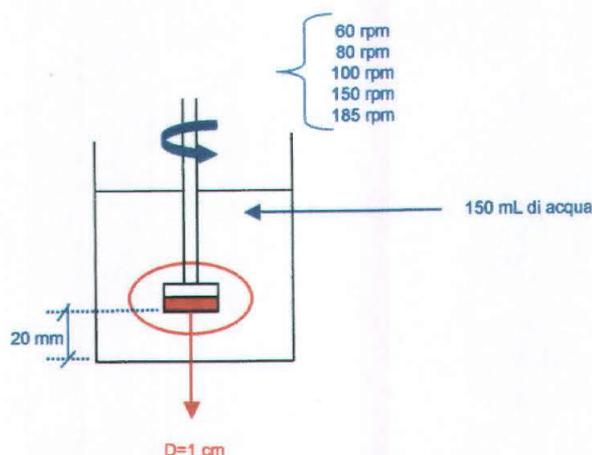


Figura 11. Rappresentazione schematica del metodo del *rotating disc* usato per lo studio della velocità intrinseca.

#### Procedimento:

Come prima cosa si preparano delle compresse di teofillina del diametro di 1 cm mediante doppia compressione utilizzando una comprimitrice pneumatica manuale (manca nome) ed applicando una forza di 3 tonnellate. La compressa così ottenuta viene fissata all'albero del dissolutore con paraffina solida facendo attenzione a ricoprire i lati della compressa, in modo che solo la superficie piana della compressa sia interessata dal processo di dissoluzione. L'albero del dissolutore è stato sistemato in modo che la superficie della compressa si trovi a 20 mm dal fondo di un becker di capacità 500 ml in cui viene eseguita la prova. Il becker contiene 150 ml di acqua distillata termostata a 37°C. A questo punto vengono effettuate delle prove di dissoluzione a diverse velocità di rotazione dell'albero (60, 80, 100, 150 e 185 rpm), registrando l'assorbanza in funzione del tempo con modalità automatica (spettrofotometro).

#### *Studi morfologici*

La forma e la superficie degli estrusi è stata esaminata mediante l'utilizzo del microscopio a scansione elettronica Philips 500 (Eindhoven, Olanda).

#### *Test di dissoluzione in vitro*

La determinazione della velocità di dissoluzione è stata effettuata seguendo le disposizioni indicate nella F.U. XI ed., ed in particolare utilizzando un dissolutore a cestello (Erweka, mod. DT-1, città) (figura 12). Le prove di dissoluzione sono state realizzate in acqua distillata termostata a 37°C.

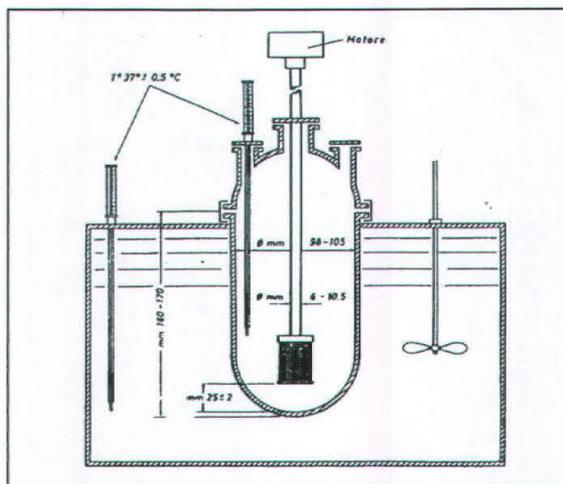


Figura 12. Dissolutore a cestello rotante.

La concentrazione di teofillina rilasciata durante il processo di dissoluzione è stata determinata per via spettrofotometrica misurando l'assorbanza del mezzo di dissoluzione, alla lunghezza d'onda di 271 nm, ad intervalli regolari di tempo e calcolando la concentrazione mediante la legge di Lambert-Beer:

$$C = A / \epsilon \times s \quad (\text{eq.4})$$

C = concentrazione (moli/l)

A = assorbanza

$\epsilon$  = coefficiente di estinzione molare (l/moli x cm)

s = cammino ottico (cm)

Il coefficiente di estinzione molare è stato determinato costruendo una retta di taratura, misurando cioè, l'assorbanza di 5 soluzioni a concentrazione nota di teofillina e

disegnando un grafico in cui si pone l'assorbanza in funzione della concentrazione. Dalla pendenza della retta che si ottiene si ricava il valore della  $\epsilon$  (figura 13). In queste condizioni operative il valore del coefficiente di estinzione molare della teofillina è 10190.

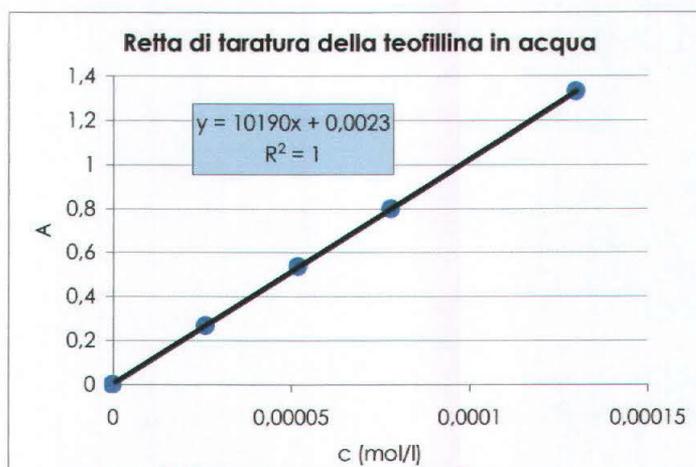


Figura 13. Retta di taratura della teofillina.

La quantità di campione analizzata in ogni prova di dissoluzione è stata calcolata per ogni estruso in modo da operare al di sotto delle "sink condition" (20% della solubilità massima, che in questo caso equivalgono a 250 mg in 900 ml) e rientrare nell'assorbanza massima letta dallo strumento. L'assorbanza è stata letta ogni ora effettuando dei prelievi di campione in modalità automatica. Ogni prova di dissoluzione è stata ripetuta tre volte ed è stato assunto come valido il valore medio delle tre determinazioni.

### *Analisi della presenza di farmaco in superficie – Spettroscopia di fotoemissione (XPS)*

La tecnica spettroscopica di fotoemissione (X-Ray Photoemission Spectroscopy-PII) permette di rilevare la presenza di un determinato elemento e di calcolare le concentrazioni delle varie specie presenti in prossimità della superficie del campione. Le misure di XPS sono state realizzate con uno spettroscopio PII modello 04-151 che utilizza una sorgente di raggi X, nella quale un fascio di elettroni ad alta energia (dell'ordine dei

KeV) incide su un anodo di magnesio, producendo una radiazione caratteristica con energia  $h\nu = 1253.6$  eV. Per ottenere un buon segnale il campione deve essere posizionato il più vicino possibile alla sorgente di raggi X, in quanto il flusso di fotoni che investe il campione varia in modo inversamente proporzionale al quadrato della distanza. Il campione viene bombardato con i raggi X prodotti dalla sorgente ed in questo modo si ottiene l'espulsione degli elettroni provenienti dai primi strati atomici, che vengono analizzati in funzione della loro energia cinetica (o della loro energia di legame). Nel processo di fotoemissione, un fotone con una data energia  $h\nu$  penetra nel solido e viene assorbito da un elettrone che giace in un dato orbitale. Se l'energia del fotone è maggiore di un certo valore critico, l'elettrone viene emesso dal solido con una certa energia cinetica. Solamente alcuni elettroni fotoemessi da una certa profondità (100 Å), possono raggiungere la superficie del solido. Gli elettroni rilevati dall'analizzatore sono quelli che, giunti nei pressi della superficie, hanno energia sufficiente per superare la barriera di potenziale. Gli elementi presenti sulla superficie di un solido vengono chiaramente individuati nello spettro XPS grazie all'interpretazione dei picchi generati dalla fotoemissione dai livelli profondi, la cui posizione nello spettro dipende dall'energia di legame degli elettroni fotoemessi. Tecnica questa, già applicata con successo nella determinazione della teofillina, sulla superficie dei pellets ottenuti per fusione in granulatore rapido (figura 14) (Voinovich D. et al., 2000).

### *Modelling del meccanismo di rilascio del farmaco*

Il rilascio di principi attivi da sistemi farmaceutici ottenuti per estrusione e composti essenzialmente da una matrice bassofondente che ingloba il farmaco e gli eccipienti, è un fenomeno complesso, regolato da diversi e concorrenti meccanismi. Quando il mezzo di dissoluzione acquoso bagna l'estruso, gli eccipienti (in questo caso lattosio e PEG) ed il farmaco (teofillina), presenti negli strati più esterni della matrice, cominciano a dissolvere

con cinetiche diverse, ciascuna proporzionale alla rispettiva solubilità in acqua (alta per gli eccipienti, nettamente più bassa per il farmaco).

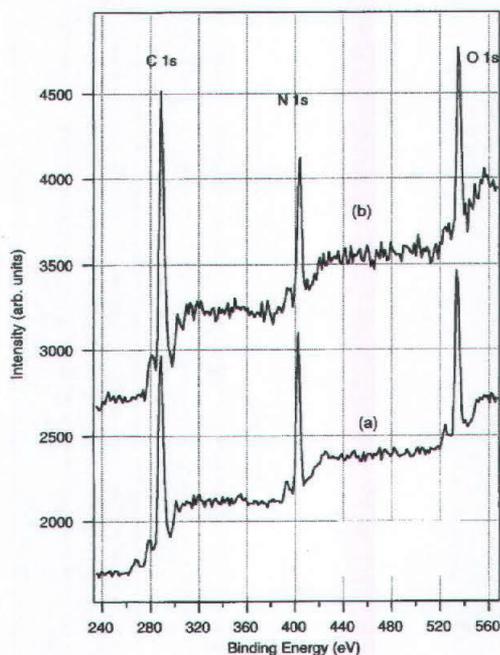


Figura 14. Spettro di fotoemissione : a) teofillina pura; b) teofillina sferonizzata.

Di conseguenza si formano tre interfacce solido/liquido (farmaco/mezzo di dissoluzione ed eccipienti/mezzo di dissoluzione) che si muovono verso l'interno della matrice con diverse velocità. Questo processo dà origine ad una matrice porosa, caratterizzata da una serie di canalicoli interconnessi, che si sviluppano all'interno della matrice insolubile costituita dall'acido stearico e che ospitano le molecole del farmaco e degli eccipienti che si sono già solubilizzate e che, per effetto di un gradiente di concentrazione, si muovono verso l'esterno della matrice per giungere nell'ambiente di rilascio (figura 15). Il processo di rilascio termina quando si è raggiunto l'equilibrio termodinamico tra le specie chimiche presenti nella matrice e nell'ambiente di rilascio. La complessità della topologia dei canalicoli in via di formazione (bisogna tener presente che la porosità della matrice si modifica con il tempo per la progressiva solubilizzazione del farmaco e degli eccipienti) rende inutile ogni tentativo di dare una dettagliata descrizione della matrice in termini geometrici (Giona M., 1991).

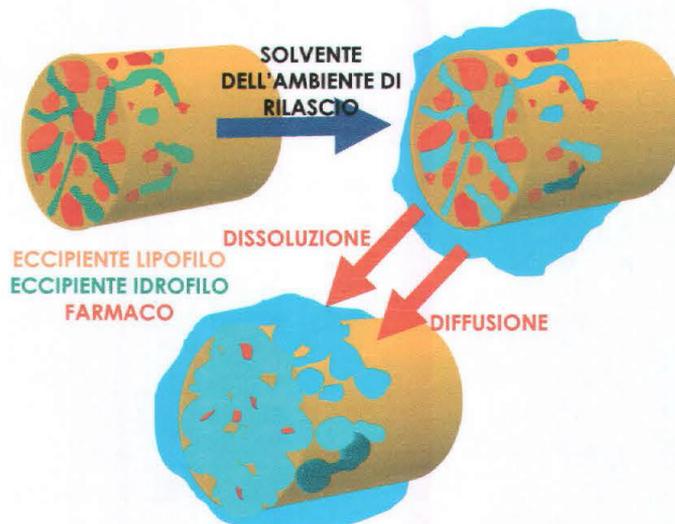


Figura 15. Meccanismo di rilascio del farmaco da un sistema farmaceutico costituito dal componente liofilo (acido stearico), dal farmaco (teofillina) e dagli eccipienti (lattosio e PEG).

Di conseguenza per semplificare la situazione e poter modellizzare il sistema si formulano le seguenti ipotesi:

- Si suppone che gli eccipienti dissolvano istantaneamente e che la topologia (forme e dimensioni) dei canalicoli nella matrice non sia modificata dalla dissoluzione del farmaco.
- Si suppone che la dissoluzione degli eccipienti non influenzi la diffusione delle molecole del farmaco all'interno del liquido che riempie i canalicoli formati nella matrice di acido stearico.
- Sebbene si stia chiaramente trattando un sistema non omogeneo, poiché le molecole del farmaco diffondono solo nel liquido che riempie i canalicoli e nessun trasporto di massa può avvenire attraverso le pareti dei canalicoli, si suppone che la matrice sia omogenea. Questa ipotesi obbliga a definire un coefficiente di diffusione effettivo  $D_e$  che caratterizza il moto diffusivo delle molecole di farmaco all'interno della matrice (Peppas N., 1984).

- Si suppone che la densità della matrice non vari a causa della diffusione del farmaco e che la matrice abbia una perfetta forma cilindrica che non subisce né rigonfiamento (*swelling*) né erosione durante il processo di rilascio.
- Sebbene, in teoria, la matrice cilindrica sia circondata da uno strato stagnante (il cui spessore dipende dalle condizioni idrodinamiche imposte nell'ambiente di rilascio (teoria dello strato limite (Bird R. B et al., 1960), che ostacola la fuoriuscita del farmaco dalla matrice, si suppone che questa resistenza sia trascurabile rispetto a quelle dovute alla dissoluzione del farmaco ed alla sua diffusione nella matrice.
- Si suppone che il coefficiente di diffusione effettivo  $D_e$  possa assumere, negli strati più esterni della matrice cilindrica, un valore più elevato che nelle parti più interne della matrice. In questo modo si mette in evidenza che il rilascio del farmaco dagli strati più esterni della matrice è principalmente regolato dalla dissoluzione piuttosto che dalla diffusione.
- Si assume che, a causa della simmetria cilindrica della matrice, non ci sia diffusione tangenziale del farmaco, ma la diffusione avvenga solo nella direzione del raggio e dell'asse del cilindro.

Sulla base di tutte queste ipotesi l'intero processo di rilascio può essere descritto dal seguente bilancio di massa bidimensionale (assiale e radiale) espresso in termini di derivate parziali:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{1}{R} \frac{\partial}{\partial R} \left[ R D_e \frac{\partial C}{\partial R} \right] + \frac{\partial}{\partial Z} \left[ D_e \frac{\partial C}{\partial Z} \right] - \frac{\partial C_d}{\partial t} \quad (\text{eq. 5})$$

$$\frac{\partial C_d}{\partial t} = -K_1 (C_s - C) \quad (\text{eq. 6})$$

dove  $t$  è il tempo,  $R$  e  $Z$  sono, rispettivamente, la coordinate radiale ed assiale,  $C$  e  $C_d$  sono, rispettivamente, la concentrazione del farmaco dissolto e non dissolto,  $K_1$  è la

costante di dissoluzione e  $C_s$  indica la solubilità del farmaco nel fluido dell'ambiente di rilascio.

L'equazione 5 rappresenta il bilancio di massa del farmaco eseguito su un ideale anello all'interno della matrice cilindrica (figura 16).

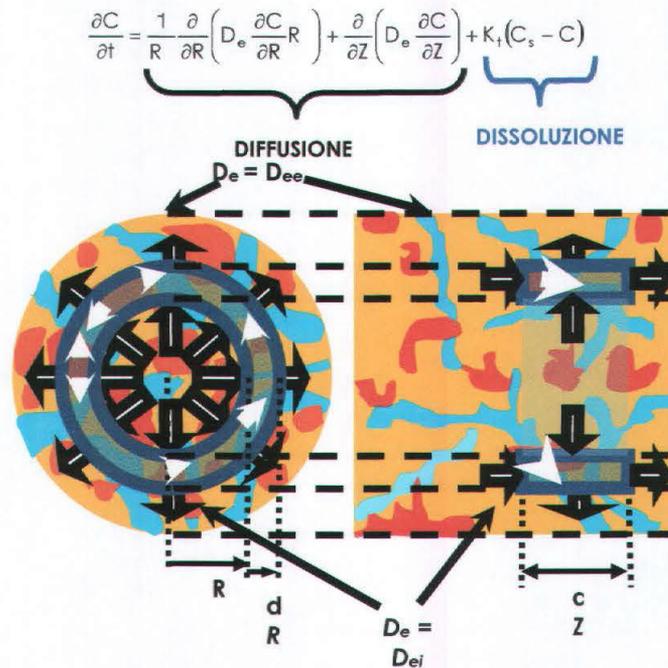


Figura 16. Sezione radiale ed assiale della generica matrice cilindrica. L'equazione 6 rappresenta il bilancio di massa fatto sul farmaco all'interno di un generico anello (indicato in figura dalle zone grigie) interno alla matrice. La matrice, infatti può essere immaginata come un insieme di tanti anelli cilindrici concentrici affiancati gli uni agli altri per tutta la lunghezza del cilindro.

Infatti, si può immaginare di suddividere tutta la matrice in direzione radiale e assiale in tanti anelli concentrici. All'interno di ciascun anello si suppone che la concentrazione di farmaco sia uniforme. In queste condizioni la variazione di concentrazione  $C$  del farmaco solubilizzato, contenuto in un anello, sarà data dal bilancio tra il flusso di farmaco in ingresso, che è quello che giunge per diffusione dagli anelli più interni, il flusso in uscita, che è quello che diffonde verso gli anelli più esterni, e la quantità di farmaco che proviene dalla dissoluzione del farmaco solido presente nell'anello. La somma algebrica del flusso diffusivo in ingresso ed in uscita corrisponde ai primi due termini dell'equazione 5, mentre il contributo dovuto alla dissoluzione è dato dal terzo termine della equazione 5.

L'equazione 6 rappresenta, invece, un classico modo di schematizzare la dissoluzione di un farmaco solido (Martinet A. et al., 1983; Grassi M. et al., 1999; Abdekhodaie M. J. e Cheng Y. L., 1997; Byun Y. R. et al., 1990). In pratica, tale equazione afferma che la velocità della dissoluzione è proporzionale, tramite la costante  $K_t$ , alla differenza tra la concentrazione locale di farmaco solubilizzato ( $C$ ) e la sua solubilità  $C_s$  in quel ambiente. La dissoluzione cessa quando  $C = C_s$  o quando tutto il farmaco solido si è dissolto. L'equazione 5 non ammette soluzione analitica e deve quindi essere risolta con un metodo numerico (metodo dei volumi di controllo (Patankar S. V., 1990), ricordando che le seguenti condizioni iniziali ed al contorno devono essere soddisfatte:

*condizioni iniziali:*

$$C_r = 0 \quad \text{(eq. 7)}$$

$$C(R, Z) = 0 \quad 0 < R < R_c \quad 0 < Z < Z_c \quad \text{(eq. 8)}$$

$$C_d(R, Z) = C_{d0} \quad 0 < R < R_c \quad 0 < Z < Z_c \quad \text{(eq. 9)}$$

*condizioni al contorno:*

$$\left. \frac{\partial C}{\partial R} \right|_{R=0} = 0 \quad 0 < Z < Z_c \quad \text{(eq. 10)}$$

$$C_r = \frac{C}{K_p} \quad \text{(eq. 11)}$$

$$M_0 = V_r C_r + N \int_0^{Z_c} \int_0^{R_c} [C(R, Z) + C_d(R, Z)] 2\pi R dR dZ \quad \text{(eq. 12)}$$

dove:

$N$  è il numero totale di matrici cilindriche considerate;

$R_c$  e  $Z_c$  sono, rispettivamente, il raggio e l'altezza del cilindro;

$C_{d0}$  è la concentrazione iniziale di farmaco solubilizzato in ciascuna matrice;

$C_r$  indica la concentrazione di farmaco nell'ambiente di rilascio;

$K_p$  è la costante di partizione matrice/ambiente di rilascio;

$M_0$  è la massa totale di farmaco inizialmente presente nelle  $N$  matrici cilindriche considerate;

$V_r$  indica il volume dell'ambiente di rilascio.

All'inizio, l'ambiente di rilascio non contiene farmaco (eq. 7), mentre esso è presente nelle  $N$  matrici cilindriche solo in forma solida (eq. 8, 9) ed è distribuito in maniera uniforme. L'equazione 10 impone, per ragioni di simmetria, che non ci sia flusso di farmaco in direzione radiale in corrispondenza dell'asse del cilindro. L'equazione 11 impone le condizioni di partizione tra la matrice e l'ambiente di rilascio, mentre l'equazione 12 rappresenta il bilancio di massa fatto sull'ambiente di rilascio e sulle  $N$  matrici in esso contenute. Infatti, ad ogni istante  $t$ , deve risultare che la somma della massa di farmaco contenuta nelle matrici (sia in forma solubilizzata che indissolta) e nell'ambiente di rilascio sia uguale alla massa di farmaco  $M_0$ , inizialmente contenuta nelle  $N$  matrici. Le condizioni imposte con l'equazione 12 permettono un miglioramento, dal punto di vista dell'accuratezza della soluzione numerica, del modeling del sistema (Grassi M. et al., 2000), rispetto a quelle che generalmente vengono utilizzate per questo tipo di analisi matematica (Crank J., 1975).

Al fine di ottenere un ragionevole compromesso tra accuratezza numerica e il tempo richiesto dal computer per giungere alla soluzione numerica dell'equazione 6, si è scelto di discretizzare il tempo di rilascio in intervalli  $\Delta t$  pari a 60 s e suddividere la matrice cilindrica in 20 anelli in direzione radiale e assiale, per un totale di 400 anelli.

### *Studi in vivo*

Capsule di gelatina dura di tipo "0", contenenti 320 mg di teofillina, sono state somministrate a tre soggetti sani, di età media 35 anni, di sesso maschile.

A tempi determinati di 0, 1, 2, 4, 6, 9, 12 e 24 ore dalla somministrazione, sono stati prelevati campioni di plasma (5 ml), successivamente eparinizzati e centrifugati a 1500 rpm per 10 minuti. Il siero così ottenuto è stato congelato e conservato a  $-20^\circ\text{C}$ .

## Determinazione della teofillina nel plasma

La determinazione quantitativa della teofillina nel plasma è stata effettuata mediante cromatografo liquido ad alte prestazioni (Serie 4, Perkin Elmer), dotato di spettrofotometro LC 85B e di un integratore LCI 100 (entrambi Perkin-Elmer). L'analisi è stata eseguita con una colonna analitica C<sub>18</sub> a fase inversa (particelle da 5 µm, 25 cm x 4.6 mm ID della Omnispher HPLC - Varian), utilizzando una fase mobile costituita da una miscela di due fasi in rapporto 88:12:

- fase A, ottenuta aggiungendo a 1000 ml di acqua 6 ml di tetrametilammoniodrossido (soluzione al 25%) e 2 ml di acido perclorico (soluzione al 70-72%) fino a pH 3.1;
- fase B costituita da acetonitrile.

Le condizioni cromatografiche utilizzate per l'analisi prevedono un flusso della fase mobile di 1.0 ml/min, la lunghezza d'onda di rilevazione di 271 nm, una temperatura di 30°C ed un tempo totale di analisi di 10 minuti (tempo di ritenzione di 4,8 minuti). In figura 17 si riporta un cromatogramma relativo ad un campione analizzato.

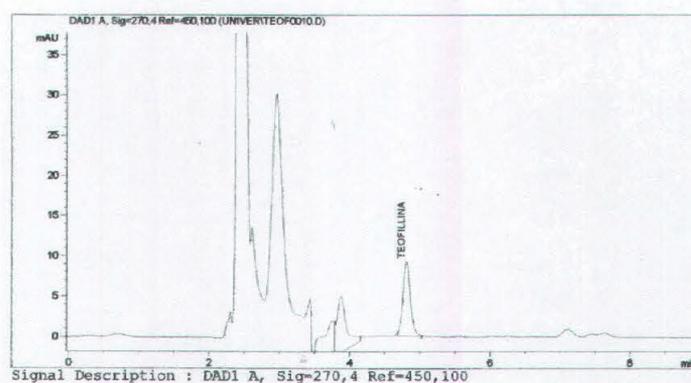


Figura 17. Cromatogramma relativo ad un campione analizzato.

Prima di effettuare l'analisi dei campioni plasmatici si rende necessario effettuare una retta di calibrazione utilizzando concentrazioni comparabili a quelle delle dosi assunte dai pazienti in corso di terapia e quindi alle concentrazioni plasmatiche attese. Per la

preparazione del bianco e della curva di calibrazione è stato utilizzato siero umano, proveniente da donatori. Le soluzioni per la costruzione della retta di taratura sono state preparate aggiungendo a 0.5 ml di siero, quantità scalari di soluzione standard 100 µg/ml di teofillina pura in HCl 0,1M ottenendo concentrazioni finali di 1.0, 2.0, 5.0 e 10.0 µg/ml di farmaco nel siero. La curva ottenuta è riportata in figura 18. I campioni sono stati preparati aggiungendo a 0.5 ml di siero, 0.5 ml di metanolo e 50 µl di HCl concentrato. La miscela è stata sonicata per 5 minuti, quindi centrifugata a 5000 rpm. 20 µl del surnatante limpido sono stati filtrati ed iniettati nel cromatografo liquido.

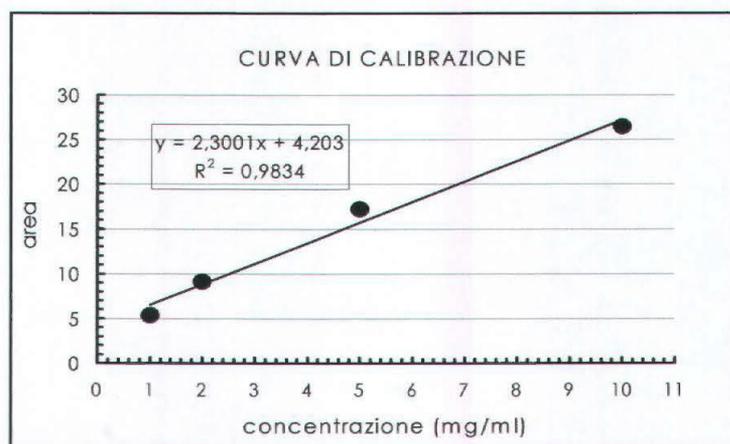


Figura 18. Curva di calibrazione.

Il metodo descritto è stato modificato secondo il metodo usato presso l'U.O. Laboratorio di Tossicologia Forense dell'A.S.S. n°1 Triestina (G. W. Perig et al., 1978).

### 2.3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Per la produzione di forme farmaceutiche a rilascio sostenuto è stato scelto come farmaco modello la teofillina, grazie al suo basso indice terapeutico e alla sua rapida eliminazione. Tuttavia prima di utilizzarla per la produzione degli estrusi è necessario studiarne il comportamento idrodinamico. Questo comporta la realizzazione di prove di dissoluzione di una compressa di teofillina a diverse velocità di rotazione (figura 19).

Queste prove permettono di determinare la costante della velocità di dissoluzione, il coefficiente di diffusione, la velocità di dissoluzione intrinseca e mettere in evidenza una eventuale trasformazione del reticolo cristallino che si può verificare durante il processo dissolutivo.

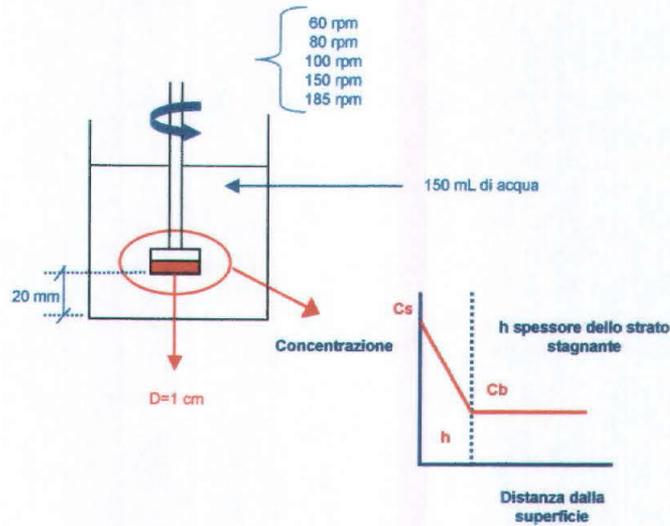


Figura 19. Rappresentazione schematica del metodo utilizzato per lo studio della velocità intrinseca e dello strato stagnante di diffusione, che si forma sulla superficie della compressa.

