



***Università della Calabria***

*Dipartimento di Farmacia e Scienze della Salute e della Nutrizione*

---

*Tesi di Dottorato in Medicina Traslationale*

Campo di Ricerca: Matrici Polimeriche Reticolate per il Rilascio

Controllato e/o Modificato di Farmaci

(S.S.D. CHIM/09 Tecnologico Farmaceutico applicativo)

XXIX Ciclo

***IDROGEL FUNZIONALI PER LA VEICOLAZIONE  
DI PRINCIPI ATTIVI***

Supervisore  
Prof. Nevio Picci

Candidata  
Tania Spataro

Coordinatore  
Prof. Sebastiano Andò

---

***Anno Accademico 2015-2016***

# INDICE

<b>Introduzione</b>	<b>1</b>
<b>Capitolo 1</b>	
<i>Sistemi polimerici per il rilascio modificato di principi attivi</i>	
1.1 Generalità	3
1.2 Polimeri come trasportatori di molecole bioattive	6
1.2.1 Polimeri idrofobici	6
1.3 Classificazione dei sistemi a rilascio controllato	8
1.3.1 Sistemi di rilascio controllati dalla diffusione	8
1.3.1.1 Sistemi a riserva	9
1.3.1.2 Sistemi a matrice	10
1.3.2 Sistemi controllati dalla dissoluzione	11
1.3.2.1 Sistemi erodibili	11
1.3.2.2 Profarmaci macromolecolari	12
1.3.3 Sistemi osmotici	13
1.3.4 Resine scambiatrici	14
1.4 Idrogel: definizione, sintesi e proprietà	15
1.5 Idrogel sensibili all'ambiente esterno	18
1.6 Sistemi di rilascio termo-sensibili	19
1.6.1 Cinetica e termodinamica dello swelling-deswelling	21
1.6.2 Classificazione degli idrogel termo-sensibili	23
1.6.2.1 Sistemi a rilascio termo-sensibili negativamente	23
1.7 Idrogel sensibili a stimoli elettrici	25
1.8 Idrogel sensibili a stimoli luminosi	35
1.9 Sistemi modulati magneticamente	36
1.10 Sistemi modulati dagli ultrasuoni	37
1.11 Idrogel sensibili agli enzimi	37
1.12 Idrogel sensibili agli antigeni	38
1.13 Idrogel pH sensibili	39
1.13.1 Fattori che influenzano lo swelling pH sensibile	42

1.13.2 Idrogel sensibili al glucosio	43
1.13.3 Rilascio urea-sensibile	45

## **Capitolo 2**

### *Idrogel termo-sensibili: Sintesi, analisi strutturale e rilascio di terapeutici*

2.1 Introduzione	46
2.2 Sintesi dei polimeri termo-sensibili	47
2.3 Caratterizzazione degli idrogel	49
2.3.1 Analisi tramite spettroscopia FT-IR	49
2.3.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)	50
2.3.3 Microscopia elettronica a scansione (SEM)	50
2.3.4 Studi di rigonfiamento	51
2.4 Caricamento dei farmaci nei film polimerici	55
2.5 Studi di rilascio dei farmaci dai film polimerici	57
2.5.1 Rilascio pulsato dai film polimerici	67
2.6 Conclusione	69
2.7 Parte sperimentale	69
2.7.1. Materiali	69
2.7.2 Strumentazione	70
2.7.3 Sintesi dei copolimeri	70
2.7.4 Studi di rigonfiamento	70
2.7.5 Caricamento del farmaco mediante incorporazione	71
2.7.6 Caricamento del farmaco mediante impregnazione	71
2.7.7 Stabilità dei principi attivi a pH 7,0 a 25 e 40°C	71
2.7.8 Rilascio dei farmaci dal film polimerico	72
2.7.9 Analisi statistica	72

## **Capitolo 3**

### *Preparazione di un dispositivo elettromodulabile per il rilascio di farmaci*

3.1 Introduzione	73
3.2 Ferite cutanee	74
3.3 Classificazione e caratteristiche delle medicazioni topiche	75
3.4 Applicazione degli idrogel come medicazioni innovative ad uso topico	77

3.5 Sintesi di dispositivi compositi idrogel-garza	81
3.6 Determinazione del grado di rigonfiamento	84
3.7 Determinazione della forza tensile	86
3.8 Caricamento del farmaco	86
3.9 Profili di rilascio del farmaco	87
3.10 Conclusione	94
3.11 Parte sperimentale	95
3.11.1 Materiali	95
3.11.2 Strumentazione	95
3.11.3 Sintesi di polimeri elettro-sensibili	96
3.11.4 Caricamento del Diclofenac Sodico nelle matrici polimeriche	96
3.11.5 Determinazione del grado di rigonfiamento	96
3.11.6 Determinazione della forza tensile	97
3.11.7 Rilasci del farmaco dai film polimerici <i>in vitro</i>	97
3.11.7 Analisi statistica	97

## Capitolo 4

*Nanosfere di caseina rivestite: strumento innovativo per la somministrazione orale di farmaci*

4.1 Introduzione	98
4.2 La caseina: struttura, caratteristiche e proprietà	99
4.3 Idrogel a base di caseina	100
4.4 Microparticelle e nanoparticelle di caseina	101
4.5 Biodegradabilità degli idrogel per applicazioni farmaceutiche	103
4.6 Rivestimento di matrici polimeriche per applicazioni farmaceutiche	104
4.7 Sintesi degli idrogel	106
4.8 Caratterizzazione degli idrogel	107
4.8.1 Analisi morfologica tramite SEM	108
4.8.2 Analisi FT-IR	108
4.8.3 Determinazione del grado di rigonfiamento	111
4.8.4 Degradazione enzimatica	111
4.9 Caricamento del farmaco	112
4.9.1 Analisi calorimetrica differenziale (DSC)	113
4.10 Esperimenti di rilascio <i>in vitro</i>	114

4.11 Analisi della cinetica di rilascio	116
4.12 Conclusione	119
4.13 Parte sperimentale	120
4.13.1 Materiali	120
4.13.2 Preparazione delle nanoparticelle	120
4.13.3 Analisi FT-IR	120
4.13.4 Analisi morfologica e dimensionale	121
4.13.5 Determinazione del grado di rigonfiamento	121
4.13.6 Degradazione enzimatica delle nanoparticelle di caseina	121
4.13.7 Rivestimento delle nanosfere di caseina	122
4.13.8 Caricamento del farmaco	122
4.13.9 Stabilità dei principi attivi a pH 1,0 e pH 7,4	122
4.13.10 Studi di rilascio <i>in vitro</i>	122
4.13.11 Studi di rilascio <i>in vitro</i> in presenza di enzimi	123
4.13.12 Studi di rilascio simulanti il passaggio gastrointestinale	123
4.13.13 Analisi statistica	124

## **Capitolo 5**

### *Idrogel sensibili a pH e temperatura con proprietà antiossidanti modulabili*

5.1 Introduzione	125
5.2 Stabilità dei farmaci	127
5.2.1 Alterazioni fisiche	129
5.2.2 Alterazioni chimiche	130
5.2.2.1 Reazioni di idrolisi	131
5.2.2.2 Reazioni di isomerizzazione, racemizzazione e polimerizzazione	132
5.2.2.3 Reazioni di decomposizione fotochimica	133
5.2.2.4 Reazioni di ossidazione	133
5.3 Metodi per prevenire o ritardare i processi ossidativi	134
5.4 Flavonoidi: (+)-catechina e quercetina	136
5.5 Acido Folico	140
5.6 Sintesi degli idrogel per la protezione dell'Acido Folico	144
5.7 Caratterizzazione delle matrici sintetizzate	146
5.7.1 Caratterizzazione chimico-fisica	146

5.7.2 Determinazione del grado di rigonfiamento	147
5.8 Determinazione dell'attività antiossidante in funzione della temperatura	151
5.9 Determinazione dell'attività antiossidante in funzione del pH	154
5.10 Conclusioni	157
5.11 Parte sperimentale	158
5.11.1 Materiali	158
5.11.2 Strumentazione	158
5.11.2 Sintesi degli idrogel	159
5.11.3 Determinazione del grado di rigonfiamento	159
5.11.4 Determinazione dell'effetto <i>scavenger</i> sul radicale DPPH	160
5.11.5 Determinazione dell'effetto <i>scavenger</i> sul radicale ABTS	160
5.11.6 Determinazione dei gruppi fenolici disponibili	161
5.11.7 Analisi calorimetrica	162
5.11.8 Caricamento del farmaco nelle matrici	162
5.11.10 Valutazione del grado di preservazione del farmaco	162
5.11.11 Valutazione dell'AF in soluzione a pH 1,0 e 7,4	163
5.11.12 Studi di riutilizzo della matrici sintetizzate	163
5.11.13 Analisi statistica	163
<b>Bibliografia</b>	<b>164</b>

# Introduzione

Una delle principali linee di ricerca nel settore tecnologico farmaceutico riguarda lo sviluppo di formulazioni in grado di rilasciare farmaci nell'organismo in quantità e velocità controllate. Negli ultimi anni lo studio si è incentrato su nuove strategie per la somministrazione di farmaci con caratteristiche particolari, quali instabilità fisica e chimica, suscettibilità alla degradazione enzimatica, caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche non favorevoli. I *Drug Delivery Systems* (DDS) rappresentano una vantaggiosa alternativa alle forme farmaceutiche convenzionali poiché attraverso la modulazione di velocità, sito, tempo, e cinetica di rilascio, consentono la protezione del farmaco da fenomeni di alterazione chimico-fisica, di mantenere una concentrazione costante di principio attivo all'interno della finestra terapeutica per un periodo prolungato, e di rilasciarlo in siti recettoriali specifici. Sistemi con tali proprietà consentono di minimizzare gli effetti collaterali, l'entità e il numero di somministrazioni, e contemporaneamente di aumentare l'efficacia del trattamento e la *compliance* del paziente.

Tra i DDS gli idrogel sensibili ad uno stimolo esterno occupano sicuramente un ruolo importante all'interno della comunità scientifica internazionale. Tali sistemi esibiscono due fasi: una dominata da interazioni polimero-polimero, in cui il gel raggiunge il suo massimo grado di idrofobicità e si contrae; la seconda caratterizzata da interazioni solvente-polimero, in cui l'idrogel guadagna il suo massimo di idrofilicità e rigonfia. Temperatura, pH e campo elettro-magnetico sono gli stimoli più ampiamente utilizzati per indurre una transizione di fase volumetrica nei sistemi polimerici caratterizzati da funzionalità chimiche sensibili a tale stimolo esterno.

Il lavoro svolto durante il corso di Dottorato di Ricerca si è posto l'obiettivo di progettare, sintetizzare e opportunamente caratterizzare matrici polimeriche innovative recanti funzionalità chimiche in grado di assicurare affinità reversibile per il mezzo acquoso e di proteggere e/o modulare il rilascio di molecole biologicamente attive in seguito ad uno o più stimoli esterni.

La sintesi degli idrogel è stata realizzata attraverso reazioni di copolimerizzazione radicalica di opportune specie monomeriche commerciali (N-isopropilacrilammide, acido acrilico, acido

metacrilico, acrilammide) aventi porzioni pH, elettro o termo-sensibili. Al fine di ottenere materiali con opportune proprietà morfologiche e meccaniche sono state esplorate diverse tecniche di polimerizzazione tra cui la polimerizzazione in emulsione in fase inversa, per precipitazione, in *bulk* e la fotopolimerizzazione prendendo in esame diversi sistemi iniziatori termici ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>/TEMED o AIBN) o fotochimici (Irgacure). La caratterizzazione dei materiali ha riguardato sia l'aspetto chimico-fisico (affinità per i mezzi acquosi, analisi spettroscopica, morfologica e calorimetrica), sia quello biologico (prove di biocompatibilità effettuate su opportune linee cellulari). La capacità delle matrici sintetizzate di rispondere allo stimolo esterno è stata dimostrata attraverso misure di affinità per il mezzo acquoso condotte a diversi pH e temperature o sotto l'azione di campi elettrici a diversi voltaggi. Le matrici così sintetizzate sono state utilizzate per il rilascio topico di opportune molecole con attività biologica (Antinfiammatori quali ad esempio Diclofenac o Naprossene) in modo da modulare i loro profili di rilascio in diverse condizioni. In aggiunta, molecole con attività protettiva e antiossidante quali polifenoli e flavonoidi in particolare, sono stati covalentemente ancorati al reticolo polimerico consentendo a questo di svolgere anche un'azione protettiva nei confronti di principi attivi instabili. Opportuni protocolli sperimentali sono stati messi a punto al fine di dimostrare l'azione protettiva della matrice polimerica sia nella fase di conservazione, sia in quella di rilascio.



# CAPITOLO 1

## **Sistemi polimerici per il rilascio modificato di principi attivi**

### **1.1 Generalità**

Negli ultimi 30 anni, la ricerca nel settore farmaceutico ha focalizzato l'attenzione sullo sviluppo di nuovi sistemi in grado di liberare il farmaco nell'organismo in quantità e velocità controllata. L'obiettivo principale è quello di indirizzare il farmaco esclusivamente verso l'organo o il sito recettoriale con dosaggio adeguato e per il tempo necessario ad esplicare la sua azione terapeutica.

Tale interesse è stato dettato da una duplice necessità:

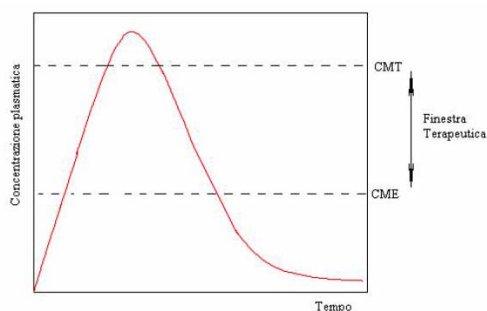
- 1) migliorare la performance di farmaci di provata sicurezza ed efficacia terapeutica;
- 2) rendere fattibile la somministrazione di farmaci con breve emivita (es. proteine, DNA) o farmaci che danno luogo ad effetti secondari e tossici di notevole entità (es. farmaci antitumorali, antivirali).

In una terapia convenzionale, il farmaco, nell'opportuna forma farmaceutica, è somministrato generalmente attraverso un'applicazione non specifica, cioè che non interessa il sito in cui il farmaco deve agire, e periodica, cioè ripetuta più volte nella giornata ad intervalli di tempo regolari. Il farmaco, dopo l'assunzione, sarà presente non solo nel sito d'azione, ma sarà trasportato dal flusso ematico anche in altri tessuti. Questa distribuzione incontrollata nell'organismo potrebbe portare una diminuzione dell'azione terapeutica, perché è limitata la quantità di farmaco presente nel sito d'azione, e contemporaneamente può dar luogo ad effetti collaterali. Inoltre, una somministrazione di farmaci per via orale, parenterale, o endovena richiede l'impiego di trattamenti ripetuti per poter raggiungere un adeguato livello terapeutico nell'organo prescelto.

In commercio esistono numerose forme farmaceutiche dalle quali il rilascio può essere ritardato, o mediante le quali la velocità e la durata della liberazione del principio attivo possono essere programmate. Tali formulazioni sono definite sistemi a rilascio controllato e

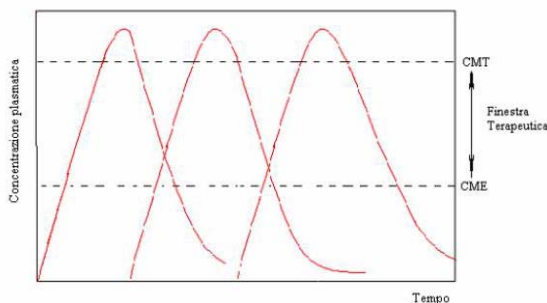
sono progettate in modo tale da ridurre le quantità di farmaco da somministrare, diminuire il numero di somministrazioni quotidiane e proteggere, tramite opportuni rivestimenti, farmaci chimicamente instabili da processi di degradazione.

Lo scopo di tali formulazioni è quello di liberare il principio attivo ad una velocità tale che la frazione di farmaco che entra in circolo bilanci esattamente la frazione che viene eliminata dall'organismo, limitando così le oscillazioni di concentrazione plasmatica della sostanza, riducendo la tossicità e minimizzando gli effetti collaterali dell'agente terapeutico. Con farmaci convenzionali, infatti, le variazioni delle concentrazioni plasmatiche, dopo somministrazione di dosi singole (Figura 1.1), segue un andamento pulsato con indesiderate punte di massimo, che superano la concentrazione minima tossica (CMT), oltre la quale si possono verificare degli effetti collaterali, e punte di minimo, inferiori alla concentrazione minima efficace (CME), in cui il farmaco non ha effetto.



**Figura 1.1:** *Concentrazione plasmatica di farmaco in seguito a terapia convenzionale.*

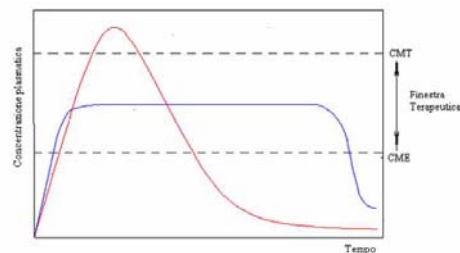
Pertanto al fine di mantenere un livello terapeutico di farmaco, è necessario aumentare la frequenza delle somministrazioni (Figura 1.2). Anche in questo caso, però, si raggiungono livelli di concentrazione ematica elevati, con l'inconveniente dell'instaurarsi di effetti collaterali.



**Figura 1.2:** *Concentrazione plasmatica di farmaco a somministrazione multipla con terapia convenzionale.*

Per questo motivo sono state messe a punto delle forme farmaceutiche in cui i farmaci vengono miscelati a prodotti di origine naturale o sintetica che funzionano da veicolanti, oppure vengono incorporati chimicamente o fisicamente in matrici polimeriche biodegradabili e non biodegradabili per dare sistemi a rilascio controllato. Infatti, questi permettono di ottenere livelli plasmatici terapeutici, compresi tra la minima concentrazione efficace e quella tossica, con un ridotto numero di somministrazioni giornaliere.

Con un'unica somministrazione tali sistemi consentono di mantenere le concentrazioni plasmatiche all'interno della finestra terapeutica per un periodo prolungato di tempo (Figura 1.3).



**Figura 1.3:** Concentrazione plasmatica di farmaco con terapia a rilascio controllato.

Questo produce una maggiore *compliance* del paziente, che in questo modo segue con facilità la terapia, e riduce notevolmente i costi. Lo sviluppo di matrici polimeriche solubili e biodegradabili in condizioni fisiologiche sembra soddisfare i requisiti di un rilascio controllato. Tuttavia questi sistemi polimerici possono influenzare, in virtù delle loro proprietà intrinseche, l'assunzione, la distribuzione e l'eliminazione del farmaco, aumentando da un lato l'efficienza terapeutica e diminuendo dall'altro i livelli di tossicità. I materiali impiegati per la realizzazione di tali sistemi devono possedere determinate caratteristiche; in particolare devono essere:

- chimicamente inerti;
- non tossici;
- non cancerogeni;
- non teratogeni;
- immunocompatibili;
- non devono influenzare l'attività biologica del farmaco;
- devono proteggere il farmaco da processi di alterazione chimica e/o enzimatica.

Le forme a rilascio controllato, però, sono spesso caratterizzate da grande complessità e, proprio per questa ragione, si rende necessaria l'introduzione di particolari cautele che

garantiscono la prevedibilità e la riproducibilità del sistema e prevengano così casi di sovradosaggio o di intolleranza al farmaco.

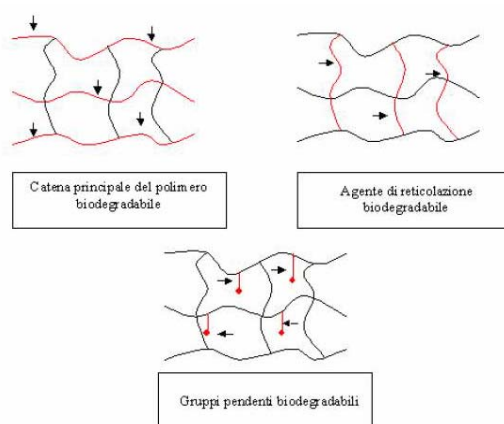
## 1.2 Polimeri come trasportatori di molecole bioattive

Molti materiali polimerici di origine naturale, semisintetica o sintetica, possono essere utilizzati sia come composti ad attività terapeutica intrinseca, sia come *carrier*, cioè molecole in grado di trasportare un farmaco e indirizzarlo verso un sito specifico. Una delle strategie sviluppate per la veicolazione di farmaci mediante *carrier* di natura polimerica prevede l'incorporazione del principio attivo in microparticelle. Le matrici usate per la progettazione di sistemi microparticellari possono essere costituite da polimeri con caratteristiche chimico-fisiche diverse.

In particolare, è possibile distinguere matrici idrofobiche, cioè impermeabili all'acqua, in grado di rilasciare il farmaco incorporato in seguito alla loro biodegradazione nei mezzi biologici con cui vengono a contatto, e matrici idrofiliche, insolubili nei mezzi biologici ma capaci di trattenere acqua e, di conseguenza, rigonfiare. Questi ultimi saranno diffusamente trattati nei successivi capitoli.

### 1.2.1 Polimeri idrofobici

Le matrici idrofobe biodegradabili sono materiali macromolecolari che vengono convertiti in prodotti meno complessi attraverso reazioni chimiche o enzimatiche che possono intervenire a carico della catena principale, dell'agente reticolante o dei gruppi funzionali presenti in catena laterale, come mostrato in Figura 1.4.

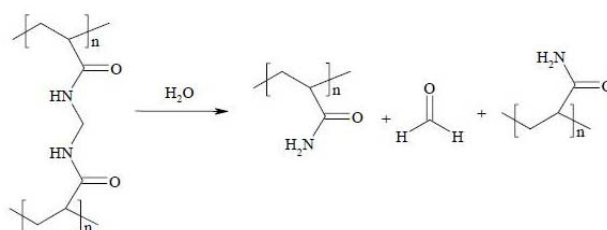


**Figura 1.4:** Punti di degradazione dei polimeri biodegradabili.

Si possono quindi distinguere:

- polimeri reticolati insolubili in acqua, che si solubilizzano in seguito a reazioni di idrolisi coinvolgenti i punti di reticolazione.

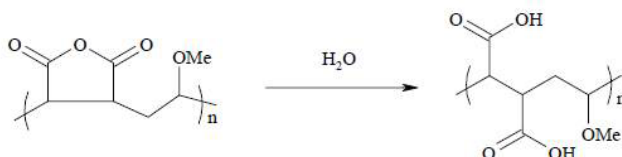
Queste matrici sono costituite da unità ricorrenti ad elevato grado di idrofilia come poliacrilammidi (Schema 1.1), che producono un notevole rigonfiamento in acqua. Tali sistemi sono, pertanto, adatti al rilascio di farmaci macromolecolari (proteine) che a causa delle loro dimensioni rimangono intrappolate all'interno della matrice e non possono fuoriuscire finché la densità dei punti di reticolazione non si è sostanzialmente ridotta. La cinetica di rilascio quindi è direttamente dipendente dalla velocità della reazione di idrolisi.



**Schema 1.1:** Polimeri reticolati solubili in acqua dopo idrolisi coinvolgente i punti di reticolazione.

- polimeri lineari insolubili in acqua, che si solubilizzano in seguito a reazioni di idrolisi o di ionizzazione di raggruppamenti funzionali presenti in catena laterale.

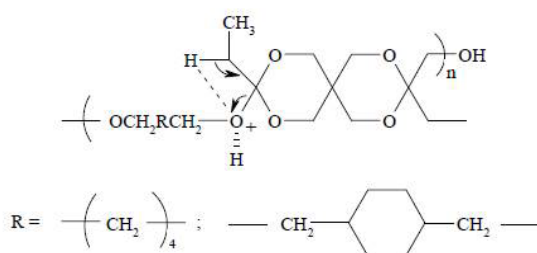
Questi sistemi includono tutti quei polimeri che diventano solubili mediante reazioni di idrolisi, ionizzazione, o protonazione dei gruppi in catena laterale. Esempio classico sono i copolimeri a base di alchilvinil etero e acido maleico o monoesteri dell'acido maleico, i quali diventano solubili grazie alla protonazione dei gruppi carbossilici (Schema 1.2). L'intervallo di pH al di sopra del quale questi copolimeri sono solubili in acqua può essere modificato variando la natura sia del residuo alchilico del vinil etere, che del residuo estereo, agendo quindi sul bilancio idrofilo/idrofobo del copolimero.



**Schema 1.2:** Polimeri lineari solubili in acqua in seguito a reazioni di idrolisi di raggruppamenti funzionali presenti in catena laterale.

- polimeri lineari insolubili, che si solubilizzano in seguito a processi degradativi che hanno luogo a livello della catena principale.

A questo gruppo appartengono esclusivamente policondensati, che contengono in catena gruppi funzionali con unità strutturali idrolizzabili in ambiente fisiologico. Di particolare interesse appaiono le matrici basate su poli(ortoesteri) (Schema 1.3), i quali contengono legami estremamente labili in ambiente acido.



**Schema 1.3:** Polimeri lineari solubili in acqua in seguito a processi degradativi a livello della catena principale.

Il rilascio del farmaco da questo tipo di matrici avviene in seguito ad una diminuzione dell'integrità e ad una conseguente dissoluzione della matrice.