Per lo studio della velocità intrinseca si utilizza la consueta equazione che descrive la dissoluzione di un solido in *sink conditions* (eq. 13) [U. V. Banakar, 1991]:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{DxS}{hxV} \times C_s \quad (\text{eq. 13})$$

Dove:

S= superficie del solido esposta al mezzo di dissoluzione (cm<sup>2</sup>)

V= volume del mezzo di dissoluzione (cm<sup>3</sup>)

C<sub>s</sub>= concentrazione alla saturazione (mg/ cm<sup>3</sup>)

C= concentrazione nel tempo (mg/ cm<sup>3</sup>)

h= spessore dello strato di fluido stagnante ed aderente alla superficie solida (cm<sup>2</sup>)

D= coefficiente di diffusione del farmaco nello strato stagnante (cm<sup>2</sup>/sec).

Ponendo il rapporto  $D/h = k_t$  (costante della velocità di dissoluzione) e rielaborando l'equazione 13 si otterrà:

$$\frac{dC}{dt} = k_t \times \frac{S \times C_s}{V} \quad (\text{eq. 14})$$

da cui:

$$k_t = \frac{dC}{dt} \times \frac{V}{S \times C_s} \quad (\text{eq. 15})$$

Dove  $dC/dt$  è la pendenza delle rette calcolate fittando i profili di dissoluzione in acqua (figura 20), ottenuti alle diverse velocità di rotazione (60, 80, 100, 150 e 185 rpm), mentre  $V$ ,  $S$  e  $C_s$  sono dei parametri sperimentali conosciuti (tabella 4).

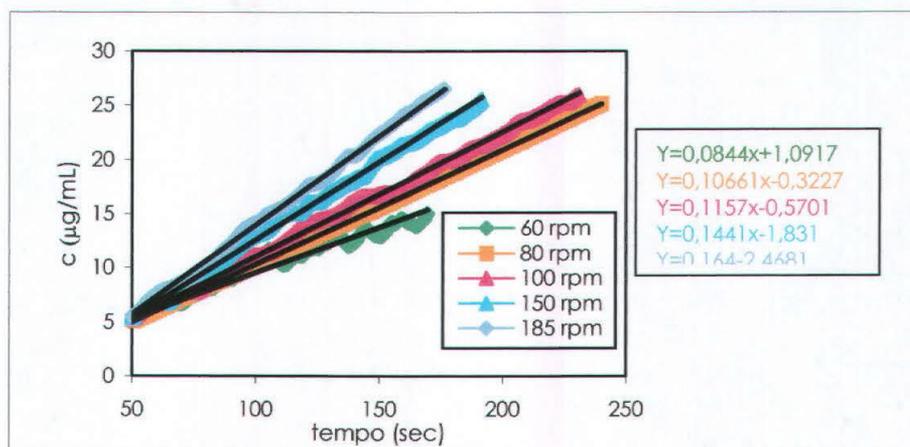


Figura 20. Grafico riassuntivo dei profili dissolutivi ottenuti dalle compresse di teofillina alle diverse velocità di rotazione dell'albero motore.

In figura 20 si nota come all'aumentare della velocità di rotazione si ha un aumento della pendenza della retta, e quindi un aumento della velocità con cui la teofillina passa in soluzione, inoltre dato che la pendenza delle rette rimane costante durante le prove di dissoluzione si può concludere che non si verificano modificazioni polimorfe della teofillina durante il processo di solubilizzazione. A questo punto, sapendo che il volume di acqua utilizzata, come mezzo di dissoluzione, è  $150 \text{ cm}^3$ , la superficie della compressa è  $0,785$

cm<sup>2</sup> ( $\pi \times r^2$ ) e la solubilità della teofillina in acqua a 37°C è 12495 ug/cm<sup>3</sup>, si possono calcolare i valori di  $k_f$  per ogni velocità di rotazione (tabella 5).

Tabella 4. Valori delle pendenze per le diverse velocità di rotazione dell'albero motore.

VELOCITA' di ROTAZIONE (rpm)	PENDENZA (dC/dt)
60	0.0797
80	0.1063
100	0.1109
150	0.1384
185	0.1577

Tabella 5. Valori della  $k_f$  per ogni velocità di rotazione dell'albero motore.

VELOCITA' (rpm)	$k_f$ [(dC/dt)x(V/SxCs)]
60	0.001218
80	0.001625
100	0.001696
150	0.002117
185	0.002411

Nelle condizioni operative appena presentate, Levich ha dimostrato che lo spessore dello strato stagnante ( $h$ ), è funzione delle condizioni idrodinamiche dell'ambiente di dissoluzione (ovvero della velocità di rotazione imposta alla superficie solida) e può essere calcolato con la seguente equazione (Levich V.G.,1962):

$$h = 1.612 \times D^{1/3} \times \nu^{1/6} \times \omega^{-1/2} \quad (\text{eq. 16})$$

dove:

$\nu = 0.0069614 \text{ cm}^2/\text{sec}$  viscosità cinematica dell'acqua a 37°C

$\omega =$  velocità angolare dell'albero del dissolutore in rad/sec.

Sostituendo i valori di  $\nu$ ,  $\omega$  e  $k_f$  nell'equazione 16, si ottiene l'equazione (eq. 17) di una retta dalla cui pendenza è possibile ricavare il coefficiente di diffusione  $D$ , che nel caso della teofillina è  $8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{sec}$  (tabella 6, figura 21).

$$k_t = (0.62 \times v^{-1/6} \times \omega^{1/2}) \times D^{2/3} \quad (\text{eq. 17})$$

Tabella 6. Valori della  $k_t$  e del prodotto  $0.62 \times v^{-1/6} \times \omega^{1/2}$  per la determinazione del coefficiente di diffusione  $D$ .

VELOCITA' DI ROTAZIONE (rad/sec)	$k_t$ (cm/sec)	$0.62 \times v^{-1/6} \times \omega^{1/2}$
6.280	0.001218	3.553
8.370	0.001625	4.103
10.47	0.001696	4.587
15.70	0.002117	5.618
19.36	0.002411	6.239

A questo punto si conoscono tutti i parametri che ci permettono di calcolare, utilizzando l'equazione 16, i valori dello spessore dello strato di diffusione (tabella 7), per le singole velocità di rotazione.

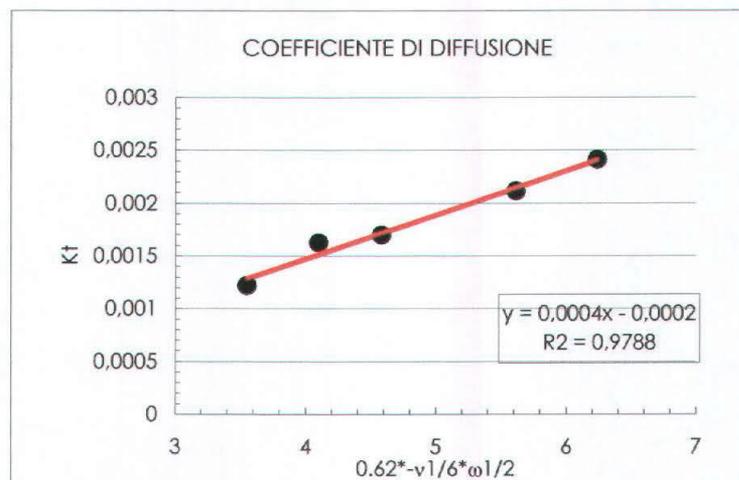


Figura 21. Grafico per il calcolo del valore del coefficiente di diffusione; la retta ha l'equazione  $k_t = (0.62 \times v^{-1/6} \times \omega^{1/2}) \times D^{2/3}$ , con pendenza  $D^{2/3}$ .

Nella stessa tabella 7 si nota pure come il valore di  $h$  diminuisca all'aumentare della velocità di rotazione. Inoltre, lo studio della velocità intrinseca ci permette di fare un'ultima considerazione, che si basa sulla possibilità di calcolare il valore della velocità di dissoluzione intrinseca ( $IDR$ ) che ci fornisce un'indicazione sul comportamento biofarmaceutico della teofillina. Il valore della  $IDR$  viene calcolato con l'equazione 19 per

la velocità di rotazione di 100 rpm, in quanto sarà la velocità a cui poi vengono condotte le prove di dissoluzione come previsto in FU XI.

Tabella 7. Valori dello spessore dello strato di diffusione (*h*) espressi in cm, relativi a tutte le velocità di rotazione dell'albero motore.

VELOCITA' DI ROTAZIONE (rad/sec)	<i>h</i> (cm)
6.28	0.00564
8.37	0.00493
10.47	0.00437
15.70	0.00352
19.36	0.00324

$$IDR \text{ (mg}\cdot\text{sec}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}) = k_t \text{ (cm/min)} \times C_s \text{ (mg/cm}^3\text{)} \quad (\text{eq. 18})$$

Nelle nostre condizioni operative precedentemente descritte, l'*IDR* per la teofillina è 1.27 mg\*sec<sup>-1</sup>\*cm<sup>-2</sup>; questo valore è superiore al valore limite, per cui non avremo problemi di carattere biofarmaceutico in fase formulativa (*IDR*>1 mg\*sec<sup>-1</sup>\*cm<sup>-2</sup>) (Lieberman H.A. et al., 1989). Lo studio della velocità intrinseca ci ha confermato che la scelta di utilizzare la teofillina monoidrata, come farmaco modello, è stata valida in quanto essa non dà ne problemi biofarmaceutici ne problemi di eventuali trasformazioni polimorfe durante il processo dissolutivo.

Il passo successivo è stato quello di eseguire delle prove preliminari di estrusione per fusione con una formulazione a base di teofillina, acido stearico, lattosio e PEG 6000 allo scopo di verificare la fattibilità della tecnica e fissare delle limitazioni per le proporzioni dei quattro componenti della miscela. Verificata la fattibilità della tecnica e fissate le limitazioni, si è passati all'utilizzo del disegno sperimentale di tipo assiale secondo Cox (figura 10) per progettare un piano sperimentale (tabella 8) che permetta uno studio dell'effetto di ogni singolo componente sul meccanismo di rilascio del farmaco dalla matrice che si viene a formare. Data la complessità della progettazione delle prove per un design assiale secondo Cox, applicato ad una miscela di quattro componenti con limitazioni, la matrice sperimentale è stata elaborata mediante il programma NEMRODW

(Mathieu D. et al., 1999). Dopo averne verificato la fattibilità, le 17 prove sperimentali previste dal piano sperimentale (tabella 8) sono state eseguite in ordine *random*.

Dato che lo scopo di questo lavoro è quello di formulare degli estrusi che permettano un rilascio ritardato della teofillina, la risposta sperimentale che si è scelto di valutare è il tempo necessario per avere il 50% di farmaco rilasciato dalla formulazione ( $t_{50\%}$ ). Quest'ultimo viene valutato secondo il test di dissoluzione in vitro, utilizzando come mezzo di dissoluzione l'acqua depurata; i profili ottenuti sono riportati in figura 22.

La  $t_{50\%}$  è stata determinata per le miscele corrispondenti ai punti del design assiale ed i risultati sono riportati sempre in tabella 8.

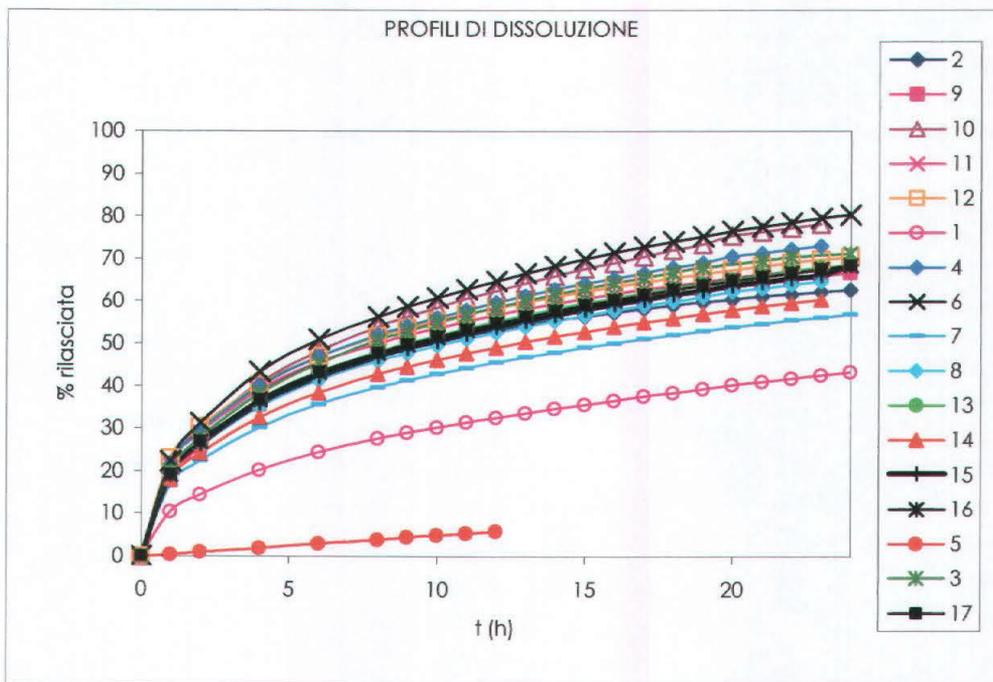


Figura 22. Profili di dissoluzione per i 17 estrusi testati.

Per meglio evidenziare l'effetto di ciascun componente sulla risposta, i valori del  $t_{50\%}$  ottenuti su ciascuno dei quattro assi, espressa in funzione di quella dell'estruso 17 preso come riferimento, sono rappresentati in un grafico in funzione del componente corrispondente, come mostrato in figura 23.

Tabella 8. Piano sperimentale e risposte sperimentali ( $Y=t_{50\%}$ ) determinate per i 17 estrusi.

N° ESP	COMPONENTE				Y
	X1 (%)	X2 (%)	X3 (%)	X4 (%)	$t_{50\%}$ (h)
1	10.05	69.19	10.38	10.38	8.0
2	29.09	54.55	8.18	8.18	9.0
3	48.13	39.40	5.98	5.98	2.0
4	67.17	25.25	3.79	3.79	5.0
5	52.46	25.05	11.24	11.24	1.5
6	38.37	45.19	8.22	8.22	5.0
7	24.28	65.32	5.20	1.04	32.0
8	10.18	85.45	2.18	2.18	34.0
9	37.81	54.01	0.08	8.10	9.0
10	35.94	51.34	5.03	7.70	6.0
11	34.06	48.66	9.97	7.30	8.0
12	32.19	45.99	14.92	6.90	8.0
13	37.81	54.01	8.10	0.08	18.0
14	35.94	51.34	7.7	5.03	12.0
15	34.06	48.66	7.30	9.97	7.0
16	32.19	45.99	6.90	14.92	6.0
17	35.00	50.00	7.50	7.50	10.0

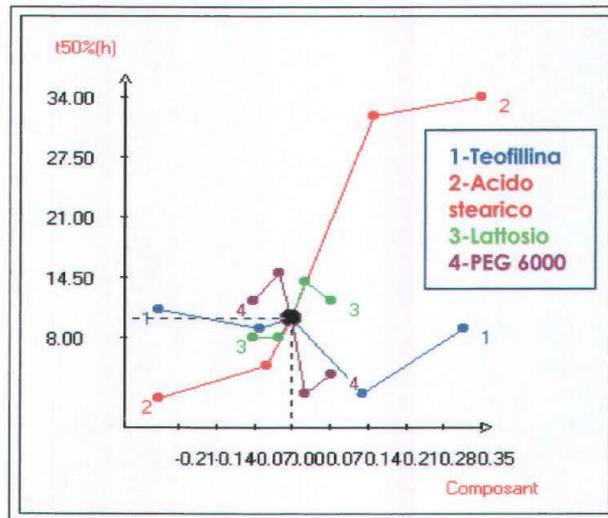


Figura 23. Rappresentazione dei valori della  $t_{50\%}$  al variare delle frazioni dei singoli componenti ( $X_i$ ).

Esaminando il grafico in figura 23 si osserva che l'andamento della risposta varia notevolmente al variare delle frazioni di ogni singolo componente, e si può perciò dedurre che tutti e quattro i componenti esercitano un'influenza sulla risposta. Si nota, inoltre, come l'effetto più significativo sul valore di  $t_{50\%}$  sia quello dovuto all'acido stearico; quest'effetto era prevedibile, in quanto l'acido stearico è il componente che costituisce

la matrice insolubile del sistema e una variazione della sua quantità comporta notevoli variazioni sulla topologia della matrice stessa e quindi anche sui profili di rilascio del farmaco. Gli effetti degli eccipienti idrofili (lattosio e PEG) e della teofillina sono da attribuire anche in questo caso ad una modifica topologica che essi provocano quando si solubilizzano, infatti mano a mano che passano in soluzione essi daranno origine ad una serie di canalicoli interni dentro i quali il farmaco potrà diffondere all'esterno della matrice. Ne consegue che, maggiore sarà la frazione dei componenti idrofili e maggiori saranno i canali che si formano dai quali diffonderà il farmaco, più basso sarà il  $t_{50\%}$ . La velocità con cui i componenti idrofili passano in soluzione sarà funzione della loro solubilità in acqua, maggiore sarà questa e più velocemente passeranno in soluzione. Per analizzare il meccanismo di rilascio della teofillina dagli estrusi, si è resa necessaria un'ulteriore caratterizzazione degli estrusi, in particolare si è dovuto valutare la presenza del farmaco in superficie.

Dall'analisi dello spettro di fotoemissione (XPS) è stata quindi determinata la presenza del farmaco in superficie (figura 24), presenza che giustifica la sua fase iniziale rapida di liberazione nel test di dissoluzione (figura 22), e viene confermata dalle concentrazioni relative degli elementi presenti sulla superficie (C1s, N1s, O1s) che vengono calcolate elaborando lo spettro stesso (figura 24). Analizzando le superfici degli estrusi al microscopio elettronico (SEM) è stato messo in evidenza un certo grado di porosità (figura 25) che potrebbe giocare un ruolo non trascurabile sulla cinetica di rilascio del farmaco dalla formulazione (Voinovich D., 2000). Prima però di proseguire con la sperimentazione, si è pensato di studiare il meccanismo con cui il farmaco viene rilasciato dalle matrici cilindriche che si formano, allo scopo di trovare un modello matematico che descriva il fenomeno, e che possa avere una certa utilità di tipo previsionale sulle caratteristiche di rilascio che si possono ottenere da questi sistemi. In un primo momento si è cercato di realizzare il *modelling* del meccanismo di rilascio della teofillina solo dall'estruso 17 (riferimento), per poi passare alla convalida dello stesso per tutti gli altri estrusi.

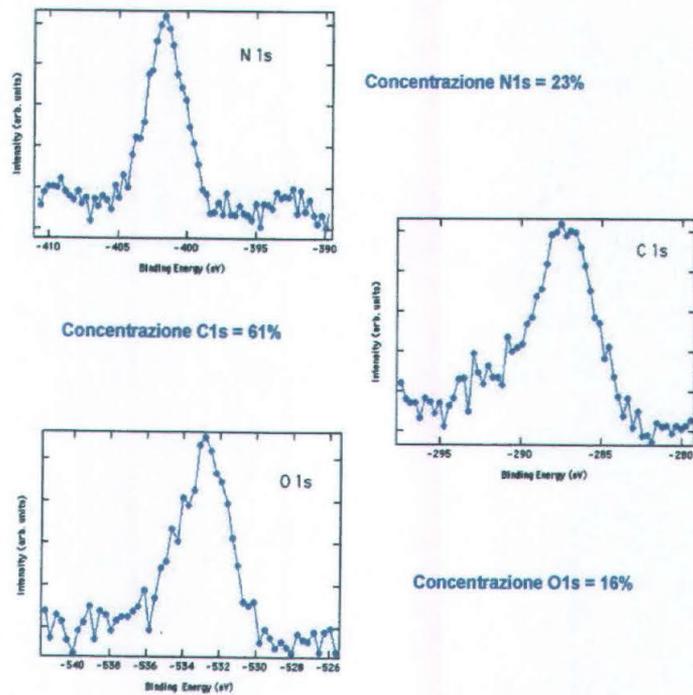


Figura 24. Spettri XPS della superficie dell'estruso 17.

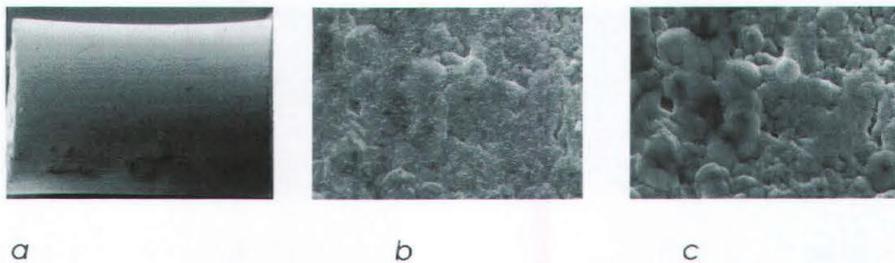


Figura 25. Microfotografia dell'estruso 17 prodotto per *melt-extrusion* in Thalassia® ram extruder; a) Panoramica (58X); b,c) Particolari della superficie (10000X; 10020X).

Il modello matematico sviluppato si basa sulle ipotesi esposte nel paragrafo relativo al *modelling* (eq. 5-12) e sostanzialmente ammette che il rilascio sia regolato dalla dissoluzione del farmaco solido e dalla sua diffusione nei canalicoli (riempiti di acqua) che pervadono l'estruso a causa della rapida dissoluzione degli eccipienti (PEG, Lattosio). In particolare, anche alla luce dei risultati ottenuti con l'XPS, si ipotizza che il rilascio del farmaco dagli strati più esterni dell'estruso sia principalmente regolato dalla dissoluzione

piuttosto che dalla diffusione. A tal fine, il modello ammette che il sistema farmaco/matrice sia caratterizzato da due diversi valori del coefficiente di diffusione effettivo:  $D_{ee}$  per gli strati più esterni e  $D_{ei}$  per quelli più interni. Di conseguenza, i parametri di *fitting* del modello saranno  $D_{ee}$ ,  $D_{ei}$ ,  $K_t$  (che regola la velocità di dissoluzione del farmaco nei canalicoli) ed  $h$ , spessore degli strati più esterni della matrice ove la diffusione è caratterizzata da  $D_{ee}$ . La determinazione di tali parametri prevede di stabilirne dei valori iniziali ragionevoli, procedere alla soluzione numerica del modello (ottenuta mediante la tecnica dei volumi di controllo (Patankar S.V., 1990) ed eseguita da un programma scritto in FORTRAN) da confrontare poi con il rilascio determinato sperimentalmente. In caso di buon accordo tra dati sperimentali e previsione del modello, possiamo dire di avere determinato i valori dei parametri di *fitting*. In caso contrario, i valori dei parametri vanno opportunamente modificati nel tentativo di dare una migliore descrizione dei dati sperimentali. La procedura continua sino al raggiungimento di una descrizione soddisfacente. Dal confronto tra i dati ottenuti con il modello matematico proposto, e quelli ottenuti sperimentalmente, si può valutare che le ipotesi fatte sono ragionevoli.

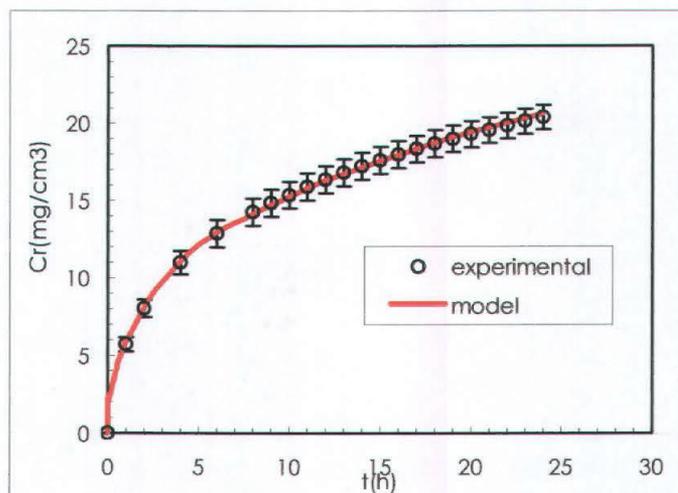


Figura 26. Confronto tra il *fitting* del modello (linea continua) ed i dati sperimentali (cerchietti) relativi al rilascio del sistema 17.

La figura 26 mostra il buon accordo tra il *fitting* del modello matematico proposto in questo caso ed i dati sperimentali relativi al sistema 17, che rappresenta il sistema di

riferimento scelto. Il *fitting*, condotto sapendo che il volume di rilascio  $V_r = 900 \text{ cm}^3$ , l'altezza del cilindro  $Z_c = 0.5 \text{ cm}$ , il raggio del cilindro  $R_c = 0.15 \text{ cm}$  ( $k = 3.33$ ) e  $M_0 = 75.4 \text{ mg}$  (questa condizione corrisponde a  $N = 2$  cilindri), fornisce i seguenti valori per i tre parametri di *fitting*:  $K_t = 0.1 \text{ cm/s}$ ,  $D_{ee} = 2 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ,  $D_{ei} = 4.2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  dove  $D_{ee}$  e  $D_{ei}$  rappresentano, rispettivamente, il coefficiente di diffusione effettivo relativo allo strato esterno (spessore  $h = 58 \text{ }\mu\text{m}$ ) ed alle parti interne della matrice. L'analisi di questa figura permette di concludere che le ipotesi sulle quali il modello si basa sono ragionevoli. Inoltre, è interessante notare che, nonostante il piccolo valore di  $h$  (spessore dello strato più esterno), il modello prevede la presenza del 9% di tutto il farmaco contenuto nella matrice, indipendentemente dalla composizione. Il *fitting* dei dati sperimentali mediante il modello proposto, non sarebbe soddisfacente se non si assumesse l'esistenza di uno strato esterno della matrice, caratterizzato da un coefficiente di diffusione effettivo di valore superiore a quello assunto nelle parti più interne. In particolare, il modello non sarebbe in grado di *fit* bene contemporaneamente sia la parte iniziale del rilascio (0 – 4 h) che quella finale perché non potrebbe descrivere l'iniziale *burst effect*, fenomeno tipico delle compresse (Huang X. e Brazel C. S., 2001). Il profilo di rilascio che si ottiene può essere spiegato ricordando che negli strati più esterni della matrice, a causa della piccola distanza da attraversare, il rilascio del farmaco è principalmente controllato dalla dissoluzione e la diffusione gioca un ruolo meno importante. Nelle parti più interne della matrice, al contrario, la diffusione rappresenta lo stadio limitante e, conseguentemente, il rilascio del farmaco è sensibilmente ridotto. Sulla base dei valori del coefficiente di diffusione effettivo ( $D_{ei}$ ,  $D_{ee}$ ) e sapendo che il coefficiente di diffusione della teofillina  $D_w$  nel mezzo di dissoluzione ( $T = 37^\circ\text{C}$ ) è uguale a  $8.0 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ , come determinato dallo studio della velocità intrinseca, è possibile determinare la tortuosità  $\tau$  degli estrusi utilizzando la seguente equazione proposta da Peppas (Peppas N., 1984):

$$\tau = \frac{D_w}{D_e \cdot \varepsilon} \quad (\text{eq. 19})$$

dove  $\epsilon$  indica il grado di vuoto della matrice ed esprime il rapporto tra il volume vuoto dell'estruso ed il suo volume totale (figura 27).

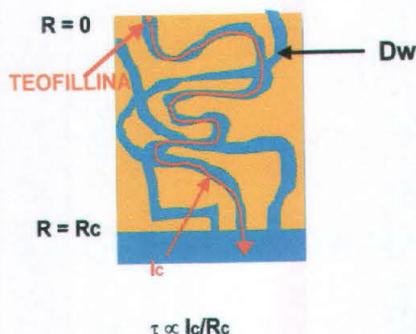


Figura 27. Rappresentazione grafica del significato di tortuosità ( $\tau$ );  $lc$ = lunghezza effettiva percorsa dalla particella di teofillina per diffondere dall'estruso;  $Dw$ = coefficiente di diffusione in acqua;  $Rc$ = raggio dell'estruso.