### 1.3 Classificazione dei sistemi a rilascio controllato

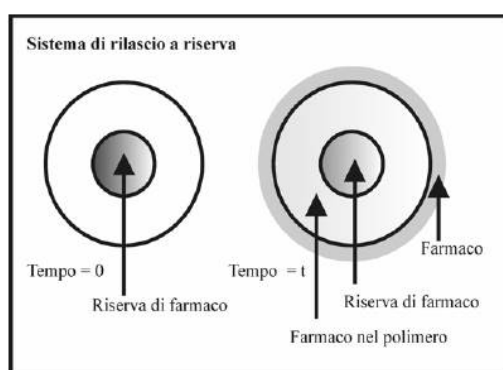
Nel settore delle forme farmaceutiche a rilascio controllato i sistemi destinati alla via orale ricoprono circa il 50% del mercato. La via orale è quella più comunemente sfruttata per la somministrazione sia di forme convenzionali che di sistemi a rilascio controllato soprattutto per l'accettabilità da parte del paziente e la facilità di somministrazione. I più comuni sistemi di rilascio per le sostanze assunte per tale via utilizzano fenomeni di diffusione, dissoluzione, erosione, osmosi, scambio ionico.

#### 1.3.1 Sistemi di rilascio controllati dalla diffusione

Il fenomeno della diffusione è sfruttato sui sistemi polimerici insolubili in acqua. Il rilascio dei principi attivi da polimeri reticolati risulta strettamente dipendente dalle leggi che regolano il fenomeno diffusivo. I sistemi che forniscono un buon rendimento nella veicolazione/rilascio del principio attivo sono i sistemi a matrice e quelli a riserva.

### 1.3.1.1 Sistemi a riserva

I *sistemi a riserva* (Figura 1.5) sono costituiti da un nucleo centrale di farmaco circondato da una membrana polimerica (metil- o etil-cellulosa, poliidrossimetacrilati, idrossipropilcellulosa, polivinilacetato) e il rilascio del principio attivo è regolato dalla prima legge di Fick, nella quale la quantità di farmaco che nell'unità di tempo supera la membrana,  $dm/dt$ , è direttamente proporzionale al coefficiente di diffusione,  $D$  (area/unità di tempo a temperatura costante), alla superficie,  $A$  (area), di diffusione e al gradiente di concentrazione  $dc/dx$ . Il rapporto  $dc/dx$  indica la differenza di concentrazione di soluto tra i due compartimenti in considerazione.



**Figura 1.5:** Sistemi a riserva per il rilascio di principi attivi.

L'equazione che descrive la cessione del principio attivo dipende dalla forma geometrica del sistema. Per una forma piatta e nella quale avvenga la cessione da un solo lato vale l'equazione 1.1:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{A \cdot D \cdot K \cdot \Delta C}{l} \quad \text{Equazione 1.1}$$

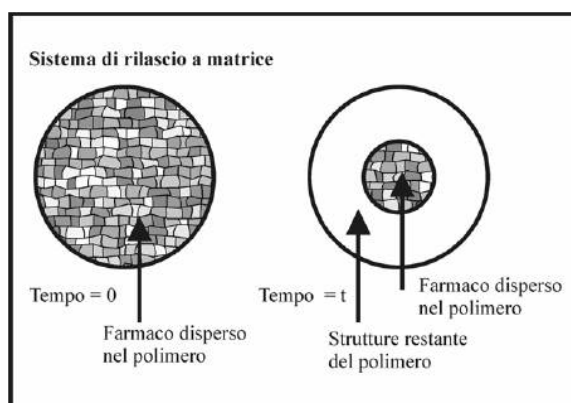
nella quale la velocità di cessione (massa di farmaco ceduta nel tempo),  $dM/dt$ , è direttamente proporzionale all'area superficiale del dispositivo  $A$ , al coefficiente di diffusione  $D$  del farmaco nella membrana, al coefficiente di partizione  $K$  e alla differenza di concentrazione  $\Delta C$  ai due lati membrana. È inversamente proporzionale allo spessore  $l$  della membrana. Si tratta in questo caso di una cinetica di ordine zero per il fatto che la velocità di cessione del farmaco è indipendente dal tempo.

I sistemi che rilasciano il farmaco con una velocità costante vengono definiti ad attività costante e sono caratterizzati da una concentrazione di principio attivo nel compartimento donatore-riserva costante. Ad esempio, quando la riserva è costituita da una sospensione del

principio attivo in un veicolo (acquoso od oleoso) o dalle polvere secca. In queste condizioni, il flusso di liberazione del principio attivo è costante e raggiunge il valore di saturazione. Esistono anche sistemi riserve ad attività non costante in cui non sono raggiunte le condizioni di saturazione del compartimento donatore e la concentrazione del farmaco diminuisce al procedere del rilascio e il flusso di liberazione non è costante ma decresce nel tempo. In questi sistemi il principio attivo può essere semplicemente sciolto in un veicolo acquoso, lipofilo o anche in soluzione micellare o in emulsione.

### 1.3.1.2 Sistemi a matrice

Nei *sistemi a matrice* (Figura 1.6), il farmaco è uniformemente disperso nella matrice di natura polimerica (materiali plastici insolubili metilacrilato-metilmetacrilato, cloruro di polivinile, polietilene) ed è ceduto al mezzo acquoso nel quale prima discioglie e poi diffonde sino a che l'interfaccia solvente/farmaco non si sposta, man mano, verso l'interno.



**Figura 1.6:** Sistemi a matrice per il rilascio di principi attivi.

Poiché la distanza di diffusione del soluto non si mantiene costante nel tempo, ma aumenta continuamente in seguito all'allontanamento del principio attivo, si genera una zona di eluizione il cui spessore cresce progressivamente e il rilascio avviene in regime di diffusione non stazionario, descritto matematicamente dalla seconda legge di Fick (equazione 1.2):

$$\frac{dC}{dt} = \frac{d}{dX} \left( D_{ip} \frac{dC_i}{dX} \right) \quad \text{Equazione 1.2}$$



dove  $C_i$  rappresenta la concentrazione di farmaco,  $D_{ip}$  il coefficiente di diffusione del farmaco nel polimero,  $dC/dX$  il gradiente di concentrazione (differenza di concentrazione di soluto tra i due compartimenti). Il rilascio del principio attivo dipende dalla tipologia di matrice polimerica utilizzata, dalla temperatura di transizione vetrosa del polimero e dal suo peso molecolare. La cinetica di rilascio, che risente dell'influenza di queste variabili, segue una cinetica di ordine diverso da zero.

In relazione alla struttura della matrice si distinguono sistemi matriciali omogenei, eterogenei o granulari. I primi sono sistemi polimerici non porosi formati da una fase continua in cui il soluto diffonde solo se è solubile in essa (meccanismo di diffusione per solubilizzazione); i secondi sono costituiti da materiali porosi in cui la liberazione del farmaco ha luogo per diffusione nel mezzo che bagna i pori. Generalmente, i sistemi monolitici sono sistemi semplici da preparare e sicuri, data l'impossibilità di liberare accidentalmente l'intera dose di farmaco e dotati di buona resistenza meccanica. Tali materiali, tuttavia, presentano l'inconveniente di non essere in grado di rilasciare il principio attivo a velocità costante. Infine, esistono dei sistemi, detti ibridi, costituiti da matrici rivestite da uno strato di polimero che può essere anche di diversa natura da quello che costituisce la matrice. In questo caso si verificano due processi di diffusione, attraverso la matrice e attraverso la membrana e si potrà avere una cinetica di rilascio approssimativamente di ordine zero soltanto se la diffusione attraverso la barriera polimerica è il processo cineticamente determinante e quindi lo stadio lento dell'intero processo di rilascio.

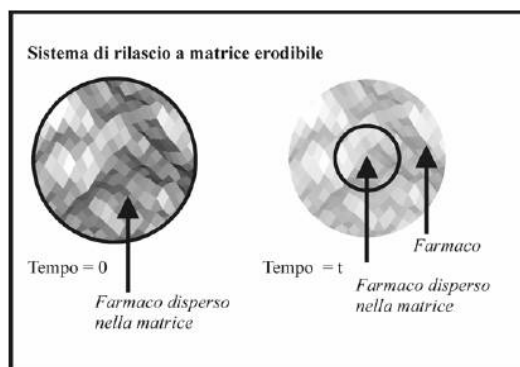
### **1.3.2 Sistemi controllati dalla dissoluzione**

Il fenomeno della dissoluzione viene sfruttato per la possibilità di creare sistemi incapsulati contenenti il principio attivo, dove la cessione del farmaco è determinata dalla velocità di dissoluzione della capsula (nei sistemi incapsulati varia lo spessore del polimero organizzato in microgranuli attorno al farmaco) o anche per la creazione di sistemi a matrice nella quale è disperso il farmaco e nei quali la sua cessione dipende dalla velocità di dissoluzione dalla matrice.

#### **1.3.2.1 Sistemi erodibili**

I sistemi erodibili (Figura 1.7) hanno nella loro costituzione una matrice polimerica atossica erodibile che può essere utilizzata anche nei sistemi per impianto. La cinetica di rilascio, ora, non dipenderà solo dai fenomeni di diffusione o dissoluzione del principio attivo nel mezzo

ma anche da quelli che riguardano la matrice. È possibile controllare questi fenomeni, e quindi stabilirne matematicamente una cinetica, se tra il farmaco e la matrice si siano instaurati legami di tipo covalente, cosicché il rilascio potrebbe essere controllato dall'azione di specifici enzimi presenti nell'organismo umano e il rilascio potrebbe avvenire per fenomeni enzimatici o di idrolisi.



**Figura 1.6:** Sistemi a matrice erodibili per il rilascio di principi attivi.

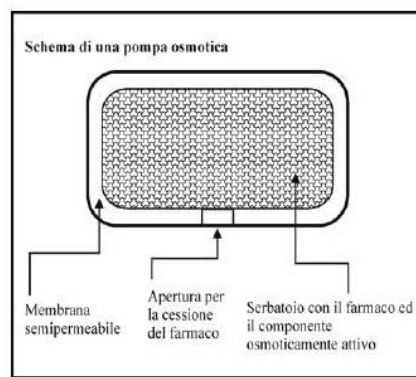
I meccanismi di erosione sono distinti secondo l'idrofilia del polimero in omogenea ed eterogenea. Si verifica una erosione omogenea se il carattere idrofilo del materiale è tale da consentire una rapida penetrazione dei fluidi biologici acquosi nell'intera massa polimerica, ed eterogenea se la degradazione resta confinata alla superficie del sistema in ragione della sua natura idrofoba. Spesso la situazione reale è intermedia tra questi due estremi. L'impiego di polimeri bioerodibili nel campo dei sistemi a rilascio controllato, consentirebbe, soprattutto, di evitare la rimozione chirurgica di impianti dopo esaurimento del farmaco ivi contenuto alla fine del trattamento. Inizialmente per la realizzazione di tali sistemi erano usati polimeri come l'acido poli-lattico, glicolico, già usati come materiali per suture, grazie alla loro biocompatibilità e al fatto che i loro prodotti di degradazione sono completamente atossici. Per gli stessi motivi attualmente vengono proposti polimeri tra cui i polipeptidi.

### 1.3.2.2 Profarmaci macromolecolari

Per i profarmaci macromolecolari, una reazione chimica sta alla base del rilascio del farmaco. Legando chimicamente (con legame ionico o covalente) un farmaco ad un polimero-*carrier* si ottengono coniugati polimero-farmaco. Il legame può instaurarsi soltanto se sia il farmaco, sia il polimero presentano gruppi funzionali idonei. L'idrolisi chimica o enzimatica di questi legami consente il rilascio del principio attivo.

### 1.3.3 Sistemi osmotici

I sistemi osmotici si basano sul passaggio di un soluto (*il farmaco*) attraverso una membrana semipermeabile, capace, in altre parole, d'essere permeabile a particelle di un certo diametro ed impermeabile ad altre di diametro maggiore. Se il sistema contiene una soluzione con caratteristiche di concentrazione maggiori rispetto all'ambiente esterno si genera una pressione (*osmotica*) che tende a riequilibrare il sistema portando al di fuori soluto e favorendo l'entrata di liquidi. Nel caso di un sistema a pompa osmotica (Figura 1.10) esiste un'apertura che facilita la fuoriuscita del farmaco e se il sistema è a volume interno costante ci sarà un pari volume di liquidi (acqua) in entrata.



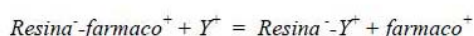
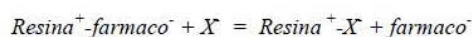
**Figura 1.10:** *Schema di una pompa osmotica.*

Si distinguono pompe osmotiche elementari e generiche a seconda della presenza di uno o due compartimenti separati nel sistema. Il principio di funzionamento è in ogni modo analogo per entrambi i tipi. Attraverso una membrana semipermeabile, l'acqua entra nel compartimento in cui è presente il farmaco e/o un propellente osmotico. L'ingresso dell'acqua provoca nel caso di pompe osmotiche elementari direttamente la fuoriuscita attraverso un opportuno orifizio di un volume di soluzione acquosa del farmaco analogo al volume di acqua introdotto nel sistema, oppure nel caso di pompe osmotiche generiche l'acqua preme su una membrana flessibile il cui movimento determina lo spostamento di un volume corrispondente di soluzione di farmaco. Nelle pompe osmotiche il rilascio di farmaco, dopo un periodo iniziale di latenza, necessario alla soluzione dell'agente attivo e/o dell'agente osmotico si verifica con velocità costante. Quando la concentrazione del principio attivo all'interno delle pompe scende di sotto il valore di saturazione, la velocità di rilascio del farmaco scende rapidamente, fino ad esaurimento del sistema. L'uso di pompe osmotiche, consente di ottenere velocità di

rilascio più elevate rispetto a quelle ottenute con altri sistemi terapeutici, indipendentemente dalla proprietà del principio attivo e dalle differenze dell'ambiente biologico in cui si trovano.

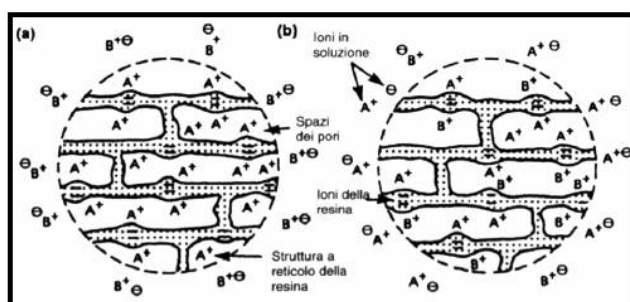
### 1.3.4 Resine scambiatrici

Le resine a scambio ionico sono polimeri organici sintetici caratterizzati da strutture idrocarburiche reticolate cui sono fissati gruppi ionizzabili. Questi possono permutare gli ioni legati ai loro gruppi ionizzati con ioni della stessa carica presenti in soluzione. La tecnologia delle resine scambiatrici anioniche o cationiche si basa sulla fissazione di un farmaco ad una resina che, a contatto con appropriati ioni di carica opposta, dà luogo allo scambio, acquisendo lo ione e cedendo il farmaco favorendone la diffusione nel mezzo. Lo schema può essere riassunto (Schema 1.4) considerando ad esempio due ioni  $X^-$  e  $Y^+$  del tratto gastroenterico.



**Schema 1.4:** Resine scambiatrici anioniche o cationiche.

In una resina a scambio ionico quindi si potranno osservare i siti di scambio fissi prima e dopo la reazione di scambio (Figura 1.11):



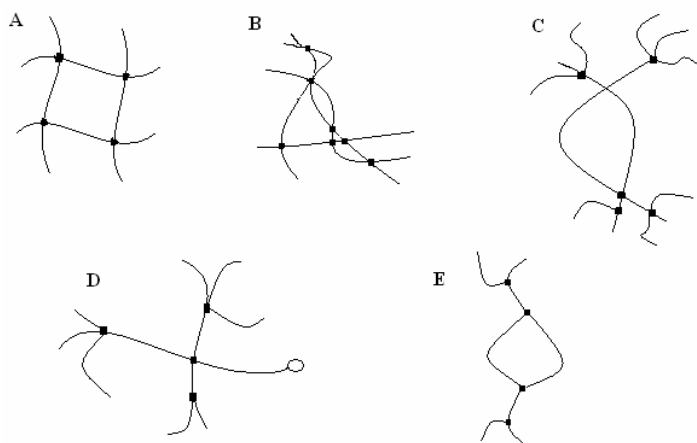
**Figura 1.11:** Resina a scambio ionico nello stato iniziale prima della reazione di scambio con il catione  $B^+$  (a); nello stato di equilibrio (b) dopo la reazione di scambio con il catione  $A^+$ .

La capacità di una resina di scambiare uno ione con un altro dipende dalla sua affinità per lo ione e dalla concentrazione degli ioni in soluzione. La velocità di diffusione è direttamente proporzionale all'area di diffusione, inversamente proporzionale alla lunghezza del percorso

di diffusione attraverso la resina e alla quantità/qualità dei legami crociati nella resina. La velocità di cessione dipende dalla concentrazione ionica nella resina. La velocità di rilascio di farmaci basici da resine a scambio cationico dipende dal diametro dei grani della resina, dal grado di reticolazione all'interno della resina e dal pKa dei gruppi ionizzabili della resina. Le resine a scambio anionico come le resine poliamminometileniche e poliamminostireniche sono state usate come antiacidi. Le resine a scambio ionico sono impiegate per prolungare l'azione dei farmaci formando complessi con essi.

#### 1.4 Idrogel: definizione, sintesi e proprietà

Gli idrogel sono strutture polimeriche reticolate in grado di assorbire un'elevata quantità di acqua o fluidi biologici (Brannon-Peppas e Harland, 1986). Una valutazione strutturale degli idrogel rivela che un reticolo ideale può essere osservato raramente. In Figura 1.12 A è riportato un reticolo macromolecolare ideale in cui è possibile distinguere punti di reticolazione tetrafunzionali (*junction*). Tuttavia, in reticoli reali è possibile incontrare giunzioni multifunzionali (Figura 1.12 B) o aggrovigliamenti molecolari dovuti alla presenza di interazioni non covalenti (Figura 1.12 C). Infine, è sempre possibile imbattersi in idrogel con difetti molecolari. In figura 1.12 D e 1.12 E sono riportati due di questi difetti: estremità funzionali non reagite con parziali aggrovigliamenti (1.12D) e "loop" (1.12 E). Né l'uno né l'altro di questi effetti contribuisce alle proprietà fisiche e meccaniche del reticolo polimerico.

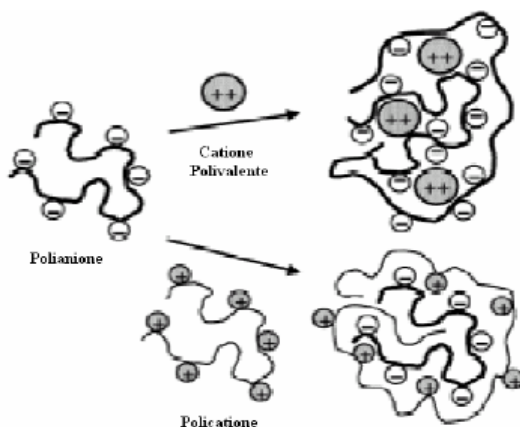


**Figura 1.12:** Tipologie di reticoli polimerici.

I termini "*junction*" o "*tie-point*" (rappresentato dal cerchio indicato in Figura 1.12 D) indicano i punti di connessione di una serie di catene. Queste giunzioni possono interessare legami carbonio-carbonio o possono derivare da un'associazione di molecole che

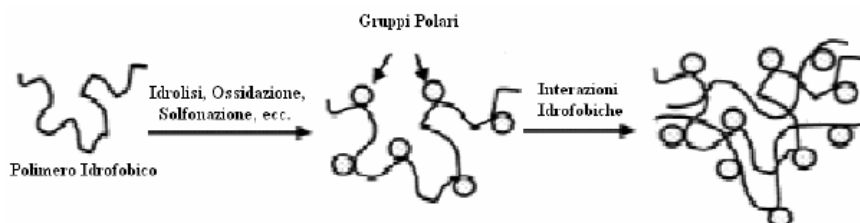
interagiscono tramite forze di Van der Waals, legami a idrogeno e altre interazioni deboli (idrogel fisici) o legami covalenti (idrogel chimici) (Hickey e Peppas, 1995).

I primi possono essere sintetizzati per interazione di un poli-anione con un catione metallico polivalente o con un poli-catione (Figura 1.13).



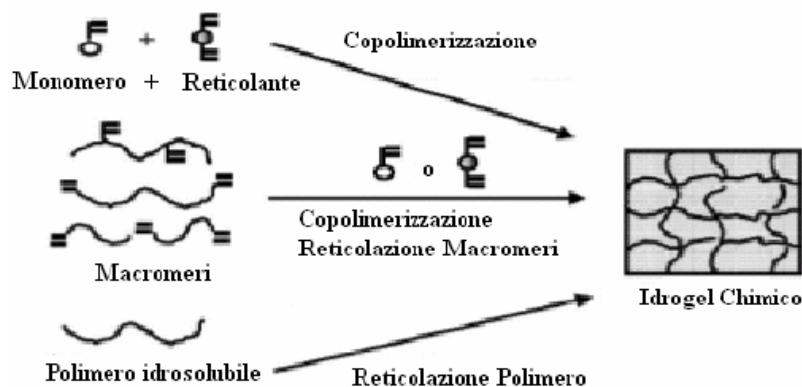
**Figura 1.13:** Sintesi di idrogel fisici tramite interazioni ioniche.

Alternativamente è possibile introdurre gruppi polari su una catena polimerica attraverso opportune reazioni chimiche. Tali gruppi interagendo attraverso interazioni idrofobiche conducono alla formazione di un reticolo polimerico (Figura 1.14).



**Figura 1.14:** Sintesi di idrogel fisici tramite interazioni idrofobiche.

Gli idrogel chimici invece vengono sintetizzati tramite reazioni di polimerizzazione che generalmente prevedono il passaggio attraverso un intermedio di natura radicalica. In letteratura, sono inoltre riportati diversi esempi che, sfruttando ad esempio reazioni di policondensazione, generano strutture polimeriche idrorigonfiabili (Figura 1.15).



**Figura 1.15:** Sintesi di idrogel chimici.

Grazie alla natura idrofila delle catene polimeriche, gli idrogel risultano termodinamicamente compatibili con l'acqua; questa caratteristica permette loro di rigonfiare nei mezzi acquosi (Flory e Renher, 1943). Gli idrogel trovano molte applicazioni sia in campo biomedico sia farmaceutico in quanto grazie alle loro proprietà risultano molto simili ai tessuti viventi più di ogni altro materiale sintetico (Peppas e Langer, 1994). Gli idrogel vengono utilizzati come lenti a contatto, membrane per biosensori, materiali per la realizzazione di pelle artificiale e congegni per il rilascio modificato di farmaci (Park, 1997; Peppas, 1997).

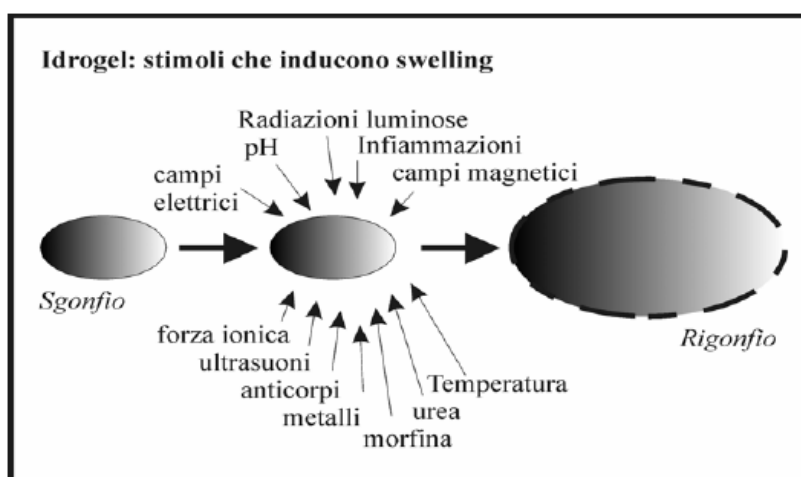
In base al metodo di preparazione, alla carica ionica e alle caratteristiche strutturali, gli idrogel possono essere classificati in una serie di categorie. Tenendo conto del metodo di preparazione, è possibile distinguere omopolimeri, copolimeri, multi-polimeri e strutture polimeriche interpenetrate. I primi sono reticoli polimerici contenenti unità ripetitive identiche, mentre i copolimeri sono strutture reticolate costituite da due co-monomeri di cui almeno uno di natura idrofilia che rende idrorigonfiabile il materiale (Peppas e al., 1999). Infine, gli idrogel polimerici interpenetrati sono preparati sintetizzando un primo reticolo che è quindi rigonfiato in un monomero. In seguito a polimerizzazione di quest'ultimo si osserva la formazione di una seconda struttura polimerica interna alla prima. In base alla natura dei gruppi funzionali presenti in catena laterale, gli idrogel possono essere classificati in neutri o ionici. Tenendo conto della morfologia del reticolo polimerico possiamo distinguere idrogel amorfi, semicristallini, strutture supramolecolari e aggregati idrocolloidali. Infine, la struttura del reticolo permette di parlare di idrogel macroporosi, microporosi e non porosi. Una caratteristica fondamentale degli idrogel è rappresentata dalla loro elevata permeabilità; tale proprietà risulta particolarmente importante soprattutto nel campo del rilascio controllato dei

principi attivi. In questo campo di ricerca, come in altri, la performance del sistema polimerico dipende in gran parte dalla sua struttura tridimensionale.

### 1.5 Idrogel sensibili all'ambiente esterno

Gli idrogel hanno trovato una notevole applicazione in campo biomedico e farmaceutico grazie alla loro elevata biocompatibilità. In particolare, sistemi in grado di rigonfiare in conseguenza di uno stimolo derivante dall'ambiente esterno si sono dimostrati particolarmente interessanti ed efficienti.