Dato che sia gli eccipienti (lattosio e PEG) che la teofillina si dissolvono durante il processo di rilascio,  $\epsilon$  si modificherà nel tempo così come la tortuosità. Si può quindi andare a calcolare il valore di  $\epsilon$  all'inizio del processo di rilascio in cui la teofillina è tutta allo stato solido e gli eccipienti si considerano totalmente dissolti ( $\epsilon_1=0.13$ ,

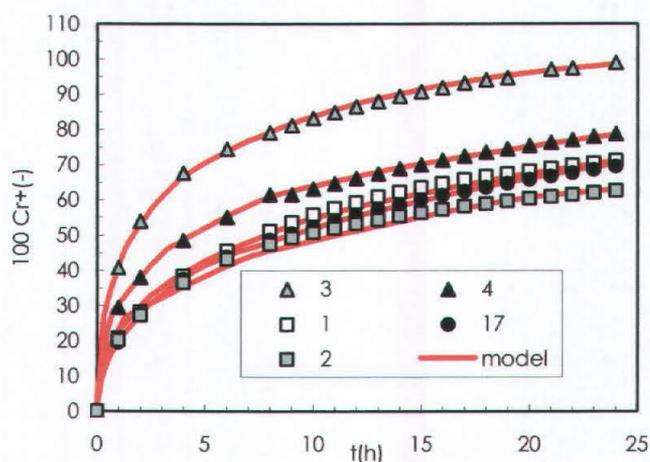
$$\epsilon_1 = \left( \frac{\omega_{LATT} + \omega_{PEG}}{\rho_{LATT} + \rho_{PEG}} \right) / \left( \frac{\omega_{LATT} + \omega_{PEG} + \omega_{AS} + \omega_{TEO}}{\rho_{LATT} + \rho_{PEG} + \rho_{AS} + \rho_{TEO}} \right)$$

ed alla fine quando il solo acido stearico

costituisce la matrice ( $\epsilon_2=0.41$ ;  $\epsilon_2 = \left( \frac{\omega_{LATT} + \omega_{PEG} + \omega_{TEO}}{\rho_{LATT} + \rho_{PEG} + \rho_{TEO}} \right) / \left( \frac{\omega_{LATT} + \omega_{PEG} + \omega_{AS} + \omega_{TEO}}{\rho_{LATT} + \rho_{PEG} + \rho_{AS} + \rho_{TEO}} \right)$ ). Con questi

due valori di  $\epsilon$  si possono calcolare 2 valori di  $\tau$ , rispettivamente  $\tau_e = 20.6$  e  $\tau_i = 98.1$  dove  $\tau_e$  e  $\tau_i$  rappresentano, rispettivamente, la tortuosità della matrice negli strati più esterni ed in quelli interni.

Come già accennato in precedenza, dopo aver ottenuto dei risultati molto buoni con il *fitting* dei dati relativi all'estruso 17, si è passati all'analisi degli altri sistemi. Per l'analisi degli altri 16 estrusi, li si suddivide in quattro gruppi a seconda del componente di cui si studia l'effetto.



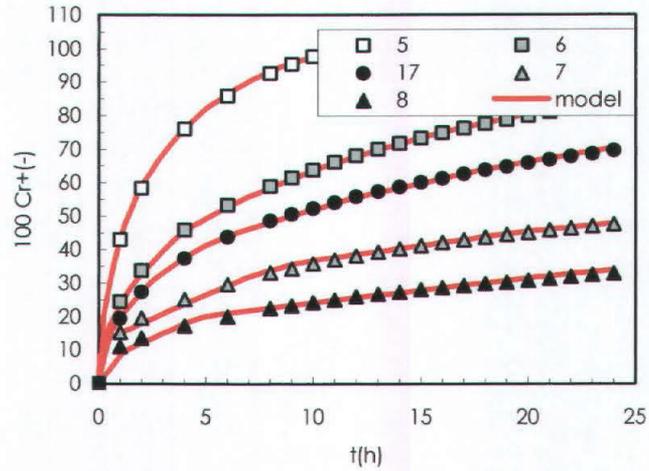
	1	2	3	4	17
Teofillina (%)	10.05	48.13	48.13	67.17	35
Ac. Stearico (%)	69.19	39.40	39.40	25.25	50
Lattosio (%)	10.38	5.98	5.98	3.79	7.5
PEG 6000 (%)	10.38	5.98	5.98	3.79	7.5

Figura 28. Confronto tra il *fitting* del modello (linea continua) ed i dati sperimentali relativi al rilascio dai sistemi 1, 2, 3, 4 e 17 (effetto della teofillina).

La figura 28 mostra il confronto tra il *fitting* del modello ed i dati sperimentali relativi al rilascio dai sistemi 1, 2, 3, 4 e 17; in ordinate si è considerata la quantità dimensionale  $C_r^+$  che indica il rapporto tra  $C_r$  ed il valore da essa assunto dopo un tempo infinitamente lungo (equilibrio termodinamico) ( $C_{r\infty}$ ).

E' evidente come il modello è ancora in grado di descrivere molto bene i dati sperimentali e dai grafici è anche evidente come la variazione della frazione di massa della teofillina ( $\omega_{TEO}$ ) ha una notevole influenza sulla cinetica di rilascio. Infatti, un aumento della quantità di teofillina come nei sistemi 3 e 4 comporta un aumento della cinetica di rilascio rispetto al rilascio relativo al sistema 17. Infatti, mano a mano che la teofillina si dissolve, la porosità della matrice aumenta rapidamente e naturalmente questo processo diventa sempre più importante all'aumentare del contenuto di farmaco (per il sistema 3 si ha  $\omega_1 = 0.10$ ,  $\omega_2 = 0.51$ ; sistema 4,  $\omega_1 = 0.07$ ,  $\omega_2 = 0.67$ ; sistema 1,  $\omega_1 = 0.16$ ,  $\omega_2 = 0.24$ ;

sistema 2,  $\omega_1 = 0.14$ ,  $\omega_2 = 0.37$ ). Il fatto che il sistema 4 sia caratterizzato da una cinetica di rilascio più bassa rispetto al sistema 3, potrebbe essere dovuto al *crowding effect*, che si verifica all'interno dei canalicoli della matrice (Peppas N., 1984).

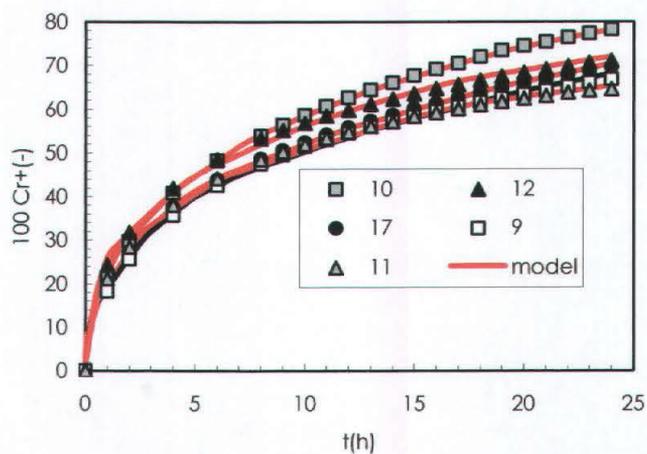


	5	6	7	8	17
Teofillina (%)	52.46	8.3 7	24.28	10.18	35
Ac. Stearico (%)	25.05	5.1 9	65.32	85.45	50
Lattosio (%)	11.24	8.2 2	5.20	2.18	7.5
PEG 6000 (%)	11.24	8.2 2	1.04	2.18	7.5

Figura 29. Confronto tra il *fitting* del modello (linea continua) ed i dati sperimentali relativi al rilascio dai sistemi 5, 6, 7, 8 e 17 (effetto dell'acido stearico).

Per *crowding effect* si intende un particolare fenomeno per cui il coefficiente di diffusione si riduce all'aumentare della concentrazione del soluto nel solvente, questo è dovuto al fatto che a causa del numero elevato delle molecole di soluto esse competono e si ostacolano vicendevolmente nel loro moto nel solvente, rendendo così più bassa la loro capacità di diffondere. La figura 29 mostra il confronto tra il *fitting* del modello e i dati sperimentali relativi ai sistemi 5 – 8. Mentre per gli estrusi 5 e 6 la descrizione dei dati è

molto buona, per la parte iniziale dei sistemi 7 e 8, lo è meno. Probabilmente ciò è dovuto al fatto che l'ipotesi di una immediata dissoluzione degli eccipienti (lattosio e PEG) non è completamente vera a causa dell'elevata percentuale del componente insolubile (acido stearico) che ne impedisce la fuoriuscita nell'ambiente di rilascio. Ciò nonostante, la figura 29 dimostra chiaramente che l'aumento della frazione di massa dell'acido stearico  $\omega_{\text{SACID}}$  determina un incremento dell'azione ritardante sul rilascio dal momento che la topologia della matrice diventa sempre più complessa ed il grado di vuoto diminuisce.



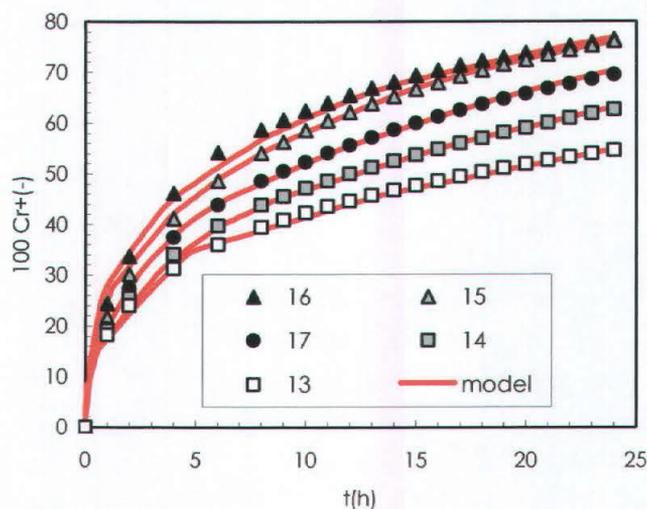
	9	10	11	12	17
Teofillina (%)	37.81	35.94	34.06	32.19	35
Ac. Stearico (%)	54.01	51.34	48.66	45.99	50
Lattosio (%)	0.08	5.03	9.97	14.92	7.5
PEG 6000 (%)	8.10	7.70	7.30	6.90	7.5

Figura 30. Confronto tra il *fitting* del modello (linea continua) ed i dati sperimentali relativi al rilascio dai sistemi 9, 10, 11, 12 e 17 (effetto del lattosio).

Infatti, come mostrato in tabella,  $T_i$  e  $T_e$  (parametri che danno indicazioni sulla topologia della matrice) variano, rispettivamente, da 2.5 e 4.2 (estruso 5) a 31978 e 19986 (estruso 8).

Queste considerazioni portano alla conclusione che, a parte l'effetto del fattore di forma  $k$ , la frazione di acido stearico è la variabile più importante per la modificazione

della cinetica di rilascio dai nostri sistemi. Anche per i sistemi 5 – 8, un buon *fitting* richiede l'esistenza di uno strato esterno della matrice caratterizzato da un più alto valore del coefficiente di diffusione, mentre  $K_f$  rimane sempre uguale a 0.1 cm/s.



	13	14	15	16	17
Teofillina (%)	37.81	35.94	34.06	32.19	35
Ac. Stearico (%)	54.01	51.34	48.66	45.99	50
Lattosio (%)	8.10	7.7	7.30	6.90	7.5
PEG 6000 (%)	0.08	5.03	9.97	14.92	7.5

Figura 31. Confronto tra il *fitting* del modello (linea continua) ed i dati sperimentali relativi al rilascio dai sistemi 13, 14, 15, 16 e 17 (effetto del PEG).

L'analisi delle figure 30 e 31 rivela che il modello è ancora in grado di descrivere bene i dati sperimentali quale che sia il sistema considerato. La procedura di *fitting* rivela che, per tutti i test considerati,  $K_f = 0.1$  cm/s e che non si può prescindere dall'esistenza di uno strato esterno della matrice caratterizzato da un più elevato coefficiente di diffusione (tabella 9). Analogamente a quanto avevamo visto in precedenza con lo studio grafico degli effetti dei componenti sul  $t_{50\%}$ , anche in questo caso è possibile ottenere delle

rappresentazioni grafiche della variazione di  $D_{ei}$ ,  $D_{ee}$  (provenienti dal *fitting* del modello sui dati sperimentali) in funzione di  $\omega$ , differenza tra la composizione dell'estruso 17 (riferimento) e la composizione della matrice in esame (figure 32 e 33). Per quanto riguarda le prove 1, 2, 3 e 4, che permettono di studiare l'effetto della teofillina sui coefficienti di diffusione, si può notare che mentre i valori di  $D_{ei}$  e  $D_{ee}$  aumentano passando dal sistema 1 al 3, essi diminuiscono per l'estruso 4. E' inoltre interessante notare anche che, per i sistemi 1 - 4, il *fitting* del modello richiede l'esistenza di uno strato esterno della matrice caratterizzato da un più alto valore del coefficiente di diffusione (tabella 9), mentre  $K_f$  risulta sempre essere uguale a 0.1 cm/s. Questo fatto permette di concludere che la struttura della matrice, almeno dal punto di vista macroscopico, non è sostanzialmente influenzata dal contenuto di teofillina.

Le prove 5, 6, 7 e 8 permettono di studiare l'effetto dell'acido stearico e dalle figure 32 e 33 si nota come ad un aumento della frazione di acido stearico corrisponda una riduzione sia di  $D_{ei}$  che di  $D_{ee}$ , questa è una chiara evidenza del fatto che un aumento della frazione di questo componente comporta un notevole incremento dell'azione ritardante.

Le prove 9, 10, 11 e 12 permettono, invece, di studiare l'effetto del lattosio sul meccanismo di rilascio del farmaco dagli estrusi, dalle figure 32 e 33 si nota che sia  $D_{ei}$  che  $D_{ee}$  non sono sostanzialmente modificati dal valore della frazione di massa del lattosio ( $\omega_{LAT}$ ), questo testimonia il fatto che tale parametro non riveste un ruolo di primo piano nella regolazione della cinetica di rilascio. Tuttavia, il fatto che le curve di rilascio (figura 32, tabella 9) e la relativa coppia  $D_{ei}$ ,  $D_{ee}$  non siano inversamente proporzionali al valore della frazione di massa dell'acido stearico, suggerisce che il lattosio possa, in qualche modo, intervenire sulla topologia della matrice.

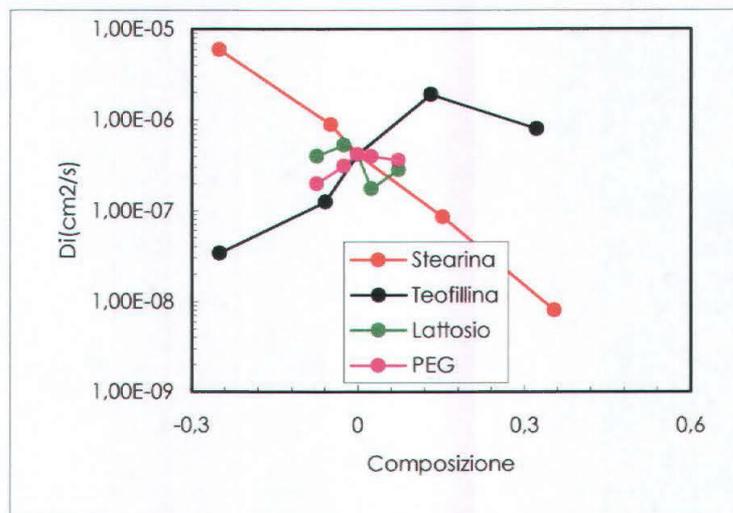


Figura 32. Andamento del coefficiente di diffusione effettivo ( $D_{ei}$ ) caratterizzante gli strati interni della matrice in funzione di  $\omega$ , differenza tra la composizione di riferimento ( $\omega_{TEO}$ ,  $\omega_{SACID}$ ,  $\omega_{LAT}$  e  $\omega_{PEG}$  del sistema 17) e quella del sistema corrente ( $\omega_{TEO}$ ,  $\omega_{SACID}$ ,  $\omega_{LAT}$  e  $\omega_{PEG}$  per i sistemi 1 - 4, 5 - 8, 9 - 12 e 13 - 16, rispettivamente).

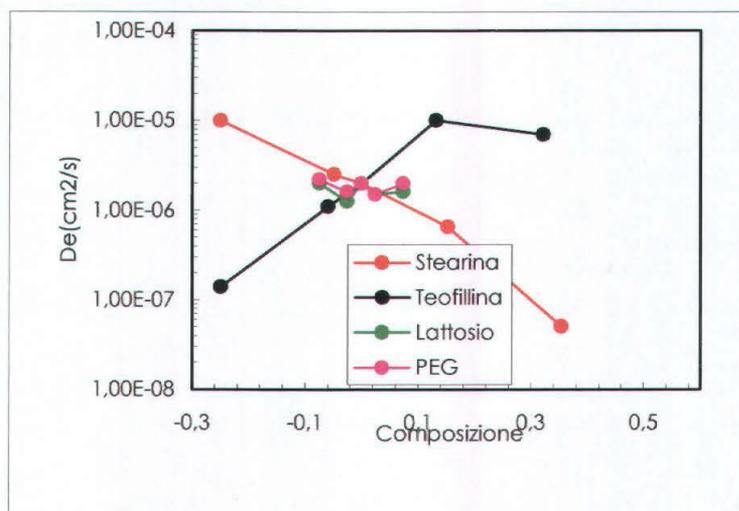


Figura 33. Andamento del coefficiente di diffusione effettivo ( $D_{ee}$ ) caratterizzante gli strati esterni della matrice in funzione di  $\omega$ , differenza tra la composizione di riferimento ( $\omega_{TEO}$ ,  $\omega_{SACID}$ ,  $\omega_{LAT}$  e  $\omega_{PEG}$  del sistema 17) e quella del sistema corrente ( $\omega_{TEO}$ ,  $\omega_{SACID}$ ,  $\omega_{LAT}$  e  $\omega_{PEG}$  per i sistemi 1 - 4, 5 - 8, 9 - 12 e 13 - 16, rispettivamente).

Questa è probabilmente la ragione per cui, per esempio, la coppia  $D_{ei} - D_{ee}$ , relativa al sistema 10 ( $\omega_{SACID} = 0.5134$ ), assume un valore più grande rispetto a quello della stessa coppia relativa al sistema 11 ( $\omega_{SACID} = 0.4866$ ) e 12 ( $\omega_{SACID} = 0.4599$ ).

Infine le prove 13, 14, 15 e 16 mettono in evidenza l'effetto del PEG sui profili di rilascio del farmaco, dalle figure 32 e 33 si nota che mentre  $D_{ee}$  è praticamente

indipendente dal valore assunto dalla frazione di massa del PEG ( $\omega_{PEG}$ ),  $D_{ei}$  è direttamente proporzionale a  $\omega_{PEG}$  ed inversamente proporzionale alla frazione di acido stearico. Quest'ultima osservazione suggerisce che l'effetto del PEG sulla cinetica di rilascio sia addirittura minore di quella esercitata dal lattosio.

A questo punto è interessante analizzare alcune simulazioni ottenute dal modello assumendo come riferimento i parametri che caratterizzano il sistema 17 e modificando il fattore di forma  $k$  che, come discusso precedentemente, gioca un ruolo molto importante nella cinetica di rilascio, dal momento che regola l'area della superficie esterna del cilindro.

Tabella 9. Parametri di *fitting* ( $K_i$ ,  $D_{ei}$ ,  $D_{ee}$ ,  $h$ ), grandezze derivate ( $\tau_i$ ,  $\tau_e$ ) e porosità iniziale ( $\varepsilon_1$ ) e finale ( $\varepsilon_2$ ) relativi ai 17 sistemi studiati.

N°	K (cm/s)	$D_{ei}$ (cm <sup>2</sup> /s)	$D_{ee}$ (cm <sup>2</sup> /s)	h(μm)	$\tau_e$ (-)	$\tau_i$ (-)	$\varepsilon_1$ (-)	$\varepsilon_2$ (-)
1	0.1	3.40*10 <sup>-8</sup>	1.40*10 <sup>-7</sup>	115	293.6	1208.9	0.164	0.239
2	0.1	1.25*10 <sup>-7</sup>	1.10*10 <sup>-6</sup>	115	36.5	321.8	0.136	0.367
3	0.1	4.20*10 <sup>-7</sup>	2.00*10 <sup>-6</sup>	115	4.6	24.0	0.105	0.510
4	0.1	1.90*10 <sup>-6</sup>	1.00*10 <sup>-5</sup>	115	8.9	77.8	0.071	0.670
5	0.1	6.00*10 <sup>-6</sup>	1.00*10 <sup>-5</sup>	115	2.5	4.2	0.210	0.675
6	0.1	9.00*10 <sup>-7</sup>	2.50*10 <sup>-6</sup>	58	14.8	41.0	0.142	0.457
7	0.1	4.20*10 <sup>-7</sup>	2.00*10 <sup>-6</sup>	58	96.4	737.8	0.083	0.270
8	0.1	8.50*10 <sup>-8</sup>	6.50*10 <sup>-7</sup>	115	3197.8	19986.2	0.033	0.105
9	0.1	4.00*10 <sup>-7</sup>	2.00*10 <sup>-6</sup>	58	32.2	161.0	0.074	0.374
10	0.1	5.30*10 <sup>-7</sup>	1.25*10 <sup>-6</sup>	115	37.3	87.9	0.109	0.397
11	0.1	4.20*10 <sup>-7</sup>	2.00*10 <sup>-6</sup>	115	24.7	211.5	0.145	0.422
12	0.1	1.75*10 <sup>-7</sup>	1.50*10 <sup>-6</sup>	115	19.3	110.4	0.062	0.365
13	0.1	2.00*10 <sup>-7</sup>	2.20*10 <sup>-6</sup>	58	34.0	374.3	0.182	0.446
14	0.1	3.10*10 <sup>-7</sup>	1.60*10 <sup>-6</sup>	58	30.0	154.8	0.105	0.395
15	0.1	4.20*10 <sup>-7</sup>	2.00*10 <sup>-6</sup>	115	24.2	90.7	0.149	0.424
16	0.1	4.00*10 <sup>-7</sup>	1.50*10 <sup>-6</sup>	115	14.8	82.1	0.192	0.454
17	0.1	4.20*10 <sup>-7</sup>	2.00*10 <sup>-6</sup>	58	20.6	98.1	0.127	0.410

A tal proposito, la figura 34 riporta le curve di rilascio ( $0 < t < 24$  h) calcolate secondo il modello proposto assumendo che  $k$  vari da 0.1 a 30, essendo questo intervallo tipico per sistemi a rilascio di forma cilindrica (Grassi M. et al., 2000).

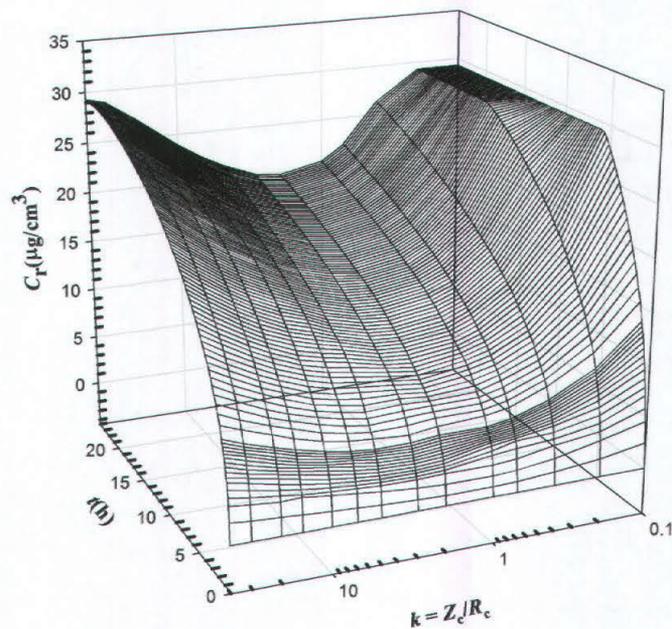


Figura 34. Curve di rilascio simulate mediante il modello assumendo a riferimento i parametri relativi al sistema 17 e variando il fattore di forma  $k$ , essendo costante il volume di ciascun cilindro.

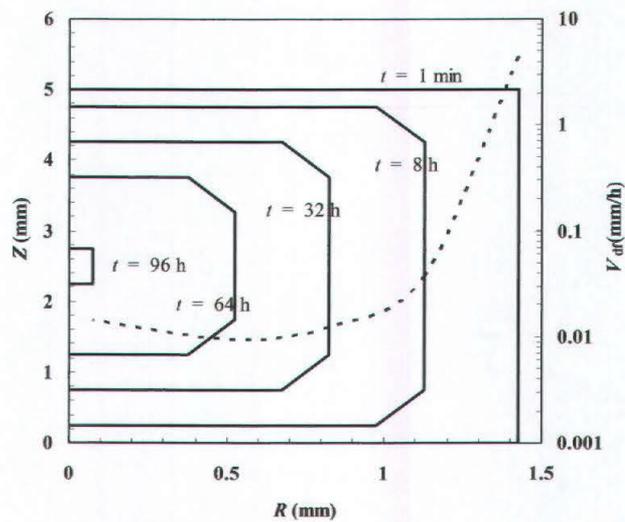


Figura 35. Posizione (linee continue) e velocità ( $V_{diff}$ , linea tratteggiata) del fronte di diffusione, in funzione del tempo, calcolate secondo il modello postulato assumendo i parametri relativi al sistema 17.

E' evidente che mentre la più bassa cinetica di rilascio si ha in corrispondenza del valore minimo assunto dell'area della superficie esterna del cilindro ( $k = 2$ ), per valori di  $k$  superiori o inferiori si assiste ad un aumento della cinetica di rilascio.

E' ancora interessante notare che il modello ci permette di determinare come si sposti il fronte di diffusione (superficie ideale di separazione tra la porzione di matrice che contiene solo farmaco disciolto e porzione che contiene ancora del farmaco allo stato solido (Henrist D. et al., 1999).

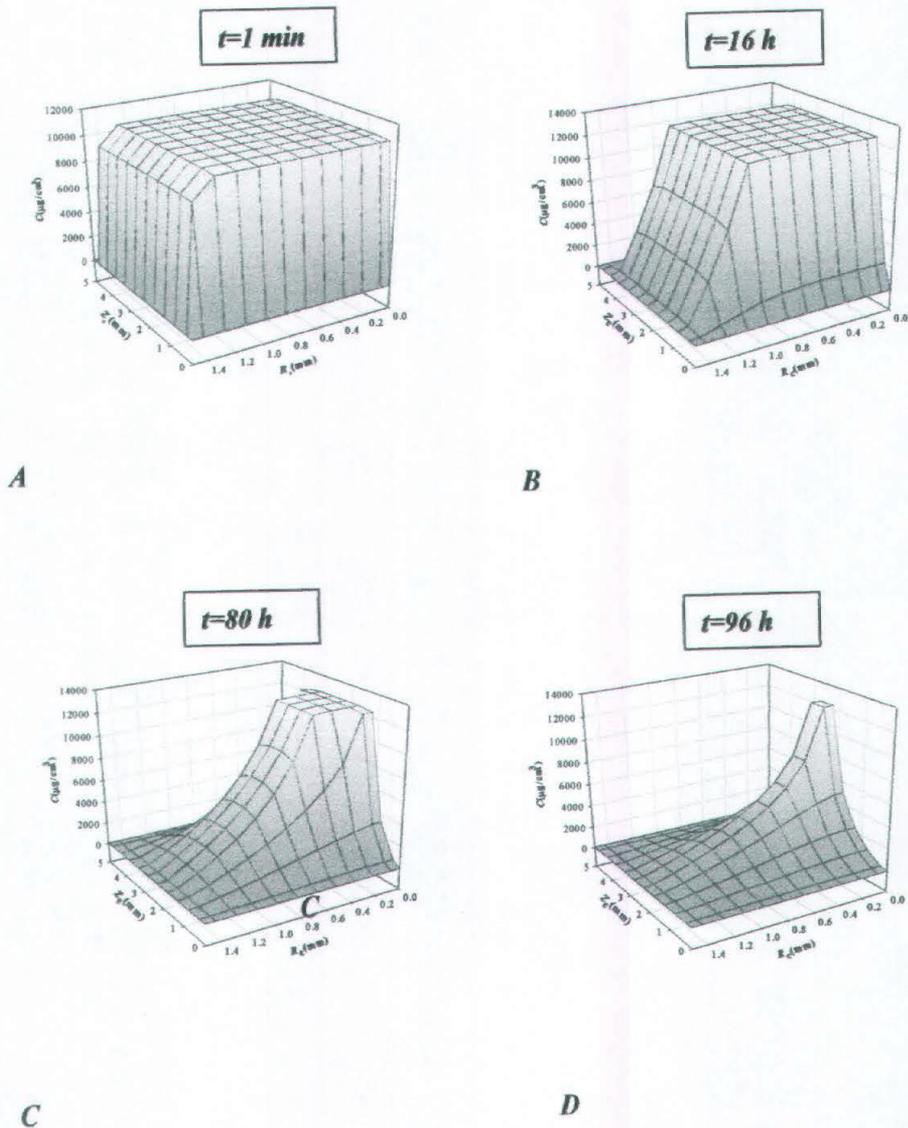


Figura 36. Rappresentazione grafica della quantità di farmaco che dissolve nel tempo.