Sono stati studiati numerosi stimoli esterni che inducendo un rigonfiamento della matrice polimerica determinano il rilascio di principio attivo (pH, temperatura, ultrasuoni, campi elettrici o magnetici, ecc.) (Figura 1.16) (Kost e Langer, 2001; Yong e Park, 2001; Gupta e al., 2002; Myiata et al., 2002; Kashyap et al., 2005).



**Figura 1.16:** Stimoli che inducono rigonfiamento/collassamento dell'idrogel.

Negli ultimi anni, è stato di grande interesse la ricerca su idrogel che rispondessero all'ambiente o in conformità a stimoli fisiologici. Si può ben capire come è stato importante lo studio di questa tipologia di idrogel se si fa riferimento all'ambiente nel quale questa particolare forma farmaceutica può ritrovarsi dopo somministrazione e al suo comportamento a contatto con i liquidi biologici. Questi idrogel mostrano drastici cambiamenti nel loro rapporto di *swelling* attraverso cambiamenti del pH esterno, della temperatura, forza ionica, radiazioni elettromagnetiche ed altri ancora. Un altro vantaggio degli idrogel è che possono provvedere alla protezione dei farmaci da un ambiente potenzialmente ostile, a livello del sito di rilascio, serbandoli all'interno del reticolo polimerico in attesa dello stimolo al rilascio.



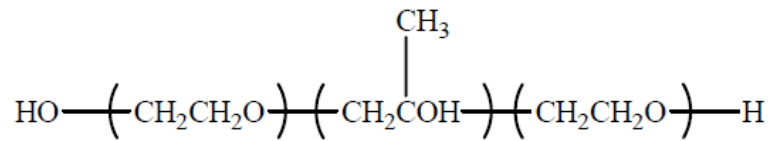
## 1.6 Sistemi di rilascio termo-sensibili

Molti polimeri mostrano proprietà di transizione di fase in risposta ad una variazione di temperatura (Bromberg e Ron, 1998).

Si deve dare, in prima istanza, una definizione che servirà a completare la comprensione del comportamento al variare della temperatura relativo ai sistemi bifasici polimeri-acqua. Per meglio definire tale comportamento si fa riferimento alla temperatura critica di soluzione inferiore (LCST), che per un sistema bifasico rappresenta la temperatura limite, al di sotto delle quale il sistema risulta completamente miscibile e al di sopra di tale valore le due fasi sono invece immiscibili. Per i sistemi polimerici la LCST è intesa come quel valore di temperatura limite, al di sotto del quale la matrice interagisce con il solvente (generalmente acqua), rigonfiando. Contrariamente, un valore di temperatura superiore alla LCST implica una completa repulsione per il solvente e una conseguente contrazione della matrice polimerica. Analogamente, esiste un valore di temperatura critica di soluzione superiore (UCST), che riferita sempre ad un sistema bifasico, rappresenta la temperatura massima al di sopra della quale i componenti risultano totalmente miscibili e, viceversa, al di sotto. Lo stesso concetto può essere esteso ai sistemi bifasici polimero-solvente, osservando un comportamento di rigonfiamento (*swelling*) a valori superiori alla UCST, e di contrazione (*shrinking*) a valori più bassi della UCST. I polimeri che possiedono una LCST esibiscono un comportamento conosciuto come *swelling* inverso o negativo dipendente dalla temperatura. La caratteristica comune dei polimeri sensibili alla temperatura con *swelling* inverso è la presenza di gruppi idrofobici come metili, etili o propili. Gli idrogel con *swelling* inverso sono costruiti con catene polimeriche che possiedono gruppi moderatamente idrofobici (nel caso di gruppi troppo idrofobici le catene polimeriche potrebbero non dissolvere in acqua completamente) o contengono miscele di segmenti idrofobici ed idrofilici. A bassa temperatura, i ponti idrogeno tra i segmenti idrofilici delle catene polimeriche e le molecole d'acqua sono dominanti, portando ad una aumentata idratazione. All'aumento della temperatura le interazioni tra i segmenti idrofobici si fanno più forti e i ponti idrogeno divengono più deboli. Il risultato netto è la contrazione dell'idrogel dovuta alle associazioni tra le catene polimeriche attraverso le interazioni idrofobiche. In generale, se le catene polimeriche contengono più costituenti idrofobici, la LCST diminuisce (Schild, 1995). La LCST può essere modificata cambiando il rapporto tra i segmenti idrofilici e quelli idrofobici del polimero. Una via è quella di costruire copolimeri costituiti da monomeri idrofilici (es.

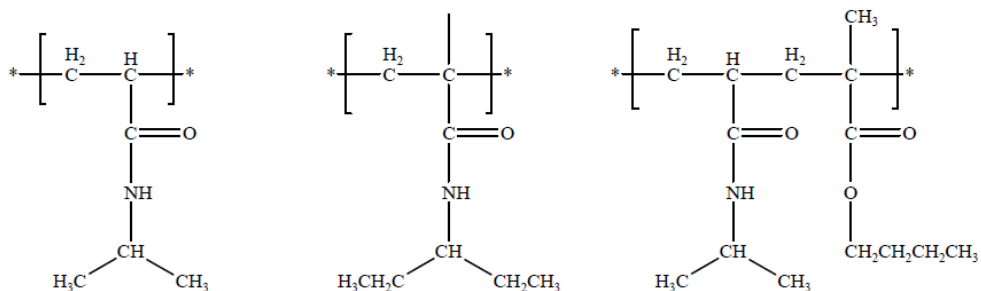
acido acrilico) e idrofobici (es. NIPAAm) (Feil e al., 1992; Hirotsi, 1993, Irie, 1993; Spizzirri e al., 2011).

Se le catene del polimero nell'idrogel non sono legate da legami covalenti, gli idrogel termo-sensibili possono subire la transizione di fase da sistema colloidale in forma liquida, *sol*, a forma semisolida, *gel*, invece della transizione *swelling-shrinking*. I gel termicamente reversibili, con inversa dipendenza dalla temperatura, divengono *sol* a temperatura più alte. I polimeri che mostrano questo comportamento sono copolimeri a blocchi di polietilenoossido (PEO) e polipropilenoossido (PPO) conosciuti come Pluronic® (Figura 1.17).



**Figura 1.17:** Rappresentazione schematica del copolimero a blocchi PEO-PPO-PEO.

Il blocco idrofobico di PPO può essere rimpiazzato con un altro polimero idrofobico. Per esempio, il PEO copolimerizzato con l'acido polilattico mostra lo stesso comportamento termo-reversibile. In questo caso l'acido polilattico rende il materiale particolarmente biodegradabile. Esempi di polimeri termo-sensibili sono poli(N-isopropilacrilammide) (pNIPAAm), poli(N,N-isopropilacrilamide) (pDEAAm) e il copolimero costituito da NIPAAm e metacrilato di butile (BMA) (p(NIPAAm-co-BMA)). I primi due sono due omopolimeri largamente utilizzati con una temperatura di transizione intorno a 30-32°C che trovano utilizzo in campo farmaceutico nella veicolazione e il rilascio di terapeutici soprattutto per applicazioni topiche; il terzo è un copolimero del NIPAAm che ha come monomero il butil-metacrilato che è un gruppo con la funzione di modificare opportunamente la LCST (Figura 1.18).



**Figura 1.18:** Rappresentazione schematica degli omopolimeri pNIPAAm, pDEAAm e p(NIPAAm-co-BMA).

### 1.6.1 Cinetica e termodinamica dello *swelling-deswelling*

Il processo di rigonfiamento di un idrogel è legato alle interazioni che si instaurano dal mescolamento di una fase polimerica con un solvente e dalla reazione elastica che il polimero esplica sul solvente. I vari contributi che influenzano il fenomeno dello *swelling* possono essere descritti in termini di potenziali chimici:

$$\eta - \eta_0 = (\Delta\eta)_{\text{elas}} + (\Delta\eta)_{\text{mix}} + (\Delta\eta)_i + (\Delta\eta)_{\text{elect}} \quad \text{Equazione 1.3}$$

dove

$(\Delta\eta)_{\text{elas}}$ : variazione di potenziale chimico del solvente legata alla diversa configurazione assunta dalle catene polimeriche rispetto alla configurazione di equilibrio che il network polimerico assume a reticolazione avvenuta.

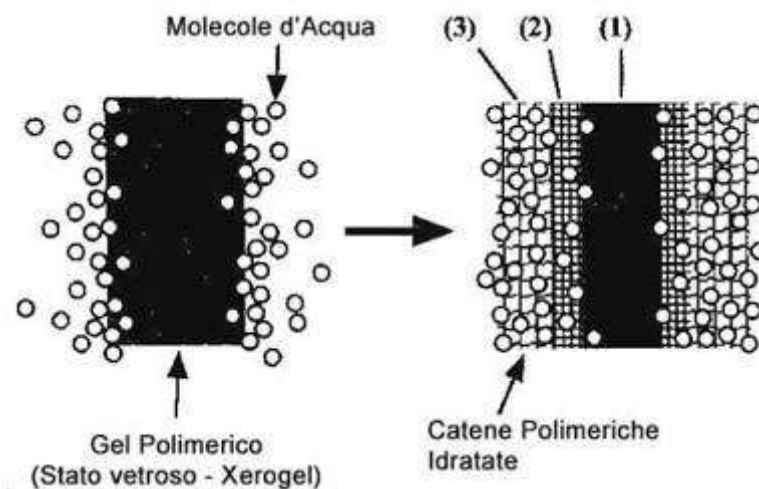
$(\Delta\eta)_{\text{mix}}$ : variazione di energia libera che subisce il solvente in seguito alla miscelazione con il polimero.

$(\Delta\eta)_i$ : variazione di energia libera dovuta alla differente concentrazione di ioni mobili all'interno e all'esterno dell'idrogel rigonfio.

$(\Delta\eta)_{\text{elect}}$ : energia connessa alla repulsione elettrostatica che nasce tra le cariche fisse delle catene polimeriche.

Quando all'equilibrio si verifica una variazione del potenziale chimico dovuto alla variazione di temperatura, l'idrogel tenderà a portarsi ad una nuova configurazione di equilibrio, espellendo (*deswelling*) o assorbendo (*swelling*) fluido all'esterno.

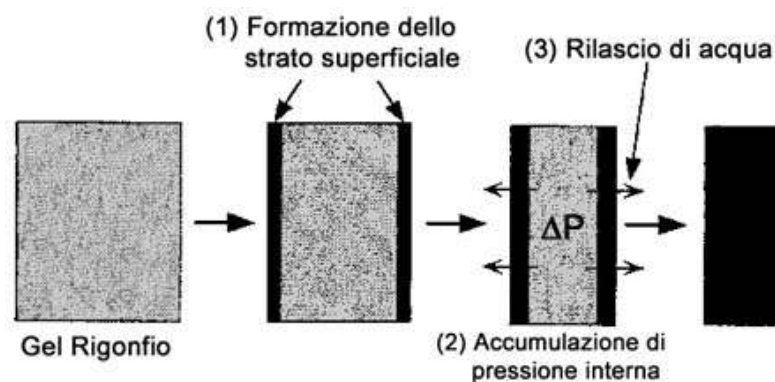
Il processo di *swelling* può essere suddiviso in 3 fasi, come mostrato in Figura 1.19:



**Figura 1.19:** Rappresentazione schematica delle tre fasi di *swelling* di un gel.

1. Diffusione di molecole d'acqua nel network polimerico (*FASE 1*);
2. Rilassamento delle catene polimeriche a causa dell'idratazione (*FASE 2*);
3. Espansione del network polimerico nel volume di acqua circostante (*FASE 3*).

Quando non avvengono cambiamenti configurazionali del *network* polimerico o quando la velocità di diffusione di penetrazione dell'acqua nel polimero è molto più grande di quella del processo di rilassamento del polimero idratato lo *swelling* è governato dalla diffusione delle molecole di solvente attraverso il polimero (*FASE 1*). Quando la velocità di diffusione del solvente è molto più piccola della velocità di rilassamento, il rilassamento diviene la causa principale dell'idratazione del polimero (*FASE 2*). Quando il processo di espansione domina, la cinetica di rigonfiamento è regolata dalla diffusione collettiva (*FASE 3*). Nel momento in cui la temperatura di un idrogel termosensibile arriva alla sua temperatura di collassamento si osserva un fenomeno di *deswelling*, come mostrato in Figura 1.20.



**Figura 1.20:** Schematizzazione del processo di *deswelling*.

Un aumento della temperatura produce un restringimento della superficie esterna più calda con formazione di uno strato più denso rispetto alla zona interna (*FASE 1*). In seguito alla formazione dello strato superficiale, un'ulteriore fuoriuscita di acqua viene ad essere inibita a causa di problemi di diffusione dal cuore gelatinoso (*FASE 2*).

Dopo questa fase si ha la formazione di bolle sulla superficie dovute all'accumulo di pressione idrostatica all'interno dell'idrogel (l'acqua vorrebbe uscire dal gel, ma incontra l'opposizione dello strato, rompendo la continuità dello strato esterno e definendo una via di uscita per le molecole d'acqua). L'acqua viene rilasciata attraverso queste bolle e il gel ricomincia a collassare lentamente.

I cambiamenti nello *swelling-deswelling* influenzano anche le proprietà fisiche e l'aspetto dell'idrogel. Gli idrogel sono quasi trasparenti nello stato rigonfiato, ma cominciano ad essere opachi in seguito a variazioni di temperatura.

### **1.6.2 Classificazione degli idrogel termo-sensibili**

Come precedentemente detto, gli idrogel in grado di cambiare la propria affinità per il mezzo acquoso in funzione della temperatura possono essere classificati in sistemi a rilascio termo-sensibili negativamente, sistemi a rilascio termo-sensibili positivamente e gel termicamente reversibili. In particolare i primi rappresentano i sistemi termo-sensibili che più diffusamente sono stati oggetto di studio per la loro grande versatilità e applicabilità in campo biomedico e farmaceutico.

#### **1.6.2.1 Sistemi a rilascio termo-sensibili negativamente**

Per questi materiali si fa riferimento ad una temperatura critica di soluzione inferiore (LCST) e si osserva un rigonfiamento a temperature inferiori alla LCST e una contrazione di volume a temperature più alte della LCST. L'idrogel di riferimento per questa categoria di materiali è un gel a base di p(N-isopropilacrilammide) (Dautzenberg e al., 2000; Gil e Hudson, 2004).

Gli idrogel di N-isopropilacrilammide sono anche altamente biocompatibili e poiché la LCST è prossima alla temperatura corporea sono considerati dei candidati ottimali per il rilascio di farmaci. I copolimeri di NIPAAm sono stati studiati per il rilascio orale di calcitonina (Serres e al., 1996) ed insulina (Yong-Hee e al., 1994): essi rimangono stabili durante il passaggio nello stomaco, mentre ai pH alcalini dell'intestino si disintegrano liberando il farmaco. La LCST può essere modulata variando sia il peso molecolare e la concentrazione (Fujishige e al., 1989), sia il bilanciamento idrofobico-idrofilico tra il NIPAAm e un secondo componente presente nel reticolo polimerico. I comonomeri idrofobici fanno diminuire la LCST, mentre quelli idrofilici provocano l'effetto contrario (Kuckling e al., 2000; Principi e al., 2000).

Wang e al. (1998) hanno investigato la transizione conformazionale che subiscono le catene di p(NIPAAm), notando la presenza di due stadi intermedi, che porta a quattro gli stati termodinamicamente stabili dell'idrogel. Nello stato globulare l'idrogel contiene ancora il 66% di acqua. Washington e Steinbock (2001) hanno sintetizzato, per la prima volta mediante la tecnica della polimerizzazione frontale un idrogel di p(NIPAAm) utilizzando come reticolante la N'N'-metilenbisacrilammide e come iniziatore il persolfato di ammonio. La polimerizzazione frontale è stata condotta in soluzione di dimetilsolfossido poiché la

temperatura del fronte raggiungeva valori superiori alla temperatura d'ebollizione dell'acqua e questa sarebbe evaporata prima della polimerizzazione del monomero. Attraverso analisi del microscopio a scansione elettronica gli autori hanno confrontato la morfologia e la struttura microporosa dell'idrogel sintetizzato mediante polimerizzazione frontale con un medesimo campione sintetizzato in un bagno ad olio a 60°C per un'ora dimostrando che per quello sintetizzato in polimerizzazione frontale, la struttura spugnosa microporosa possiede una migliore uniformità e maggiore ampiezza dei pori. La dimensione ben definita dei pori ottenuti mediante polimerizzazione frontale è attribuibile al rapido aumento della temperatura del fronte di polimerizzazione che impedisce eventuali separazioni di fase macroscopiche, micro-aggregazioni e la sedimentazione dei domini a differente densità.

Hitotsu et al. (1987) hanno proposto la reticolazione del NIPAAm con piccole quantità di copolimeri ionici per la sintesi di gel in cui la LCST risulta più aumentata. Anche Beltran et al. (1991) hanno lavorato con gel di NIPAAm contenenti comonomeri ionici, osservando risultati simili a quelli precedentemente descritti (Tanaka, 1978). Hoffman ha proposto l'applicazione del NIPAAm e dei suoi copolimeri per il rilascio di farmaci temperatura-sensibili attraverso la pressione e la regolazione superficiale (Hoffman, 1987). Nel sistema "*bulk squeezing*", il farmaco che è distribuito all'interno della matrice viene espulso fuori dal sistema a causa del collassamento dell'idrogel, come conseguenza dell'aumento della temperatura dell'ambiente al di sopra della temperatura di transizione di fase del sistema.

Nel sistema "*surface regulation*", il rapporto di rigonfiamento dello strato di pelle aumenta quando la temperatura del sistema si abbassa al di sotto della temperatura di transizione di fase, e dunque le molecole di farmaco potranno diffondere attraverso lo strato di pelle. Chen ed Hoffman (1995) hanno preparato gel di NIPAAm-g-AA che esibivano un comportamento pH e temperatura-sensibile. Questi gel erano capaci di rispondere rapidamente a cambiamenti sia di pH che di temperatura. Il comportamento di rigonfiamento temperatura e pH dipendente era più pronunciato nei copolimeri graffati rispetto ai copolimeri casuali contenenti simili quantità di componenti pH e temperatura sensibili.

Il gruppo di Okano (Yoshida e al., 1995; Kanebo e al., 1996; Kanebo e al., 1998) ha sviluppato un metodo ingegnoso per preparare idrogel graffati di NIPAAm. La catena principale del NIPAAm reticolato contiene parti di NIPAAm a basso peso molecolare. Per valori di temperature sopra la LCST, le regioni idrofobiche apparivano nei pori del gel, provocando un rapido collasso. Questi materiali avevano la capacità di contrarsi partendo da

una conformazione completamente rigonfia in 20 minuti, mentre gel simili che non contenevano catene graffate richiedevano più di un mese per collassare completamente.

L'abilità del NIPAAm e dei suoi copolimeri nel mostrare una natura idrofilica sotto la LCST ha attratto molti ricercatori, allo scopo di creare superfici per sistemi di coltura cellulare (Okano e al., 1995). La maggior parte delle cellule si attacca e cresce su superfici idrofobiche, come il polistirene. Applicando un rivestimento di un polimero temperatura-sensibile sulla sommità dei dischi di coltura cellulare, le cellule possono essere staccate facilmente seguendo il loro meccanismo naturale semplicemente cambiando la temperatura. Inoue et al. (1997) hanno sintetizzato idrogel graffati con oligomeri con due differenti LCST. Gli idrogel risultanti mostravano due temperature di transizione di fase corrispondenti alle LCST delle catene laterali.

Sono stati riportati anche coniugati del NIPAAm con vari enzimi (Ding e al., 1998). Hoffman ed i suoi collaboratori hanno sintetizzato coniugati di oligomeri di NIPAAm e tripsina. Questi coniugati sono solubili in soluzione e possono catalizzare reazioni enzimatiche. Essi possono poi essere separati dalla soluzione per precipitazione termica. Il recupero dei coniugati attraverso tale tecnica si è dimostrato altamente efficiente anche dopo 14 cicli di variazione di temperatura attraverso la LCST.

Serres e i suoi collaboratori (1996) hanno sviluppato un idrogel di NIPAAm e pAA che è capace di rilasciare un farmaco proteico, la calcitonina, come conseguenza delle variazioni della temperatura. Lavori simili sono stati svolti dal gruppo di Peppas (Vakkalanka e al., 1996). Essi hanno preparato copolimeri a blocchi di NIPAAm e pMAA che hanno l'abilità di rispondere sia alla temperatura, sia al pH. Usando questi materiali, hanno potuto effettivamente modulare le cinetiche di rilascio della *streptochinasi*.

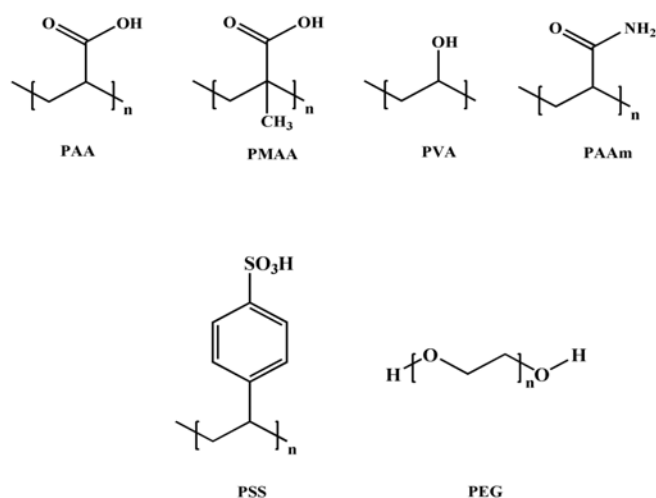
Infine, il NIPAAm insieme al p(AA) forma un polimero interpenetrato, uno dei pochi esempi di idrogel che possiedono una UCST. La temperatura di transizione è di circa 25°C ed è dovuta ai legami ad idrogeno che si instaurano tra le unità di AA e NIPAAm (Aoki e al., 1994).

### **1.7 Idrogel sensibili a stimoli elettrici**

Gli idrogel elettro-sensibili rivestono notevole interesse in settori specifici quali la realizzazione di muscoli artificiali (Bassil e al., 2008), di dispositivi per il rilascio modificato di farmaci sito-specifico (Murdan, 2003) e per la riparazione o l'occlusione di vasi sanguigni danneggiati (Jackson e al., 2013; Jackson e al., 2015a).

Gli idrogel sensibili a stimoli elettrici sono materiali in grado di deformarsi in seguito all'applicazione di un campo elettrico alla soluzione in cui essi si trovano. Generalmente sono costituiti da polielettroliti polimerici, sia naturali che di sintesi, contenenti gruppi funzionali ionizzabili, che risultano i principali responsabili del loro comportamento elettro-sensibile (Hsu e Block, 1996). Alcuni esempi chiave di polimeri naturali elettro-sensibili, o che possono essere resi tali mediante modificazioni chimiche, sono gli idrogel a base di polisaccaridi (chitosano, alginato, acido ialuronico, cellulosa, destrano, gomma xantano, agarosio), di proteine (collagene, gelatina, fibrina, elastina, albumina), polipeptidi e polimeri sintetici (alcool polivinilico, polivinilpirrolidone, polietilenglicole, acido poli(lattico-co-glicolico), acido poli(lattico) e metacrilati) (Moura e al., 2013).

Tra i polimeri sintetici, con caratteristiche di elettro-responsività rivestono particolare interesse gli idrogel a base di poli(acido acrilico) (pAA), poli(acido metacrilico) (pMAA), acido poli(stirene sulfonico) (pSS), poli(vinilalcol) (pVA), poli(acrilammide) (pAAm) e glicole poli(etilenico) (PEG). (Figura 1.21).



**Figura 1.21:** Struttura di omopolimeri sensibili al campo elettrico.

Tutti questi polimeri raramente sono utilizzati come tali, in quanto in forma neutra hanno bassa sensibilità allo stimolo elettrico, per cui si preferisce usare i loro sali, come nel caso dell'acido acrilico, metacrilico e stirene sulfonato, o di modificarli covalentemente, come nel caso dell'alcol vinilico e della poli(acrilammide).

Il problema principale dei polimeri sintetici è che la maggior parte di loro presenta scarsa biodegradabilità *in vivo* e questo favorisce l'insorgere di fenomeni avversi, non desiderati. Polimeri a base di acido acrilico, metacrilico e acrilammide sono scarsamente biodegradabili

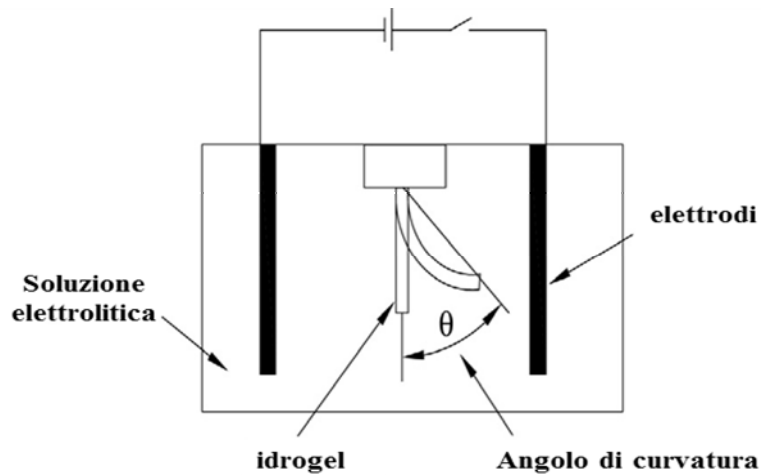


per cui non possono essere usati come tali. Per ovviare a questo tipo di inconvenienti sono stati introdotti in network polimerici insieme a sistemi macromolecolari di origine naturali, caratterizzati spesso da una adeguata biodegradabilità e biocompatibilità. A tale scopo sono stati preparati idrogel elettrosensibili mediante copolimerizzazione di monomeri e reticolanti funzionali, con sistemi naturali o semisintetici, che contengono nella loro struttura gruppi carichi o ionizzabili in soluzione o ancora che possono essere modificati covalentemente per inserire tali gruppi. L'integrazione di molecole naturali in network polimerici combina le peculiari caratteristiche biologiche di tali sistemi, come ad esempio l'affinità e la specificità di legame, con le proprietà modulabili quali resistenza e stabilità meccanica, sensibilità a stimoli esterni ecc., di monomeri e materiali di sintesi (Shiwen e al., 2011). Il p(vinilalcol), al contrario, è completamente biodegradabile e in più ha ottime proprietà chimico-fisiche per cui può essere usato per la sintesi di idrogel biodegradabili elettro-sensibili, modificandone le funzioni ossidriliche pendenti per legarvi covalentemente gruppi carichi come è stato fatto per la preparazione del p(vinil alcol) benzil solfonato (Shiwen e al., 2011).

La risposta di questi idrogel all'applicazione di una tensione elettrica, a specifici voltaggi, determina fenomeni di rigonfiamento (*swelling*), contrazione (*shrinking*), o piegamento (*bending*) sul materiale polimerico, che inducono modificazioni del network, tali da controllare il rilascio di principi attivi (Jackson e Stam, 2015b).

I fenomeni di *swelling* e *shrinking* si verificano quando l'idrogel si trova in posizione perpendicolare rispetto agli elettrodi. Mentre il *bending* si osserva quando il materiale polimerico è disposto in parallelo rispetto agli elettrodi carichi (ma senza toccarli) e un lato del polimero si rigonfia mentre il lato opposto si contrae. In generale, la deformazione della matrice dipende dalla forma del gel e della sua posizione rispetto agli elettrodi.

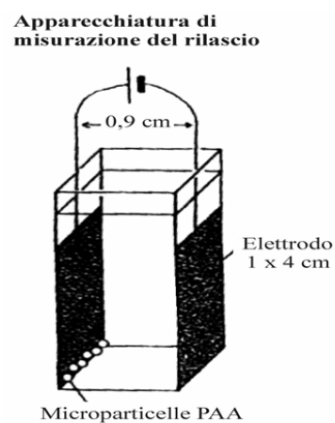
Quando una striscia di gel carica è posta parallelamente rispetto a una coppia di elettrodi, e viene applicata una corrente costante, gli ioni all'interno del gel e gli ioni liberi in soluzione migrano verso l'elettrodo di segno opposto, mentre l'idrogel, grazie alle sue proprietà di neutralità elettrica, resta immobile (Figura 1.22).



**Figura 1.22:** *Idrogel tra due elettrodi sotto effetto del campo elettrico.*

Questo cambiamento d'aspetto, comprendendo *swelling*, *shrinking* e flessione dell'idrogel, trae origine da una serie di fenomeni e condizioni.

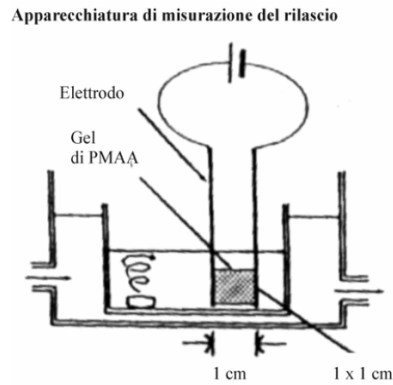
Se la superficie dell'idrogel è a contatto con un elettrodo (Figura 1.23), la risultante del campo elettrico applicato potrebbe essere differente da sistemi dove l'idrogel è posto in acqua (o in una miscela d'acqua e acetone), senza toccare gli elettrodi. Il risultato sarà ancora differente se la fase acquosa contiene elettroliti.



**Figura 1.23:** *Idrogel elettrosensibile a contatto con un solo elettrodo.*

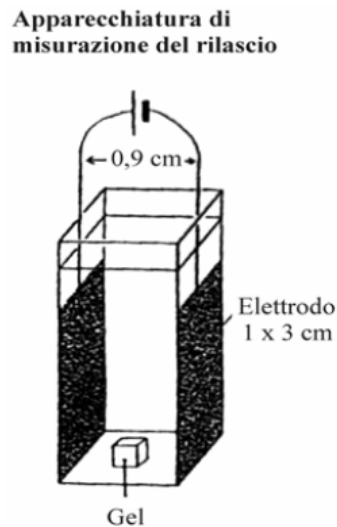
L'idrogel di poliacrilammide o acido polimetacrilico (Figura 1.24), che è a contatto con entrambi gli elettrodi, subisce contemporaneamente il collasso del volume mediante un cambiamento infinitesimale nel potenziale elettrico sul gel. Quando il potenziale è applicato, gli ioni  $H^+$  idratati migrano verso il catodo producendo una perdita d'acqua dal lato

dell'anodo. Allo stesso tempo l'attrazione elettrostatica delle cariche negative dei gruppi dell'acido acrilico verso la superficie dell'anodo crea uno stress (assiale) lungo l'asse del gel, maggiormente dal lato dell'anodo. Questi due eventi simultanei conducono alla compressione dell'idrogel al lato dell'anodo (Gnog e al., 1994).



**Figura 1.24:** Idrogel elettrosensibile a contatto con entrambi gli elettrodi.

Quando un idrogel, costituito da un copolimero di sale sodico dell'acido acrilico e acrilammide, è posto in una soluzione acquosa sotto l'azione di un campo elettrico senza toccare gli elettrodi (Figura 1.25), la tipologia della deformazione dell'idrogel dipende dalla concentrazione degli elettroliti.



**Figura 1.25:** Idrogel elettrosensibile distaccat da entrambi gli elettrodi.

In assenza di elettroliti o alla presenza di bassissime concentrazioni di elettroliti, l'applicazione di un campo elettrico causa la compressione dell'idrogel. Questo è dovuto alla migrazione di  $\text{Na}^+$  al catodo, risolvendosi nel cambiamento dei gruppi carbossilici delle

catene del polimero da  $-\text{COO}^-\text{Na}^+$  a  $-\text{COOH}$  (Shiga e al., 1992). Alla presenza d'alte concentrazioni d'elettroliti nella soluzione, entra più  $\text{Na}^+$  nell'idrogel rispetto a quello che migra dall'idrogel al catodo. Se un tensioattivo cationico è addizionato alla soluzione acquosa, lo *swelling* appare dalla parte del catodo dell'idrogel. Questo è dovuto al movimento delle molecole caricate positivamente del tensioattivo verso il catodo a formare un complesso con le cariche negative delle catene polimeriche dal lato dell'idrogel, affacciato all'anodo.

Quando le particelle microsferiche dell'idrogel sono poste in acqua senza sale, l'applicazione di un campo elettrico determina la compressione dell'idrogel dovuto ad elettrosmosi (migrazione d'acqua) ed elettroforesi (migrazione di ioni) dall'idrogel al catodo (Sawahata e al., 1990). Questa proprietà è stata utilizzata per il rilascio di farmaci modulato mediante l'accensione o lo spegnimento del campo elettrico.

A causa di questo movimento di cariche, la pressione osmotica della rete polimerica, nella porzione di idrogel vicino all'elettrodo verso cui sono migrati i contro-ioni, aumenta e diventa maggiore di quella presente sul lato opposto. Di conseguenza si ha la formazione di un gradiente ionico all'interno dell'idrogel, e questa è la forza motrice che causa la deformazione della matrice polimerica verso l'elettrodo di segno opposto ai contro-ioni (Jin e al., 2013).

In letteratura sono riportati diversi esempi di idrogel a base di polielettroliti, che, in seguito ad applicazione di un campo elettrico, vanno incontro a fenomeni di *swelling*, *deswelling* o *bending*, per l'instaurarsi di un gradiente ionico all'interno dell'idrogel. Tra questi il poli (N-vinilpirrolidone-*co*-acido acrilico) ha mostrato un comportamento elettrosensibile, sotto l'effetto di un campo elettrico applicato (Jin e al., 2013). Dopo l'applicazione di un campo elettrico a corrente continua, strisce di idrogel a base di poli(NVP-*co*-AA), immerse in una soluzione tampone, tendono a ripiegarsi verso l'anodo o verso il catodo a secondo del pH della soluzione elettrolitica in cui sono immersi. Quando lo stimolo elettrico viene rimosso, l'idrogel ritorna alla sua posizione di partenza. Inoltre, se la polarità del campo viene modificata, l'idrogel prima ritorna alla sua posizione iniziale e poi inizia a ripiegarsi verso l'elettrodo opposto (Jin e al., 2013).

La deformazione della matrice polimerica dipende, anche, dalla concentrazione di gruppi carbossilati presenti nel gel. Gel con piccole quantità di gruppi  $-\text{COO}^-$  (circa il 20%) vanno incontro a *shrinking*, mentre gel con elevate quantità di funzioni  $-\text{COO}^-$  (60-100%) vanno incontro a fenomeni di *swelling* (Jin e al., 2013).

La deformazione dell'idrogel, e in particolare il gradiente di pressione osmotica che si sviluppa al suo interno, porta all'espulsione e quindi al rilascio del farmaco dalla matrice polimerica.

Il rigonfiamento e la deformazione degli idrogel elettro-sensibili, in seguito all'applicazione di un campo elettrico, può essere spiegato, dalla teoria della pressione osmotica ( $\pi$ ), che è data dalla differente concentrazione di ioni tra l'interno e l'esterno del gel, sottoposto ad un campo elettrico. Quando la pressione osmotica aumenta si ha l'instaurarsi di un gradiente ionico all'interno del gel e le catene polimeriche, disposte a reticolo, tendono a restringersi.

La differenza di pressione osmotica ( $\Delta\pi$ ), è quindi il fattore principale che, in condizioni statiche, sotto l'effetto di un campo elettrico, determina la curvatura o il rigonfiamento del polimero. Pertanto, in termini matematici, possiamo dire che la pressione osmotica totale ( $\pi_{tot}$ ) è data da Horkay e al., (2000):

$$\pi_{tot} = -V_1^{-1} (\delta\Delta F_{tot} / \delta n_1) = \pi_{el} + \pi_{mix} + \pi_{ion} \quad \text{Equazione 1.4}$$

dove:

- $\pi_{el}$ ,  $\pi_{mix}$  e  $\pi_{ion}$  sono i contributi elastici, di miscelazione e di ionizzazione della pressione totale ( $\pi_{tot}$ ).
- $V_1$  è il volume molare di solvente.
- $n_1$  è il numero di moli del solvente.

L'estensibilità delle catene gioca un ruolo importante nel rigonfiamento e nella deformazione fisica dei gel polielettrolitici. Per i network polimerici costituiti da catene flessibili, la pressione elastica ( $\pi_{el}$ ) è uguale (Flory, 1953):

$$\pi_{el} = -ARTv\phi^{1/3} = -G \quad \text{Equazione 1.5}$$

dove:

- $v$  è la concentrazione di catene elastiche.
- $\phi$  è la frazione volumetrica di polimero.
- $R$  è la costante dei gas.
- $T$  è la temperatura assoluta.
- $A$  è un fattore che dipende dalla natura dei legami.

La pressione osmotica di miscelazione ( $\pi_{\text{mix}}$ ), data dalla miscelazione delle catene polimeriche con le molecole di solvente, può essere descritta dalla seguente equazione (Flory, 1953):

$$\pi_{\text{mix}} = \frac{-RT}{V_1} [\ln(1 - \varphi) + (1 - P^{-1})\varphi + x\varphi^2] \quad \text{Equazione 1.6}$$

dove:

- $P$  è il grado di polimerizzazione. Per polimeri con legami crociati  $P = \infty$ .
- $x$  è il parametro di interazione di Flory-Huggins. Solitamente  $x$  dipende dalla concentrazione di polimeri in soluzione.

Negli idrogel polielettrolitici, si crea una differenza di concentrazione ionica tra l'interno e l'esterno del gel per soddisfare le condizioni di elettroneutralità. Questa differenza di concentrazione si traduce in una differenza di pressione osmotica tra il gel e l'equilibrio in soluzione, descritta dall'equazione di Donnan (Prange e al., 1989; Horkay e al., 2000):

$$\pi_{\text{ion}} = RT \sum_{j=1}^N (c_j \text{ gel} - c_j \text{ sol}) \quad \text{Equazione 1.7}$$

dove:

- $c_j \text{ gel}$  e  $c_j \text{ sol}$  rappresentano la concentrazione di ioni nel gel e nella soluzione all'equilibrio.
- $N$  il numero di ioni mobili nel sistema.

La maggior parte della ricerca, fino ad oggi, si è concentrata sullo sviluppo del materiale elettro-sensibile; tuttavia è necessaria anche l'ottimizzazione dello stimolo indotto dall'esterno, per la specifica applicazione degli idrogel elettro-responsive. Test *in vitro* condotti utilizzando questi dispositivi non hanno evidenziato particolari problematiche, tuttavia alcuni parametri sperimentali risultano essere critici per le applicazioni *in vivo*, in quanto l'applicazione della corrente elettrica può danneggiare i tessuti e avere conseguenze fatali per il paziente. Bisogna quindi individuare quali sono i parametri ottimali di stimolazione che aumentano la capacità di risposta degli idrogel elettrosensibili riducendo i rischi connessi alla stimolazione elettrica *in vivo* (Chatterjee e al., 1986).

Alcuni studi sono stati incentrati sull'ottimizzazione dei parametri di stimolazione elettrica, per idrogel con potenziali applicazioni in campo biomedico e farmaceutico. Di particolare

interesse è lo studio di un idrogel elettrosensibile a base di Pluronic® e sale sodico dell'acido metacrilico in cui sono stati analizzati i principali parametri per l'ottimizzazione della stimolazione elettrica.

I parametri che generalmente devono essere considerati nella progettazione e realizzazione di un *device* in grado di veicolare e rilasciare un principio attivo in funzione di una tensione elettrica esterna sono:

- 1) **Frequenza:** numero di eventi che si ripetono nell'unità di tempo; matematicamente la si esprime in Hz,  $f = \frac{1}{T}$ , e quindi  $1\text{Hz} = \frac{1}{s}$

In risposta alla stimolazione elettrica, all'aumentare della frequenza diminuisce il grado di *swelling* dei polimeri.

- 2) **Impedenza:** la forza che si oppone al passaggio della corrente in un circuito elettrico.

I campioni che rigonfiano in una soluzione ionica hanno un'impedenza più bassa di quelli che rigonfiano in acqua deionizzata. Questo è dovuto al fatto che la soluzione ionica contiene più ioni che rendono gli idrogel più conduttivi.

- 3) **Tempo di rilassamento:** tempo in cui le molecole di polielettrolita in un idrogel non sono in grado di rispondere perché la frequenza di stimolazione è troppo elevata. Per una polarizzazione pulsante, se la frequenza è sufficientemente elevata, l'idrogel elettrosensibile non avrà il tempo di rigonfiarsi durante il periodo in cui viene interrotto il passaggio di corrente (0 V), e di conseguenza prevarrà la sua contrazione (*shrinking*). Una frequenza di polarizzazione minore consente, invece, all'idrogel di rispondere passivamente, rilassandosi e rigonfiandosi (*swelling*), durante il periodo in cui la tensione applicata è 0 V.

- 4) **Spaziatura e configurazione degli elettrodi:** lo *swelling* dell'idrogel, dato dall'applicazione di un campo elettrico, dipende anche dalla spaziatura tra gli elettrodi e dalla loro configurazione. Diminuendo la distanza tra gli elettrodi aumenta, infatti, la contrazione dell'idrogel.

- 5) **Tensione di corrente:** definita anche come differenza di potenziale elettrico, rappresenta il lavoro compiuto per spostare una carica unitaria attraverso il campo da un punto all'altro, cambiata di segno. La tensione di corrente, nel Sistema Internazionale di Unità di Misura, è misurata in Volt. Quello che possiamo osservare per gli idrogel elettrosensibili è che aumentando la tensione di corrente (voltage),

aumenta il *deswelling* dell'idrogel elettro-sensibile in quanto aumenta la quantità di ioni che diffondono all'interno del gel.

Alcuni di questi parametri sono strettamente correlati tra loro, ad esempio la spaziatura tra gli elettrodi e l'ampiezza della tensione o, anche, l'elevato carico di lavoro associato a un'elevata tensione che provoca cambiamento di pH e elettrolisi. È importante considerare che i dispositivi elettrosensibili per uso medico, non devono indurre elettrolisi o variazioni di pH, dunque è necessario una corretta valutazione dei vari fattori affinché non si abbiano sbilanciamenti elettrolitici o di pH.

Al fine di prevedere gli effetti della variazione dei diversi parametri sulla percentuale di *swelling* è stato sviluppato un modello matematico, rappresentato dalla seguente equazione:

$$D = \frac{2,76 \ln(F) - 0,003DC^2 + 0,66DC - 0,448V^2 + 7,29V}{n} \quad \text{Equazione 1.8}$$

dove:

- **D** è la percentuale (%) di swelling dell'idrogel elettro-sensibile
- **F**: è la frequenza espressa in Hz
- **DC**: è il ciclo di lavoro espresso in %
- **V**: è la tensione della corrente elettrica espressa in Volt
- **n**: è una costante che ha un valore pari a 1,13.

Questo modello matematico è valido solo per soluzioni a concentrazioni note di polimero, e serve a prevedere il comportamento dell'idrogel in seguito all'applicazione di un campo elettrico esterno.

Quello che contraddistingue gli idrogel elettro-sensibili da tutti gli altri tipi di idrogel sensibili a stimoli esterni è la possibilità di gestire strumentalmente lo stimolo dall'esterno, con conseguenze immediate sul materiale polimerico. È possibile effettuare un controllo preciso della quantità di corrente che viene fornita al dispositivo, controllare la durata degli impulsi elettrici, gli intervalli tra gli impulsi e altri parametri che modificano l'interazione matrice-mezzo e i profili di rilascio del terapeutico. Il campo elettrico, infatti, può essere applicato e rimosso dall'esterno in qualunque momento, e ciò dà la possibilità di creare profili di rilascio *ON-OFF* del farmaco da impianti opportunamente progettati (Kulkarni e Sa, 2009). Nell'ottica di superare la formazione di cariche, irritazioni e bruciature sulla pelle nell'area

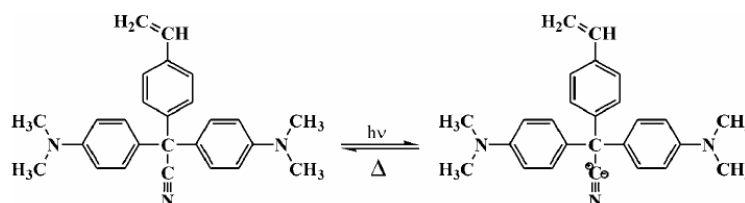


d'applicazione degli elettrodi si è valutata l'opzione di utilizzare una corrente pulsante. La corrente è accesa e spenta a brevi intervalli. Quando il campo elettrico viene annullato, il gradiente di pressione osmotica si stabilizza, diminuendo, e il materiale torna alla sua forma originale, per cui la quantità di principio attivo rilasciato diminuisce nel tempo.

Questo rappresenta senz'altro un notevole vantaggio di gestione della terapia farmacologica che può essere modulata in termini di tempo e luogo andando a minimizzare ulteriormente gli effetti tossici e le problematiche legate a una terapia convenzionale non mirata e non modulata nel tempo.

### 1.8 Idrogel sensibili a stimoli luminosi

Gli idrogel sensibili alla luce hanno potenziali applicazioni nello sviluppo di dispositivi per il rilascio oculare. Potrebbero apportare molti vantaggi nel rilascio controllato di farmaci poiché lo stimolo luminoso può essere applicato istantaneamente e con molta accuratezza. Gli idrogel sensibili alla luce possono essere divisi in sensibili alla luce ultravioletta e sensibili alla luce visibile. Differentemente dalla luce ultravioletta, la luce visibile è facilmente disponibile, sicura, pulita e più facile da manipolare. Gli idrogel UV sensibili sono sintetizzati introducendo, ad esempio, una molecola derivata dalla leucina, come il bis(4-dimetilamino)fenilmetil-leucocianuro, nella rete del polimero (Figura 1.26) (Mamada e al., 1990).



**Figura 1.26:** Modifiche strutturali di bis(4-dimetilamino)fenilmetil-leucocianuro dopo irradiazione UV.

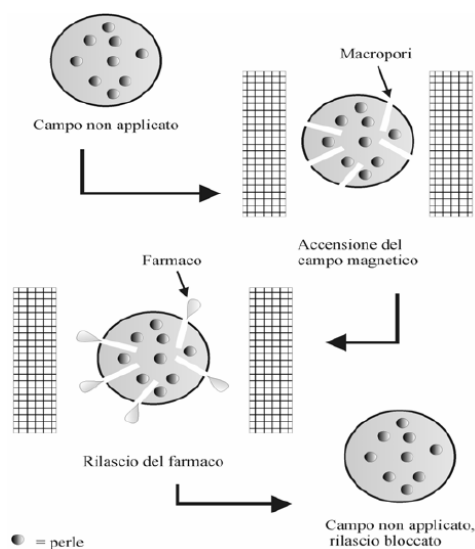
I derivati del leucotrifetilmetano sono normalmente neutri ma dissociano in coppie ioniche sotto irradiazione da raggi ultravioletti producendo cationi trifetilmetilici. Ad una data temperatura, l'idrogel rigonfia per risposta ai raggi ultravioletti e si contrae quando la luce ultravioletta è rimossa. Gli idrogel sensibili alla luce visibile sono preparati introducendo un cromoforo nell'idrogel di poli(*N*-isopropilacrilammide) (Suzuki e Tanaka, 1990). Quando la luce (488nm di lunghezza d'onda) è applicata all'idrogel, il cromoforo assorbe luce che è poi dissipata localmente come calore da transizione senza radiazioni, aumentando la temperatura locale dell'idrogel. L'aumento di temperatura altera lo *swelling* dell'idrogel, come per gli

idrogel termo-sensibili. L'aumento di temperatura è proporzionale all'intensità luminosa e alla concentrazione del cromoforo. Se un gruppo funzionale, come il gruppo ionizzabile dell'acido poliacrilico, è addizionato all'idrogel, questo, sensibile alla luce, diventa anche sensibile ai cambiamenti di pH. Questo tipo di idrogel può essere attivato (collassamento) dalla luce visibile e disattivato (rigonfiamento) dall'incremento di pH (Suzuki e al., 1996).

La luce infrarossa può essere anche usata per suscitare la risposta dell'idrogel in assenza di cromofori. Questo metodo è utilizzabile grazie all'alta assorbanza di luce infrarossa dell'acqua (Zhang e al., 1995).

### 1.9 Sistemi modulati magneticamente

Alcuni studi, hanno dimostrato che l'insulina e altre molecole possono essere continuamente rilasciate da un *carrier* che trasporta l'ormone. Un esempio è il copolimero dell'etilenvinilacetato (EVAc) (Creque e Langer, 1980). La matrice di EVAc-proteina contiene perle magnetiche. Quando il sistema è immerso in un campo magnetico (oscillante) esterno si ha rilascio di principio attivo (Figura 1.27).



**Figura 1.27:** Rilascio di principio attivo dopo applicazione di un campo magnetico.

Ad esempio, in un dispositivo costituito da una matrice polimerica contenente insulina, nel quale sono inserite le perle magnetiche, il livello di glucosio può essere velocemente abbassato, su richiesta fisiologica, mediante l'applicazione di un campo magnetico (Kost e al., 1987).

I fattori critici nel controllare il grado di rilascio in questi sistemi possono essere caratterizzati in due gruppi: le caratteristiche del campo magnetico e le proprietà meccaniche della matrice polimerica. È stato osservato che il grado di rilascio aumenta con l'ampiezza del campo magnetico applicato e, le proprietà meccaniche della matrice polimerica risentono anch'esse dell'aumento dell'intensità del campo magnetico (Edelman e al., 1985). Il modulo d'elasticità del copolimero EVAc può essere, comunque, facilmente alterato cambiando il contenuto di vinilacetato del copolimero (Kost e al., 1986).

### **1.10 Sistemi modulati dagli ultrasuoni**

Una pronunciata erosione di un polimero e il rilascio di farmaco sono stati osservati quando il campione bio-erodibile è stato esposto agli ultrasuoni. Il sistema, risponde rapidamente e reversibilmente all'impulso ultrasonoro. L'aumentato rilascio è stato anche osservato in sistemi non erodibili esposti ad ultrasuoni dove il rilascio è dipendente dalla diffusione. Il grado di rilascio può essere regolato dall'intensità e dalla frequenza degli ultrasuoni (Kost e al., 1988).

Gli ultrasuoni sono stati anche utilizzati per il rilascio di principio attivo attraverso la pelle in dispositivi transdermici. Tale tecnica prende il nome di *fonoforesi* e indica il movimento del principio attivo attraverso la pelle e nei tessuti molli sotto l'influenza delle perturbazioni ultrasonore (Tyle e Agrawalw, 1989).