La figura 35, riportando la sezione assiale della matrice cilindrica (ascissa, direzione radiale  $R$ ; ordinata direzione assiale  $Z$ ) mette in evidenza, per mezzo di linee continue, la posizione del fronte di diffusione a diversi tempi (1 min, 8, 32, 64 e 96 h). In aggiunta, la riga

tratteggiata (i cui valori sono leggibili sull'asse destro delle ordinate) indica la velocità radiale del fronte di diffusione  $V_{dr}$  (analoghe considerazioni possono essere fatte per la direzione assiale) in funzione della sua posizione radiale (che, a sua volta, dipende dal tempo). Da questa figura si può notare che  $V_{dr}$  decresce rapidamente nelle prime 8 ore per poi assumere un valore costante approssimativamente dopo 32 ore.

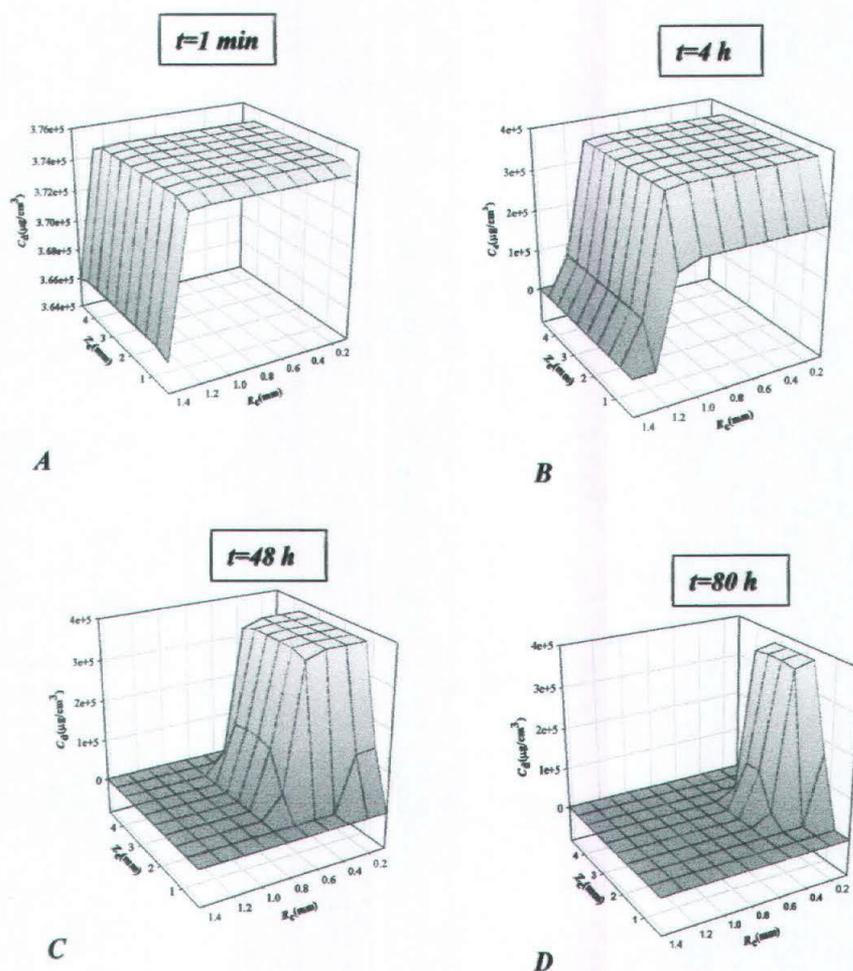


Figura 37. Rappresentazione grafica di come varia la quantità di farmaco indissolto nel tempo.

Le figure 36 e 37 mostrano come si modifichi nel tempo rispettivamente la concentrazione del farmaco solubilizzato ed indissolto nella matrice secondo quanto previsto dal modello ed assumendo, ancora una volta, i parametri relativi al sistema 17. Come si può vedere, si assiste ad un impoverimento delle zone esterne della matrice sia di

farmaco solubilizzato che indissolto finchè non rimane che un piccolo nucleo di farmaco al centro della matrice. Ovviamente queste simulazioni suppongono che durante tutto il corso del rilascio la matrice non subisca né rigonfiamento né erosione.

Pertanto, tali risultati sono riferibili solo a prove *in vitro* e non a prove *in vivo*. Per verificare la biodisponibilità *in vivo* degli estrusi, si è reso necessario selezionare una delle formulazioni prodotte. Tale selezione è stata realizzata mettendo a confronto i nostri profili dissolutivi e i rispettivi  $t_{50\%}$ , dei diversi estrusi, con quelli riportati in letteratura di una formulazione belga (*Xanthium*<sup>®</sup>300).

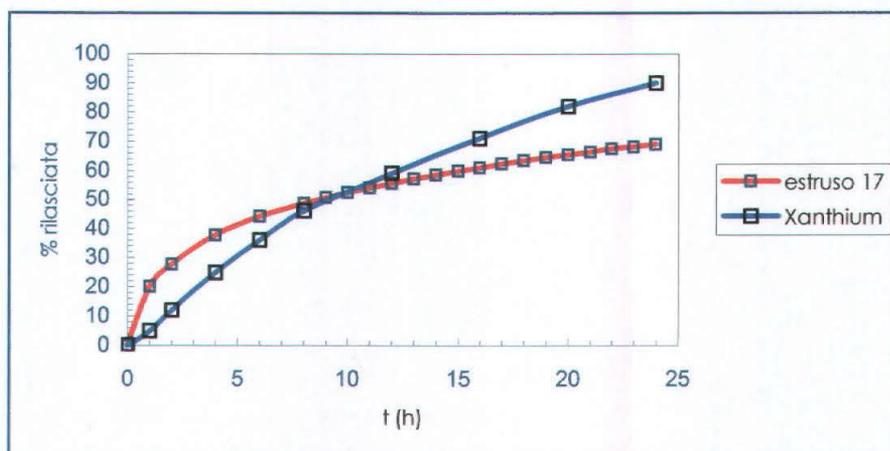


Figura 38. Profili dissolutivi *in vitro* per la specialità *Xanthium*<sup>®</sup>300 e per l'estruso 17.

Tale formulazione è stata scelta perché soddisfa i requisiti di una forma farmaceutica ad azione protratta quali:

- a) liberare gradualmente e continuamente il principio attivo contenuto;
- b) garantire per un lungo periodo di tempo una risposta efficace senza forti oscillazioni;
- c) ridurre al minimo il rischio che la risposta, sia pure in via transitoria, raggiunga valori molto elevati e potenzialmente pericolosi (Henrist D. et al., 1999).

L'estruso 17 si è così rivelato il più vicino, come  $t_{50\%}$ , al farmaco commerciale di confronto e conseguentemente è stato selezionato per le prove *in vivo*. Le differenze tra i

due profili dissolutivi (figura 38) sono facilmente comprensibili se si tiene conto dei diversi processi produttivi utilizzati nella preparazione dell'estruso e del prodotto commerciale.

Infatti, nel caso dello *Xanthium*<sup>®</sup>300 si tratta di microgranuli di lattosio su cui è depositata la teofillina, poi sottoposti ad un rivestimento filmogeno che ne determina una lenta e progressiva liberazione del farmaco (figura 39a).

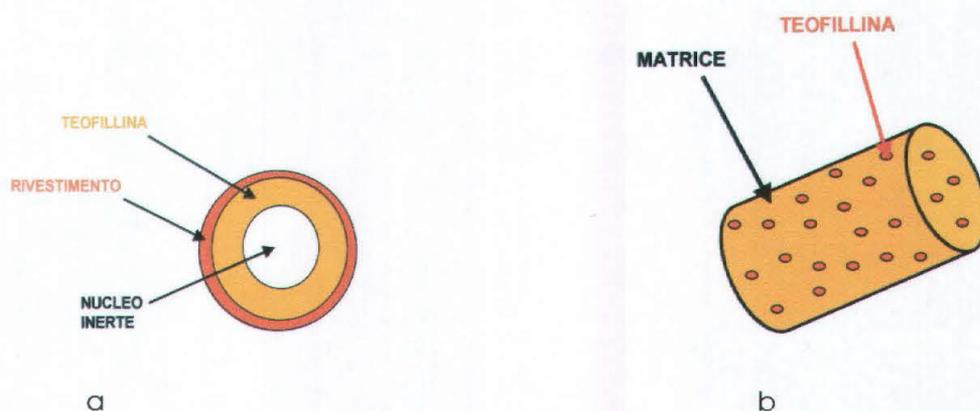


Figura 39. Struttura del sistema: a) commerciale, b) dell'estruso.

Nell'estruso, invece, il principio attivo è incorporato e trattenuto in una matrice polimerica inerte che forma un vasto intreccio di canalicoli (figura 39b); dove al penetrare dei liquidi digestivi, in tali canali, il farmaco viene progressivamente disciolto e liberato dalla matrice. A questo punto si è potuto procedere alla somministrazione orale di una dose singola di estruso 17, corrispondente a 320 mg di principio attivo, a tre soggetti volontari sani (figura 40).

Il profilo ematico così ottenuto (figura 40), rivela che le concentrazioni plasmatiche, dopo 4 ore dalla somministrazione, non subiscono grandi oscillazioni e si avvicinano, come andamento, alla risposta di una forma farmaceutica orale ad azione protratta ideale. Visto il numero ridotto di campioni preso in esame, un'analisi statistica non può essere elaborata.

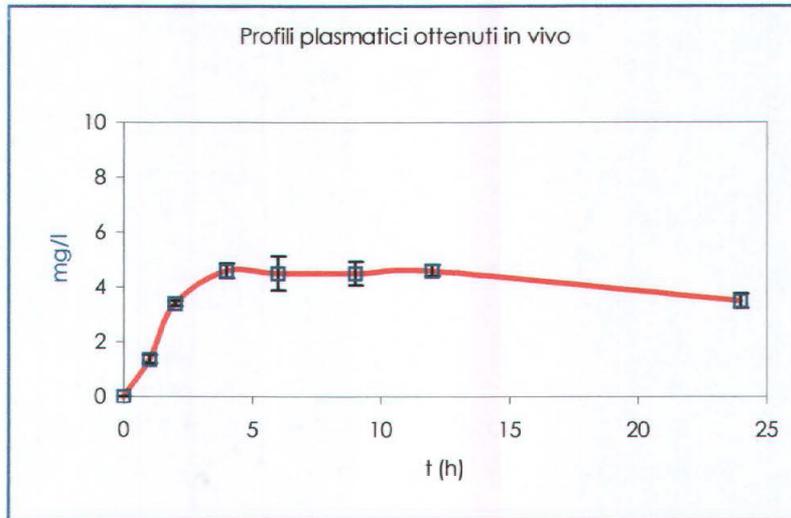


Figura 40. Livelli plasmatici di teofillina in tre soggetti dopo somministrazione di una dose orale di 320mg.

Tuttavia la formulazione presa in esame, e testata in vivo, può portare a una utilizzazione più economica e razionale del farmaco, sia per la minor dose totale somministrata sia per il migliore controllo dei tassi ematici che restano, o per lo meno dovrebbero restare, entro l'intervallo terapeutico.

## CAPITOLO 3

### SISTEMI AUTOEMULSIONANTI SOLIDI

### 3.1. SISTEMI AUTOEMULSIONANTI SOLIDI E GRANULAZIONE AD UMIDO

Farmaci poco solubili in acqua, se somministrati in formulazioni solide tradizionali, generalmente presentano una scarsa biodisponibilità orale, in quanto l'assorbimento può essere cinematicamente limitato dalla loro bassa solubilità. Per cercare di migliorare la biodisponibilità bisogna prima di tutto evitare, almeno parzialmente, il lento processo di dissoluzione dei farmaci idrofobici (Pouton C. W., 2000) a tale scopo sono state applicate diverse strategie quali la formulazione di dispersioni solide, la complessazione con polimeri e più recentemente le formulazioni lipidiche.

Le formulazioni lipidiche per la somministrazione orale di farmaci sono generalmente costituite da un principio attivo disciolto in una miscela di uno o più eccipienti, i quali possono essere trigliceridi, gliceridi parziali, tensioattivi o co-tensioattivi. I sistemi lipidici hanno il vantaggio di essere versatili in quanto possono presentarsi sotto forma di soluzioni, sospensioni, emulsioni, sistemi auto-emulsionanti e microemulsioni (Humberstone A.J. e Charman W. N., 1997). Per un loro ottimale assorbimento questi sistemi sfruttano il metabolismo lipidico e la via linfatica ed in particolare i processi di digestione lipidica che si verificano all'interno dell'intestino interessano non solo i grassi introdotti con la dieta ma anche quelli utilizzati come carriers per farmaci lipofili.

La digestione dei lipidi è il risultato di tre processi sequenziali che comprendono:

- dispersione dei globuli di grasso in una emulsione grossolana, di elevata area superficiale;
- idrolisi enzimatica dei trigliceridi all'interfaccia olio/acqua;
- dispersione dei prodotti di digestione lipidica in una forma assorbibile

(Humberstone A.J. e Charman W. N., 1997).

La digestione lipidica inizia ad opera delle lipasi linguali e gastriche, secrete rispettivamente dalle ghiandole salivari e dalla mucosa gastrica. Questi enzimi provvedono all'idrolisi di una limitata quantità di trigliceridi, portando alla formazione del corrispondente digliceride e dell'acido grasso all'interno dello stomaco. Il passaggio di

questi prodotti nel duodeno promuove la formazione di un'emulsione grezza. In questo sito, la presenza di lipidi stimola la secrezione di sali biliari, lipidi biliari e succhi pancreatici, che possono alterare marcatamente la forma chimica e fisica dell'emulsione di di- e trigliceridi. I lipidi biliari ed i chilomicroni secreti si legano alla superficie dei di- e trigliceridi emulsionati, incrementando la stabilità e riducendo le dimensioni delle gocce di emulsione. La digestione viene completata dall'azione della lipasi pancreatica, un enzima interfacciale in grado di agire sulla superficie delle gocce di trigliceridi emulsionate, per produrre il corrispondente due-monogliceride e due acidi grassi. Dato che né i lipidi non digeriti né i loro prodotti di scissione, prevalentemente acidi grassi liberi, sono idrosolubili, l'attività solvente dei sali biliari risulta essenziale. Questi ultimi infatti sono in grado di sostenere l'emulsione dei grassi, un processo importante dato che la superficie relativamente elevata delle goccioline di emulsione favorisce la lipolisi ed inoltre rappresentano il presupposto della formazione di micelle a partire dai prodotti della lipolisi. Più precisamente i prodotti di digestione producono una struttura liquida cristallina, che in presenza di una quantità sufficiente di sali biliari forma strutture micellari unilamellari e multilamellari. I sali biliari e le terminazioni polari dei monogliceridi, dei fosfolipidi e del colesterolo si orientano all'esterno verso la fase acquosa, mentre i lipidi apolari, le vitamine liposolubili e gli esteri del colesterolo costituiscono il nucleo delle micelle (figura 41). Con un diametro inferiore a 50 nm le micelle sono in grado di passare fra i microvilli dell'orletto a spazzola del duodeno e dell'ileo, per poi posizionarsi in prossimità della membrana luminale. Il pH acido presente in prossimità della superficie dell'enterocita, a livello della parete intestinale, provoca la dissociazione delle micelle ed il rilascio dei monomeri lipidici, che si trovano in una fase intermicellare facilmente assorbibile (O'Driscoll C. M., 2002). I sali biliari non vengono introdotti nella cellula, ma vengono liberati nel lume, dove saranno nuovamente disponibili per la formazione di nuove micelle, oppure saranno assorbiti in corrispondenza dell'ileo terminale (Klinke R. e Silbernagl S., 1999). La via linfatica intestinale ha un ruolo fondamentale nell'assorbimento di sostanze lipidiche (es. acidi grassi a lunga catena, vitamine liposolubili) e quindi può risultare importante anche per farmaci lipofili.

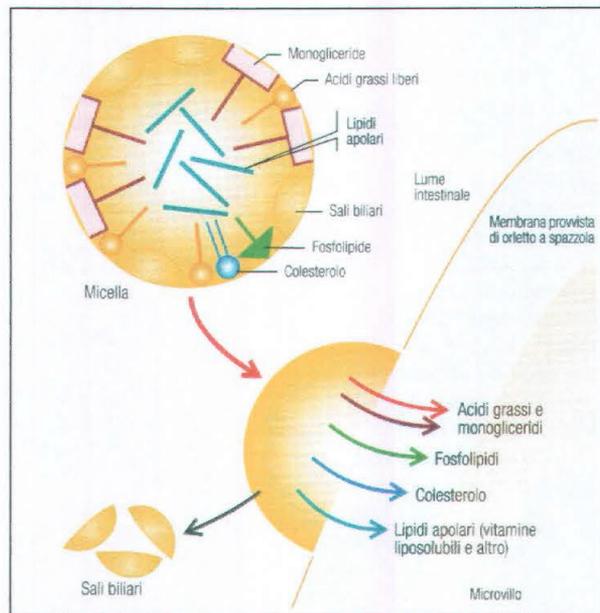


Figura 41. Assorbimento dei grassi dalle micelle.

Infatti, mentre principi attivi idrofili, somministrati oralmente, hanno accesso alla circolazione sistemica tramite la via portale, quelli altamente lipofili possono giungere direttamente alla circolazione utilizzando la via linfatica (Humberstone A.J. e Charman W.N., 1997). Il vantaggio dell'assorbimento del farmaco attraverso il sistema linfatico intestinale è quello di poter *bypassare* il meccanismo di *first pass* epatico. Tuttavia, ciò che limita maggiormente questa via è il fatto che il flusso attraverso i vasi linfatici, rispetto a quelli sanguigni, è molto più basso. L'assorbimento da parte del sistema linfatico, di alcune sostanze lipofile, può venir aumentato dall'interazione con carriers, quali per esempio i sali biliari. Le vie di accesso per raggiungere il sistema linfatico intestinale sono tre:

- *via paracellulare* (la struttura porosa dei capillari linfatici rende possibile il passaggio di macromolecole idrofiliche e coniugati macromolecolari);
- *passaggio attraverso il tessuto linfoepiteliale* (GALT);
- *via transcellulare* (utilizza sistemi di trasporto lipidici).

La via transcellulare è la più importante per l'assorbimento linfatico di composti di natura lipofila ed il grado di assorbimento attraverso questa via è influenzato dal tipo di trasportatore lipidico utilizzato (figura 42).

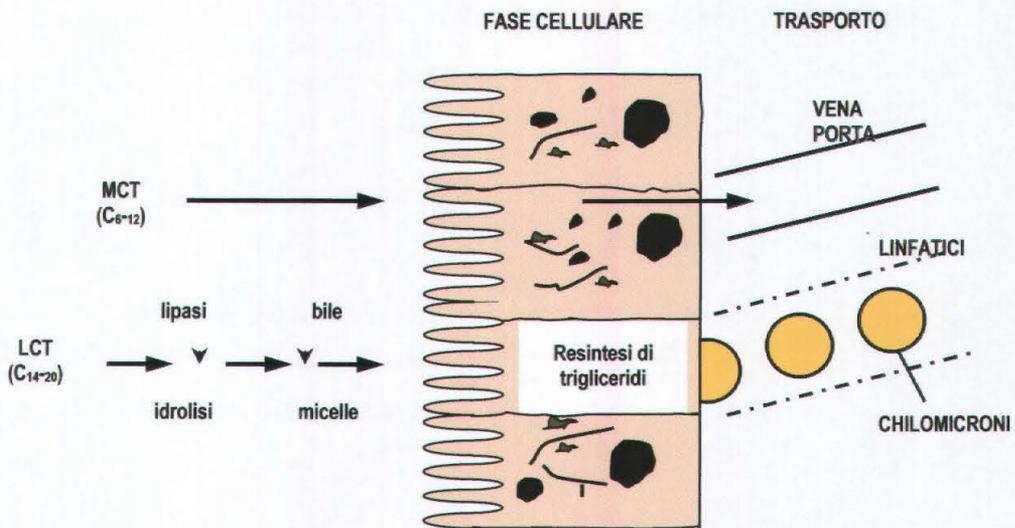


Figura 42. Raffronto delle fasi coinvolte nell'assorbimento di trigliceridi a media (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>) (MCT) e lunga catena (C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub>) (LCT).

I trigliceridi a media catena possono essere assorbiti direttamente, mentre quelli a catena lunga prevedono un passaggio attraverso stadi intermedi, fino ad essere inglobati nelle micelle; solo a questo punto entrano nella circolazione linfatica. Le ipotesi di penetrazione dei lipidi micellari nelle cellule della mucosa, per il raggiungimento della circolazione linfatica, sono due: l'intera micella può essere assorbita, con il ritorno al lume dei sali biliari; alternativamente, solo i lipidi possono essere assorbiti ed i sali biliari trattenuti nel lume (figura 43) (Florence A.T. e Attwood D., 2002). Recentemente è stato proposto un sistema di classificazione, per le formulazioni lipidiche, basato sia sulle dimensioni delle particelle disperse che sulle caratteristiche chimico-fisiche dei componenti presenti nella formulazione (tabella 10 e figura 44); queste ultime vengono classificate in tipo I, II, IIIA e IIIB. Sono classificate come "formulazioni lipidiche di tipo I", quelle costituite dal farmaco solubilizzato in trigliceridi e/o miscele di gliceridi. Questi sistemi semplici vengono utilizzati come carriers per i farmaci lipofili ed i lipidi sono generalmente rappresentati da oli

vegetali o trigliceridi a media catena, come le esempio frazioni dell'olio di cocco, girasole e semi di soia (tabella 11).

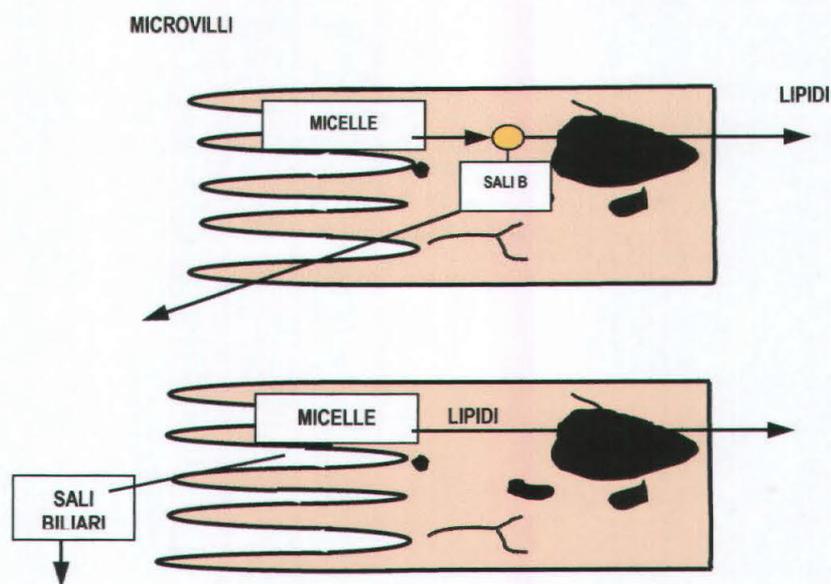


Figura 43. Ipotesi di penetrazione di lipidi micellari nelle cellule della mucosa.

Tabella 10. Classificazione delle formulazioni lipidiche.

Componenti (%)	Incremento del contenuto idrofilico →			Tipo III B
	Tipo I	Tipo II	Tipo III A	
Trigliceridi o gliceridi miscelati	100	40-80	40-80	<20
Tensioattivi	-	20-60 (HLB<12)	20-40 (HLB>12)	20-50 (HLB>11)
Co-solventi idrofilici	-	-	0-40	20-50
Dimensioni delle particelle disperse (nm)	Grossolane	100-250	100-250	50-100

La biodisponibilità dei principi attivi somministrati in questo tipo di soluzioni oleose è generalmente buona perché, come visto in precedenza, i trigliceridi sono rapidamente degradati ad acidi grassi liberi e due-monogliceridi, che vengono facilmente solubilizzati per formare dispersioni colloidali all'interno di micelle costituite da sali biliari e lecitina. In questo modo le micelle possono costituire un sistema reservoir per il farmaco solubilizzato.

Tuttavia la bassa capacità solvente dei trigliceridi spesso ostacola la formulazione di queste soluzioni, che rimangono scelta valida solo per farmaci attivi a basso dosaggio

di conseguenza ad eccezione di un ampio utilizzo nella somministrazione delle vitamine liposolubili A e D, pochi farmaci sono stati formulati con questo tipo di sistemi.

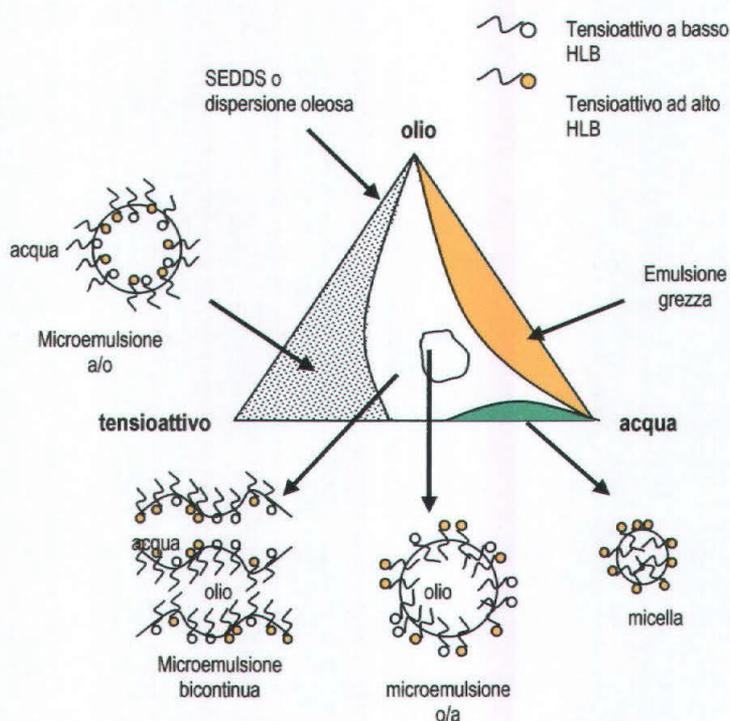


Figura 44. Ipotesico diagramma ternario di fase di un sistema olio/acqua/tensioattivo.

Un incremento della capacità solvente dei trigliceridi può essere ottenuto aggiungendo altri eccipienti lipofili che comprendono miscele di mono- e digliceridi con struttura simile ai prodotti naturali di degradazione dei trigliceridi aumentando notevolmente la frazione di 1-monogliceride presente nell'intestino (Humberstone A.J. e Charman W.N., 1997). Quando invece, il grado di dispersione aumenta sensibilmente e sono presenti inoltre anche tensioattivi, la formulazione lipidica viene classificata come di *tipo II* o di *tipo III*.

L'inserimento nelle formulazioni lipidiche di un tensioattivo è legato alla sua natura anfifila, espressa in termini di equilibrio fra porzioni idrofobiche ed idrofiliche presenti nella molecola, la quale conferisce le seguenti proprietà alle formulazioni lipidiche:

- capacità di concentrarsi e venire adsorbiti all'interfaccia;

- formare delle micelle diminuendo la tensione superficiale;
- modificare le proprietà delle membrane biologiche.

Tabella 11. Potenziali carriers per formulazioni lipidiche orali (Bottle W, 2000).

Tipo di carrier	Prodotto
Acidi grassi	Oleico, caprilico, caprico, eicosapentaenoico, gamma linolenico
Gliceridi idrogenati	Gliceridi idrogenati del cocco
Macrogliceridi	Lauroil macrogliceride Stearoil macrogliceride Caprilocaproil macrogliceride
Mono-di-trigliceridi	Digliceril caprilato, gliceril caprilato, gliceril monodicaprilato, gliceril monocaprilato, gliceril monolaurato, trigliceridi dell'acido miristico, trigliceridi a media catena in generale.
Oli, trigliceride	Caprico/caprilico trigliceride
Oli vegetali	Semi di soia, girasole, cocco
Poliglicerol esteri di acidi grassi	Poligliceril oleato (acidi grassi misti)
Esteri propilenglicolici di acidi grassi	Propilenglicole dicaprilato/caprato
Miscele varie	

Incorporate in determinate formulazioni, le molecole di tensioattivo sono in grado di modificare la disaggregazione e la dissoluzione di forme di dosaggio solide, nonché di controllare la velocità di precipitazione di farmaci somministrati in forma di soluzione.

In particolare il rilascio di un principio attivo poco solubile, da compresse o capsule, può essere aumentato grazie alla capacità dei tensioattivi di diminuire l'aggregazione tra le particelle ed aumentare l'area superficiale disponibile per il processo di dissoluzione. Inoltre, tali agenti, riducendo la tensione superficiale, esercitano già a basse concentrazioni un effetto bagnante, favorendo così la penetrazione dell'acqua all'interno della forma farmaceutica, in modo da consentire una rapida disaggregazione. Questi effetti risultano importanti soprattutto quando il processo di assorbimento del farmaco è limitato dalla sua bassa velocità di dissoluzione. La solubilizzazione micellare è dovuta alla proprietà dei tensioattivi di formare degli aggregati colloidali (5-30  $\mu\text{m}$ ) noti come micelle, quando l'interfaccia è già completamente occupata. La concentrazione alla quale si verifica questo fenomeno viene detta concentrazione micellare critica (CMC). In presenza di queste condizioni i composti

apolari si sciolgono all'interno delle micelle, mentre quelli polari vengono adsorbiti sulla superficie (Florence A.T. e Attwood D., 2002). A livello delle membrane biologiche, la presenza del tensioattivo determina una variazione dell'integrità, la quale ha come conseguenza diretta un aumento della permeabilità (figura 45).

La causa principale della perturbazione di membrana ad opera dei tensioattivi risiede nella probabile solubilizzazione e successiva precipitazione dei fosfolipidi. Una consistente variazione della permeabilità incide notevolmente sull'assorbimento, nonché sull'attività farmacologica della formulazione lipidica. In campo farmaceutico sono da preferire i tensioattivi non-ionici o zwitterionici, perché considerati meno tossici e meno sensibili ai cambiamenti di pH e forza ionica.

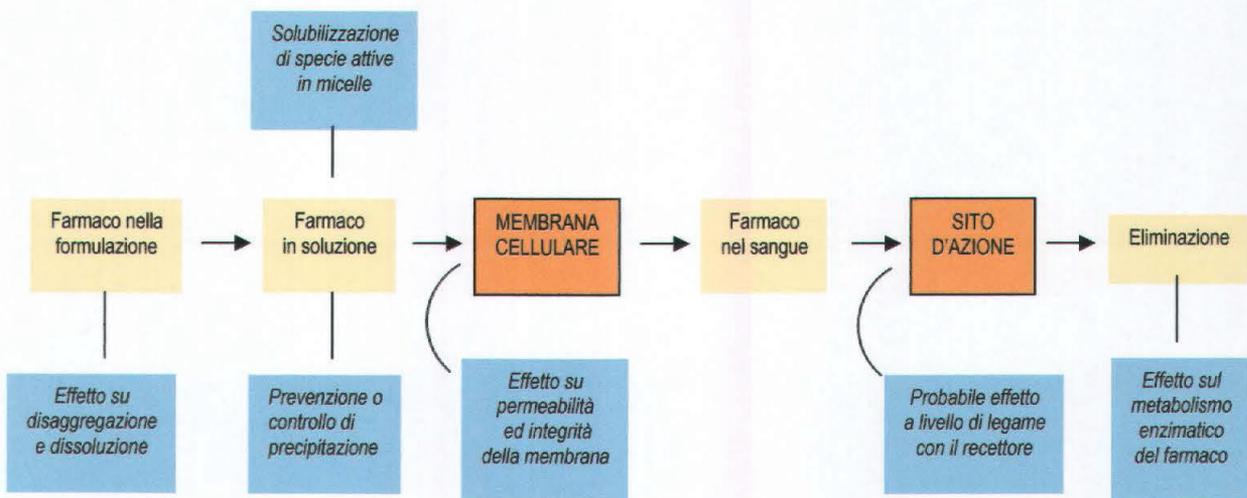


Figura 45. Possibili siti d'azione dei tensioattivi.

La scelta di un tensioattivo per uso farmaceutico implica una considerazione della tossicità della sostanza, che deve essere ingerita in grande quantità. I tensioattivi non ionici più comunemente utilizzati per la formulazione di forme farmaceutiche solide sono gli esteri del sorbitano ed i polisorbati. Gli esteri del sorbitano sono miscele di esteri parziali del sorbitolo e sue mono-dianidridi con l'acido oleico. Essi sono generalmente insolubili in acqua e vengono usati come emulsionanti acqua in olio e agenti bagnanti (tabella 12). I polisorbati, invece, sono miscele complesse di esteri parziali del sorbitolo e sue mono-

dianidridi condensate con un numero approssimato di moli di ossido di etilene. I polisorbati sono miscibili con acqua a causa dei loro alti valori di HLB e vengono usati come emulsionanti per le emulsioni olio in acqua (Florence A.T. e Attwood D., 2002) (tabella 13).

Tabella 12. HLB di esteri del sorbitano.

Nome chimico	Nome commerciale	HLB
Monolaurato del sorbitano	Span 20	8,6
Monopalmitato del sorbitano	Span 40	6,7
Monostearato del sorbitano	Span 60	4,7
Tristearato del sorbitano	Span 65	2,1
Monooleato del sorbitano	Span 80	4,3
Trioleato del sorbitano	Span 85	1,8

Le "formulazioni lipidiche di tipo II" sono costituite da una miscela di trigliceridi a media catena e/o mono- o digliceridi con tensioattivi con valore HLB generalmente inferiore a 12; generano una efficiente dispersione iniziale della fase oleosa di diametro compreso tra 100 e 250 nm.

Tabella 13. HLB e concentrazione micellare critica (CMC) dei polisorbati.

Nome chimico	Nome commerciale	HLB	CMC (g dm <sup>-3</sup> )
Monolaurato del sorbitano poliossietilenato (20)	Polisorbato (Tween) 20	16,7	0,060
Monopalmitato del sorbitano poliossietilenato (20)	Polisorbato (Tween) 40	15,6	0,031
Monostearato del sorbitano poliossietilenato (20)	Polisorbato (Tween) 60	14,9	0,028
Tristearato del sorbitano poliossietilenato (20)	Polisorbato (Tween) 65	10,5	0,050
Monooleato del sorbitano poliossietilenato (20)	Polisorbato (Tween) 80	15,0	0,014
Trioleato del sorbitano poliossietilenato (20)	Polisorbato (Tween) 85	11,0	0,023

Questa classe fa riferimento soprattutto a sistemi auto-emulsionanti per farmaci (SEDDS), in grado di emulsionarsi in soluzione acquosa in condizioni di blanda agitazione.

Questo fa sì che essi siano dei buoni candidati per il trasporto di farmaci idrofobici con adeguata solubilità in olio (Costantinides P.P., 1995). Al contrario delle emulsioni normali, le emulsioni derivanti dall'esposizione dei SEDDS nella fase acquosa si formano spontaneamente perché sono termodinamicamente stabili grazie ad un ridotto volume della fase oleosa dispersa ed uno stretto range di distribuzione delle dimensioni delle goccioline. Infatti, in seguito ad una somministrazione orale, i sistemi auto-emulsionanti si disperdono nello stomaco dove formano un'emulsione fine; in questo caso la motilità dello stomaco e dell'intestino può provvedere all'agitazione necessaria per la loro auto-emulsione. L'impiego dei sistemi auto-emulsionanti dipende da due principali fattori in grado di controllare la velocità di rilascio del principio attivo dall'olio nella fase acquosa:

- l'abilità della miscela auto-emulsionante di formare emulsioni fini (dimensioni < di 5  $\mu\text{m}$ ) con distribuzione uniforme delle dimensioni;
- la polarità delle goccioline di olio risultanti che promuovono un rilascio rapido del farmaco nella fase acquosa.

La polarità delle goccioline dipende dall'HLB, dalla lunghezza della catena e dal grado di insaturazione dell'acido grasso coinvolto, dal peso molecolare della porzione idrofilica e dalla concentrazione dell'emulsionante (Shah N.H. et al., 1994).

Le formulazioni lipidiche di tipo III si suddividono a loro volta in IIIA e IIIB. Le "formulazioni lipidiche di tipo IIIA" si differenziano da quelle di tipo II per l'aggiunta di co-solventi o co-tensioattivi idrofilici, i quali hanno lo scopo di aumentare la solubilità del principio attivo nella formulazione, ma mantengono lo stesso grado di dispersione (100-250 nm). Le "formulazioni lipidiche di tipo IIIB" presentano, invece, caratteristiche idrofiliche più accentuate (percentuale di co-solventi idrofilici più elevata) e sono costituite quasi esclusivamente da gliceridi semplici; questo comporta la formazione di una microemulsione nel tratto gastrointestinale del diametro di circa 50 nm (tabella 1). Questi sistemi sono meglio conosciuti come sistemi auto-microemulsionanti (SMEDDS) (Pouton C.W., 2000).

## 3.2 PARTE SPERIMENTALE

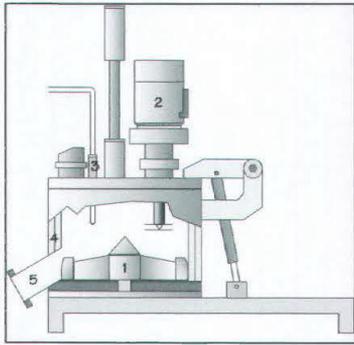
### 3.2.1. Materiali

Le materie prime impiegate nella preparazione dei sistemi auto-emulsionanti solidi sono: Lattosio monoidrato, GranuLac 200® (Meggle, Wasserburg Germany), Cellulosa microcristallina, Microcel 101® (Blanver Farmoquimica, Itapevi, SP, Brazil), Miscela di gliceril mono- e di oleato, Cithrol GMO (S)® (Croda, Singapore), Polisorbato 80, Montanox 80 VG PHA® (Seppic, Castres, France), Nimesulide (Eurand International, Trieste, Italia).

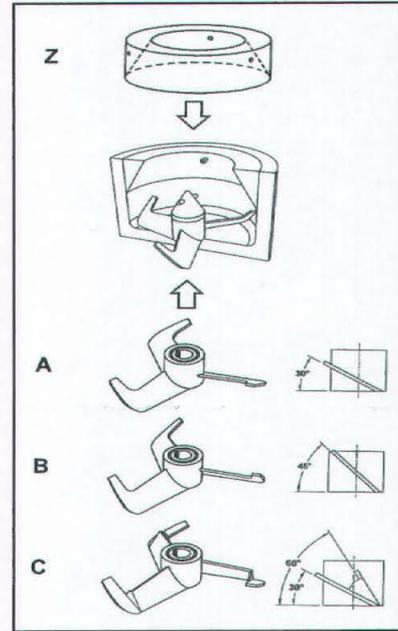
### 3.2.2. Apparecchiature

Per la preparazione dei granulati è stato utilizzato un granulatore rapido ad asse verticale da 10 litri, il *Roto Junior* ("Zanchetta & C.", S. Salvatore, Lucca, figura 47).

Rispettando geometrie e caratteristiche dei modelli maggiori, il Roto-J si distingue per il minimo volume del cestello (10 litri), caratteristica questa che lo rende particolarmente adatto all'uso in laboratorio di ricerca e sviluppo. Con questo tipo di apparecchiatura è possibile eseguire le numerose prove necessarie per la messa a punto di una formulazione o di un processo, utilizzando quantità relativamente modeste di prodotti. Sul fondo del cestello cilindrico è installato l'impeller composto da tre pale opportunamente sagomate ed inclinate, per impartire al prodotto una corretta movimentazione (figura 47). Il granulatore è equipaggiato da tre tipi differenti di impeller, i quali si differenziano tra di loro per la diversa inclinazione, geometria e area superficiale delle pale. Gli impeller A e B sono piani, hanno un'area delle lame rispettivamente di 189 e 187 cm<sup>2</sup> ed una inclinazione di 30 e 45°. L'impeller C invece, ha un'area delle pale di 176 cm<sup>2</sup> ed una geometria differente, in particolare è costituito da parte piana inclinata di 60° ed una parte terminale inclinata di 30°.



a.



b.

Figura 47 a. 1-impeller; 2-chopper; 3-sonda verticale per la misura della temperatura; 4-camicia; 5-valvola di scarico del prodotto; Alloggiamento dell'impeller nel cestello; b. deflettore (Z); impeller A (30°); impeller B (45°); impeller C (60°).

La parete del cestello è incamiciata e vi si può far scorrere acqua di raffreddamento, oppure acqua calda fornita da una caldaia installata nel corpo della macchina. E' possibile installare tramite un ancoraggio a vite, nella parte superiore del cestello, un deflettore di materiale plastico che è in grado di modificare sia il movimento delle polveri all'interno della camera, come pure ridurre il volume della camera a 8,4 litri. Il cestello viene chiuso superiormente da un coperchio piano, scorrevole verticalmente ed orizzontalmente su un'asse guida, provvisto dei seguenti accessori:

- un atomizzatore senza aria (air-less), per la nebulizzazione del fluido legante, collegato mediante un tubo flessibile ad un serbatoio esterno provvisto di attacco per il fluido di spinta;
- un frantumatore o chopper, provvisto di tre lame disposte perpendicolarmente fra di loro, ed accoppiato ad un motore elettrico a velocità fissa;

- un tubo per lo sfiato dell'aria di flussaggio, e l'attacco per il vuoto munito di vacuometro ad ago;
- una sonda verticale per la misurazione della temperatura del prodotto in lavorazione.

Per il passaggio di scala è stato impiegato il modello Roto-P 50 (figura 48), in quanto la sua geometria e le sue proprietà sono analoghe a quelle dei modelli di dimensioni maggiori; inoltre esso permette di avere un'ulteriore verifica della fattibilità del processo di granulazione.



Figura 48. Granulatore Roto-P 50.

L'apparecchiatura è composta da un cestello cilindrico di 50 litri, completamente incamiciato e isolato termicamente, che può venir fatto oscillare intorno ad un asse orizzontale, alla base del quale è sistemato l'impeller dalla caratteristica geometria ad elica. La forma interna del recipiente è arrotondata sul fondo per migliorare il movimento della massa umida in lavorazione e impedirne la deposizione sulle pareti.

### 3.2.3. Preparazione dei granulati

Sulla base dei risultati ottenuti effettuando alcune prove preliminari con i diversi impeller e diverse velocità di rotazione, si è scelto di condurre i successivi esperimenti nel granulatore Roto J, impiegando un carico totale di polveri secche di 500g, l'impeller C

(60°) ed una velocità di rotazione nella fase d'impasto, di 250 rpm. Le fasi operative per la preparazione dei granulati sono comuni a tutte le prove, e possono essere così riassunte:

#### *1) Miscelazione*

Le polveri, costituite da Lattosio e Cellulosa microcristallina, nelle proporzioni riportate nel piano sperimentale (tabella 9) vengono miscelate in granulatore Roto-J, per 10 minuti ad una velocità dell'impeller di 100 rpm.

#### *2) Preparazione dell'emulsione*

Cithrol®, Montanox® ed acqua vengono miscelati, sempre secondo le proporzioni riportate in tabella 9, con l'aiuto di un agitatore magnetico, fino alla formazione di un'emulsione omogenea olio in acqua.

#### *3) Bagnatura*

L'emulsione viene spruzzata sulle polveri utilizzando un ugello di 0.3 mm di diametro, ad una velocità media di 87ml/min. Durante questa fase la velocità dell'impeller viene mantenuta costante rispetto alla fase di miscelazione.

#### *4) Impasto*

Durante questa fase la velocità dell'impeller viene aumentata a valori di 250 rpm, per una durata di 10 minuti.

#### *5) Essiccamento*

A granulazione ultimata, i granulati vengono prelevati dalla camera di granulazione e disposti in stufa, in uno strato sottile a 40°C, fino a raggiungimento di peso costante.

#### *6) Conservazione*

I granulati vengono depositi in sacchetti di polietilene ben chiusi e lasciati stagionare per 14 giorni, prima di venire caratterizzati.

Le fasi operative del processo di granulazione ad umido nel Roto-P 50 sono identiche a quelle effettuate nel Roto-J, ad eccezione del carico totale di polveri, che in ciascuna prova è stato di 7.5 Kg, della velocità di flusso del liquido granulante durante la

fase di bagnatura, che è stata posta uguale a 878.5 ml/min per mantenere inalterate le condizioni di bagnatura rispetto al modello da laboratorio. È stata inoltre modificata la velocità dell'impeller in modo da avere uguale velocità periferica della massa in movimento in entrambi i modelli. La velocità periferica è stata assunta infatti come parametro di riferimento per lo scale up dal Roto-J al Roto-P 50 (Voinovich D. et al., 1993). La velocità periferica della massa movimentata ( $V_p$ , espressa in m/s) e la velocità di rotazione dell'agitatore principale ( $V_r$ , espressa in rpm) sono direttamente correlate dalla seguente equazione:

$$V_p = \frac{V_r D \pi}{60} \quad (\text{eq. 20})$$

dove D è il diametro interno del cestello (in m).

### 3.2.4. Progettazione delle prove sperimentali

Per valutare la fattibilità del processo di granulazione a umido per la produzione di sistemi auto-emulsionanti solidi, sono state effettuate inizialmente alcune prove preliminari con il granulatore Roto-J. Le informazioni ottenute hanno permesso di estrapolare le limitazioni quantitative per i cinque componenti della miscela (tabella 14), le quali in parte dipendono dalla modalità di aggiunta della fase liquida.

Tabella 14. Limitazioni superiori ed inferiori selezionate per i cinque componenti presi in esame.

Componenti	Limitazioni inferiori	Limitazioni superiori
Lattosio (X1)	16%	24%
Microcel® (X2)	27%	37%
Acqua (X3)	37.5%	42.5%
Montanox® (X4)	2%	8%
Cithrol® (X5)	1%	5%

Questa, infatti, viene aggiunta mediante un nebulizzatore il cui flusso è notevolmente influenzato dalla viscosità dell'emulsione utilizzata come legante. Una

buona nebulizzazione riduce la formazione di grumi, garantisce una crescita di granuli più controllata ed una maggiore riproducibilità del processo. In questo caso il dominio sperimentale è rappresentato solo da una piccola porzione irregolare, individuata dai limiti di concentrazione imposti ai cinque componenti (figura 49). Per risolvere il problema della descrizione del fenomeno all'interno di tale dominio, è stata adottata una strategia sperimentale che permetta la scelta di un ridotto numero di esperimenti senza compromettere la qualità dell'informazione ottenuta dalla sperimentazione stessa.

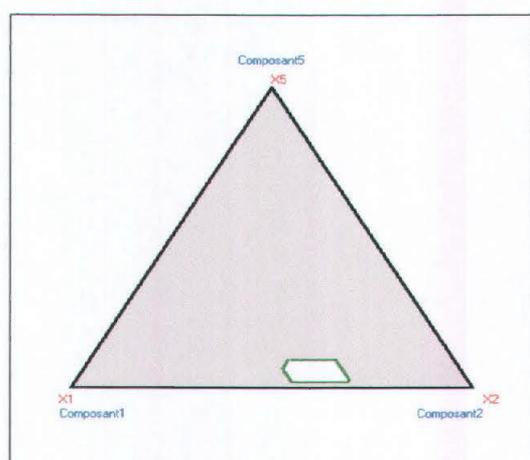


Figura 49. Dominio sperimentale risultante dalle limitazioni riportate in tabella 7 dove  $X_3$  (acqua) = 0.3750 e  $X_4$  (montanox®) = 0.0800.

In queste condizioni è possibile progettare le prove sperimentali utilizzando due diverse strategie:

- nella prima strategia come punti candidati vengono scelti quelli più rappresentativi del dominio sperimentale: tali punti corrispondono ai vertici, ai punti medi degli spigoli, ai punti centrali delle facce e al baricentro del dominio, per un totale nel nostro caso di 161 punti sperimentali (Lewis G.A. et al., 1999);
- la seconda strategia provvede alla trasformazione del dominio sperimentale delle variabili dipendenti ( $q=5$ ) in un dominio di variabili indipendenti ( $q=4$ ) al fine di ottenere una marcata riduzione delle prove sperimentali (Cornell J.A., 1981).

In questo lavoro si è scelto di utilizzare la seconda strategia ed in particolare le prove sperimentali sono state progettate con una matrice ibrida costituita da punti sperimentali

appartenenti ad un design fattoriale, a stella, assiale e uno o più punti al centro della zona di studio. A causa della sua particolare struttura questo tipo di design presenta alcuni svantaggi, in particolare: la convalida del modello deve essere fatta mediante l'aggiunta di punti test ed inoltre, poiché molte esperienze sono localizzate sulla superficie della sfera che identifica il dominio sperimentale, questa matrice non è adatta ad un approccio di tipo sequenziale Lewis G.A. et al., 1999). La matrice ibrida espressa in termini di variabili indipendenti è riportata in tabella 15.

Tabella 15. Matrice ibrida per quattro variabili indipendenti.

Esp.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>
1	-0.354	-0.612	0.612	0.354
2	-0.354	0.612	-0.612	0.354
3	0.354	-0.612	-0.612	0.354
4	0.354	0.612	0.612	0.354
5	-0.75	-0.433	-0.433	0.250
6	-0.75	0.433	0.433	0.250
7	0.75	-0.433	0.433	0.250
8	0.75	0.433	-0.433	0.250
9	-0.707	0	0	-0.707
10	0.707	0	0	-0.707
11	0	-0.866	0	-0.5
12	0	0.866	0	-0.5
13	0	0	-0.866	-0.5
14	0	0	0.866	-0.5
15	0	0	0	1
16	0	0	0	0

	Punti sperimentali assiali
	Punti sperimentali fattoriali
	Punti sperimentali a stella
	Baricentro

La matrice ibrida (tabella 15) può essere successivamente ritrasformata per ottenere la matrice sperimentale con 16 esperimenti utilizzata per studiare i cinque componenti selezionati (tabella 16). La matrice inoltre comprende cinque prove sperimentali (17, 18, 19, 20, 21) che rappresentano i punti test necessari per la convalida del modello matematico postulato (tabella 16 e figura 50). Data la complessità della progettazione delle prove per questo design in queste particolari condizioni la matrice sperimentale è stata elaborata mediante il programma NEMRODW (Mathieu D. e Phan Than Luu R., 1993).

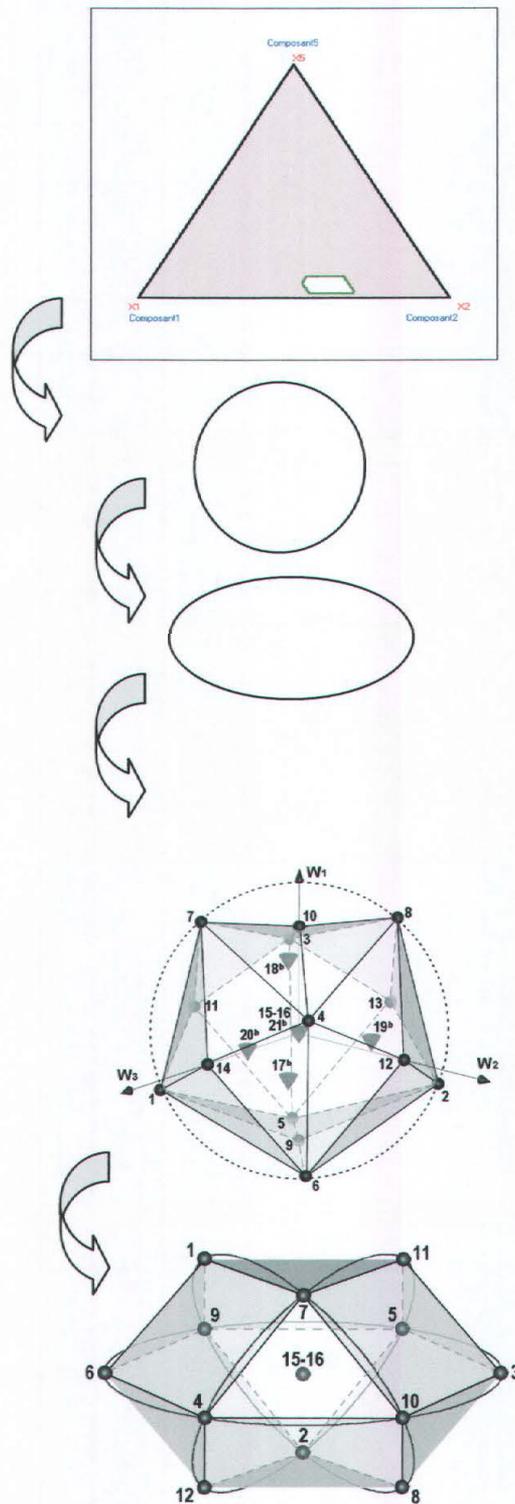


Figura 50. Passaggi di trasformazione da un dominio ellissoidale ad un dominio sferico con i rispettivi disegni sperimentali dove: A) dominio sperimentale per i cinque componenti disegnato fissando il componente X3 al valore 0.3750 e il componente X4 a 0.0800; rappresentazioni grafiche dei punti sperimentali della matrice ibrida espressa in: B) variabili indipendenti con  $W_4=0$ , C) variabili dipendenti (composizioni).

Tabella 16. Coordinate dei punti sperimentali in termini di componenti originali ( $X_i$  dove  $X_1$ = lattosio,  $X_2$ = microcel®,  $X_3$ = acqua,  $X_4$ = montanox®,  $X_5$ = cithrol®) e di pseudocomponenti ( $X'_i$ ).

Esp	COMPONENTI ORIGINALI					PSEUDOCOMPONENTI				
	X1	X2	X3	X4	X5	X'1	X'2	X'3	X'4	X'5
1	0.1945	0.3114	0.3979	0.0469	0.0493	0.2091	0.2509	0.1388	0.1630	0.2382
2	0.2251	0.3158	0.3886	0.0341	0.0363	0.3945	0.2776	0.0824	0.0855	0.1594
3	0.1912	0.3497	0.3886	0.0341	0.0363	0.1891	0.4830	0.0824	0.0855	0.1594
4	0.2152	0.3004	0.4139	0.0341	0.0363	0.3345	0.1842	0.2358	0.0855	0.1594
5	0.1814	0.3343	0.4139	0.0341	0.0363	0.1297	0.3897	0.2358	0.0855	0.1594
6	0.2150	0.3001	0.3847	0.0639	0.0363	0.3333	0.1824	0.0588	0.2661	0.1594
7	0.1812	0.3339	0.3847	0.0639	0.0363	0.1285	0.3873	0.0588	0.2661	0.1594
8	0.2052	0.2847	0.4099	0.0639	0.0363	0.2739	0.0891	0.2115	0.2661	0.1594
9	0.1713	0.3185	0.4099	0.0639	0.0363	0.0685	0.2939	0.2115	0.2661	0.1594
10	0.2288	0.2992	0.4012	0.0518	0.0190	0.4170	0.1770	0.1588	0.1927	0.0545
11	0.1774	0.3506	0.4012	0.0518	0.0190	0.1055	0.4885	0.1588	0.1927	0.0545
12	0.2106	0.3366	0.3821	0.0518	0.0190	0.3067	0.4036	0.0430	0.1927	0.0545
13	0.1957	0.3132	0.4204	0.0518	0.0190	0.2164	0.2618	0.2752	0.1927	0.0545
14	0.2108	0.3369	0.4042	0.0291	0.0190	0.3079	0.4055	0.1770	0.0552	0.0545
15	0.1955	0.3129	0.3982	0.0744	0.0190	0.2152	0.2600	0.1406	0.3297	0.0545
16	0.2000	0.3200	0.4000	0.0500	0.0300	0.2424	0.3030	0.1515	0.1818	0.1212
17	0.2166	0.3143	0.3955	0.0459	0.0276	0.3430	0.2685	0.1242	0.1570	0.1067
18	0.1919	0.3390	0.3955	0.0459	0.0276	0.1933	0.4182	0.1242	0.1570	0.1067
19	0.1980	0.3169	0.4115	0.0459	0.0276	0.2303	0.2842	0.2212	0.1570	0.1067
20	0.1962	0.3140	0.3985	0.0637	0.0276	0.2194	0.2667	0.1424	0.2648	0.1067
21	0.1973	0.3157	0.3989	0.0485	0.0397	0.2261	0.2770	0.1448	0.1727	0.1800

### 3.2.5. Caratterizzazione dei granulati

#### *Analisi granulometrica*

Per l'analisi granulometrica è stata utilizzata una setacciatrice, Endocotts OCTAGON 200 (ditta), provvista di 5 setacci in acciaio inox con maglie di 2000, 1250, 800, 630, 500 e 400  $\mu\text{m}$ , connessa ad una apparecchiatura vibrante ERWEKA AR 400.