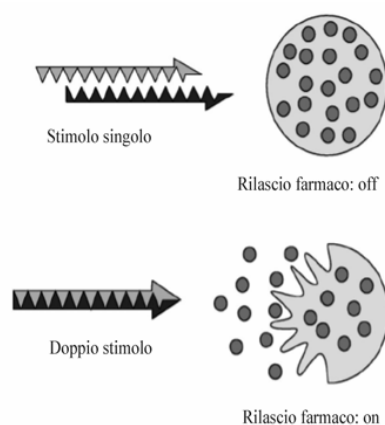
### **1.11 Idrogel sensibili agli enzimi**

I polimeri biodegradabili sono divenuti assai importanti per le loro applicazioni in tessuti ingegnerizzati e nel sistema di rilascio dei farmaci (Hollinger, 1995). Da quando si sono studiati alcuni polimeri biodegradabili e la loro possibilità di essere digeriti da specifici enzimi sono stati preparati idrogel sensibili agli enzimi.

Molti enzimi sono utilizzati come segnali importanti per diagnosi a monitorare molti cambiamenti fisiologici e specifici enzimi, in organi specifici, sono divenuti segnali utili per il rilascio di farmaci sito-specifico. Gli enzimi microbici, che sono presenti a livello del colon, possono essere utilizzati come segnali per il rilascio sito-specifico di farmaci a livello del colon. Gli enzimi microbici nel colon, come la *destranasi*, possono degradare il polisaccaride destrano. Esiste, ad esempio, un idrogel al destrano che forma una struttura reticolata con il di-isocianato per il rilascio di farmaco colon-specifico. Il rilascio di farmaco dall'idrogel di destrano può essere controllato dalla presenza di *destranasi* (Hovgaard e Brondsted, 1995).

Inoltre alcune applicazioni potenziali degli idrogel stanno nella loro capacità di sentire cambiamenti fisiologici, di diversi disturbi, allo stesso tempo. In questo caso si è pensato ad idrogel sensibili a due stimoli contemporanei cioè che possano essere degradati dalla presenza contemporanea di due enzimi, come stimolo biologico.

La rete interpenetrata sensibile a due stimoli può essere costituita da polietilenglicole (PEG) e destrano. Solo la presenza di entrambi gli enzimi, *papaina* e *destranasi*, può indurre la degradazione della rete, mentre la presenza di un solo enzima non è sufficiente (Figura 1.28) (Kurisawa e al., 1997).

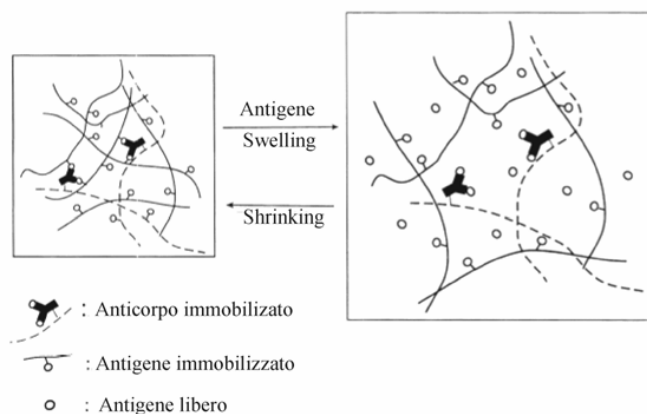


**Figura 1.28:** *Idrogel sensibile a due stimoli.*

### 1.12 Idrogel sensibili agli antigeni

Un anticorpo ha siti di riconoscimento per legare specifici antigeni attraverso legami non covalenti, come legami elettrostatici, legami idrogeno, interazioni idrofobiche e interazioni di van del Waals. Le principali caratteristiche degli anticorpi sono legate con la risposta immunitaria a proteggere l'organismo dalle infezioni. Gli anticorpi sono stati utilizzati in svariate prove immunologiche che utilizzano la loro specificità e versatilità per scoprire sostanze biologiche (Diamandis e Christolopus, 1996).

Così, la funzione specifica di riconoscimento dell'antigene di un anticorpo può fornire le basi per la costruzione di sensori per svariati usi di prove immunologiche e per scoprire gli antigeni. Gli idrogel sensibili agli antigeni sono preparati usando antigene-anticorpo legati a punti di cross-link nell'idrogel (Figura 1.29).



**Figura 1.29:** Rappresentazione di un idrogel sensibile agli anticorpi.

In generale, le maggiori potenzialità degli idrogel sensibili agli stimoli richiedono un comportamento reversibile in risposta ai cambiamenti degli stimoli ambientali. Nel caso degli idrogel contenenti antigene-anticorpo intrappolati, l'anticorpo trasuda dall'idrogel, mentre questo subisce *swelling* per risposta ad uno specifico antigene.

Come risultato della perdita dell'anticorpo, l'idrogel, con intrappolati antigene e anticorpo, non mostra un comportamento reversibile di *swelling/shrinking* in risposta ai cambiamenti in concentrazione di antigene. Quindi, gli idrogel devono essere costruiti per far sì di avere un idrogel sensibile all'antigene reversibile. Per fare questo, l'anticorpo deve essere immobilizzato nella rete cosicché può costruire un complesso con l'antigene innestato alla rete in una soluzione tampone, senza la presenza di antigene libero.

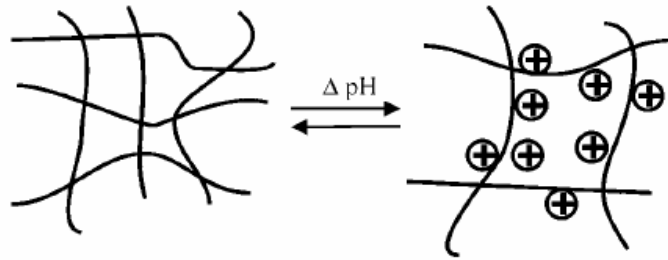
Un idrogel reversibile, sensibile agli antigeni, è stato preparato con la fabbricazione di una struttura a rete polimerica semi-interpenetrante (*semi-IPN*), che consiste in un polimero lineare racchiudente gli anticorpi e una rete contenente gli antigeni. Anche questi idrogel, con antigene e anticorpo intrappolati, con struttura a rete semi-interpenetrante sono capaci di rigonfiare, immediatamente dopo l'aggiunta di immunoglobuline alla soluzione tampone. Ma sono capaci, altresì, di subire modificazioni alla presenza dell'antigene. Per questo, il rapporto di *swelling* è strettamente dipendente dalla concentrazione dell'antigene nella soluzione tampone.

### 1.13 Idrogel pH sensibili

Tutti i polimeri, sensibili alle variazioni di pH, contengono gruppi pendenti acidi (acidi carbossilici e solfonici) o basici (sali di ammonio) che accettano o rilasciano protoni in

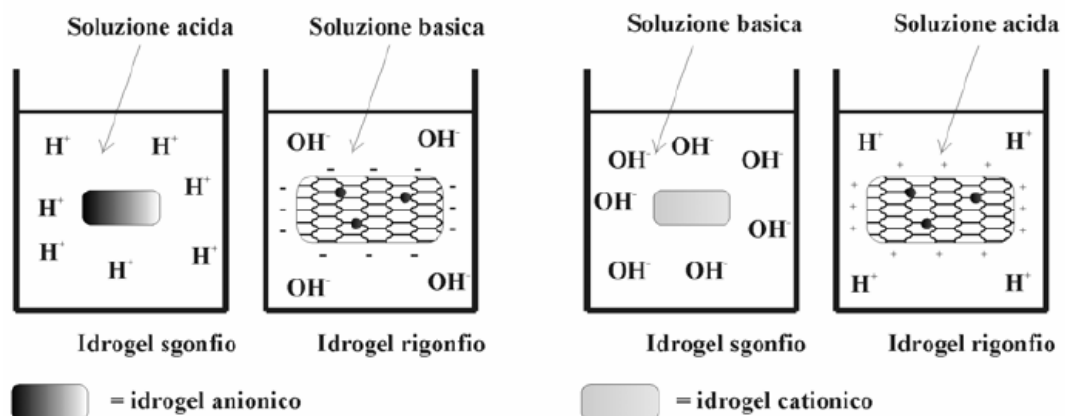
risposta alle modificazioni di pH dell'ambiente circostante. I polimeri con un gran numero di gruppi ionizzabili sono definiti polielettroliti.

In un mezzo acquoso ad un appropriato valore di pH i gruppi pendenti, in seguito a ionizzazione, sviluppano una carica sulla rete polimerica, creando forza elettrostatiche repulsive responsabili dello *swelling* o dello *shrinking* dell'idrogel pH-sensibile. Piccoli cambiamenti di pH si risolvono in significanti cambiamenti nella misura delle maglie della rete polimerica (Figura 1.30).



**Figura 1.30:** Rigonfiamento dell'idrogel in seguito a variazioni di pH.

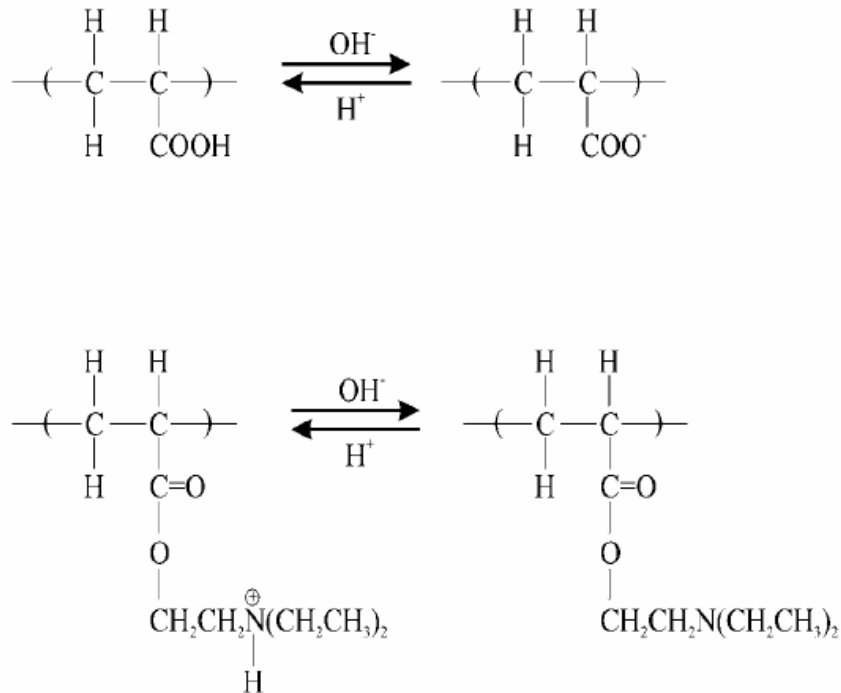
Il rigonfiamento facilitando la diffusione del farmaco tra le catene polimeriche permette al principio attivo di fuoriuscire e di espletare la sua azione terapeutica. I gruppi pendenti degli idrogel anionici non sono ionizzati sotto il valore della pKa della rete polimerica e ionizzati sopra tale valore, portando al rigonfiamento dell'idrogel sopra la pKa del polimero per la forza di *swelling* osmotica attraverso la presenza degli ioni. Al contrario, gli idrogel cationici rigonfiano a valore di pH inferiori a quelli dalla pKa dove le funzioni acide risultano deprotonate. Si assiste ad un differente ed opposto swelling degli idrogel polielettrolitici, quindi, nei due differenti ambienti contenenti un tampone acido o basico (Figura 1.31).



**Figura 1.31:** Rappresentazione schematica del funzionamento di idrogel anionici e cationici.

Due esempi di polielettroliti anionici e cationico sono rispettivamente l'acido poliacrilico e il poli(*N,N'*-dietilaminoetilmetacrilato) (PDEAEM) (Myiata e al., 1999).

In Figura 1.32 è rappresentata l'acido poliacrilico. Questo si presenta nella forma ionizzata a valori di pH inferiori alla pKa dell'acido acrilico. Al contrario il PDEAEM si ionizza a valori di pH superiori alla pKa del *N,N'*-dietilaminoetilmetacrilato. Tuttavia è necessario considerare che i valori delle costanti acide dei singoli monomeri possono subire, a causa dell'intorno chimico presente, piccole variazioni.



**Figura 1.32:** Esempio di polielettroliti anionici (acido poliacrilico) e cationico (poli(*N,N'*-dietilaminoetilmetacrilato)).

La ionizzazione sui poli-elettroliti è più difficoltosa per gli effetti elettrostatici esercitati da gruppi ionizzati adiacenti ma il rigonfiamento, in questo caso, risulta molto più grande rispetto a quello che può essere raggiunto da un idrogel costituito da polimeri non elettrolitici. L'idrogel costituito da acido polimetacrilico innestato con polietilenglicole ha qualità uniche pH sensibili (Kim e al., 2003; Blanchette e al., 2004; Peppas, 2004). A basso pH, i protoni acidi dei gruppi carbossilici dell'acido polimetacrilico interagiscono con l'ossigeno del gruppo etereo del polietilenglicole attraverso i legami ponte idrogeno, così questo complesso genererà la contrazione dell'idrogel. Al contrario quando i gruppi carbossilici dell'acido

polimetacrilico diventano ionizzati ad elevati valori di pH si ha rigonfiamento dell'idrogel per rottura del complesso.

### 1.13.1 Fattori che influenzano lo swelling pH sensibile

I maggiori fattori che influenzano il grado di *swelling* di un polimero ionico includono le proprietà del polimero (carica, concentrazione e pKa del gruppo ionizzabile, grado di ionizzazione, densità dei cross-link, idrofilicità o idrofobicità) e le proprietà del mezzo (pH, forza ionica e valenza) (Kim, 2000).

Insieme ai fattori menzionati, la natura della specie tampone è stata anche rapportata all'effetto sulla cinetica di swelling del polimero. L'equilibrio di *swelling* e il grado di *swelling* del copolimero poli(metilmetacrilato-co-N,N-dimetilaminoetilmetacrilato), ad esempio, è marcatamente dipendente dalla natura del tampone (Firestone e Siegel, 1991). Tale polimero, rigonfiando in soluzione tamponata contenente un acido organico debole raggiunge l'equilibrio in poche ore, con il mezzo non tamponato impiega settimane o mesi a raggiungere l'equilibrio.

Ad un determinato pH e forza ionica, l'estensione dello *swelling* nel tampone con ioni multivalenti (citrato, fosfato) è più basso che in quelli in tampone con ioni monovalenti. Si deve considerare l'effetto della concentrazione nelle specie tamponanti acide sul grado di rigonfiamento di idrogel cationici in tamponi a differente pKa, concentrazione e pH. Il grado *swelling* aumenta col crescere di pKa e concentrazione della specie tampone e al decrescere del pH del mezzo.

Ad ogni cambiamento nella soluzione che incrementa la concentrazione di tampone non ionizzato si ha incremento del grado di *swelling*.

Sono due le maggiori condizioni perché si verifichi lo swelling degli idrogel pH sensibili. La prima è che il pKa del tampone deve essere più basso del pKa dei gruppi amminici del polimero; la seconda è che il rilascio di protoni dalle ammine ionizzabili fisse deve essere un passo limitante nello *swelling* dell'idrogel. Per lo *swelling* pH dipendente degli idrogel ionici deve essere stabilita, quindi, la specie tampone specifica e la sua concentrazione, non dimenticando le condizioni che mimino il comportamento fisiologico.

Il rigonfiamento e la risposta al pH degli idrogel poli-elettrolitici possono essere modificati, altresì, usando comonomeri neutri come il 2-idrossietilmetacrilato, il metilmetacrilato e l'anidride maleica. I diversi comonomeri procurano differenti gradi d'idrofobicità alle catene polimeriche, portando a diversi comportamenti in relazione al pH (Ende e Peppas, 1997).



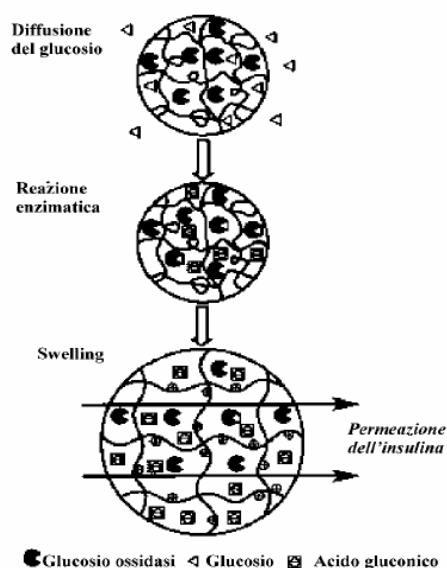
### 1.13.2 Idrogel sensibili al glucosio

Gli organi devono rispondere alla presenza di specifiche molecole, sia nei cambiamenti fisico-chimici, sia di pH e temperatura per mantenere la vita.

L'ultima generazione di biomateriali e di sistemi di rilascio dei farmaci sono costituiti da idrogel sensibili alle variazioni di pH indotte da biomolecole, tra le quali il glucosio, che riconoscono e alle quali rispondono (Pitt, 1986; Heller, 1988).

La concentrazione di glucosio a livello ematico subisce una precisa regolazione. Un decremento o l'assenza della secrezione d'insulina dalle isole pancreatiche è la causa del diabete mellito, una sindrome caratterizzata da iperglicemia stabile ed eventualmente glicosuria. I pazienti affetti da diabete mellito soffrono per un lungo periodo di un graduale declino nell'efficienza di vari organi, occasionalmente anche la perdita della vista. In alcuni casi le condizioni gravi possono anche portare a morte. L'iniezione d'insulina a tempo debito è necessaria per il trattamento dei pazienti diabetici. L'auto-iniezione d'insulina è fastidiosa e dolorosa ed ha la possibilità di sviluppare un coma ipoglicemico dopo una possibile overdose d'insulina. In altri casi, l'insufficiente dose d'insulina può portare ad iperglicemia e ad un insufficiente effetto terapeutico. Così, è nata un'intensa domanda per forme farmaceutiche che prevedessero un preciso ed effettivo rilascio d'insulina, per assicurare un normale apporto nel sangue a controllo dei livelli di glucosio. Il rilascio d'insulina è diverso da qualsiasi altro tipo di rilascio di farmaci, poiché l'insulina deve essere rilasciata in un preciso dosaggio e al tempo esatto relativamente al bisogno. Così, il sistema di rilascio di insulina autoregolato richiede la capacità di percepire il glucosio e un meccanismo automatico di spegnimento.

Gli idrogel glucosio-sensibili, che subiscono *swelling* per risposta alla presenza di glucosio, possono provvedere alle forme farmaceutiche che si fondano su sistemi auto-regolati di rilascio d'insulina, nei quali un apporto dell'ormone può essere somministrato per risposta alla concentrazione ematica di glucosio. Il sistema consiste nell'immobilizzazione dell'enzima *glucosio-ossidasi* in un idrogel polimerico pH sensibile che racchiude in esso una soluzione satura di insulina (Figura 1.33) (Albin e al., 1987).

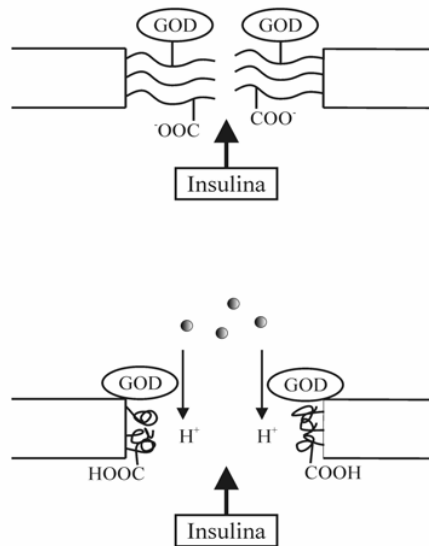


**Figura 1.33:** Rappresentazione schematica di idrogel sensibili al glucosio.

Nel momento in cui il glucosio diffonde nell'idrogel, la *glucosio-ossidasi* catalizza la sua conversione in acido gluconico favorendo l'abbassamento del pH nel microambiente della membrana. Si ha, quindi, la successiva protonazione degli amino-gruppi dell'idrogel che favorisce il processo di rigonfiamento. Gli idrogel maggiormente in uso per questa tecnologia sono quelli costituiti da *N,N*dimetilaminoetilmetacrilato, l'idrossietilmetacrilato e il tetraetilenglicole di metacrilato (Horbett e al., 1984).

Due tipi di idrogel pH sensibili offriranno altrettante tipologie di rilascio modulato di insulina. Per la membrana di idrogel costituita da poli-cationi, come nel PDEAEM poli(*N,N*-dietilaminoetilmetacrilato), l'abbassamento del pH porta al gonfiamento della membrana dell'idrogel attraverso la ionizzazione di PDEAEM che tende a rilasciare una maggiore quantità di farmaco.

Se la membrana è costituita da poli-anioni, il rilascio di insulina autoregolato è controllato da un meccanismo differente. In questo caso si parlerà di un meccanismo di rilascio fondato sul controllo di flusso idraulico glucosio sensibile. Questo può essere progettato utilizzando un sistema a membrana porosa che consiste in un filtro poroso innestato con poli-anioni e *glucosio-ossidasi* immobilizzata. Le catene polianioniche innestate sono espanse a pH=7 per la repulsione elettrostatica sulle cariche delle catene del polimero. Quando la *glucosio-ossidasi* converte il glucosio in acido gluconico le catene collassano per la protonazione dei gruppi carbossilici del polimero. Così i pori sono aperti per la diffusione dell'insulina (Figura 1.34) (Ito e al., 1989).



**Figura 1.34:** Meccanismo di rilascio dell'insulina da un idrogel sensibile al glucosio.

### 1.13.3 Rilascio urea-sensibile

Il sistema richiede l'immobilizzazione di un enzima in una rete polimerica per alterare il pH locale e quindi causare cambiamenti nel grado di erosione in un polimero (Heller e Trescony, 1979). L'*ureasi*, enzima di conversione dell'urea, è stato immobilizzato per ottenere la conversione dell'urea a  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  e  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Per questa reazione che porta all'innalzamento del valore di pH locale è richiesto un polimero che sia soggetto ad aumento dell'erosione ad alti valori di pH.

Si sono utilizzati, a tale scopo, copolimeri parzialmente esterificati di metil-vinil etero e anidride maleica che mostra un comportamento al rilascio pH sensibile. Il polimero si dissolve con la ionizzazione del gruppo ossidrilico dell'acido carbossilico.

Alcuni sistemi sono stati costruiti con dispositivi non erodibili. Questi organizzati in una struttura a sandwich. Un lato della struttura costituito da una membrana pH sensibile ottenuta copolimerizzando la 4-carbossiacrilanilide con l'acido metacrilico e, l'altro, costituito da una membrana contenente *ureasi* immobilizzata in *N,N*-metilenbisacrilammide (Ishihara e al., 1985). La permeazione, d'alcune sostanze prese a modello, varia con la concentrazione esterna di urea.

## CAPITOLO 2

### **Idrogel termo-sensibili: Sintesi, analisi strutturale e rilascio di terapeutici**

#### **2.1 Introduzione**

L'attività svolta si è incentrata sulla progettazione e sulla realizzazione di idrogel termosensibili costituiti da un sistema in cui un monomero in grado di modulare l'affinità del materiale per il mezzo acquoso in funzione della temperatura, è inserito all'interno di un sistema tridimensionale tramite un processo di polimerizzazione radicalica.

Gli idrogel termo-sensibili sono materiali costituiti da gruppi pendenti idrofobici e idrofilici che in funzione della variazione di temperatura del mezzo circostante, fanno prevalere le interazioni dei gruppi idrofilici con l'acqua (rigonfiamento) o tra le catene idrofobe (contrazione) (Peppas et al., 2000; Langer e Tirrell, 2004). Nel corso degli anni, una particolare attenzione è stata rivolta agli idrogel in grado di subire cambiamenti volumetrici in seguito a variazione di temperatura del mezzo con cui vengono a contatto ed in grado di controllare il rilascio di un farmaco rispondendo alla stimolazione termica mediante *swelling* e *deswelling* (Bromberg e Ron, 1998; Spizzirri et al. 2012; Spizzirri et al. 2013). La variazione di temperatura in un fluido è sia relativamente semplice da controllare, che facile da applicare, sia in vitro che in vivo (Seok Gil e Hudson, 2004). Inoltre, l'utilizzo della temperatura come stimolo esterno è particolarmente utile, poiché nell'uomo la temperatura in condizioni normali si aggira intorno ai 37°C, ma aumenta in presenza di agenti patogeni (Klouda e Mikos, 2008; Curcio et al. 2010; Korotych et al., 2013). Questo può essere sfruttato come segnale per attivare il rilascio di agenti terapeutici opportunamente veicolati da idrogel termosensibili, per tutte quelle malattie che comportano un aumento della temperatura corporea. Come ampiamente analizzato nel capitolo precedente, gli idrogel in grado di modificare la propria affinità per il mezzo acquoso in funzione della temperatura sono soprattutto sistemi polimerici a base di N-isopropilacrilammide (NIPAAm), che riesce a coniugare proprietà come biocompatibilità e atossicità con una temperatura di transizione prossima alla temperatura corporea (Minghonga et al. 1999; Spizzirri et al., 2011a; Petrusic et

al., 2013). In questo lavoro, film polimerici a base di NIPAAm sono stati sintetizzati e proposti per la veicolazione e il rilascio di terapeutici (Cirillo et al., 2015). Le caratteristiche chimico-fisiche degli idrogel sintetizzati e i meccanismi che intervengono nella modulazione del rilascio di principi attivi (Naproxene e Diclofenac) dalla matrice in condizione controllate di temperatura sono stati dettagliatamente analizzate e saranno di seguito descritte. La metodica sperimentale è stata opportunamente ottimizzata e gli esperimenti di rilascio effettuati hanno permesso di valutare il *device* progettato come *carrier* per il rilascio transdermico di principi attivi da applicare sia in campo farmaceutico, sia biomedico.