#### Procedimento:

300 g di granulato vengono posti nel primo dei setacci della batteria opportunamente fissata i quali vengono fatti vibrare a 7/10 dell'ampiezza massima per 20 minuti. Le frazioni trattenute dai diversi setacci e quella raccolta sul piatto di fondo vengono pesate e successivamente vengono calcolate le percentuali cumulative (p/p) trattenute sui setacci stessi, rispetto alla quantità totale setacciata. I dati relativi alle

percentuali cumulative di ogni singolo campione, sono stati fittati utilizzando l'equazione di Weibull, al fine di ottenere la distribuzione sigmoidale di probabilità per le dimensioni dei granulati e di conseguenza i valori di diametro medio geometrico ponderale, la dispersione, le frazioni moda e le percentuali delle frazioni moda.

### *Studi morfologici*

La forma e superficie degli sferoidi è stata esaminata mediante l'utilizzo del microscopio a scansione elettronica Philips 500 (Eindhoven, Olanda) dopo aver rivestito tramite spruzzo sotto vuoto spinto (Edwards, Milano, Italia) la superficie di tutti i campioni con Au/Pd.

### *Determinazione della densità vera e calcolo della porosità*

La densità vera del granulato è stata determinata con il Multipicnometro della Quantachrome Corporation/Nordest srl (Quantachrome Corporation/ Nordest srl, 1992). La tecnica di misurazione della densità vera con questo strumento utilizza il principio secondo il quale un corpo solido sposta una quantità di fluido pari al suo volume. Il fluido in questo caso è rappresentato da un gas; il più raccomandato è l'elio, poiché le sue ridotte dimensioni atomiche gli permettono di penetrare facilmente attraverso i pori e le fessure del corpo solido in esame. L'elio ha anche il vantaggio di avere un comportamento analogo ai gas ideali, facilitando così la metodica analitica che si basa proprio sulla legge dei gas ideali.

#### Procedimento:

La determinazione delle densità dei campioni, con il Multipicnometro, viene effettuata andando a valutare la differenza di pressione che si verifica quando una quantità di elio, a pressione nota, viene fatta fluire da una cella di riferimento a volume noto, ad una cella contenente una quantità nota di campione solido.

Inizialmente nella cella contenente il campione si trova in condizioni di pressione ambiente e l'equazione dei gas ideali può essere scritta come:

$$p_a (V_c - V_p) = n_a R T_a \quad (\text{eq. 21})$$

dove:

$p_a$  = pressione atmosferica

$V_c$  = volume della cella portacampioni

$V_p$  = volume della polvere

$n_a$  = numero di moli di gas occupanti il volume della cella campione in presenza della polvere

$R$  = costante dei gas perfetti

$T_a$  = temperatura ambiente.

Successivamente viene fatto entrare l'elio nella cella di riferimento, fino a raggiungere una pressione di 17 PSI al di sopra quella atmosferica ed in queste condizioni nella cella di riferimento si avrà:

$$p_1 V_r = n_1 R T_a \quad (\text{eq. 22})$$

dove:

$p_1$  = pressione della cella di riferimento

$V_r$  = volume della cella di riferimento

$n_1$  = numero di moli di gas contenute nel volume  $V_r$ .

Quando la cella di riferimento viene messa in comunicazione con la cella portacampioni, la pressione scenderà ad un valore  $p_2$ , in quanto aumenta il volume totale a disposizione del gas e l'equazione dei gas ideali in queste nuove condizioni diventerà:

$$p_2 (V_c - V_p + V_r) = (n_a + n_1) R T_a \quad (\text{eq. 23})$$

dove:

$(V_c - V_p + V_r)$  = volume occupato dal gas in queste nuove condizioni

$(n_a + n_1)$  = numero di moli totali di gas presenti in questo nuovo volume.

Combinando le equazioni 2, 3 e 4 e riarrangiando otteniamo che:

$$V_c - V_p = \frac{p_1 - p_2}{p_2 - p_a} V_r \quad (\text{eq. 24})$$

Dato che l'azzeramento corrisponde alla pressione atmosferica, l'equazione può essere ulteriormente semplificata, per ottenere:

$$V_p = V_c - V_r \left( \frac{p_1}{p_2} - 1 \right) \quad (\text{eq. 25})$$

dove:

$V_c$  e  $V_r$  sono noti (13.91 cm<sup>3</sup> e 6.33 cm<sup>3</sup> rispettivamente) e i valori di  $p_1$  e  $p_2$  vengono letti dallo strumento. In queste condizioni possiamo calcolarci il *volume vero* del campione ( $V_p$ ), escludendo cioè gli spazi tra le particelle, e dei pori presenti nelle singole particelle (Quantachrome Corporation/ Nordest srl, 1992).

Per ottenere la densità vera, espressa in g/cm<sup>3</sup>, basterà dividere il peso del campione di solido utilizzato per il suo volume:

$$\text{densità vera} = \frac{\text{g di polvere}}{\text{volume vero } (V_p)} \quad (\text{eq. 26})$$

La porosità dei granulati è stata calcolata utilizzando la seguente equazione:

$$\text{porosità (\%)} = \frac{1 - \text{densità del granulato}}{\text{densità delle polveri}} \times 100 \quad (\text{eq. 27})$$

In questa equazione la densità delle polveri, determinata sempre con il picnometro ad elio, viene calcolata a sua volta tenendo conto rispettivamente: della densità vera del lattosio, della cellulosa microcristallina e delle loro rispettive proporzioni presenti nella formulazione (Newton M. et al., 2001).

## Test di disaggregazione

Il saggio di disaggregazione è stato effettuato per andare a verificare se i granulati si disaggregano entro un periodo sufficientemente accettabile, tale da garantire un impiego farmaceutico di facile attuazione. Per quanto concerne le forme farmaceutiche solide non rivestite, il tempo massimo di disaggregazione previsto è di 15 minuti.

La disaggregazione si intende raggiunta quando:

- nessun residuo rimane sulla rete del cestello;
- se c'è un residuo deve essere costituito da una massa molle non palpabile;
- rimangono solo frammenti del rivestimento o solo frammenti sulla rete del cestello (F.U. XI ed., 2002).

Il test di disaggregazione sono stati condotti secondo F.U. XI ed effettuando una modifica dei dischi cilindrici, in particolare applicando una retina con un'apertura delle maglie pari a  $400\ \mu\text{m}$ , in modo tale da poter analizzare tutte le frazioni moda dei nostri composti.

Procedimento:

Si introducono in ciascuno dei sei tubi circa tre granuli e si posiziona il disco al di sopra di essi; quindi si sospende il sistema nel becher contenente acqua a  $37\ ^\circ\text{C}$  (figura 51).

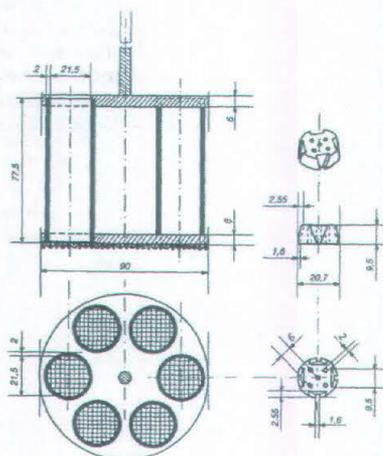


Figura 51. Apparecchio disaggregatore.



La quantità di campione analizzata è stata calcolata in modo da operare al di sotto delle "sink conditions" (20% della solubilità massima, che in questo caso equivalgono a 10 mg in 500 ml) e rientrare nell'assorbanza massima letta dallo strumento. Sono stati fatti dei prelievi in modalità automatica ad intervalli regolari di 10 secondi. Per ogni campione, la prova di dissoluzione è stata ripetuta tre volte, ed è stato assunto come valido il valore medio delle tre determinazioni.

Interferenze nelle misure di assorbimento legate alla presenza di olio e tensioattivo nelle formulazioni sono state escluse effettuando una scansione completa degli spettri di due granulati contenenti nimesulide e le stesse formulazioni senza farmaco (figura 53). Dalla scansione completa degli spettri, si può osservare che la nimesulide presenta un massimo di assorbimento a 396 nm e che i componenti non vanno ad interferire nella misura di questo assorbimento. La determinazione della quantità di nimesulide che passa in soluzione viene effettuata utilizzando l'equazione di Lambert-Beer:

$$C = \frac{A}{\epsilon * s} \quad (\text{eq. 28})$$

Dove:

C = concentrazione (g/cm<sup>3</sup>)

A = assorbanza

$\epsilon$  = coefficiente di estinzione molare (cm<sup>3</sup>/g x cm)

s = cammino ottico (cm)

Il coefficiente di estinzione molare è stato calcolato costruendo una retta di taratura, leggendo cioè l'assorbanza a 396 nm di una serie di soluzioni a concentrazione nota di nimesulide. La pendenza della retta che si ottiene ponendo in grafico l'assorbanza in funzione della concentrazione (figura 54) rappresenta il coefficiente di estinzione molare.

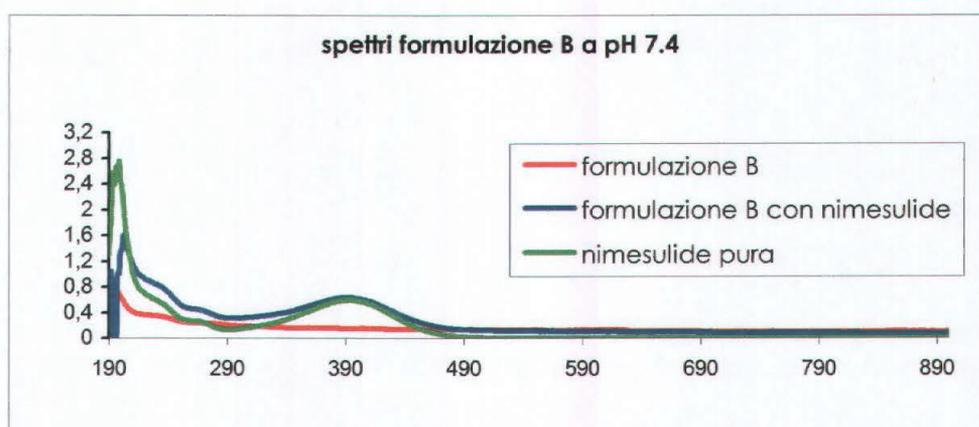
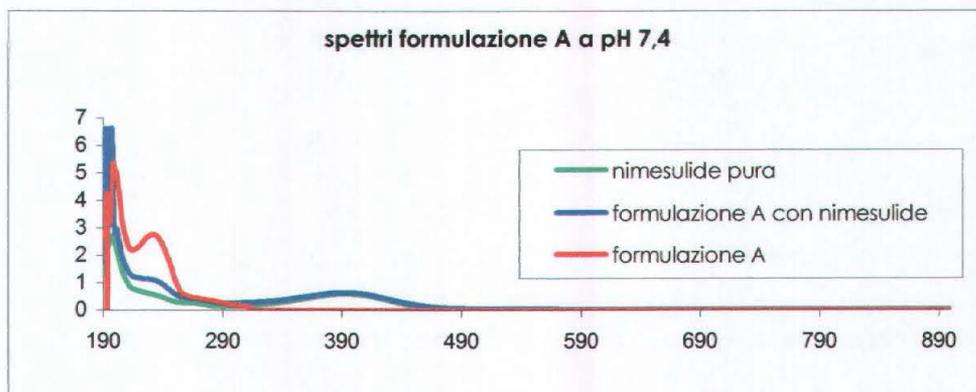
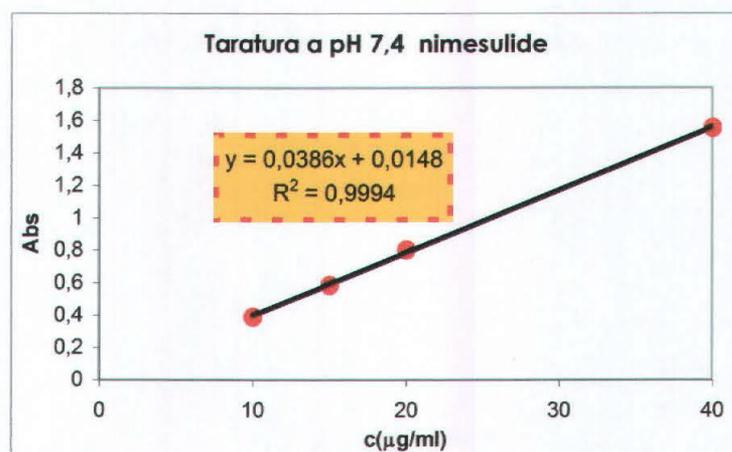


Figura 53. Spettri in soluzione tampone pH 7,4 per: 1. formulazione A più ricca in tensioattivo; 2. formulazione B più ricca in olio.



## Analisi dell'immagine

L'analisi della dimensione e della forma delle particelle è stata eseguita utilizzando un programma di analisi di immagine, basato sui descrittori di Fourier. Questi sono stati ottenuti utilizzando un Seescan Image Analyser (Sonata, Seescan, Cambridge, UK), collegato ad una videocamera in bianco e nero (CCD-4 miniature videocamera module, Rengo Company Ltd., Toyohashi, Japan), che fornisce le coordinate (x, y) del contorno delle particelle, attraverso la digitalizzazione dell'immagine delle particelle stesse. Le coordinate così ottenute sono state usate per calcolare una serie di parametri relativi alle dimensioni dei granulati quali:

- l'area;
- il perimetro;
- diametro medio (o equivalente di Martin);
- diametro di Feret.

I parametri invece, che descrivono la forma valutando la deviazione da una forma geometrica ideale come la sfera (Hickey A.J., 1997; Passerini N. et al., 2002; Alberini B. et al., 2003), comprendono:

- lo **s** (shape factor) che fornisce informazioni sulla forma della particella e si calcola con la formula seguente:  $s = 4\pi [\text{area}/(p^2)]$  e che per una particella sferica è uguale a 1, mentre per le altre forme questo valore è <1;
- l'asse maggiore e minore dell'ellisse che meglio circoscrivono la particella;
- **a** (aspect ratio) che fornisce informazioni sull'allungamento delle particelle; quest'ultimo, che è un numero adimensionale, viene calcolato come rapporto tra l'asse maggiore e quello minore. Per una forma sferica **a** è uguale a 1; per quelle allungate nella dimensione y **a** è <1, mentre **a** è >1 per le particelle allungate nella dimensione x (Thibert R., 1998).

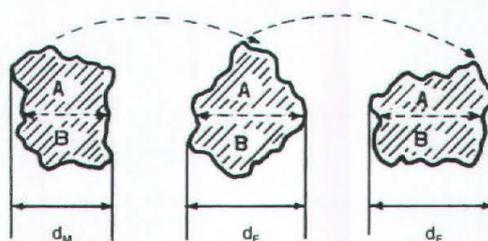


Figura 55. Orientamento delle particelle e diametri di Feret e di Martin  
 $d_F$  = diametro di Feret;  $d_M$  = diametro di Martin  $A = B$ .

### Determinazione della permeazione attraverso membrane (prove ex-vivo)

Gli esperimenti di permeazione intestinale sono stati eseguiti utilizzando l'apparecchiatura analoga a quella prevista dalla F.U. XI per il test di dissoluzione ed opportunamente modificata, come mostrato in figura 56. Con questa metodologia è stato possibile valutare il passaggio sia della nimesulide pura che della nimesulide introdotta nelle formulazioni esaminate attraverso un tratto di intestino di ratto Wistar. Il mezzo acquoso in cui è stata realizzata la prova di permeazione, è rappresentato dal tampone di Krebs Ringer modificato, utilizzato come surrogato dell'ambiente fisiologico intestinale (tabella 17).

Tabella 17. Composizione del tampone di Krebs Ringer modificato.

Componenti	Concentrazione (mM)
NaCl	113.000
KCl	4.830
CaCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O	0.645
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.210
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1.200
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.180
D-(+)-Glucosio	10.000
NaHCO <sub>3</sub>	16.960
H <sub>2</sub> O	q.b. 1000 ml

Prima di iniziare le prove di permeazione è stata costruita la retta di taratura e determinata la solubilità della nimesulide nel tampone di Krebs Ringer modificato a 37°C.

L'assorbanza è stata letta mediante Zeiss Spectrometer MCS 500 System (Carl Zeiss Jena GmbH, D-Jena) con sonda a fibre ottiche, alla lunghezza d'onda in cui la nimesulide presenta il massimo assorbimento (396 nm). In queste condizioni operative il valore del coefficiente di estinzione molare e la solubilità della nimesulide risultano essere rispettivamente 0.0425 e 160.9  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ .

#### Procedimento:

Si sacrifica, tramite  $\text{CO}_2$ , un ratto maschio Wistar di 250 g (provenienza Harlan Nossan; Stabulario dell'Università di Trieste). Si asporta l'intestino tenue (duodeno, digiuno ed ileo), separandolo dal mesentere, lo si lava internamente con tampone di Krebs usando una siringa, e lo si pone in tampone ghiacciato per preservare le cellule dalla degradazione. Si divide l'intestino in più segmenti che verranno fissati in appositi supporti dopo averli "rovesciati" su una bacchetta di teflon (Meriani F. et al., 2004).

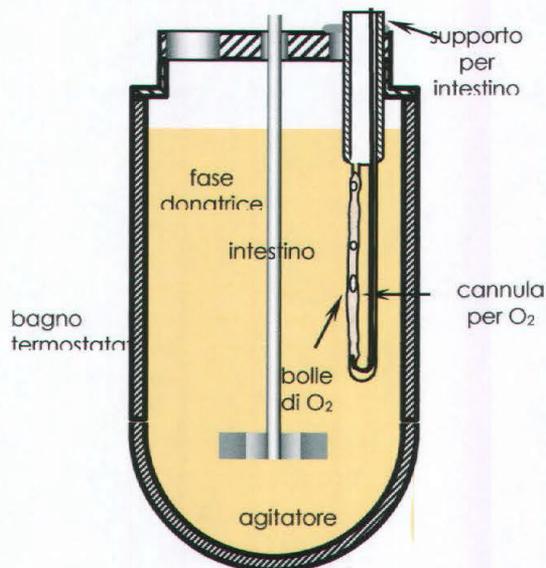


Figura 56. Sezione verticale dell'apparecchio usato per gli esperimenti di permeabilità intestinale. Il supporto consiste in un piccolo contenitore cilindrico (contenitore per la fase ricevente), sul cui fondo sono collegate le due estremità di un capillare ad "U", parte del quale è rappresentato dall'intestino stesso. All'interno del supporto, e quindi del capillare ad esso collegato, si immette il tampone (12 ml, fase ricevente) puro a 37 °C. Nell'ambiente donatore vengono collocati da quattro a sei di questi supporti, ciascuno connesso con un tratto intestinale. Come la fase donatrice, anche ogni fase ricevente è continuamente ossigenata (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ).

I supporti sono immessi nel vessel (contenitore con la fase donatrice), riempito con un litro di tampone di Krebs continuamente ossigenato e sotto agitazione a 37°C. Si

introduce nella fase donatrice al tempo zero la formulazione da analizzare. Il supporto sul quale si inserisce un segmento di intestino consiste in un piccolo contenitore cilindrico, sul cui fondo sono collegate le due estremità di un capillare ad "U" mancante di un segmento. Il tratto di intestino va a completare il segmento mancante del capillare.



Figura 57. Fotografia di profilo (a) e dall'alto (b) dell'apparecchio usato per gli esperimenti di permeabilità intestinale, schematizzato nella figura 56.

All'interno del piccolo contenitore si immettono 12 ml di tampone (fase ricevente) puro a 37°C come la fase donatrice, anche la fase ricevente è continuamente ossigenata (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). L'unico modo che la nimesulide ha per passare dalla fase donatrice a quella ricevente è quella di attraversare la membrana intestinale, quindi dal contenitore cilindrico che sovrasta il capillare si determina la quantità di nimesulide che è passata andando a valutare come varia l'assorbanza nel tempo (1 ora).

L'assorbanza viene misurata in continuo e per ogni sistema analizzato il risultato ottenuto è rappresentato dalla media di tre misure. Per confermare che la nimesulide, nelle condizioni sperimentali, passi attraverso la membrana intestinale per diffusione passiva attraverso le cellule e non attraverso varchi causati dalla degradazione del tessuto intestinale, sono state effettuate delle prove nelle quali, al posto della nimesulide,

è stato usato il rosso fenolo. Trattandosi di una molecola molto idrofila, il suo passaggio dalla fase donatrice a quella ricevente potrebbe avvenire esclusivamente in presenza di una membrana intestinale degradata.

La permeabilità del rosso di fenolo in presenza di una membrana integra è compresa tra  $10^{-5}$  e  $1,5 \cdot 10^{-5}$  cm/s. I risultati ottenuti permettono di affermare che, nelle condizioni sperimentali utilizzate, la membrana intestinale si mantiene essenzialmente integra, in quanto la permeabilità determinata dopo 60 minuti è  $1,3 \cdot 10^{-5}$  cm/s. Infine è stato condotto un esperimento senza nimesulide, per verificare che l'intorpidimento della fase ricevente, dovuto alla presenza di muco intestinale, non interferisse con le misure di assorbanza a 396 nm.

### *Determinazione delle dimensioni delle micelle mediante Laser Light*

#### *Scattering*

Le dimensioni delle micelle dell'emulsione spruzzata sulle polveri e quelle rilasciate dai granulati, sono state determinate mediante Coulter N 4 Plus (Coulter Corporation, Miami, Florida, USA). Questo strumento utilizza la spettroscopia di correlazione fotonica (PCS), la quale determina le dimensioni delle micelle misurando la variazione di intensità della luce laser diffratta, provocata dalle stesse al passaggio attraverso un fluido. La caratteristica di questa tecnica non distruttiva permette la misurazione di particelle di dimensione nanometrica. Infatti, per ottenere un'analisi dettagliata dei campioni presi in esame, il Coulter N4 Plus prevede sei angoli fissi di misurazione al fine di prevenire eventuali sovrapposizioni del segnale.

#### Procedimento:

Mediante agitatore magnetico si disperdono separatamente sia 26 mg di emulsione che 46 mg di granulato in 100 ml di acqua demineralizzata. Vengono quindi prelevati 5 ml della sospensione così ottenuta, a tempi prestabiliti di 5, 10,15, 30 e 60 minuti e filtrati

mediante filtro a siringa Sartorius da 5  $\mu\text{m}$ . I valori dei diametri micellari sono ottenuti dalla media di due misurazioni eseguite sullo stesso campione.

### 3.3. RISULTATI E DISCUSSIONE

La fattibilità del processo di granulazione ad umido in granulatore rapido per la produzione di sistemi autoemulsionanti solidi è stata verificata utilizzando una formulazione placebo costituita da cellulosa microcristallina, lattosio ed una miscela di olio, tensioattivo non ionico, acqua ed un farmaco modello quale la nimesulide.

Tabella 18. Piano sperimentale.

N°Esp	Lattosio (g)	Microcel® (g)	Acqua (g)	Montanox® (g)	Cithrol® (g)
1	192,2	307,8	393,3	46,3	48,7
2	208,1	291,9	359,2	31,5	33,6
3	176,7	323,3	359,2	31,5	33,6
4	208,7	291,3	401,4	33,1	35,2
5	175,9	324,1	401,3	33,1	35,2
6	208,7	291,3	373,4	62,0	35,2
7	175,9	324,1	373,4	62,0	35,2
8	209,4	290,6	418,3	65,2	37,0
9	174,9	325,1	418,4	65,2	37,0
10	216,7	283,3	379,9	49,0	18,0
11	168,0	332,0	379,9	49,0	18,0
12	192,4	307,6	349,1	47,3	17,4
13	192,3	307,7	413,0	50,9	18,7
14	192,4	307,6	369,0	26,6	17,3
15	192,3	307,7	391,6	73,2	18,7
16	192,3	307,7	384,6	48,1	28,8
17	204,0	296,0	372,5	43,2	26,0
18	180,7	319,3	372,5	43,2	26,0
19	192,3	307,7	399,6	44,6	26,8
20	192,3	307,7	390,5	62,4	27,0
21	192,3	307,7	388,8	47,3	38,7

Lo studio dell'influenza dei diversi componenti della formulazione è stato fatto applicando un disegno sperimentale ibrido che ha permesso di ridurre a 16 il numero di esperimenti necessari allo studio a cui sono stati aggiunti altri 5 necessari per la convalida dello stesso.

Le 21 prove di granulazione riportate nel piano sperimentale (tabella 18) sono state eseguite completamente random ed i granulati ottenuti sono stati inizialmente sottoposti ad analisi granulometrica. I risultati ottenuti con questa caratterizzazione sono stati presentati in modo da mettere in evidenza la distribuzione delle particelle nelle differenti classi dimensionali. In particolare, riportando in assi cartesiani il peso delle particelle che corrispondono ad un certo intervallo di dimensioni in funzione dell'intervallo stesso o del suo punto medio, si ottiene la curva di frequenza di distribuzione (tabella 19 e figura 58).

Tabella 19. Analisi granulometrica degli sferoidi (esp. 1) con gli stacci.

Frazione	peso (g)	% (p/p)	% cumulativa
200	10,68	2,73	2,74
400	3,5	0,89	3,62
500	5,62	1,43	5,05
630	13,9	3,55	8,63
800	47,19	12,04	20,64
1250	291,03	74,26	94,92
2000	19,97	5,10	100

Bisogna notare che la curva di figura 58 ha una distribuzione asimmetrica, che si verifica comunemente nelle polveri farmaceutiche, soprattutto quando le misure a disposizione non sono molto numerose. Dalla figura 58, inoltre è facilmente deducibile il diametro predominante delle particelle.

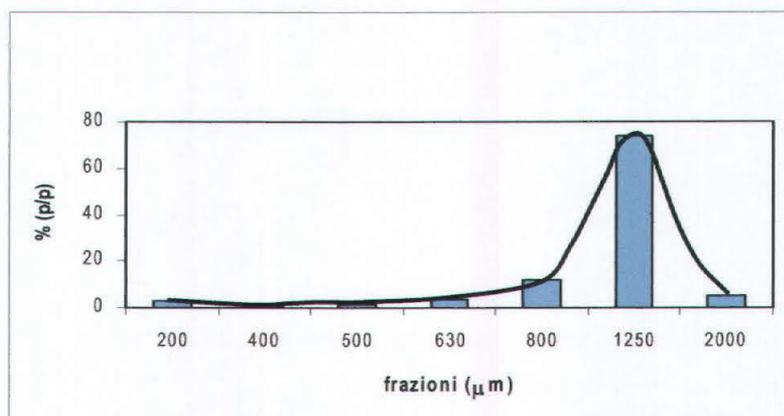


Figura 58. Curva delle frequenze della distribuzione per i dati riportati in tabella 12 relativi all'esperimento 1.

I dati relativi alla frequenza di distribuzione possono essere elaborati per ottenere la frequenza cumulativa percentuale che corrisponde, per un determinato intervallo dimensionale o diametro medio, alla somma dei valori percentuali di quell'intervallo e dei valori percentuali degli intervalli minori (tabella 19). Ponendo in ordinata la frequenza cumulativa percentuale ed in ascissa i punti medi degli intervalli dimensionali, si ottiene una curva sigmoideale di probabilità nella quale ogni punto indica la frazione percentuale di particelle di diametro inferiore a quel valore (figura 59).

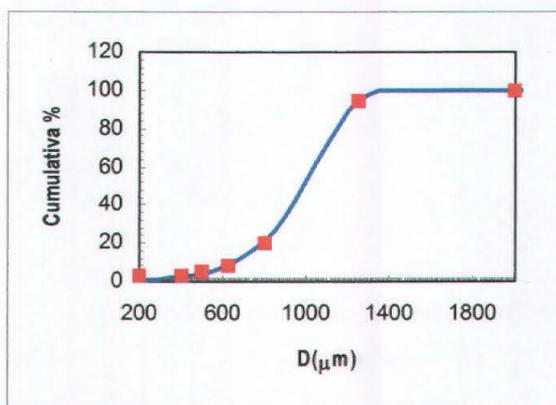


Figura 59. Curva sigmoideale di probabilità: andamento della frequenza cumulativa % in funzione delle dimensioni delle particelle (D) per i valori riportati in tabella 19.