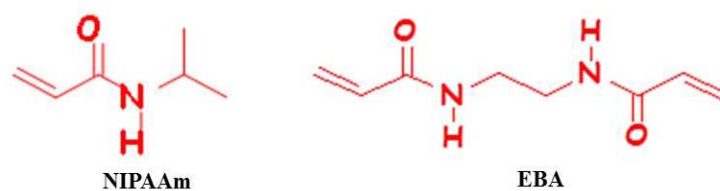
## 2.2 Sintesi dei polimeri termo-sensibili

Nel presente lavoro copolimeri a base di N-isopropilacrilammide (NIPAAm) e N, N'-etilenbisacrilammide (EBA) ottenuti attraverso polimerizzazione radicalica UV-iniziata sono stati valutati come matrici per il rilascio topico temperatura-dipendente di opportuni principi attivi. Il rapporto stechiometrico tra i due monomeri e lo spessore del film polimerico sono stati parametri sperimentali che sono stati opportunamente analizzati al fine di massimizzare le performance del *carrier* macromolecolare (Tabella 2.1).

**Tabella 2.1:** Composizione chimica degli idrogel termosensibili.

NIPAAm (g/mmol)	EBA (g/mmol)	n(NIPAAm)/n (EBA)	H <sub>2</sub> O (ml)	Spessore film Polimerico (mm)	Sigla
1,45/12,8	0,108/0,64	20	7,0	1,6	P <sub>1</sub>
1,69/14,9	0,250/1,49	10	7,0	1,6	P <sub>2</sub>
1,69/13,5	0,108/0,64	20	7,0	0,8	P <sub>3</sub>
1,53/14,9	0,250/1,49	10	7,0	0,8	P <sub>4</sub>

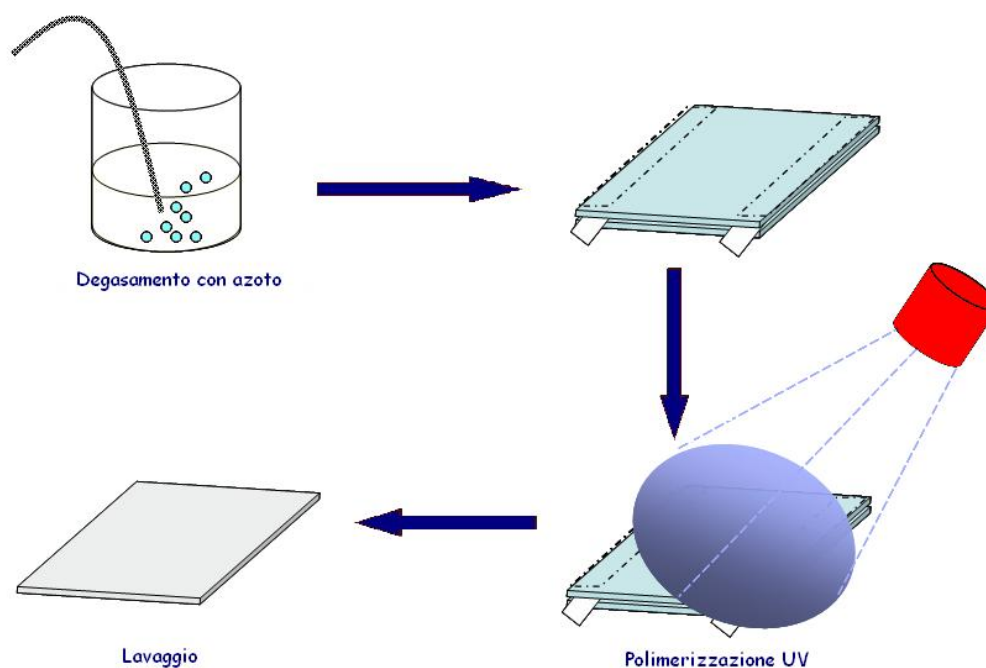
La preparazione degli idrogel avviene tramite copolimerizzazione radicalica di NIPAAm quale monomero funzionale, e EBA, quale reticolante in modo da realizzare un reticolo recante in catena laterale gruppi idrofobici che impartiscono al sistema polimerico un comportamento sensibile alla temperatura (Figura 2.1).



**Figura 2.1:** Formula di struttura dei monomeri utilizzati.

La Tabella 2.1 riporta le condizioni sperimentali dei copolimeri p(NIPAAm-co-EBA) sintetizzati. I diversi sistemi polimerici presentano un grado di reticolazione variabile determinato sia dal rapporto stechiometrico monomero funzionale/reticolante, sia dallo spessore del film polimerico. In particolare il rapporto stechiometrico risulta uguale a 10 per i polimeri P<sub>2</sub> e P<sub>4</sub> e a 20 per i polimeri P<sub>1</sub> e P<sub>3</sub>, mentre lo spessore dei film è stato di 0,8 mm e 1,6 mm. Variando e combinando opportunamente tali parametri è stato possibile modulare la temperatura di transizione in modo da renderla il più vicino possibile alla temperatura corporea, aumentando così l'applicazione dei materiali proposti in campo biomedico e farmaceutico.

Il monomero funzionale e il reticolante sono stati solubilizzati in acqua distillata nell'opportuno rapporto stechiometrico, insieme ad un fotoiniziatore (Spizzirri e Peppas, 2005). La miscela di polimerizzazione è stata posta tra due piatti interponendo spaziatori di diverso spessore ed è stata sottoposta a polimerizzazione UV. Il film polimerico ottenuto è stato sottoposto a lavaggi con etanolo, in modo da allontanare l'iniziatore e i monomeri non reagiti (Figura 2.2).



**Figura 2.2:** *Rappresentazione schematica del processo di polimerizzazione radicalica UV-iniziata.*

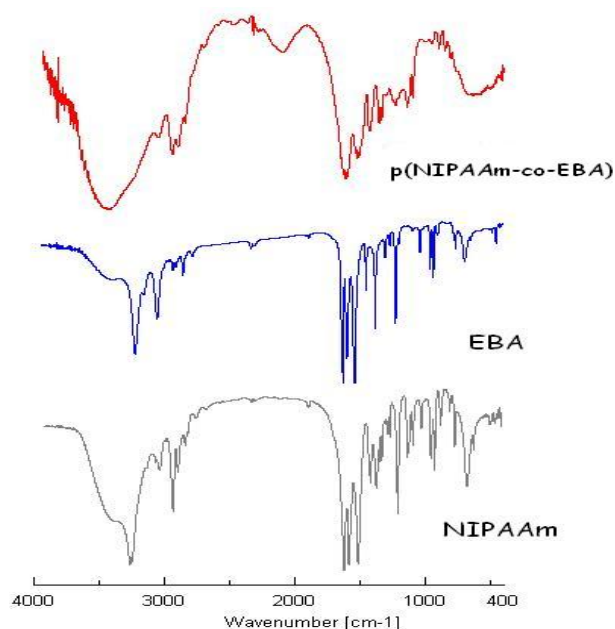
L'utilizzo di monomeri idrofilici risulta molto importante in quanto permette di condurre le reazioni di polimerizzazione in un mezzo acquoso e quindi la realizzazione di un materiale totalmente privo di residui organici che comprometterebbero la biocompatibilità del polimero.

## 2.3 Caratterizzazione degli idrogel

I polimeri sintetizzati sono stati caratterizzati tramite analisi spettroscopica FT-IR, calorimetria a scansione differenziale (DSC), microscopia elettronica a scansione (SEM) e studi di rigonfiamento in modo da ottenere informazioni sulla composizione chimica e morfologica dei sistemi.

### 2.3.1 Analisi tramite spettroscopia FT-IR

L'analisi degli spettri FT-IR ha mostrato la completezza della reazione di polimerizzazione per tutti e quattro i film polimerici sintetizzati. Lo spettro FT-IR di ciascun copolimero p(NIPAAm-co-EBA) mostra le bande caratteristiche dei due monomeri e la contemporanea scomparsa delle bande caratteristiche del doppio legame delle funzioni acriliche, rappresentate dai bending C–H fuori dal piano ( $990-918$  e  $980-954$   $\text{cm}^{-1}$ ), presenti in entrambi i monomeri di partenza. Inoltre, tutte le restanti bande caratteristiche dei monomeri sono presenti nello spettro FT-IR dei polimeri finali:  $3280$   $\text{cm}^{-1}$  (stretching vibrazionale del legame NH dei comonomeri ammidici);  $2940$   $\text{cm}^{-1}$  (stretching dei legami C–H presenti nei gruppi metilici, metilenici e metinici);  $1647$   $\text{cm}^{-1}$  (stretching del legame C=O della funzione carbonilica di NIPAAm and EBA). In Figura 2.3 sono riportati e messi a confronto gli spettri del monomero funzionale, del reticolante e del copolimero  $P_1$ . Risultati identici sono stati ottenuti per gli altri copolimeri.



**Figura 2.3:** Spettri FT-IR dei monomeri iniziali e del polimero  $P_1$ .

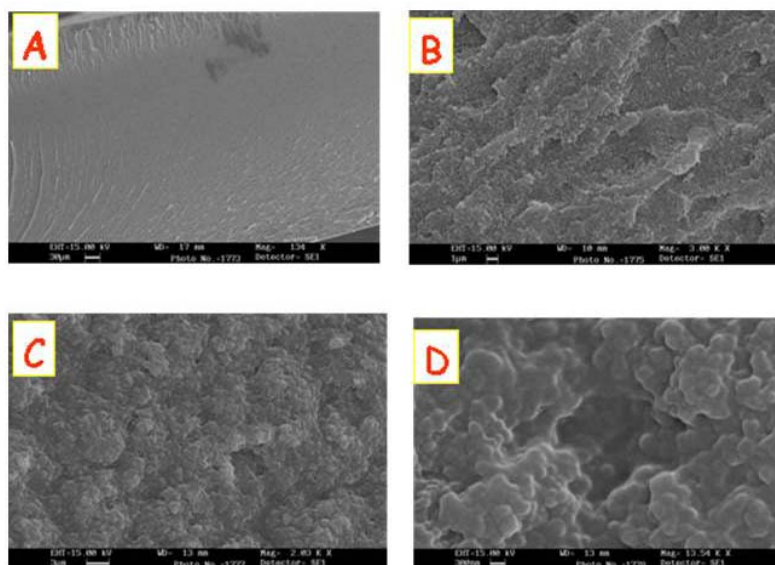
### **2.3.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)**

I termogrammi ottenuti dall'analisi DSC eseguita su tutti i campioni realizzati, hanno evidenziato la presenza di una transizione di stato. La temperatura critica di soluzione inferiore mostrata dai sistemi sintetizzati ha assunto valori compresi approssimativamente nel range 32,1-35,4°C. Tale comportamento può essere considerato come una diretta conseguenza del grado di reticolazione del materiale. La transizione da uno stato rigonfiato ad uno collassato è prodotto dalla formazione di sacche idrofobiche in seguito ad avvicinamento delle catene idrocarburiche per somministrazione di calore. Sistemi più reticolati, possedendo minor gradi di libertà, richiedono temperature più alte affinché tale transizione avvenga. Lo spessore del film polimerico prodotto sembra non avere una grande influenza sulla temperatura critica di soluzione inferiore (LCST) per i sistemi polimerici con una maggiore quantità di reticolante (copolimeri P<sub>2</sub> e P<sub>4</sub>), mentre influenza sostanzialmente la temperatura di transizione per i sistemi in cui il rapporto monomero funzionale/reticolante è uguale a 20. Tra il copolimero P<sub>1</sub>, avente spessore pari a 1,6 mm e il copolimero P<sub>3</sub> (spessore 0,8 mm) sono stati registrati 1,5°C di differenza, con la LCST che passa da 32,1 °C a 33,6°C. In particolare, i polimeri P<sub>2</sub> e P<sub>4</sub>, registrando un valore di LCST rispettivamente di 35,4°C e 35,1°C, risultano molto interessanti per i nostri scopi, in quanto tale temperatura di transizione è molto prossima a quella corporea.

### **2.3.3 Microscopia elettronica a scansione (SEM)**

I copolimeri sintetizzati sono stati sottoposti ad analisi tramite microscopio elettronico a scansione. Le fotomicrografie registrate sia sulla superficie frontale, sia sulla superficie laterale hanno evidenziato una superficie porosa. Tale condizione è un parametro estremamente importante al fine di ottenere una buona adesione tra supporto polimerico e strato cellulare. In particolare, in Figura 2.4 A-D sono riportate le analisi effettuate sul campione P<sub>3</sub> in superficie laterale (Figure 2.3 A e B) e frontale (Figure 2.4 C e D). Le fotomicrografie effettuate sugli altri copolimeri non hanno permesso di evidenziare differenze significative.

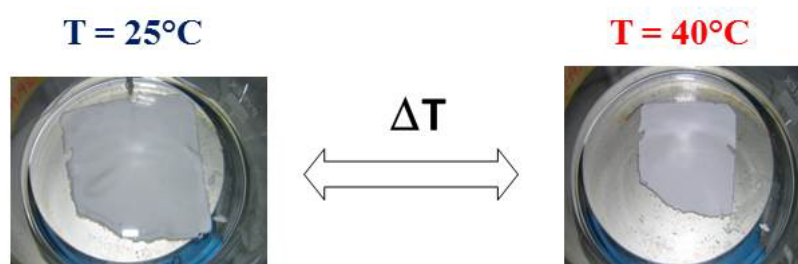




**Figura 2.4:** Analisi del sul campione  $P_3$  in superficie laterale (A e B) e frontale (C e D).

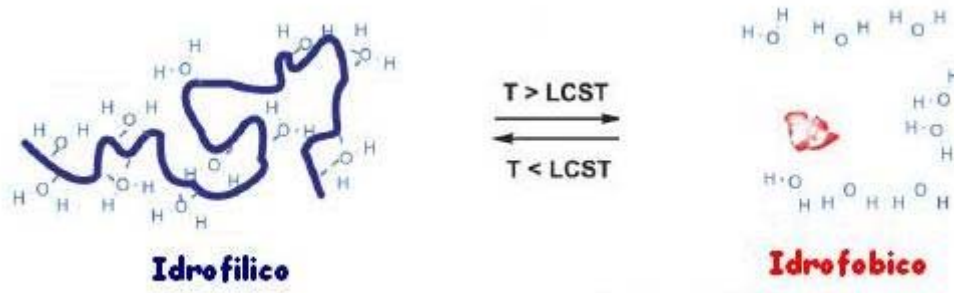
### 2.3.4 Studi di rigonfiamento

Al fine di valutare l'applicabilità di tali idrogel nel rilascio controllato di farmaci e la loro risposta alla temperatura, sono stati eseguiti studi sulla loro capacità di rigonfiamento. Immergendo il film polimerico sintetizzato, in un mezzo acquoso e variando la temperatura da 25 a 40°C, intorno alla LCST del sistema in esame, è possibile osservare visivamente (Figura 2.5) il passaggio del copolimero da uno stato rigonfiato, a temperature inferiori alla LCST, ad uno stato collassato in cui l'affinità per il mezzo acquoso risulta diminuita.



**Figura 2.5:** Swelling/deswelling temperatura-dipendente dell'idrogel NIPAAm-co-EBA.

Le interazioni idrofobiche tra le catene laterali del reticolo polimerico a temperature superiori alla LCST porta ad un materiale completamente idrorepellente che in mezzo acquoso collassa (Figura 2.6).



**Figura 2.6:** Rappresentazione schematica delle interazioni durante il processo di swelling/deswelling del polimero termo-sensibile.

La caratterizzazione della struttura reticolata degli idrogel sintetizzati è stata ottenuta tramite studi di rigonfiamento all'equilibrio in una soluzione di PBS (pH = 7,0), in accordo con la teoria proposta da Peppas e Barr-Howell (1979) e Peppas e Meadows (1984). Tale teoria si basa sulla determinazione della frazione di volume del polimero (stato rilassato),  $v_{2,r}$ , e della frazione di volume del polimero del gel rigonfio (stato rigonfiato),  $v_{2,s}$ , secondo le equazioni 2.1 e 2.2:

$$v_{2,r} = \frac{V_p}{V_{g,r}} \quad \text{Equazione 2.1}$$

$$v_{2,s} = \frac{V_p}{V_{g,s}} \quad \text{Equazione 2.2}$$

dove  $V_{g,r}$  rappresenta il volume di polimero immediatamente dopo la polimerizzazione e  $V_p$  e  $V_{g,s}$  sono i volumi del campione rispettivamente prima e dopo il rigonfiamento all'equilibrio. Questi volumi sono stati determinati sperimentalmente dal peso del polimero in aria,  $W_{a,r}$ , e in *n*-eptano,  $W_{h,r}$ , dopo che il polimero è rigonfiato fino a raggiungere l'equilibrio.  $V_p$  e  $V_{g,s}$  sono stati determinati usando le equazioni 2.3 e 2.4 dove  $\rho_h$  rappresenta la densità del *n*-eptano.

$$V_p = \frac{W_{a,r} - W_{h,r}}{\rho_h} \quad \text{Equazione 2.3}$$

$$V_{g,s} = \frac{W_{a,s} - W_{h,s}}{\rho_h} \quad \text{Equazione 2.4}$$

I dati di *swelling* all'equilibrio sono stati utilizzati per valutare la struttura reticolata dei polimeri.

Spesso la diffusione attraverso i pori delle catene macromolecolari è il principale meccanismo sfruttato dagli idrogel per il rilascio di una gente terapeutico. A seconda della dimensione dei pori, gli idrogel possono essere classificati in macroporoso, microporoso o non poroso (spesso chiamato nanoporoso). Una caratterizzazione teorica dettagliata della struttura portante in termini di dimensioni dei pori, in combinazione con gli studi di diffusione del terapeutico, fornisce un'importante panoramica sulla struttura del reticolo macromolecolare e aiuta nella progettazione di sistemi di rilascio di farmaci ottimali (Narasimhan e Peppas, 1997).

A tale scopo sono stati determinati le dimensioni dei pori,  $\xi$  (equazione 2.5), e la percentuale di rigonfiamento del sistema,  $q$  (equazione 2.6).

$$\xi = \nu_{2,s}^{-1/3} \left( \frac{2C_n \overline{M}_c}{M_r} \right)^{1/2} l \quad \text{Equazione 2.5}$$

$$q = \frac{1}{\nu_{2,s}} \quad \text{Equazione 2.6}$$

dove  $M_r$  è il peso molecolare delle unità ripetitive dalle quali la catena polimerica risulta composta,  $l$  è la lunghezza del legame C-C lungo la catena polimerica (per i polimeri metacrilici 1,54 Å),  $C_n$  è il rapporto caratteristico di Flory calcolato come la media pesata dei valori di pEBA e pNIPAAm ( $C_{n,pNIPAAm} = 11,7$  and  $C_{n,pEBA} = 3,8$ ) in acqua e  $\nu_{2,s}$  e  $\overline{M}_c$  sono rispettivamente la frazione di volume del polimero del gel rigonfio e il peso molecolare medio tra due punti di reticolazione. Quest'ultimo parametro, che fornisce un'indicazione sulla reticolazione della maglia polimerica, può essere calcolato utilizzando l'equazione 2.7 sviluppata da Peppas e Merrill (1976):

$$\frac{1}{\overline{M}_c} = \frac{2}{M_r} - \frac{\overline{v}}{V_1} \cdot \frac{[\ln(1-\nu_{2,s}) + \nu_{2,s} + \chi \cdot \nu_{2,s}^2]}{\nu_{2,r} \left[ \left( \frac{\nu_{2,s}}{\nu_{2,r}} \right)^{1/3} - \frac{1}{2} \left( \frac{\nu_{2,s}}{\nu_{2,r}} \right) \right]} \quad \text{Equazione 2.7}$$

dove  $V_1$  è il volume molare dell'acqua (18,1 cm<sup>3</sup>·mol<sup>-1</sup>);  $\overline{M}_n$  (approssimativamente 76000 g·mol<sup>-1</sup>) è il peso molecolare medio del polimero lineare prodotto nelle stesse condizioni di polimerizzazione ma senza la presenza dell'agente reticolante e  $\overline{v}$  è il volume specifico del polimero definito come il rapporto tra il peso del polimero  $W_{a,r}$ , in aria prima del rigonfiamento e il volume  $V_p$ . Il parametro di interazione polimero-solvente  $\chi$  definito da Flory, è stato calcolato come la media pesata dei valori di pNIPAAm ( $\chi = 0.51$ ) e PEA ( $\chi =$

0,55) tenendo conto della composizione del *feed* di polimerizzazione. Tale procedura non è usuale nella termodinamica dei polimeri, ma risulta opportuno in questo caso, grazie alla similitudine dei valori registrati per i due polimeri pNIPAAm e pEBA.

**Tabella 2.2:** Parametri strutturali e temperatura di transizione (LCST) degli idrogel.

Polimero	Parametri Strutturali						LCST (°C)
	Peso molecolare medio tra due punti di reticolazione $\overline{M}_c$ (g mol <sup>-1</sup> )		Dimensioni dei pori, $\xi$ (Å)		Rapporto di pesi dopo swelling all'equilibrio, q		
	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C	
P <sub>1</sub>	1140±5	325±3	25,0±1,2	9,8±0,2	12,3±0,3	4,9±0,2	32,1±0,1
P <sub>2</sub>	678±3	201±2	18,6±0,4	9,1±0,2	5,6±0,2	3,6±0,1	35,4±0,1
P <sub>3</sub>	1265±6	352±4	27,8±1,1	9,9±0,3	15,5±0,7	4,2±0,2	33,6±0,1
P <sub>4</sub>	801±4	263±2	18,8±0,9	9,4±0,2	13,3±0,5	5,3±0,2	35,1±0,1

I dati raccolti dall'analisi strutturale dei copolimeri sintetizzati sono molto interessanti in quanto dimostrano come la temperatura modula drasticamente l'affinità dei diversi sistemi verso il mezzo acquoso. Tutti i materiali polimerici realizzati mostrano una maggiore idrofilicità a 25°C, temperatura inferiore alla LCST dei vari copolimeri, come confermato sia dai valori del peso molecolare medio tra due punti di reticolazione, sia delle dimensione dei pori, sia dal rapporto di pesi dopo rigonfiamento.

I risultati indicano che variando la composizione della miscela di reazione, il valore di  $\overline{M}_c$  a 25°C aumenta da 678 g mol<sup>-1</sup> per P<sub>2</sub> (circa 6 unità NIPAAm) a 1265 g mol<sup>-1</sup> per P<sub>3</sub> (circa 10 unità NIPAAm). Poiché la distanza effettiva tra punti di reticolazione consecutivi all'interno del reticolo polimerico è proporzionale alla radice quadrata di  $\overline{M}_c$ , la dimensione media del nanoporo aumenta del 36% semplicemente modificando la composizione del *feed* di polimerizzazione e lo spessore del film. Lo stesso esperimento condotto a 40°C ha rivelato una drastica riduzione nei valori di  $\overline{M}_c$  calcolati (circa 3,5 volte). Questo dato trova spiegazione nell'aggrovigliamento delle catene polimeriche con una conseguente riduzione della distanza tra i punti di reticolazione consecutivi (apparente riduzione delle unità NIPAAm).

Analizzando i dati riportati in Tabella 2.2 si può notare che a 25°C tutti i copolimeri hanno un valore di  $\xi$  compresi nel range 18,7-27,8 Å e le differenze riscontrate risultano dipendenti dal grado di reticolazione dell'idrogel e dallo spessore del reticolo polimerico. In particolare il valore più alto è stato calcolato per il polimero P<sub>3</sub> (polimero meno reticolato e con spessore singolo) e risulta essere circa 1,5 volte più alto del polimero P<sub>2</sub> (polimero più reticolato e con spessore doppio). Tutti i polimeri ad una temperatura di 40°C, superiore alla LCST, hanno

pori con un diametro compreso tra 9,1 e 9,9 Å, approssimativamente 2 volte inferiore ai valori registrati quando l'idrogel si trova nello stato rigonfiato. Questa restrizione dei pori conferma il collasso del reticolo polimerico per valori di temperatura maggiori della LCST. Le stesse considerazioni possono essere fatte analizzando i valori registrati per il parametro strutturale  $q$  che risulta più alto (circa 3 volte) a 25°C rispetto a 40°C dove è presente una minore affinità per il mezzo acquoso. L'andamento osservato risulta più o meno marcato a seconda del grado di reticolazione dei copolimeri e dello spessore del film polimerico con il valore più basso che è stato registrato per il polimero P<sub>4</sub>.

#### **2.4 Caricamento dei farmaci nei film polimerici**

Le caratterizzazioni strutturali e morfologiche, nonché l'attenta analisi delle capacità di rigonfiamento degli idrogel termo-sensibili fin qui descritti hanno suggerito un loro possibile impiego nel rilascio di molecole bioattive. Le matrici polimeriche sono state caricate sia tramite impregnazione sia tramite incorporazione, con farmaci antiinfiammatori di largo consumo in diverse patologie come il Diclofenac (DC) e il Naprossene (NPX). La scelta del DC è dovuta alle sue molteplici applicazioni soprattutto nel trattamento cronico delle infiammazioni e nell'artrite reumatoide. NPX e DC presentano attività analgesica, antipiretica e antinfiammatoria, e sembrano in grado di ridurre le concentrazioni intracellulari di acido arachidonico libero nei leucociti probabilmente alterandone il rilascio o la captazione. Questi farmaci sono selettivi verso la *ciclossigenasi di tipo 2 (COX-2)*, responsabili della conversione dell'acido arachidonico in trombossano e prostaglandine. Queste ultime, oltre a svolgere funzioni fisiologiche importanti come aumentare il flusso ematico renale, ridurre l'azione dell'aldosterone e proteggere le cellule della mucosa gastrica, svolgono anche un ruolo predominante come mediatori dell'infiammazione. Entrambi i principi attivi manifestano ugualmente effetti collaterali a livello gastrointestinale e sono stati riportati anche danni al sistema cardiovascolare, al fegato e ai reni associati al trattamento cronico. Alcuni svantaggi di questi agenti terapeutici sono correlati alla sua bassa emivita di circa due ore dovuta ad una fase di metabolismo e di eliminazione molto rapida. Per migliorare questi aspetti negativi sono richieste nuove forme farmaceutiche che possano minimizzarne gli effetti collaterali e aumentarne l'emivita riducendo così le dosi e il numero di somministrazioni giornaliere. Tali farmaci sono stati testati anche per uso topico grazie alle loro proprietà analgesiche, in grado di alleviare il dolore, un sintomo comune di ferite cutanee acute e croniche (Price et al., 2008; Zor et al. 2010).

In particolare, la tecnica dell'incorporazione è stata impiegata sia per il NPX che per il DC, mentre l'impregnazione ha prodotto risultati soddisfacenti solo nel caso del DC. Gli esperimenti di caricamento del NPX su tutte le matrici sintetizzate hanno condotto a percentuali di impregnazioni prossime allo zero con l'ottenimento di materiali non utilizzabili negli esperimenti di rilascio.

I dati relativi alle performance di caricamento di tutte le matrici, impiegando sia DC, sia NPX tramite impregnazione e incorporazione sono riportati in tabella 3.2. Le matrici analizzate hanno permesso di raggiungere percentuali di caricamento (LE%) e quantità di farmaco dispersa (DL%) differenti.

**Tabella 2.3:** Parametri di caricamento di DC e NPX delle matrici tramite impregnazione e incorporazione.

	Impregnazione				Incorporazione			
	DC		NPX		DC		NPX	
	LE%	DL%	LE%	DL%	LE%	DL%	LE%	DL%
<b>P<sub>1</sub></b>	60,0±2,0	7,0±0,3	3,0±0,1	0,35±0,06	63,0±1,9	7,4±0,3	40,1±1,8	4,7±0,2
<b>P<sub>2</sub></b>	55,0±1,7	6,4±0,2	2,0±0,1	0,23±0,05	75,0±1,6	8,8±0,3	47,0±1,9	5,5±0,2
<b>P<sub>3</sub></b>	48,3±1,5	5,6±0,2	1,0±0,1	0,12±0,03	44,2±1,6	5,1±0,2	27,3±1,5	3,2±0,1
<b>P<sub>4</sub></b>	40,2±1,4	4,7±0,2	0,7±0,1	0,08±0,01	56,4±1,4	6,6±0,1	33,4±1,3	3,9±0,1

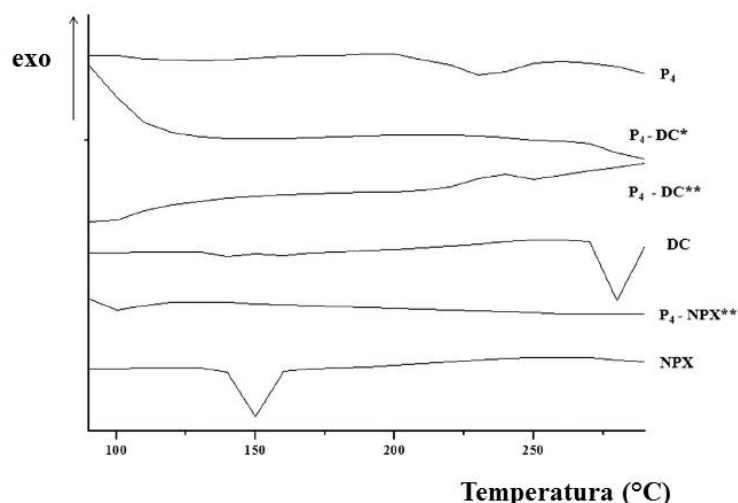
LE% = percentuale di caricamento; DL% = percentuale di farmaco dispersa.

I dati di caricamento evidenziano innanzitutto una maggiore affinità delle matrici polimeriche per il DC rispetto al NPX, indipendentemente dal grado di reticolazione del reticolo macromolecolare, dalla spessore del film polimerico e dalla tecnica di caricamento utilizzata. La scarsa affinità polimero-NPX viene in parte superata attraverso l'incorporazione del principio attivo, con percentuali che risultano tuttavia quasi due volte inferiori rispetto a quelle registrate per il DC. La tecnica dell'incorporazione si è rivelata, in generale, la metodologia migliore per massimizzare la quantità di farmaco all'interno del film in quanto permette una maggiore interazione tra le molecole di terapeutico e le catene polimeriche in crescita. Ciò dovrebbe anche consentire una migliore distribuzione del principio attivo nel reticolo polimerico a differenza di quando avviene con l'impregnazione dove la maggior parte delle molecole di farmaco si posizione principalmente sulla superficie del film polimerico. In termini di profili di rilascio quest'ultima situazione dovrebbe determinare un più rapido rilascio nei primi istanti dell'esperimento (effetto "burst"), mentre con i polimeri in cui il principio attivo è stato incorporato si dovrebbe osservare un rilascio più lento dove il contributo diffusionale dovrebbe essere preponderante.

Analizzando l'effetto della composizione del *feed* polimerico e dello spessore del materiale sulle percentuali di caricamento registrate, si può osservare come un raddoppio dello spessore del film polimerico produce in tutti gli esperimenti un sensibile aumento delle percentuali di farmaco intrappolato, indipendentemente dalla tecnica utilizzata. Al contrario, quest'ultimo parametro ha un ruolo determinante nel momento in cui si modifica il grado di reticolazione dell'idrogel. In particolare, un aumento della quantità di reticolante (polimeri P<sub>2</sub> e P<sub>4</sub>) produce una diminuzione delle percentuali di caricamento nel caso di matrici impregnate, mentre per le matrici incorporate è evidente un comportamento opposto.

L'analisi mediante DSC dei film polimerici caricati di ciascun farmaco e non, consente di determinare la natura del principio attivo all'interno della matrice polimerica. Esso, infatti, potrebbe esistere come soluzione solida, come dispersione molecolare metastabile o come cristallo, influenzando in maniera rilevante i profili di rilascio *in vitro* (Sairam et al., 2006; Curcio et al. 2013).

La Figura 2.7 riporta i termogrammi relativi al farmaco libero e al polimero P<sub>4</sub> caricato tramite incorporazione e impregnazione. Dai termogrammi è possibile osservare come il picco di fusione del farmaco libero, registrato a 278°C per DC e a 155°C per NPX, scompaia nei termogrammi relativi alle matrici P<sub>4</sub> caricate con i farmaci. Ciò è indicativo della completa dispersione del farmaco all'interno dei materiali polimerici. Stessi risultati si sono avuti con le restanti matrici.



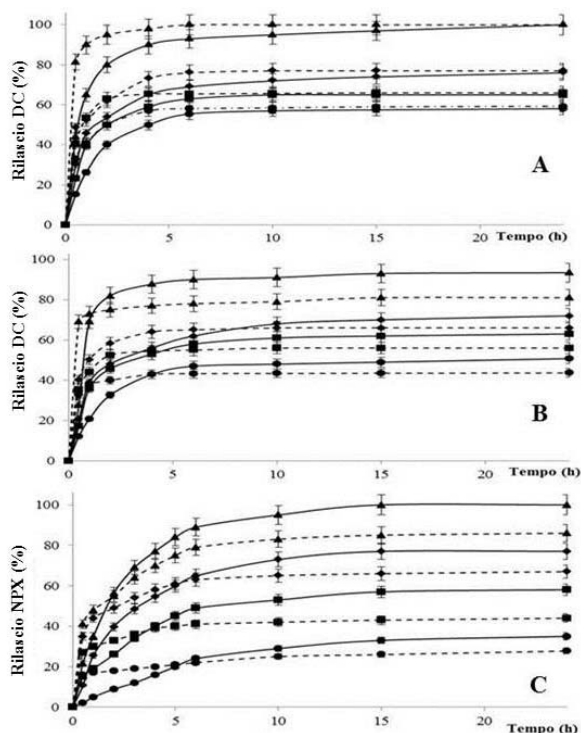
**Figura 2.7:** DSC relativi al farmaco libero DC e NPX e al polimero P<sub>4</sub> non caricato e caricato tramite impregnazione (\*) e incorporazione durante il processo di polimerizzazione (\*\*).

## 2.5 Studi di rilascio dei farmaci dai film polimerici

Il profilo di rilascio dei principi attivi dalle matrici polimeriche sintetizzate non è un elemento facilmente prevedibile. La quantità di farmaco rilasciata dagli idrogel è infatti funzione di numerose variabili, fra cui:

- capacità di idrorigonfiabilità della matrice;
- interazioni tra matrice e farmaco;
- larghezza delle maglie del reticolo polimerico (da cui dipende anche la quantità di principio attivo che si può caricare al suo interno);
- proprietà chimico-fisiche del farmaco, in particolare la sua solubilità nel mezzo esterno, e le caratteristiche del mezzo esterno stesso.

Il prevalere di un fattore sugli altri determina l'andamento del profilo di rilascio, ma è più probabile che il risultato finale sia conseguenza della combinazione dei suddetti parametri. Da queste osservazioni si può facilmente prevedere che le matrici oggetto del presente studio non siano semplici supporti inerti, ma mostrano evidenti capacità di interazione con i farmaci associati. La valutazione dei profili di rilascio dei farmaci scelti dalle matrici si pone come obiettivo la verifica dell'effettivo comportamento termo-sensibile, e dunque di un potenziale impiego degli idrogel come *carrier* di agenti terapeutici. Per tutti i film polimerici è stato determinato il profilo di rilascio *in vitro* a differenti temperature intorno alla LCST delle matrici (25 e 40°C), ad intervalli di tempo predefiniti e la quantità di terapeutico rilasciata è stata riportata in funzione del tempo, come riportato in Figura 2.8.



**Figura 2.8:** Profili di rilascio in funzione del tempo di DC e NPX impregnati (A) e incorporati (B e C) nei film polimerici  $P_1$  (◆),  $P_2$  (●),  $P_3$  (▲) e  $P_4$  (■) registrati a 25°C (—) e 40°C (- - -).



L'interpretazione dei profili di rilascio registrati risulta alquanto complessa, ma un'attenta analisi delle variabili introdotte fornisce un quadro abbastanza chiaro del comportamento di tali matrici. Innanzitutto la metodologia utilizzata per caricare l'agente terapeutico risulta determinante sul profilo di rilascio nei primi istanti dell'esperimento. Tale confronto, percorribile solo per il DC, evidenzia un pronunciato effetto *burst* per le matrici impregnate, mentre per le matrici in cui il farmaco è stato caricato tramite incorporazione, l'aumento della concentrazione di terapeutico in funzione del tempo è graduale e solo per la matrice P<sub>3</sub> a 25°C raggiunge la completezza nell'arco delle 24 h.

Un'analisi accurata del rilascio del DC dalle matrici P<sub>1-4</sub> impregnate (Figura 2.8 A) mostra, inoltre, come spessore, grado di reticolazione del film polimerico e temperatura del mezzo di rilascio siano parametri in grado di provocare profonde dissimilitudini negli andamenti dei profili. In particolare, come è possibile osservare dai profili di rilascio, per tutti i campioni DC-impregnati e per ogni intervallo di tempo, la quantità di molecole di farmaco che dal film polimerico si muovono verso il mezzo acquoso circostante risulta più alta a 40°C che a 25°C. Mentre a 25°C, temperatura a cui le matrici polimeriche si trovano nello stato rigonfio, il rilascio del farmaco risulta più lento e graduale nel tempo, a 40°C, quando le matrici si trovano nello stato contratto, si assiste, a parità di tempo, ad un rilascio molto più consistente con una variazione delle percentuali di rilascio strettamente correlate al contenuto di reticolante e allo spessore del film polimerico. Questi due parametri infatti influenzano grandemente la velocità di risposta dell'idrogel allo stimolo esterno e il cammino delle molecole di principio attivo attraverso le maglie del reticolo fino al mezzo circostante. In particolare, le maggiori percentuali di rilascio sono state registrate per il polimero P<sub>3</sub> (minor reticolazione e spessore), che ha mostrato un rilascio completo dopo 6 h a 40°C e dopo 24 h a 25°C. Al contrario, il polimero P<sub>2</sub> (maggior reticolazione e spessore) ha evidenziato le percentuali più basse, con valori di poco superiori al 50% dopo 24 h. In generale, l'effetto *burst* risulta comunque amplificato dalla metodologia di caricamento impiegata perché utilizzando l'impregnazione la maggior parte delle molecole di farmaco risultano confinate in superficie.

Analizzando i dati derivanti dai rilasci delle matrici incorporate, infatti, è evidente come una più uniforme distribuzione del principio attivo all'interno del reticolo polimerico stravolge i profili di rilascio dei principi attivi (Figura 2.8 B e C). In questo caso, per entrambi i principi attivi e per tutte le matrici si sono osservate maggiori percentuali di rilascio a temperature inferiori alla LCST, con gli idrogel nello stato rigonfiato. In tutti i casi si verifica un maggior rilascio del principio attivo nei primi tempi dell'esperimento (dopo 0,5 h), a causa della

fuoriuscita delle molecole di terapeutico sulla superficie, mentre nei momenti successivi questa percentuale cresce molto lentamente per le limitazioni diffusionali che incontrano le molecole di principio attivo che si trovano nel core della matrice. Anche in questo caso le limitazioni diffusionali dovute allo spessore del film polimerico e alla densità dei punti di reticolazione, ritardano la fuoriuscita dell'agente terapeutico con percentuali di farmaco rilasciato nel mezzo acquoso generalmente più basse dopo 24 h. Un confronto, infine, tra i due farmaci conferma la minore affinità del NPX rispetto al DC che viene rilasciato più lentamente.

La maggior parte dei modelli teorici si basa su equazione che descrivono il fenomeno della diffusione. Quest'ultimo risulta intimamente connesso alla struttura del materiale attraverso il quale ha luogo, così la conoscenza della morfologia del materiale polimerico occupa un ruolo fondamentale nella progettazione di un corretto modello matematico (Langer e Peppas, 1983). Il rilascio di un agente terapeutico da un *carrier* polimerico si basa sul movimento del farmaco attraverso la matrice polimerica. Tale fenomeno è in larga parte controllato dalle limitazioni che impediscono il trasferimento di massa tramite le catene polimeriche fino all'ambiente circostante. Al fine di analizzare e quantificare le limitazione diffusionali dovute alla grandezza delle maglie del reticolo polimerico ed evidenziate negli esperimenti di rilascio è stato utilizzato un approccio matematico che tiene conto di modelli, presenti in letteratura, che comparano le dimensioni dei pori dell'idrogel e le dimensioni del principio attivo che deve essere veicolato.

Da un punto di vista macroscopico la diffusione di un farmaco attraverso un *carrier* polimerico può essere descritto tramite la legge di Fick che risulta matematicamente espressa, per il trasporto in una dimensione, dalle equazioni 2.8 e 2.9 (Crank e Park, 1968).

$$j_i = -D_{ip} \frac{dc_i}{dx} \quad \text{Equazione 2.8}$$

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = D_{ip} \frac{\partial^2 c_i}{\partial x^2} \quad \text{Equazione 2.9}$$

dove la concentrazione e il flusso di massa della specie  $i$  sono indicati rispettivamente con  $c_i$  e  $j_i$ ;  $D_{ip}$  è il coefficiente di diffusione della specie  $i$  nella matrice polimerica e  $x$  e  $t$  rappresentano rispettivamente le variabili di tempo e di posizione. Le equazioni 2.8 e 2.9 descrivono il rilascio di un farmaco da un disco polimerico, mentre equazioni simili sono state

ottenute per il rilascio da *carrier* aventi geometrie differente. E' necessario rimarcare, inoltre, che nella legge di Fick sopra riportata il coefficiente di diffusione è indipendente dalla concentrazione; questa assunzione è internazionalmente accettata in quanto semplifica notevolmente la risoluzione delle equazioni. Tuttavia, per la diffusione di un principio attivo, il coefficiente di diffusione  $D_{ip}$  è stato sostituito con un coefficiente di diffusione effettivo  $D_{eff}$  che è definito dall'equazione 2.10.

$$D_{eff} = D_{iw} K_p K_r \frac{\varepsilon}{\tau} \quad \text{Equazione 2.10}$$

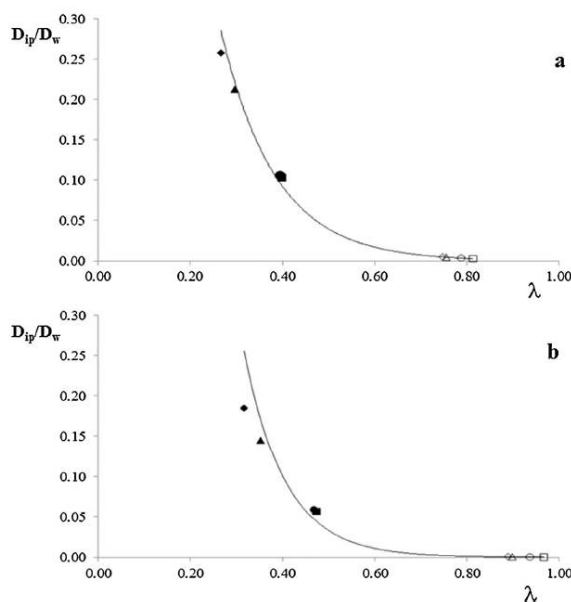
dove  $\varepsilon$  è la porosità del polimero, o frazione vuota, riferito al volume dei pori disponibili per la diffusione e  $\tau$  è la tortuosità, che descrive le caratteristiche geometriche dei pori. Il coefficiente di equilibrio di partizionamento,  $K_p$ , è il rapporto tra la concentrazione del farmaco all'interno dei pori e la concentrazione del farmaco fuori dei pori,  $K_r$ , descrive la ridotta diffusività del farmaco all'interno dei pori quando un principio attivo di diametro  $d_s$ , ha dimensioni paragonabili al nanoporo di diametro,  $d_r$ . La diffusione di un principio attivo attraverso i pori di un *carrier* macromolecolare è stata anche affrontata da Meadows e Peppas che hanno teorizzato un modello semi-empirico che può essere espresso dall'equazione 2.11 (Eyring, 1936).

$$\frac{D_{ip}}{D_w} = (1 - \lambda)^2 (1 - 2.104\lambda + 2.09\lambda^3 - 0.95\lambda^5) \quad \text{Equazione 2.11}$$

dove  $\lambda$  è il rapporto tra il diametro del farmaco,  $d_s$ , e il diametro medio dei pori,  $d_p$ , mentre  $D_{ip}$  e  $D_w$  sono i coefficienti di diffusione del farmaco attraverso il poro e in acqua, rispettivamente. È chiaro che quando le dimensioni del principio attivo si avvicinano a quelle dei nanopori, il rapporto  $D_{ip}/D_w$  si avvicina a uno.

Dati di letteratura riportano che i raggi di girazione dei principi attivi impiegati sono 3,7 Å per DC e 4,4 Å per NPX, indicando un diametro molecolare medio rispettivamente di 7,4 e 8,8 Å (Bester-Rogac, 2009). Questi dati, insieme ai parametri strutturali dei diversi idrogel, possono essere sfruttati per predire, sulla base del modello di Peppas-Meadows, l'importanza delle limitazione diffusionali che intervengono nel momento in cui il principio attivo è rilasciato in un mezzo acquoso simulante un fluido biologico.

A causa dei valori del parametro di restrizione ( $\lambda$  varia da 0,3 a 0,8), le matrici analizzate hanno determinato variazioni significative del coefficiente di diffusione dei principi attivi analizzati (Figura 2.9).



**Figura 2.9:** Coefficiente di diffusione normalizzato per DC (a) e NPX (b) in funzione del parametro di restrizione  $\lambda$  (diametro farmaco/dimensione poro) per gli idrogel  $P_1$  ( $\blacktriangle$ ),  $P_2$  ( $\blacksquare$ ),  $P_3$  ( $\blacklozenge$ ) e  $P_4$  ( $\bullet$ ) a 25°C (simbolo pieno) e 40°C (simbolo vuoto).

Per il campione  $P_3$ , caratterizzato da un valore medio dei pori di 27,8 Å, il coefficiente di diffusione ridotto,  $D_{ip}/D_w$ , è risultato essere 0,258 per DC e 0,185 per NPX; al contrario, la dimensione delle maglie di  $P_2$  ( $\xi = 9,3$  Å) fornisce i valori per  $D_{ip}/D_w$  di 0,103 e 0,0566 per DC e NPX, rispettivamente. La riduzione dei coefficienti di diffusione risultano essere in accordo con i parametri di caricamento registrati durante la procedura di impregnazione. Come conseguenza del collasso dell'idrogel, il  $D_{ip}/D_w$  diminuisce drasticamente con un aumento esponenziale dei vincoli diffusionali. In questo caso, il contributo diffusionale al rilascio del farmaco risulta essere secondario e altri meccanismi devono essere invocati per spiegare il rilascio degli agenti terapeutici.

Considerando la geometria ben definita dei campioni è stato indagato il meccanismo di rilascio dei principi attivi (Fickiano o non-Fickiano) utilizzando equazioni semi-empiriche riportate in letteratura. In particolare, le cinetiche del rilascio di DC e NPX a 25°C, temperatura inferiore alla LCST, sono state analizzate mediante l'equazione semi-empirica 2.12 che considera le percentuali di rilascio inferiori al 60% (Ritger e Peppas, 1987).

$$\frac{M_t}{M_0} = Kt^n \quad \text{Equazione 2.12}$$

A secondo del valore dell'esponente  $n$ , è possibile un'analisi delle cinetiche di rilascio. Per film polimerici quando  $n$  è uguale a 0,5 risulta predominante un meccanismo regolato dalla diffusione Fickiana, per  $n$  uguale a 1,0 avviene un trasporto Caso II, mentre valori compreso nell'intervallo di questi due valori sono registrati nel caso di meccanismi intermedi di trasporto. Un meccanismo diffusionale pseudo-Fickiano è osservato per valori di  $n$  inferiori a 0,50, in cui l'andamento osservato è simile a quello indicato dall'equazione di Fick, ma con un più lento approccio all'equilibrio. Infine, un meccanismo catalogato come Super-Caso II ( $n > 1,0$ ) risulta caratterizzato da un elevata velocità di rilascio e un rapido raggiungimento dell'equilibrio. In Tabella 2.4 sono riportati i dati di rilascio frazionale insieme con i valori stimati del coefficiente di correlazione,  $R^2$ . Dai risultati si osserva che negli esperimenti a 25°C, l'esponente  $n$  risulta compreso tra 0,24 e 0,62; quindi, sebbene dai profili di rilascio sia evidente una componente diffusionale nel meccanismo di cessione del farmaco, i dati empirici testimoniano l'intervento di altri meccanismi anomali. In effetti analizzando specificatamente i dati ottenuti si può notare come un comportamento praticamente diffusionale è stato registrato solo per il polimero P<sub>2</sub> incorporato con NPX e P<sub>3</sub> incorporato con DC; negli altri casi è possibile un andamento pseudo-fickiano e per i polimeri P<sub>1</sub> e P<sub>3</sub> incorporati con NPX un profilo di rilascio che, discostandosi leggermente dal fickiano puro, tende ad un trasporto Caso II.

**Tabella 2.4:** Parametri delle cinetiche di rilascio impiegando l'equazione di Ritger-Peppas.

	$\frac{M_t}{M_0} = Kt^n$ Equazione 2.12					
	<b>K 10<sup>3</sup>(min<sup>-n</sup>)</b>		<b>n</b>		<b>R<sup>2</sup></b>	
	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C
P <sub>1</sub> _DC*	42,3±2,2	53,7±1,2	0,30±0,04	0,18±0,03	0,95	0,91
P <sub>2</sub> _DC*	30,9±3,2	42,9±2,2	0,24±0,02	0,12±0,03	0,90	0,88
P <sub>3</sub> _DC*	65,5±3,0	N.A.	0,42±0,04	N.A.	0,99	N.A.
P <sub>4</sub> _DC*	36,5±2,9	51,5±2,0	0,33±0,01	0,29±0,02	0,91	0,90
P <sub>1</sub> _DC**	34,4±1,8	48,9±1,4	0,38±0,03	0,21±0,02	0,95	0,95
P <sub>2</sub> _DC**	25,3±2,0	37,3±0,9	0,26±0,05	0,06±0,01	0,90	0,85
P <sub>3</sub> _DC**	57,3±2,1	N.A.	0,49±0,05	N.A.	0,99	N.A.
P <sub>4</sub> _DC**	31,8±3,5	44,8±2,5	0,36±0,04	0,09±0,02	0,96	0,76
P <sub>1</sub> _NPX**	23,6±2,7	42,3±0,8	0,62±0,08	0,23±0,02	0,95	0,94
P <sub>2</sub> _NPX**	16,8±0,3	18,1±2,0	0,51±0,07	0,15±0,01	0,99	0,97
P <sub>3</sub> _NPX**	47,7±0,9	35,0±1,9	0,61±0,07	0,21±0,01	0,99	0,98
P <sub>4</sub> _NPX**	30,9±1,0	21,9±1,0	0,42±0,07	0,12±0,01	0,97	0,93

impregnazione (\*) e incorporazione durante il processo di polimerizzazione (\*\*)

Utilizzando l'equazione 2.13 di Peppas-Sahlin, applicabile per percentuali di rilascio inferiore al 90%, è possibile ottenere informazioni più dettagliate (Peppas e Sahlin, 1989).

$$\frac{M_t}{M_0} = K_1 \cdot t^{1/2} + K_2 \cdot t \quad \text{Equazione 2.13}$$

I valori di  $K_1$  e  $K_2$  dell'equazione 2.13 sono riportati in Tabella 2.5. Per tutti campioni, il termine  $K_1 t^{1/2}$  (indicante il contributo Fickiano) è risultato maggiore del termine  $K_2 t$  (indicante il contributo dei meccanismi diffusionali del Caso II): ciò conferma che a 25°C il meccanismo predominante per il rilascio dei farmaci è rappresentato dalla diffusione Fickiana attraverso le maglie del reticolo costituenti il film polimerico.