La curva sigmoideale ottenuta permette di calcolare il diametro medio geometrico ponderale e il fattore di dispersione degli sferoidi, che corrispondono rispettivamente al 50% e alla differenza tra 99 e 1% di probabilità. L'elaborazione dei dati ottenuti dall'analisi granulometrica è riportata in tabella 20. Dall'analisi dei risultati si evince come i due diversi metodi di sferonizzazione danno origine a prodotti con diverse distribuzioni granulometriche ed in particolare si può notare che il processo di granulazione ad umido in granulatore rapido permette di ottenere granulati caratterizzati da un intervallo dimensionale più ristretto, con un diametro medio <1000 μm, con una bassa dispersione e con un'alta percentuale della frazione moda. Poiché la velocità di dissoluzione aumenta con l'aumentare dell'area superficiale è evidente che per l'assorbimento di farmaci poco

solubili, come in questo caso, è importante ottenere al più presto possibile, la disaggregazione dei granulati (formazione di particelle fini).

Tabella 20. Risultati analisi granulometrica per i granulati ottenuti con il processo di granulazione ad umido rispetto a quelli ottenuti con il processo di estrusione/sferonizzazione.

Granulazione ad umido					Estrusione/sferonizzazione (Newton M. et al., 2001)				
Y <sub>1</sub>		Y <sub>2</sub>							
N° esp	Diametro medio (µm)	Dispersione (µm)	Frazioni moda (µm)	% Frazioni moda	N° esp	Diametro medio (µm)	Dispersione (µm)	Frazioni moda (µm)	% Frazioni moda
1	688	261	630-800	90.0	1	1524	1000	1400-2000	61.5
2	967	1043	800-1250	69.5	2	1365	1290	1000-1400	53.5
3	918	314	800-1250	85.5	3	1397	1290	1400-2000	49.6
4	742	812	800-1250	60.1	4	1349	1290	1000-1400	55.8
5	842	797	800-1250	78.3	5	1333	1290	1000-1400	57.9
6	893	886	800-1250	79.3	6	810	1050	710-1000	72.4
7	649	237	630-800	93.3	7	1190	1290	1000-1400	91.8
8	946	1208	800-1250	66.3	8	1460	1000	1400-2000	56.5
9	816	842	800-1250	75.5	9	1206	2450	1000-1400	46.9
10	869	1313	800-1250	60.7	10	857	900	710-1000	71.4
11	672	377	630-800	78.9	11	1444	1000	1400-2000	54.7
12	646	488	630-800	71.2	12	968	900	710-1000	53.1
13	760	812	800-1250	59.7	13	1651	2090	1400-2000	64.5
14	512	570	630-800	50.8					
15	835	1143	800-1250	65.4					
16	982	554	800-1250	86.3					
17	966	1305	800-1250	78.2					
18	892	553	800-1250	87.0					
19	900	1132	800-1250	80.4					
20	956	1033	1250-2000	80.0					
21	933	163	800-1250	92.2					

Per tale motivo tutti i granulati sono stati sottoposti al test di disaggregazione secondo F.U. XI ed i risultati ottenuti sono riportati in tabella 21 in cui vengono confrontati con quelli riportati in letteratura relativi al processo di estrusione-sferonizzazione (Newton M. et al., 2001). Il tempo di disaggregazione degli sferoidi nel mezzo di dissoluzione è legato al processo di consolidamento subito dagli sferoidi, il quale dipende a sua volta dal metodo di produzione impiegato: nel caso dell'estrusione e della successiva sferonizzazione, la quantità di energia fornita al substrato è tale da dare origine a sferoidi altamente compatti, che presenteranno un tempo di disaggregazione maggiore. Questo spiega anche i risultati delle misure di densità e porosità, le quali rivelano che i granuli prodotti con il metodo tradizionale hanno valori di densità e porosità minori rispetto a quelli prodotti in granulatore rapido. Quanto minore è la porosità del granulo, tanto più

numerosi sono i punti di contatto e, di conseguenza, la forza di coesione, che è in relazione ai punti di contatto, è più elevata. I granuli ottenuti in granulatore rapido sono tenuti assieme da legami deboli, determinati dalla natura delle materie prime.

Tabella 21. Densità, porosità e tempo di disaggregazione per i granulati ottenuti con il processo di granulazione ad umido rispetto a quelli ottenuti con il processo di estrusione/sferonizzazione

Granulazione ad umido				Estrusione/sferonizzazione (Newton M. et al., 2001)			
N	Densità (g/cm <sup>3</sup> )	Porosità (%)	T. disaggregazione ± SD (min)	N	Densità (g/cm <sup>3</sup> )	Porosità (%)	T. disaggregazione ± SD (min)
1	1.49	5.70	5.03±0.92	1	1.25	17.05	8.04±1.16
2	1.50	4.99	4.45±2.79	2	1.38	8.60	4.94±0.85
3	1.50	5.15	1.83±0.43	3	1.38	8.92	5.95±1.22
4	1.52	3.71	1.63±1.02	4	1.40	7.44	7.65±2.33
5	1.51	4.52	3.75±2.29	5	1.41	6.85	7.22±2.65
6	1.43	9.41	2.92±1.58	6	1.45	4.46	94.65±13.96
7	1.50	5.15	2.52±0.51	7	1.44	5.05	10.58±2.46
8	1.48	6.24	1.77±1.02	8	1.28	15.34	3.58±0.76
9	1.48	6.42	2.99±1.21	9	1.29	15.00	3.04±1.34
10	1.52	3.67	2.01±0.72	10	1.37	9.07	23.82±14.38
11	1.46	7.72	2.55±1.07	11	1.19	21.14	5.52±2.55
12	1.52	3.80	2.52±0.94	12	1.47	2.99	15.37±3.48
13	1.52	3.80	0.9±0.63	13	1.26	17.18	6.57±2.11
14	1.53	3.17	1.34±0.72				
15	1.51	4.44	1.77±0.98				
16	1.52	3.80	2.12±1.55				
17	1.53	3.11	2.01±1.47				
18	1.49	5.76	1.86±0.90				
19	1.52	3.80	2.06±0.95				
20	1.51	4.44	4.81±1.04				
21	1.49	5.70	2.86±0.94				

Le forze intragranulari che si instaurano invece con il processo dell'estrusione/sferonizzazione, non sono determinate unicamente dalla natura chimica dei materiali, ma anche dall'energia meccanica fornita durante il processo stesso, e conferiscono quindi al granulo una maggiore porosità. L'analisi dell'immagine dei campioni (tabella 22) mette in evidenza l'effetto che i diversi componenti hanno sulla forma dei pellets. Dai dati relativi al fattore di forma (shape factor "s") si può notare che formulazioni caratterizzate da un rapporto tensioattivo-grasso di 1:1 (p/p) portano ad un buon prodotto sferonizzato (figura 60). Per quelle in cui il tensioattivo è presente in eccesso rispetto al grasso, con un rapporto maggiore o uguale a 3:2 (p/p), il prodotto perde di sfericità (figura 60B). Quando, invece, la quantità di Microcel® aumenta, il granulo

presenta un aspetto levigato e quindi la qualità del prodotto migliora notevolmente (figura 60C). Questo fatto è dovuto al particolare comportamento della cellulosa microcristallina in grado di agire da spugna (molecular sponge): inizialmente assorbe il liquido granulante e successivamente, quando le particelle vengono a contatto fra loro, promuove il rilascio del liquido a livello superficiale, permettendo così alle particelle di coalescere ottenendo così degli sferoidi dalla superficie liscia e più levigata.

Tabella 22. Dati relativi all'analisi dell'immagine.

N. Esp.	Area $\pm$ SD (mm <sup>2</sup> )	Aspect Ratio $\pm$ SD	Diametro medio $\pm$ SD (mm)	Perimetro $\pm$ SD (mm)	Diametro di Feret medio $\pm$ SD	Shape factor $\pm$ SD
1	0.43 $\pm$ 0.07	1.38 $\pm$ 0.16	0.73 $\pm$ 0.07	3.17 $\pm$ 0.43	0.79 $\pm$ 0.07	0.54 $\pm$ 0.09
2	1.51 $\pm$ 0.33	1.38 $\pm$ 0.21	1.38 $\pm$ 0.21	5.95 $\pm$ 1.12	1.50 $\pm$ 0.18	0.58 $\pm$ 0.13
3	0.18 $\pm$ 0.05	1.65 $\pm$ 0.29	0.48 $\pm$ 0.07	2.03 $\pm$ 0.31	0.53 $\pm$ 0.06	0.60 $\pm$ 0.14
4	1.25 $\pm$ 0.42	1.47 $\pm$ 0.32	1.24 $\pm$ 0.20	6.06 $\pm$ 1.27	1.40 $\pm$ 0.25	0.45 $\pm$ 0.10
5	1.02 $\pm$ 0.28	1.64 $\pm$ 0.43	1.15 $\pm$ 0.17	4.74 $\pm$ 0.39	1.25 $\pm$ 0.17	0.57 $\pm$ 0.14
6	0.94 $\pm$ 0.29	1.53 $\pm$ 0.27	1.05 $\pm$ 0.15	5.16 $\pm$ 0.76	1.22 $\pm$ 0.16	0.43 $\pm$ 0.14
7	0.99 $\pm$ 0.21	1.56 $\pm$ 0.36	1.12 $\pm$ 0.13	4.39 $\pm$ 0.84	1.22 $\pm$ 0.16	0.78 $\pm$ 0.13
8	0.59 $\pm$ 0.35	1.55 $\pm$ 0.31	0.83 $\pm$ 0.26	4.22 $\pm$ 1.02	0.96 $\pm$ 0.28	0.41 $\pm$ 0.11
9	0.94 $\pm$ 0.19	2.04 $\pm$ 0.33	1.11 $\pm$ 0.13	5.99 $\pm$ 1.05	1.44 $\pm$ 0.17	0.35 $\pm$ 0.06
10	1.38 $\pm$ 0.39	1.55 $\pm$ 0.26	1.31 $\pm$ 0.15	6.55 $\pm$ 1.41	1.49 $\pm$ 0.23	0.41 $\pm$ 0.14
11	0.81 $\pm$ 0.42	1.63 $\pm$ 0.24	1.11 $\pm$ 0.49	5.84 $\pm$ 0.73	1.17 $\pm$ 0.18	0.70 $\pm$ 0.09
12	0.72 $\pm$ 0.15	1.58 $\pm$ 0.34	0.95 $\pm$ 0.11	3.82 $\pm$ 0.55	1.04 $\pm$ 0.12	0.63 $\pm$ 0.14
13	0.94 $\pm$ 0.29	1.53 $\pm$ 0.27	1.05 $\pm$ 0.15	5.16 $\pm$ 0.76	1.22 $\pm$ 0.16	0.43 $\pm$ 0.14
14	0.72 $\pm$ 0.11	1.31 $\pm$ 0.18	0.94 $\pm$ 0.07	3.82 $\pm$ 0.68	1.02 $\pm$ 0.11	0.64 $\pm$ 0.18
15	0.89 $\pm$ 0.26	1.66 $\pm$ 0.38	1.00 $\pm$ 0.18	5.81 $\pm$ 1.29	1.27 $\pm$ 0.22	0.33 $\pm$ 0.09
16	1.03 $\pm$ 0.32	1.54 $\pm$ 0.21	1.14 $\pm$ 0.18	5.51 $\pm$ 0.86	1.28 $\pm$ 0.20	0.45 $\pm$ 0.07
17	1.38 $\pm$ 0.35	1.40 $\pm$ 0.24	1.29 $\pm$ 0.12	5.35 $\pm$ 0.85	1.42 $\pm$ 0.20	0.59 $\pm$ 0.15
18	0.33 $\pm$ 0.09	1.44 $\pm$ 0.19	0.63 $\pm$ 0.09	3.07 $\pm$ 0.64	0.74 $\pm$ 0.09	0.47 $\pm$ 0.17
19	1.08 $\pm$ 0.26	1.33 $\pm$ 0.23	1.12 $\pm$ 0.15	5.75 $\pm$ 1.18	1.32 $\pm$ 0.23	0.42 $\pm$ 0.10
20	2.23 $\pm$ 1.16	1.51 $\pm$ 0.36	1.63 $\pm$ 0.44	7.11 $\pm$ 1.55	1.83 $\pm$ 0.44	0.53 $\pm$ 0.12
21	0.70 $\pm$ 0.20	1.45 $\pm$ 0.35	0.96 $\pm$ 0.17	3.89 $\pm$ 0.99	1.05 $\pm$ 0.21	0.63 $\pm$ 0.20



A



B



C

Figura 60. Fotografie al microscopio elettronico per i granulati: A. formulazione 3 ( $s=0.60$ ); B. formulazione 15 ( $s=0.33$ ); C. formulazione 7 ( $s=0.78$ ). A→B. effetto negativo sulla forma dovuto ad un incremento di tensioattivo; C. effetto sferonizzante della cellulosa microcristallina.

Le caratteristiche dei pellets più importanti dal punto di vista tecnologico e produttivo sono il diametro medio geometrico ponderale ( $Y_1$ ) e la resa percentuale della frazione moda ( $Y_2$ ). Le proprietà di scorrimento dei pellets sono notevolmente influenzate dal diametro medio delle particelle e sono fondamentali nel garantire un corretto riempimento di capsule e della camera di compressione, mentre la resa percentuale della frazione moda è un'importante caratteristica tecnologica che fornisce una indicazione sulla distribuzione delle dimensioni dei pellets. Per poter analizzare simultaneamente gli effetti delle proporzioni dei componenti sulle due caratteristiche dei pellets ( $Y_1$  e  $Y_2$ ), è stato postulato un modello polinomiale di secondo grado del tipo:

$$Y = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_5x_5 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{14}x_1x_4 + b_{15}x_1x_5 + b_{23}x_2x_3 + b_{24}x_2x_4 + b_{25}x_2x_5 + b_{34}x_3x_4 + b_{35}x_3x_5 + b_{45}x_4x_5$$

(eq. 29)

$b_i$  rappresentano le stime dei coefficienti  $\beta_i$  e sono definiti come:

$$b_i = \beta_i + \varepsilon$$

(eq.30)

dove  $\varepsilon$  rappresenta l'errore sperimentale.

Per stabilire una correlazione tra le variabili formulative e quelle dipendenti (risposte sperimentali) (tabella11), queste ultime sono state sottoposte a una regressione multivariata con il modello postulato (equazione10). I risultati sono riportati in tabella 23.

In aggiunta alle prove previste dal piano sperimentale, sono state eseguite ripetizioni dell'esperimento 3 ( $n=5$ ;  $Y_1 = 909; 925; 915; 930; 914$ ;  $Y_2 = 80.5; 89.4; 90.6; 81.3; 89.7$ ), utilizzate per la stima dell'errore sperimentale (analisi della varianza).

Le componenti della varianza sono desumibili dalla tabella dell'ANOVA (Castino M e Riletto E., 1991)(dall'inglese *Analysis of Variance*) riportata in tabella 24, nella quale la variazione osservata nei dati sperimentali viene scomposta in una variazione spiegata ed in una non spiegata dal modello. Dall'analisi della tabella dell'ANOVA si può notare che sia la regressione che il modello sono risultati validi per ambo le risposte sperimentali prese

in considerazione. Si denota infatti che i valori di  $R^2$  e  $R^2_A$  sono risultati essere buoni (molto vicini ad 1) per entrambi i modelli: rispettivamente 1.0 e 0.99 per  $Y_1$ , 0.99 e 0.96 per  $Y_2$ .

Tabella 23. Stime e significatività statistiche dei coefficienti del modello per le due risposte sperimentali considerate.

Coefficiente	$Y_1$	$Y_2$
b1	-546.172*	-141.022
b2	-726.316**	-18.555
b3	-6217.515***	-445.955
b4	-3237.461***	-447.356*
b5	-19108.889***	-369.201
b12	1552.508*	212.507
b13	6020.482**	823.547
b23	9882.817***	737.218
b14	9672.891***	1106.978*
b24	4272.366**	914.656*
b34	21464.463***	1218.514*
b15	30373.809***	901.382
b25	31956.215***	936.732
b35	32503.131***	1097.035
b45	21610.997***	1192.961

a(\*\*\* $\alpha < 0.001$ , \*\*  $\alpha < 0.01$ , \*  $\alpha < 0.05$ )

Per quanto riguarda la validità del modello, l'analisi della varianza dà un valore di F pari a 176 per il modello di  $Y_1$ , e un valore di 7.6 per il modello relativo a  $Y_2$ . Entrambi questi valori sono molto maggiori di quello tabulato di  $F_{14,5}$  (26.42) con  $\alpha = 0.001$  per  $Y_1$ ,  $F_{14,5}$  (4.62) con  $\alpha = 0.05$  per  $Y_2$ .

Tabella 24. Valori di significatività del modello e della regressione.

VAR.	TIPO DI VARIAZIONE	DEVIANZA	GRADI DI LIBERTA'	VARIANZA	F	SIGNIFICATIVITA'
$Y_1$	Spiegata dalla regressione	2.75936E+05	14	1.97097E+04	175.7370	0.0117***
	Non spiegata (residua)	5.60773E+02	5	1.12154E+02		
	Validità	7.67735E+01	1	7.67735E+01	0.6345	47.4
	Errore	4.84000E+02	4	1.21000E+02		
	Totale	2.76497E+02	19			
	$F_{0.001} = 26.42$	$F_R > F_{0.001}$	Regressione valida	$R^2 = 1.000$		
	$F_{0.001} = 74.14$	$F_{VM} < F_{0.001}$	Modello valido	$R^2_A = 0.996$		
$Y_2$	Spiegata dalla regressione	2.24288E+03	14	1.60206E+02	7.6095	1.94*
	Non spiegata (residua)	1.05266E+02	5	2.10533E+01		
	Validità	5.26667E+00	1	5.26667E+00	0.2107	67.0
	Errore	1.00000E+02	4	2.50000E+01		
	Totale	2.34815E+03	19			
	$F_{0.05} = 4.62$	$F_R > F_{0.05}$	Regressione valida	$R^2 = 0.998$		
	$F_{0.05} = 7.71$	$F_{VM} < F_{0.05}$	Modello valido	$R^2_A = 0.965$		

Per quanto riguarda la validità del modello, è stata riscontrata una significatività sperimentale del 47.4% per  $Y_1$  e del 67% per  $Y_2$ , mentre la capacità predittiva del modello nei punti test è messa in evidenza in tabella 25.

Tabella 25. Predizione delle risposte sperimentali nei punti test.

N	$Y_1$ sperimentale	$Y_1$ calcolata	$Y_2$ sperimentale	$Y_2$ calcolata
17	966.000	966.570	78.200	77.133
18	892.000	892.339	87.000	87.515
19	900.000	905.121	80.400	75.759
20	956.000	957.088	80.000	81.891
21	933.000	934.357	92.200	91.046

Ad esempio, i valori stimati dei coefficienti  $\beta_i$  associati ai singoli pseudocomponenti nell'equazione 10, per  $Y_1$ , tutti significativamente diversi da zero e di entità comparabile indicano che tutti e quattro i pseudocomponenti e loro rispettive interazioni hanno un effetto sul diametro medio. Per quanto riguarda  $Y_2$  invece, risulta significativo il pseudocomponente 4 che presenta inoltre interazione con altre tre pseudomischele (tabella 23).

Dopo aver verificato la validità dei modelli, essi sono stati utilizzati per studiare l'andamento del fenomeno nella zona di studio, mediante l'analisi delle curve di isorisposta (figure 61 e 62). Queste ultime si ottengono proiettando la superficie di risposta nella zona delimitata da tre variabili, fissando le altre variabili a valori costanti: in tal modo si passa da una rappresentazione tridimensionale ad una bidimensionale di più facile interpretazione.

Mediante le curve di isorisposta è possibile individuare chiaramente, all'interno del dominio sperimentale, quelle zone in cui la risposta assume valori ottimali in modo da poter determinare gli intervalli delle variabili da prendere in considerazione per ottenere la risposta desiderata.

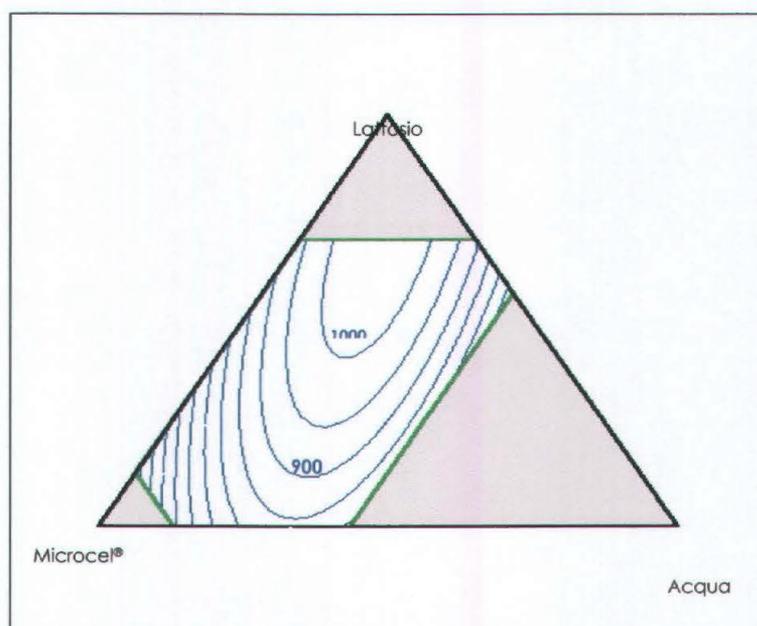


Figura 61. Curve di isorisposta per il diametro medio geometrico ponderale ( $Y_1$ ) in funzione della composizione della pseudomiscela.  $\Delta Y_1 = 50 \mu\text{m}$ ;  $X_4 = 0.05$ ;  $X_5 = 0.03$ .

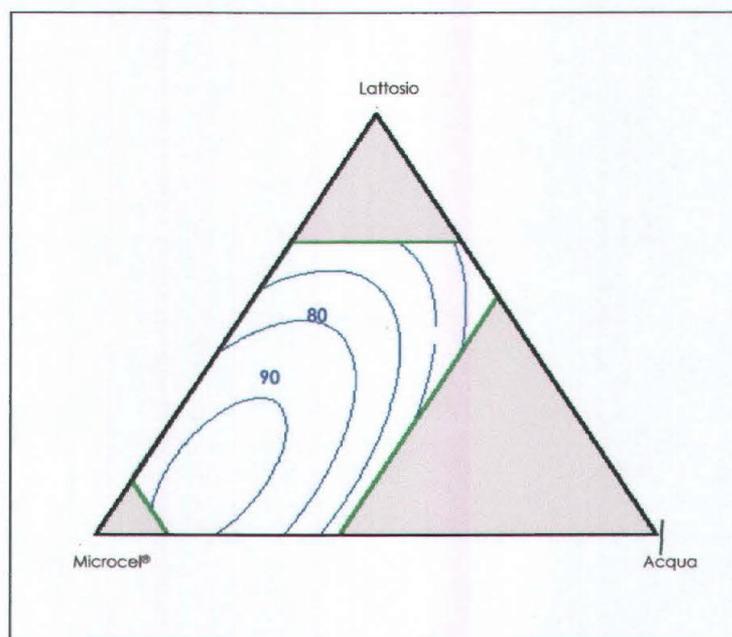
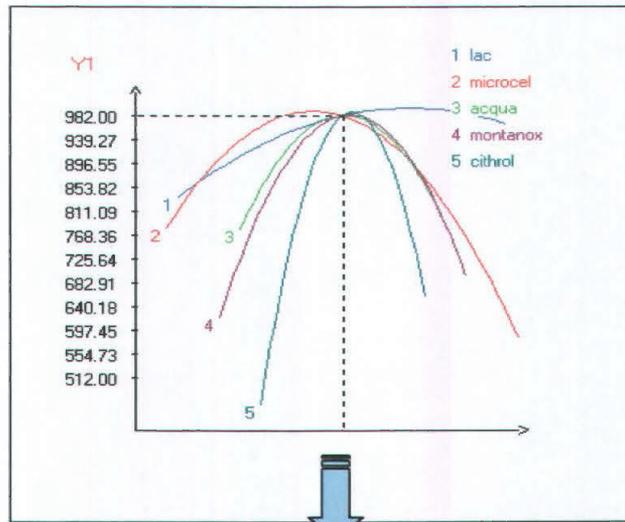


Figura 26. Curve di isorisposta per la resa percentuale della frazione moda ( $Y_2$ ) in funzione della composizione della pseudomiscela con  $\Delta Y_2 = 10 \%$ ;  $X_4 = 0.05$ ;  $X_5 = 0.03$ .



Componente	Limitazione inferiore (%)	Baricentro	Limitazione superiore (%)
Lattosio	16	20	24
Microcel®	27	32	37
Acqua	37.5	40	42.5
Montanox®	2	5	8
Cithrol®	1	3	5

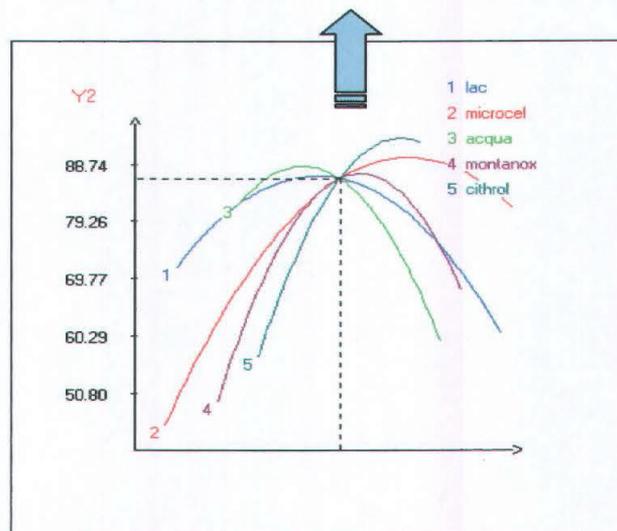


Figura 63. Effetto dei cinque componenti della formulazione sulle risposte  $Y_1$  e  $Y_2$ .

I singoli effetti dei componenti della miscela, sulle due risposte sperimentali, vengono analizzati utilizzando i calcoli ottenuti con il programma NEMRODOW (Mathieu

D. e Phan Than Luu R., 1993) mediante l'algoritmo di Cox (Cornell J.A., 1981); così si ricavano i grafici degli effetti (figura 63) sui quali si evidenzia la scarsa influenza del lattosio nel meccanismo di formazione del granulo; ma sempre necessario per favorire la disgregazione dello stesso.

Si denota invece come l'effetto degli altri componenti sul meccanismo di granulazione, sia percentuale dipendente; infatti se si assume come punto di riferimento la miscela centrale, cioè il baricentro della zona di studio, si nota un che un aumento quantitativo dei componenti porta sia ad una diminuzione del diametro medio che ad un aumento della frazione moda.

In particolare quest'ultimo effetto sulla Y2 è dovuto alla presenza della cellulosa microcristallina (Microcel®) e della fase grassa (Cithrol®). Invece, una diminuzione delle concentrazioni, sempre a partire dal baricentro, porta ad una diminuzione sia del diametro che della frazione moda.

I sistemi auto-emulsionanti (SEDDS) sono caratterizzati dalla capacità di emulsionarsi in soluzione acquosa in condizioni di blanda agitazione in quanto contrariamente alle normali emulsioni sono sistemi termodinamicamente stabili grazie ad un ridotto volume della fase oleosa dispersa ed una limitata distribuzione delle dimensioni della fase dispersa. Di conseguenza per verificare la formazione di micelle dopo l'esposizione dei pellets al mezzo acquoso, nonché le dimensioni delle micelle delle emulsioni di partenza, sono state effettuate le misure mediante Laser Light Scattering. Le formulazioni così testate sono due: la formulazione 3 contenente fase oleosa e tensioattivo in rapporto 1:1 e la formulazione 15 contenente fase oleosa e tensioattivo in rapporto 1:4 (figura 64). I dati mettono in evidenza come si formino spontaneamente micelle con dimensioni più piccole rispetto a quelle dell'emulsione di partenza. È probabile che una maggiore quantità di tensioattivo, il quale garantisce un effetto solubilizzante e riduce la tensione superficiale, provochi una più intima coesione tra la fase bagnante e le polveri della formulazione.

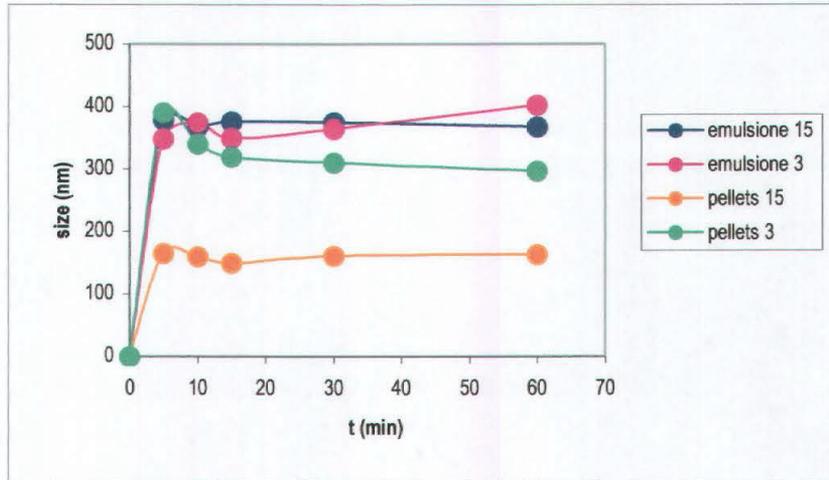


Figura 64. Dimensioni delle micelle delle emulsioni di partenza e delle micelle rilasciate dai pellets dopo l'esposizione al mezzo acquoso.

In queste condizioni si verificano interazioni di tipo chimico-fisico tra la cellulosa microcristallina, il lattosio e la fase bagnante tali da determinare la formazione di un'emulsione formata da micelle di circa 170 nm. I valori ottenuti confermano ulteriormente che siamo in presenza di sistemi auto-emulsionanti, tipicamente appartenenti alle formulazioni lipidiche di tipo II.

L'efficacia dei nostri sistemi auto-emulsionanti nella veicolazione di farmaci liposolubili è stata testata preparando dei pellets contenenti l'1% (p/p) di un farmaco modello poco solubile (nimesulide) e caratterizzandoli mediante il test di dissoluzione in vitro e di permeazione attraverso intestino di ratto. Per valutare gli effetti della presenza del tensioattivo e dei mono- e digliceridi sulle proprietà di rilascio dei sistemi auto-emulsionanti prodotti, sono state nuovamente testate le formulazioni 3 e 15. I test di dissoluzione in vitro pongono in evidenza l'effetto della presenza del tensioattivo nella formulazione ed in particolare si può notare come l'incremento di quest'ultimo aumenti la velocità di dissoluzione della nimesulide (figura 65).

Analogamente si può notare, dai dati di permeazione attraverso intestino di ratto, come la capacità di permeazione della nimesulide risulti fortemente incrementata se formulata in sistemi auto-emulsionanti (tabella 26, figura 66). L'adsorbimento del tensioattivo all'interfase olio/acqua, riducendo la tensione

interfacciale durante la preparazione di un'emulsione, favorisce la dispersione dell'olio in goccioline di dimensioni fini e aiuta a mantenere i globuli nello stato di dispersione.

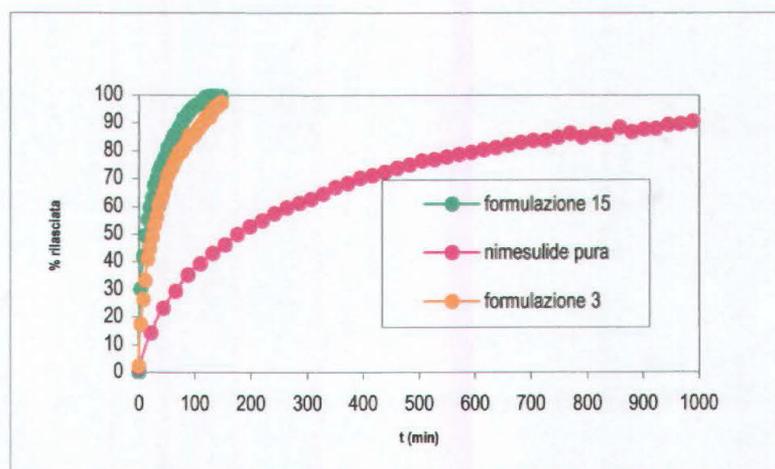


Figura 65. Profili di dissoluzione ottenuti con le formulazioni 3, 15 e nimesulide pura.

Quindi, la presenza di un monostrato di tensioattivo sulla superficie delle goccioline riduce la possibilità di collisioni efficaci che portino alla coalescenza. In particolare, i tensioattivi non ionici sono largamente impiegati nelle emulsioni farmaceutiche per la loro mancanza di tossicità e per la loro limitata sensibilità alle sostanze aggiunte.

Tabella 26. Dati relativi alle prove di permeazione per le formulazioni 3 e 15.

T(min)	Formulazione 3 C(µg/ml) ±SD	Formulazione 15 C(µg/ml) ±SD
0.017	0.49±0.19	0.54±0.20
6	0.65±0.29	0.75±0.02
12	0.76±0.31	1±0.20
18	0.90±0.42	1.46±0.35
24	1.26±0.62	2.20±0.47
30	1.71±0.80	3.14±0.56
36	2.28±0.99	4.27±0.64
42	2.95±1.17	5.57±0.70
48	3.70±1.34	6.98±0.72
54	4.52±1.51	8.43±0.72
60	5.35±1.67	9.95±0.68

Questi stabilizzanti non ionici sono adsorbiti sulla superficie delle goccioline e mantengono la stabilità formando uno strato idrato intorno alle particelle idrofobiche delle emulsioni olio in acqua. Essi trasformano efficacemente una dispersione colloidale idrofobica in una dispersione idrofila. Di solito i farmaci disciolti in olio vengono assorbiti principalmente dopo essere passati nella fase acquosa (Florence A.T. e Attwood D., 2002).

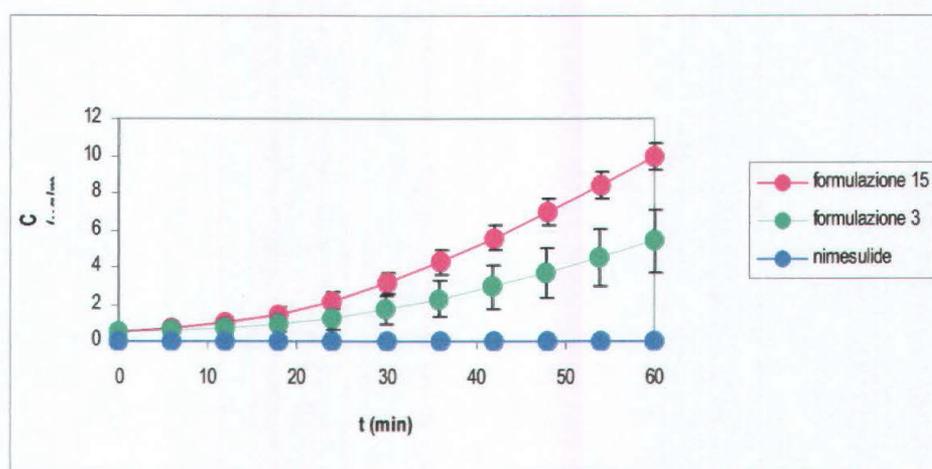


Figura 66. Profili ottenuti dalle prove di permeazione attraverso intestino di ratto.

Nell'assorbimento di farmaci da un'emulsione olio in acqua, il valore del coefficiente di ripartizione è maggiore di uno ( $P > 1$ ); quest'ultimo nel caso della nimesulide è di 21 a pH 7.5 (Grassi M. et al., 2002). Il trasporto da una fase all'altra e la ripartizione sono quindi importanti per poter determinare la quantità di farmaco che può essere assorbita.

Le prove di assorbimento e di permeazione attraverso membrana, impiegando la formulazione 15, evidenziano l'effetto del tensioattivo sull'integrità della membrana stessa, il quale ha come conseguenza diretta un aumento della quantità di farmaco assorbita. Inoltre, elevate quantità di tensioattivo comportano la diminuzione dell'aggregazione tra micelle e del diametro delle stesse. Questo fatto determina un incremento dell'area superficiale disponibile per l'assorbimento dei monogliceridi da parte degli enterociti e quindi un aumento della quantità di farmaco assorbibile. Nel caso dello sviluppo di una forma farmaceutica il trasferimento tecnologico del

processo di produzione è un passaggio obbligato. Un prospetto della convalida di ogni passaggio di produzione è parte integrante della documentazione necessaria per la richiesta di immissione in commercio del prodotto stesso. Il trasferimento tecnologico, o scale-up, prevede i seguenti passaggi:

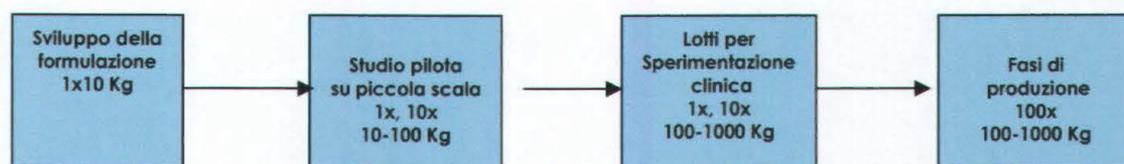


Figura 67. Fasi dello scale-up.

Il primo passaggio è costituito dalla fase di laboratorio dove la formulazione e la forma farmaceutica vengono definite. Il processo viene quindi trasferito ad uno studio pilota su piccola scala. Le prime difficoltà già si incontrano a questo livello poiché l'impianto pilota è costruito in scala ridotta prendendo come modello di riferimento gli impianti industriali; è quindi una macchina con caratteristiche spesso molto diverse rispetto a quelle delle macchine utilizzate nei laboratori. A questo punto hanno inizio anche gli studi clinici che implicano una maggiore produzione della forma farmaceutica nell'impianto pilota (a seconda del numero di persone a cui viene somministrato il farmaco). Questo comporta un'ulteriore modifica delle variabili di produzione nell'impianto pilota. Nel caso di impianti di dimensioni ancora maggiori, il processo può essere ulteriormente affinato prima di essere applicato alla fase di produzione dove verrà convalidato definitivamente.

Prima di effettuare delle prove con un impianto di dimensioni maggiori quale il Roto-P 50 è necessario verificare la similitudine geometrica tra questo ed il granulatore Roto-J (figura 68).

La tabella 18 riporta le misure relative ai due impianti. Dai valori dei fattori di scala, calcolati come rapporto tra le dimensioni A e B, si può stabilire che la similitudine geometrica tra i due impianti viene rispettata (Voinovich D. et al., 1993): questo significa che le polveri sono sottoposte allo stesso tipo di movimento.

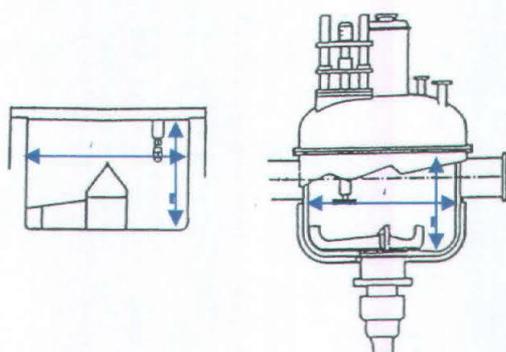


Figura 68. Rappresentazione grafica della similitudine geometrica dei granulatori della serie Roto.

Tabella 27. Similitudine geometrica dei granulatori della serie Roto.

Modello	Roto-J	Roto-P50
Capacità (litri)	10	50
A (mm)	276	450
B (mm)	196	320
Fattore di scala A/B	1.41	1.41

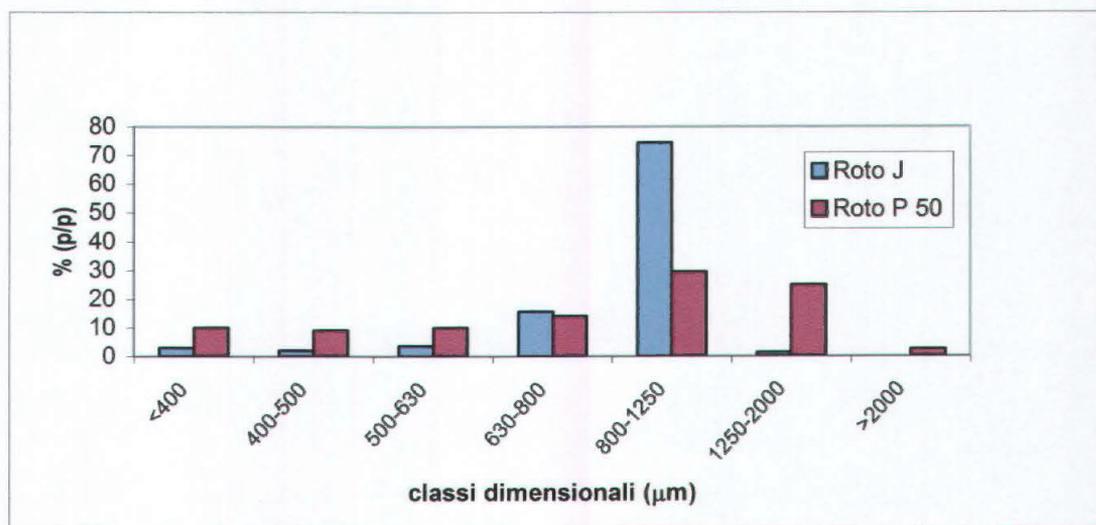


Figura 69. Curva di frequenza della distribuzione granulometrica ottenuta con il passaggio di scala della formulazione n°1.

Nella formulazione presa in esame non avvengono reazioni chimiche tra i reagenti, quindi la similitudine meccanica, termica e chimica può essere considerata valida per i due granulatori impiegati. Lo scale-up del processo di produzione di pellets

auto-emulsionanti è stato verificato trasferendo l'esperimento 1 del piano sperimentale (tabella 28) in Roto-P 50 raddoppiando la velocità periferica della massa movimentata (300 rpm) e utilizzando inoltre il chopper.

Tabella 28. Confronto dei granulati ottenuti con Roto-J e con il Roto-P 50.

Apparecchiatura	Diametro medio pellets formulazione 1 ( $\mu\text{m}$ )	Dispersione pellets formulazione 1 ( $\mu\text{m}$ )
Roto J	688	261
Roto P 50	538	1065

Come dimostrano la tabella 28 e la figura 69, i valori del diametro medio geometrico ponderale dei granulati prodotti nel Roto-P 50 hanno confermato la possibilità di compiere lo scale-up dell'esperimento selezionato, mantenendo costante la velocità dell'impeller nei due modelli. Per quanto concerne la dispersione delle particelle nel Roto-P 50, è risultata maggiore dei valori trovati nel Roto-J, questo a causa soprattutto dell'incremento della viscosità della massa durante la fase di granulazione, la quale è generata dalla pressione della maggiore altezza del carico (7.5 Kg) (ramaker J.S. et al., 1998). La maggiore agglomerazione delle particelle nel Roto-P50 viene ulteriormente favorita dalla diversa geometria interna, rispetto al modello da laboratorio evidenziata nella figura 68 e dall'utilizzo del chopper che ha lo scopo di rompere gli agglomerati più grossi in fase d'impasto, e inoltre di favorire il processo di compattazione del granulo (Vonk P. et al., 1998).

## CONCLUSIONI

I risultati degli studi, descritti in questa tesi, hanno messo in luce l'utilità che l'approccio sperimentale, proposto dal design per miscele, può avere nella trattazione di problemi inerenti l'ottimizzazione dei processi e dei prodotti, nel settore farmaceutico industriale.

Dai risultati di ricerca presentati nella tesi, emerge l'importanza che una strategia sperimentale ben congegnata assume negli studi finalizzati all'ottenimento di un prodotto rispondente a determinati criteri di qualità. L'applicazione del design per miscele allo studio di forme farmaceutiche solide (nella fattispecie sia estrusi preparati per fusione che pellets auto-emulsionanti preparati per granulazione ad umido; dove l'indagine, per entrambi, era estesa agli effetti della composizione della miscela sulle proprietà degli estrusi e dei pellets) ha reso possibile, nel caso degli estrusi, l'individuazione di miscele di eccipienti, in cui la teofillina presentava un ritardo, mentre nel caso dei pellets, l'individuazione di miscele di eccipienti che presentavano caratteristiche tecnologiche ottimali. Nei due sistemi presi in esame, la postulazione di un modello matematico si è dimostrato, infatti, adeguato alla descrizione e alla previsione del meccanismo di liberazione della teofillina e del meccanismo di granulazione.

E' bene sottolineare ancora che, mediante l'approccio utilizzato nell'indagine, si può arrivare ad individuare non uno, ma più prodotti o condizioni operative ottimali; avendo così alla fine l'opportunità di scegliere, fra tutte le diverse formulazioni che danno origine a un prodotto con prestazioni soddisfacenti, quelle che meglio si adattano alle esigenze economiche e alle potenzialità del ciclo produttivo.

## BIBLIOGRAFIA

Abdekhodaie M. J., Cheng Y. L., *Diffusional release of a dispersed solute from planar and spherical matrices into finite external volume.*, *Journal of Controlled Release* (1997) 43, 175.

Aitken-Nichol C., Zhan F., McGinity J. W., *Hot melt extrusion of acrylic films.*, *Pharmaceutical Research* (1996) 13, 804.

Albertini B., Cavallari C., Passerini N., Gonzalez-Rodriguez M.L., Rodriguez L., *Evaluation of  $\beta$ -lactose, PVP K12 and PVP K90 as excipients to prepare piroxicam granules using two wet granulation techniques*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2003) 56, 479-487.

Amidon G.L., Lennernas H., Shah V.P., Crison J.R., *A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vivo drug product dissolution and in vivo bioavailability*, *Pharmaceutical Research* (1995) 12, 413-420.

Amorosa M., *Principi di tecnica farmaceutica*, 5ª ed., Libreria Universitaria L. Tirelli, Bologna (1998).

Banakar U. V., *Pharmaceutical Dissolution Testing*, Mercei Dekker, New York, Basel, Hong Kong (1991).

BASF Pharma Knoll AG., Germany, *Shaping the future in pharmaceuticals – Melt extrusion.*, Technical Brochure (2002).

Bird R. B., Stewart E. N., Lightfoot E. N., *Transport Phenomena.*, Wiley, New York, (1960).

Bottle W., *Lipid Formulations for Oral Drug Delivery*, *Pharmaceutical Technology Europe* (2000) 12, 20-30.

Breitenbach J., *Melt extrusion: from process to drug delivery technology.*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2002) 54, 107.

Byun Y. R., Choi Y. K., Jeong S. Y., Kim Y. H., *A model for diffusion and dissolution controlled release from dispersed polymeric matrix*, *Journal of Korean Pharmaceutical Sciences* (1990) 20, 79.

Castino M., Riletto E., *Statistica Applicata*, Piccin, Padova (1991).

Chiellini E.E., Bellich B., Macchiavelli S., Fiannaca R., Skrbec D., Cadelli G.C., Carli F., *Atti del Fifth Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Biotechnology*, Lubiana (2003) 469-470.

Colombo P., Bettini R., Peppas N. A., *Observation of swelling process and diffusion front position during swelling in hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC) matrices containing a soluble drug.*, *Journal of Controlled Release* (1999) 61, 83.

Cornell J.A., *Experiments with mixtures*, John Wiley and sons, New York (1981).

Costantinides P.P., *Lipid Microemulsions for Improving Drug Dissolution and Oral Absorption: Physical and Biopharmaceutical Aspects*, *Pharmaceutical Research* (1995)12, 1561-1572.

Crank J., *The Mathematics of Diffusion.*, 2nd edition, Clarendon Press, Oxford (1975).

Cuff G., Raouf F., *A preliminary evaluation of injection moulding as a tableting technology.*, *Pharmaceutical Technology Europe* (1999) 4, 18.

Di Colo G., *Lezioni del corso di impianti dell'industria farmaceutica*, Servizio Editoriale (1999).

Doelker M., Adel El-Egakey M., Soliva M., Speiser P., *Hot extruded dosage forms.*, *Pharmaceutica Acta Helvetiae* (1971) 46, 31.

Florence A.T., Attwood D., *Le basi chimico-fisiche della tecnologia farmaceutica*, EdISES, Napoli (2002).

Follonier N., Doelker E., Cole E. T., *Evaluation of hot-melt-extrusion as new technique for the production of polymer based pellets for sustained release capsules containing high loadings of freely soluble drugs.*, *Drug Development and Industrial Pharmacy* (1994) 20, 1323.

Follonier N., Doelker E., Cole E. T., *Various ways of modulating the release of diltiazem hydrochloride from hot-melt extruded sustained release pellets prepared using polymeric materials.*, *Journal of Controlled Release* (1995) 36, 243.

Forster A., Hempenstall J., Tucker I., Rades T., *Selection of excipients for melt extrusion with two poorly water-soluble drugs by solubility parameter calculation and thermal analysis.*, *International Journal of Pharmaceutics* (2001) 226, 147.

Forster A., Hempenstall J., Rades T., *Characterization of glass solutions of poorly water-soluble drugs produced by melt extrusion with hydrophilic amorphous polymers.*, *Journal of Pharmaceutics* (2001) 53, 303.

Gauthier P., Aiache J. M., *Manufacture and Dissolution Studies of Lipid Spheres*, *Pharmaceutical Technology Europe* (2003) 15, 34-36.

Giona M., *Statistical analysis of anomalous transport phenomena in complex media.*, *AIChEJ.*, **1991**, 37, 1249.

Grassi M., Coceani N., Magarotto L., *Modelling partitioning of sparingly soluble drugs in a two-phase liquid system*, International Journal of Pharmaceutics (2002) 239, 157-169.

Grassi M., Lapasin R., Pricl S., *The effect of drug dissolution on drug release from swelling polymeric matrices: mathematical modelling.*, Chem. Eng. Com. (1999) 173, 147.

Grassi M., Lapasin R., Colombo I., *Drug release from an ensemble of swellable crosslinked polymer particles.*, Journal of Controlled Release (2000) 68, 97.

Grunhagen H.H., Knoll AG O.M., *Melt extrusion technology*, Pharmaceutical Manufacturing International (1995) 167-168.

Henrist D., Lefebvre R. A., Remon J. P., *Bioavailability of starch based hot stage extrusion formulations.*, International Journal of Pharmaceutics (1999) 187, 185.

Henrist D., Remon J. P., *Influence of the process parameters on the characteristics of starch based hot stage extrudates.*, International Journal of Pharmaceutics (1999) 189, 7.

Hickey A.J., *Concessio, Descriptors of irregular particle morphology and powder properties*, Advanced Drug Delivery Reviews (1997) 26, 29-40.

Huang X., Brazel C. S., *On the Importance and Mechanisms of Burst Release in Controlled Drug Delivery- A Review.*, Journal of Controlled Release (2001) 73, 121.

Hülsmann S., Backensfeld T., Keitel S., Bodmeier R., *Melt extrusion-an alternative method for enhancing the dissolution rate of 17-estradiol hemihydrate.*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics (2000) 49, 237.

Humberstone A.J., Charman W.N., *Lipid-based vehicles for the oral delivery of poorly water soluble drugs*, Advanced Drug Delivery Reviews (1997) 25, 103-128.

Istituto poligrafico e zecca dello Stato, *F.U. XI ed.*, Libreria dello Stato, Roma (2002).

Levich V. G., *Physicochemical Hydrodynamics*, Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ (1962).

Lewis G.A., Mathieu D., Phan Tan Luu R., *Pharmaceutical Experimental Design*, Marcel Dekker, New York (1999).

Lieberman A., Lachman L., Konig J. L., *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, Lea & febiger, Philadelphia (1996).

Lieberman H. A., Lachman L., Schwartz J. B., *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets.*, second edition, Dekker inc., (1989).

Klinke R., Silbernagl S., *Fisiologia*, 1ª ed. italiana, Zanichelli, Bologna (1999).

Kristensen H. G., *Acta Pharm. Suec.*, 25, 205 (1988).

Kristensen H. G. e Schaefer T., *Drug Development and Industrial Pharmacy* (1987) 13 (4,5) , 803 (1987);

Martin A., Swarbrick J., Cammarata A., *Physical Pharmacy, Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences.*, third edition, Lea & Febiger, Philadelphia (1983).

Mathieu D., Nony J., Phan-Tan-Luu R., *NEMRODW (New Efficient Technology for Research using Optimal Design)*., L.P.R.A.I., Marseille software (1999).

Mathieu D., Phan Than Luu R., *Nemrodw: New Efficient Methodology for Research using Optimal Design*, Université d'Aix-Marseille, Marseille (1993).

Meriani F., Coceani N., Sirotti C., Voinovich D., Grassi M., *In vitro nimesulide absorption from different formulations*, *Journal of Pharmaceutical Sciences* (2004) 93, 350-363.

Nakamichi K., Yasuura H., Fukui H., Oka M., Izumi S., *Evaluation of a floating dosage form of nifedipine hydrochloride and hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate prepared using a twin-screw extruder.*, *International Journal of Pharmaceutics* (2001) 218, 103.

Ndindayino F., Vervaet C., Van den Mooter G., Remon J. P., *Direct compression and moulding properties of co-extruded isomalt/drug mixtures.*, *International Journal of Pharmaceutics* (2002) 235, 159.

Neumann J., Breitenbach J., Schrof W., *Confocal Raman spectroscopy: analytical approach to solid dispersions and mapping of drugs.*, *Pharmaceutical Research* (1999) 16, 1109.

Newton M., Petersson J., Podczek F., Clarke A., Booth S., *The influence of formulation variables on the properties of pellets containing a self-emulsifying mixture*, *Journal of Pharmaceutical Sciences* (2001) 90, 987-995.

O'Driscoll C.M., *Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2002) 15, 405-415.

Passerini N., Albertini B., Gonzalez-Rodriguez M.L., Cavallari C., Rodriguez L., *Preparation and characterization of ibuprofen-poloxamer 188 granules obtained by melt granulation*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2002) 15, 71-78.

Patankar S. V., *Numerical Heat Transfer and Fluid Flow.*, Hemisphere Publishing, New York (1990).

Peppas N., *Mathematical models for controlled release kinetic, in medical application of controlled release.*, Langer R. S. and Wise D. L. eds., CRC Press, Boca Raton (1984).

Perig G. W., Gadalla M. A. F., Chlou W. L., *High-Performance Liquid-Chromatographic Determination of Theophylline in Plasma.*, *Clinical Chemistry* (1978) 24/2, 357.

Perissutti B., Newton M. J., Podczek F., Rubessa F., *Preparation of extruded carbamazepine and peg 4000 as a potential rapid release dosage form.*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2002) 53, 132.

Pouton C.W., *Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and self-microemulsifying drug delivery systems*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2000) 11, 93-98.

Quantachrome Corporation/ Nordest srl, *Multipicnometro, Manuale d'uso*, Dipartimento di Ingegneria e Scienza dei Materiali, Università degli Studi di Trieste (1992).

Ramaker J. S., Albada Jelgersma M., Vonk P., Kossen N. W. F., *Scale-down of a high-shear pelletisation process: Flow profile and growth kinetics*, *International Journal of Pharmaceutics* (1998) 166, 89-97.

Repka M. A., McGinity J.W., *Bioadhesive properties of hydroxypropylcellulose topical films produced by hot-melt extrusion.*, *Journal of Controlled Release* (2001) 70, 341.

Ritger P.L., Peppas N.A., *Journal of Controlled Release* (1985) 5, 37-42.

Schaefer T.; *Acta Pharm. Suec.*, 25, 205 (1998).

Shah N.H., Carvajal M.T., Patel C.I., Infeld M.H., Mallick A.W., *SEDDS with polyglycolized glycerides for improving in vitro dissolution and oral absorption of lipophilic drugs*, *International Journal of Pharmaceutics* (1994) 106, 15-23.

Thibert R., Akbarieh M., Tawashi R., *Application of fractal dimension to the study of the surface ruggedness of granular solids and excipients*, *Journal of Pharmaceutical Sciences* (1988) 77, 724-726.

Thomsen L. J., Schaefer T., Kristensen H.G.; *Drug Development and Industrial Pharmacy* (1994) 7, 179-1197.

Thomsen L. J., Schaefer T., Kristensen H. G., *Drug Development and Industrial Pharmacy* (1993) 15, 1867-1887 (1993).

Voinovich D., Moneghini M., Perissutti B., Filipovic-Grcic J., Grabnar I., *Preparation in high-shear mixer of sustained-release pellets by melt pelletisation.*, International Journal of Pharmaceutics (2000) 203, 235.

Voinovich D., Moneghini M., Rubessa F., *Simultaneous optimization of several response variables in a granulation process*, Drug Development and Industrial Pharmacy (1993) 19, 1479-1496.

Vonk P., Guillaume C. P. F., Ramaker J. S., Vromans H., Kossen N. W. F., *Growth mechanism of high-shear pelletisation*, International Journal of Pharmaceutics (1998) 157, 93-102.

Wacker S., Soliva M., Speiser P., *Injection molding as a suitable process for manufacturing solid drug dispersion or solutions.*, Journal of Pharmaceutical Sciences (1971) 60, 1281.

Zhang F., McGinity J. W., *Properties of sustained-release tablets prepared by hot-melt extrusion.*, Pharmaceutical Development and Technology (1999) 4, 241.

Zhou F., Vervaet C., Reman J.P., International Journal of Pharmaceutics (1996) 133, 155-160.