**Tabella 2.5:** Parametri delle cinetiche di rilascio impiegando l'equazione di Peppas-Sahlin.

	$\frac{M_t}{M_0} = K_1 \cdot t^{1/2} + K_2 \cdot t$					
	Equazione 2.13					
	$K_1 10^3 (\text{min}^{-1/2})$		$K_2 10^3 (\text{min}^{-1})$		$R^2$	
	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C
P <sub>1</sub> _DC*	43,5±2,1	51,4±3,1	-5,9±0,6	-7,6±0,9	0,96	0,87
P <sub>2</sub> _DC*	31,9±1,4	39,5±2,5	-4,2±0,3	-5,9±0,5	0,98	0,88
P <sub>3</sub> _DC*	79,7±2,0	30,7±1,0	-17,1±0,4	20,2±0,9	0,99	0,69
P <sub>4</sub> _DC*	39,7±1,9	47,5±2,9	-5,6±0,2	-7,3±0,3	0,96	0,79
P <sub>1</sub> _DC**	37,6±1,6	45,9±1,9	-4,6±0,3	-6,9±0,2	0,98	0,83
P <sub>2</sub> _DC**	26,3±1,3	32,1±1,6	-3,3±0,2	-5,0±0,1	0,97	0,66
P <sub>3</sub> _DC**	75,4±2,9	59,8±1,9	-15,5±0,4	-9,5±0,3	0,99	0,52
P <sub>4</sub> _DC**	35,4±1,8	39,8±1,8	-4,7±0,2	-6,1±0,3	0,96	0,79
P <sub>1</sub> _NPX**	33,4±1,9	40,9±1,7	-3,5±0,1	-5,8±0,2	0,97	0,91
P <sub>2</sub> _NPX**	8,9±0,3	14,7±0,5	-0,3±0,1	-1,9±0,2	0,93	0,82
P <sub>3</sub> _NPX**	42,3±1,1	48,3±1,6	-4,4±0,2	-6,4±0,3	0,98	0,96
P <sub>4</sub> _NPX**	22,7±0,9	27,6±0,8	-2,2±0,2	-4,0±0,3	0,99	0,84

Impregnazione (\*) e incorporazione durante il processo di polimerizzazione (\*\*)

A 40°C, accanto agli effetti diffusionali vanno considerati ulteriori meccanismi di rilascio ed in particolare diventa importante il fenomeno di “squeezing out” del polimero rigonfiato. In queste condizioni di temperatura, per tutti i campioni i valori di  $n$  sono risultati compresi tra 0,06 e 0,29. Ciò indica per tutti i campioni un rilevante apporto della diffusione non-Fickiana ai profili di rilascio registrati. Tale contributo diventa tanto più rilevante quanto più ci si allontana dal valore ideale di 0,5. Dall'equazione di Peppas-Sahlin è possibile ottenere ulteriori informazioni: la differenza tra i due termini a 40°C risulta minore rispetto a 25°C,

indicando quindi che per temperature superiori alla LCST il ruolo della componente diffusionale diventa meno importante nel meccanismo di rilascio complessivo.

Un modello differente riportato in letteratura analizza il rilascio di soluto da un idrogel considerandolo come un fenomeno di partizione (Reis et al., 2007).

La cinetica di rilascio descritta attraverso il modello di Reis considera valori di  $M_t/M_0 \leq 1.0$ , e può essere di primo o secondo ordine come indicato nelle seguenti equazioni:

$$\frac{M_t}{M_0} = M_{\max} (1 - e^{-(k_R / M_{\max})t}) \quad \text{Equazione 2.14}$$

$$\frac{M_t}{M_0} = \frac{M_{\max}(e^{2(k_R / \alpha)t} - 1)}{1 - 2M_{\max} + e^{2(k_R / \alpha)t}} \quad \text{Equazione 2.15}$$

dove  $M_{\max}$  è il valore massimo di rilascio del farmaco dalla matrice,  $k_r$  è una costante che indica il tasso di rilascio,  $\alpha$  è un parametro che esprime la ripartizione del farmaco tra il solvente e la matrice polimerica,  $t_{1/2}$  è il tempo necessario al farmaco per raggiungere il 50% di  $M_{\max}$ .

$\alpha$  è definito come il rapporto delle concentrazioni di soluto tra le due fasi come riportato nell'equazione 2.16:

$$\alpha = \frac{M_{\max}}{1 - M_{\max}} \quad \text{Equazione 2.16}$$

Un elevato valore di  $\alpha$  indica alta affinità di rilascio dell'idrogel.

$t_{1/2}$  può essere determinato per un rilascio di primo e secondo ordine dalle equazione 2.17 e 2.18:

$$t_{1/2} = \ln\left(\frac{1}{2}\right) \cdot \frac{M_{\max}}{k_R} \quad \text{Equazione 2.17}$$

$$t_{1/2} = \frac{\alpha}{2k_R} \cdot \ln(3 - 2M_{\max}) \quad \text{Equazione 2.18}$$

L'applicabilità di tali modelli ai profili di rilascio registrati è confermata dai valori  $R^2$  riportati in Tabella 2.6 e che sottolineano come per tutti i sistemi realizzati i valori siano superiori a 0,92.

**Tabella 2.6:** Valori di  $R^2$  per le cinetiche del primo e del secondo ordine.

	$\frac{M_t}{M_0} = M_{\max} (1 - e^{-(k_R / M_{\max})t})$		$\frac{M_t}{M_0} = \frac{M_{\max} (e^{2(k_R / \alpha)t} - 1)}{1 - 2M_{\max} + e^{2(k_R / \alpha)t}}$	
	$R^2$		$R^2$	
	25°C	40°C	25°C	40°C
<b>P<sub>1</sub>_DC*</b>	0,9893	0,9936	0,9963	0,9992
<b>P<sub>2</sub>_DC*</b>	0,9931	0,9985	0,9959	0,9997
<b>P<sub>3</sub>_DC*</b>	0,9742	0,9498	0,9856	0,9679
<b>P<sub>4</sub>_DC*</b>	0,9983	0,9838	0,9991	0,9868
<b>P<sub>1</sub>_DC**</b>	0,9751	0,9967	0,9734	0,9968
<b>P<sub>2</sub>_DC**</b>	0,9774	0,9881	0,9799	0,9896
<b>P<sub>3</sub>_DC**</b>	0,9823	0,9605	0,9877	0,9685
<b>P<sub>4</sub>_DC**</b>	0,9897	0,9807	0,9898	0,9781
<b>P<sub>1</sub>_NPX**</b>	0,9908	0,9278	0,9386	0,9447
<b>P<sub>2</sub>_NPX**</b>	0,9573	0,9651	0,9714	0,9669
<b>P<sub>3</sub>_NPX**</b>	0,9771	0,9613	0,9896	0,9664
<b>P<sub>4</sub>_NPX**</b>	0,9934	0,9329	0,9969	0,9295

\*Impregnazione; \*\*Incorporazione durante la reticolazione.

In tabella 2.7 sono riportati i valori di  $M_{\max}$ ,  $\alpha$ ,  $k_R$ , and  $t_{1/2}$  per ogni formulazione proposta calcolati utilizzando i profili di rilascio registrati a 25 e 40°C.

**Tabella 2.7:** Valori di  $M_{\max}$ ,  $\alpha$ ,  $k_R$ , and  $t_{1/2}$  per il rilascio di DC e NPX dalle matrici polimerimeriche P<sub>1-4</sub>.

	$M_{\max}$		$\alpha$		$k_R$		$t_{1/2}$	
	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C
<b>P<sub>1</sub>_DC*</b>	0.9998±0.2548	0.9998±0.0235	4999	4999	1.7815±0.0901	8.9654±0.4561	0.56	0.11
<b>P<sub>2</sub>_DC*</b>	0.6430±0.0073	0.6571±0.0018	1.8011	1.9163	0.6117±0.0266	1.3745±0.0198	0.79	0.36
<b>P<sub>3</sub>_DC*</b>	0.7258±0.0157	0.7563±0.0211	2.6470	3.1034	0.7562±0.0623	1.3780±0.1817	0.76	0.45
<b>P<sub>4</sub>_DC*</b>	0.5744±0.0035	0.5808±0.0101	1.3496	1.3855	0.3573±0.0073	0.8387±0.0660	1.16	0.50
<b>P<sub>1</sub>_DC**</b>	0.9435±0.0576	0.7950±0.0070	16.6991	3.8780	1.5128±0.2715	1.9250±0.0922	0.59	0.35
<b>P<sub>2</sub>_DC**</b>	0.6457±0.0174	0.5527±0.0087	1.8225	1.2356	0.5345±0.0522	0.7308±0.0501	0.91	0.54
<b>P<sub>3</sub>_DC**</b>	0.7335±0.0162	0.6370±0.0179	2.7523	1.7548	0.6400±0.0496	0.8397±0.1016	0.92	0.57
<b>P<sub>4</sub>_DC**</b>	0.5118±0.0100	0.4383±0.0106	1.0483	0.7803	0.3290±0.0222	0.3976±0.0374	1.09	0.74
<b>P<sub>1</sub>_NPX**</b>	0.9988±5.5372	0.7931±0.0230	832.3333	3.8332	0.7342±0.1200	1.9452±0.3452	1.36	0.34
<b>P<sub>2</sub>_NPX**</b>	0.7019±0.0197	0.5856±0.0120	2.3546	1.4131	0.6100±0.0591	1.3144±0.1716	0.90	0.32
<b>P<sub>3</sub>_NPX**</b>	0.7758±0.0148	0.6245±0.0142	3.4603	1.6631	0.6538±0.0381	0.9710±0.1151	0.98	0.48
<b>P<sub>4</sub>_NPX**</b>	0.6315±0.0072	0.3682±0.0111	1.7137	0.5828	0.3165±0.0090	0.6492±0.1130	1.49	0.37

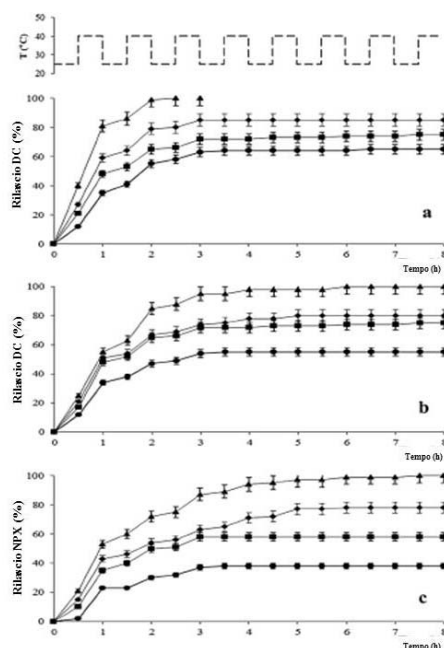
\*Impregnazione; \*\*Incorporazione durante la reticolazione.



Per tutti i campioni, il minore valore di  $t_{1/2}$  corrispondente alla maggiore velocità di rilascio è stato registrato a 40°C, come conseguenza della rapida contrazioni dell'idrogel a temperature superiori alla LCST di ciascun polimero. Per i materiali caricati con DC, il comportamento agli estremi è stato osservato per P<sub>1</sub> e P<sub>4</sub> che hanno mostrato rispettivamente la velocità di rilascio più alta e più bassa. Inoltre, dovrebbe essere sottolineato che i profili di rilascio dei campioni in cui il principio attivo è stato incorporato nel corso del processo di polimerizzazione il rilascio è molto più lento e la massima quantità di farmaco rilasciata nell'arco delle 24h risulta ridotta. Infine, in accordo con il grado di reticolazione degli idrogel e con i parametri strutturali del reticolo calcolati, il minore valore di  $\alpha$  è stato riscontrato per il polimero P<sub>4</sub>.

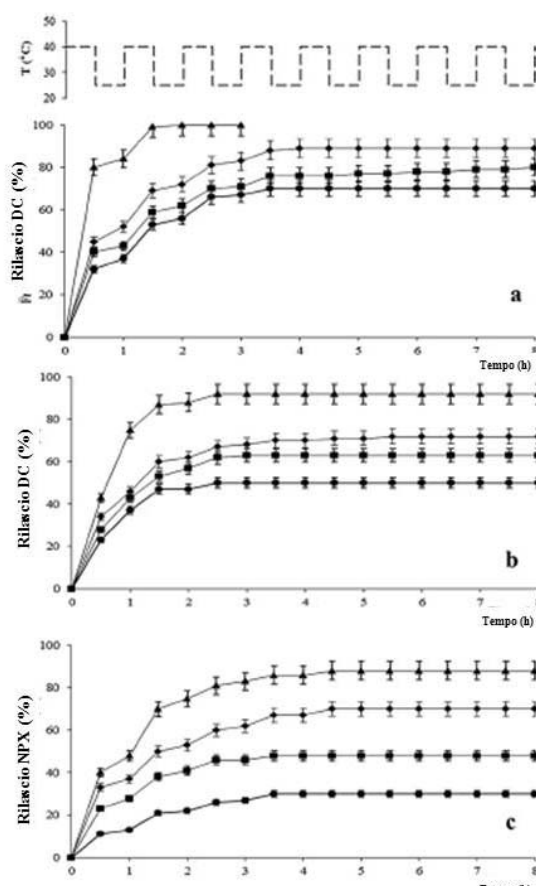
### 2.5.1 Rilascio pulsato dai film polimerici

Particolarmente interessante in campo biomedico e farmaceutico risulta l'utilizzo di tali materiali come *device* in grado di assicurare un rilascio pulsato variando ciclicamente la temperatura intorno alla LCST di ogni formulazione. In tal modo l'affinità dell'idrogel per il mezzo acquoso viene opportunamente cambiata e il profilo di rilascio modulato in base alle esigenze del paziente. Esperimenti di rilascio *in vitro* cambiando ciclicamente la temperatura tra 25°C e 40°C partendo sia da un polimero nello stato rigonfio (Figura 2.10), sia nello stato collassato (Figura 2.11) sono stati eseguiti in tampone fosfato a pH 7.0 e i profili di rilascio sono stati registrati cambiando la temperatura ad intervalli di tempo regolari.



**Figura 2.10:** Profili di rilascio dei farmaci in funzione del tempo per gli idrogel P<sub>1</sub> (▲), P<sub>2</sub> (■), P<sub>3</sub> (◆) e P<sub>4</sub> (●). Gli idrogel sono stati stabilizzati a 25°C, e la temperatura variata ciclicamente tra 25 e 40 °C. DC impregnato (a); DC incorporato (b); NPX incorporato (c).

La maggior quantità di farmaco inizialmente rilasciata è stata osservata per i polimeri impregnati con DC partendo da una temperatura di 40°C (Figura 2.11a) in conseguenza del rapido collasso dell'idrogel. In tal caso l'80% del DC viene rilasciato in 30 min rendendo poco evidenti gli effetti generati dai successivi cambi di temperatura. Quando la temperatura iniziale del mezzo di rilascio è al di sotto della LCST risulta evidente l'effetto della temperatura sulla quantità di farmaco rilasciata. In particolare, DC viene rilasciato più velocemente a 40°C e più lentamente a 25°C dove interviene un meccanismo prevalentemente diffusionale.



**Figura 2.11:** Profili di rilascio dei farmaci in funzione del tempo per gli idrogel  $P_1$  (▲),  $P_2$  (■),  $P_3$  (◆) e  $P_4$  (●). Gli idrogel sono stati stabilizzati a 40°C, e la temperatura variata ciclicamente tra 25°C e 40 °C. DC impregnato (a); DC incorporato (b); NPX incorporato (c).

Sostanzialmente diversi appaiono i risultati registrati con i polimeri in cui il principio è stato incorporato nel corso del processo di polimerizzazione (Figura 2.10 b-c e Figure 2.11 b-c). In particolare, in questo caso è stata registrata una considerevole riduzione dell'effetto *burst* dovuta soprattutto al fatto che il principio attivo si trova uniformemente disperso nel reticolo polimerico e solo una piccola percentuale è confinata in prossimità della superficie. In questo caso, il rilascio dell'agente terapeutico è risultato essere più lento e i diversi profili registrati

possono essere considerati una conseguenza del grado di reticolazione dell'idrogel e della diversa affinità farmaco-matrice.

## **2.6 Conclusioni**

Le caratteristiche strutturali di film polimerici sensibili alla temperatura sono state ampiamente analizzate e tali materiali sono stati proposti come *carrier* polimerici per il rilascio transdermico di farmaci antiinfiammatori non-steroidi (DC e NPX). In particolare, l'influenza della temperatura sulla percentuale di farmaco rilasciata è stata determinata e analizzata in termini di parametri sintetici quali il rapporto monomero funzionale/reticolante all'interno del *feed* polimerico e lo spessore dell'idrogel. Inoltre, opportune equazioni semi-empiriche hanno consentito la valutazione del contributo diffusionale al profilo di rilascio a temperature inferiori alla LCST, mentre per valori sopra la LCST, una deviazione significativa dal trasporto Fickiano puro è stato registrato.

I profili di rilascio dei farmaci registrati risultano dipendenti da due fenomeni: il rigonfiamento/collasso dell'idrogel dipendente dalla temperatura del mezzo circostante e dalla diffusione dell'agente terapeutico attraverso le maglie del reticolo polimerico. L'analisi della struttura del sistema tridimensionale indica che le dimensioni delle maglie diminuisce aumentando la temperatura attraverso la LCST caratteristica di ogni composizione; tale mutamento, inoltre, modifica i vincoli diffusionali, modulando nel tempo il profilo di rilascio del principio attivo. È interessante notare, infine, come tale comportamento sia reversibile e che tali sistemi risultino ottimali per un rilascio *on-off* di agenti terapeutici. Questi risultati hanno rivelato il grande potenziale di questi dispositivi per la somministrazione dei farmaci dimostrando notevoli vantaggi per un'applicazioni in campo biomedico e farmaceutico.

## **2.7 Parte sperimentale**

### **2.7.1. Materiali**

N-isopropilacrilammide, N-N' etilenbisacrilammide, Naprossene, Diclofenac sodico, acido acetico glaciale, ammonio acetato sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co, Milano, Italia). Irgacure 2959 (1-[4-(2-idrossietossi)-fenil]-2-idrossi-2-metil-1-propan-1-one, con un massimo di assorbimento a 275 nm, acquistato da Ciba) è stato utilizzato come fotoiniziatore. Acetonitrile, etanolo, metanolo e acqua, tutti HPLC-grade, sono stati acquistati dalla Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia).

### 2.7.2 Strumentazione

Gli spettri FT-IR sono stati effettuati su pasticche di KBr, utilizzando uno spettrofotometro Jasco FT-IR 4200 nel range di lunghezza d'onda 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Il segnale è stato ottenuto eseguendo 100 scan a una risoluzione di 1  $\text{cm}^{-1}$ . Gli studi morfologici (superficie e sezione dei film polimerici) sono stati eseguiti tramite un microscopio a scansione elettronica Leica LEO 420; la superficie dei campioni è stata resa conduttrice mediante la deposizione di uno strato di oro (spessore  $\sim 100\text{\AA}$ ), effettuato sotto atmosfera di argon. Per analizzare la sezione i campioni sono stati crio-fratturati dopo immersione in azoto liquido. Le analisi calorimetriche sono state effettuate utilizzando un calorimetro a scansione differenziale Netzsch DSC 200 PC riscaldando circa 10 mg di campione rigonfiato (48 h in acqua fino al raggiungimento del massimo *swelling*) da 25 a 55°C sotto azoto con una velocità di flusso pari a 25  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  e un riscaldamento di 3°C al minuto.

### 2.7.3 Sintesi dei copolimeri

Per la sintesi dei copolimeri, NIPAAm e EBA nell'opportuno rapporto stechiometrico sono disciolti in acqua bidistillata, e al fine di facilitare la solubilizzazione dei monomeri la soluzione è stata sottoposta a sonicazione (3x15 min). A solubilizzazione avvenuta alla soluzione è stato aggiunto l'Irgacure 2959 all'1% m/m rispetto alla carica monometrica. Per la reazione di polimerizzazione due lastre di vetro (10x10 cm) sono state assemblate tramite clips interponendo tra i due uno spaziatore di Teflon dell'opportuno spessore (0,8 e 1,6 mm). La soluzione precedentemente preparata è stata degassata sotto flusso di azoto per 20 minuti e trasferita poi, tra i piatti di vetro assemblati per essere sottoposta a polimerizzazione UV (Philips HPK 125, 500  $\text{mW cm}^{-2}$ ,  $\lambda = 275\text{ nm}$ ,  $t = 10\text{ min}$ ). I polimeri infine, sono stati lavati per 24-48 h con acqua distillata per allontanare le specie non reagite ed essiccati sotto vuoto in presenza di  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

### 2.7.4 Studi di rigonfiamento

Un'attenta analisi della struttura reticolata degli idrogel preparati è stata eseguita tramite il metodo di Peppas e Meadows precedentemente descritto. Campioni di approssimativamente 1  $\text{cm}^2$  sono stati tagliati da ogni film polimerico ottenuto, e pesati in aria e in un non solvente (*n*-eptano). I campioni sono stati quindi posizionati in una soluzione di tampone fosfato (pH = 7,0) per 24h a 25°C, utilizzando un bagno termostato, fino al raggiungimento dell'equilibrio, e di nuovo pesati in aria e in *n*-eptano. La temperatura del bagno termostato

è stata quindi portata a 40°C per altre 24h, trascorse le quali i copolimeri sono stati nuovamente pesati in aria e *n*-eptano.

### **2.7.5 Caricamento del farmaco mediante incorporazione**

Mediante la tecnica di incorporazione, i farmaci (Naproxene e Diclofenac sodico) sono stati caricati nella matrice polimerica durante il processo di polimerizzazione. In particolare, un opportuno volume di soluzione del farmaco è stato aggiunto alla miscela di polimerizzazione in modo da assicurare una percentuale di impregnazione del 10% m/m. Il film ottenuto lavato con aliquote di acqua al fine di allontanare le specie monomeriche non reagite e l'iniziatore è stato lasciato poi essiccare sotto cappa per 48 h: per i polimeri caricati con Naprossene è stata utilizzata come soluzione di lavaggio acqua acida (soluzione al 5% v/v di acido acetico glaciale), mentre per il Diclofenac sodico, etanolo assoluto.

La determinazione della quantità di farmaco intrappolata è stata eseguita sottoponendo la matrice caricata di farmaco (circa 100 mg) a processo estrattivo tramite *soxhlet* utilizzando come solvente di estrazione 200 ml di una miscela 3/7 v/v metanolo/acqua per 48h e quindi 200 ml di etanolo per altre 48h. I solventi di estrazione sono stati analizzati tramite analisi HPLC al fine di determinare la concentrazione di ciascun farmaco e quindi la percentuale di principio attivo caricato dalle matrici.

### **2.7.6 Caricamento del farmaco mediante impregnazione**

Il caricamento del farmaco è stato effettuato anche tramite impregnazione. Una quantità nota di matrice (circa 200 mg) è stata messa a contatto con un piccolo volume (2,0 ml) di una soluzione a concentrazione nota di farmaco (10,0 mg/ml). L'impregnazione è stata condotta a temperatura ambiente sotto agitazione per tre giorni, durante i quali il farmaco a contatto con la superficie esterna delle microsfele stabilisce delle interazioni deboli con la matrice prevalentemente a livello superficiale. Successivamente, il solvente è stato rimosso per filtrazione e i film polimerici sono stati essiccati a 40°C sotto vuoto fino a peso costante.

### **2.7.7 Stabilità dei principi attivi a pH 7.0 a 25 e 40°C**

La stabilità dei farmaci è stata studiata a pH 7,0 e a differenti temperature (25 e 40°C). 10 mg di principio attivo sono stati incubati a 25 e 40°C in tampone fosfato  $10^{-3}$  M a pH 7,0. A determinati intervalli di tempo, corrispondenti agli stessi tempi degli esperimenti di rilascio, i campioni sono stati analizzati tramite analisi HPLC. Le analisi HPLC sono state condotte usando un cromatografo Jasco PU-2080 equipaggiato con iniettore Rheodyne 7725i (loop di

20 µl), un detector Jasco UV-2075 e un integratore Jasco-Borwin. Per ottenere la separazione cromatografica è stata utilizzata a temperatura ambiente una colonna C<sub>18</sub> a fase inversa (µBondapak, 150×4.6 mm, diametro interno pari a 10 µm acquistata dalla Waters)

Le condizioni cromatografiche per i due farmaci sono:

- Naprossene: la fase mobile è acetonitrile/tampone fosfato 5 mM, pH 6,8 (5/5, v/v), la velocità di flusso è di 0,5 ml min<sup>-1</sup>, lo spettrofotometro UV è settato a 280 nm (Venkateswara Rao et al., 2014). Tempo di ritenzione di 4,5 min, limite di rilevamento 0,6 µM, limite di quantificazione 12,1 µM.
- Diclofenac sodico: la fase mobile è ammonio acetato/metanolo/acetonitrile (4/3/3, v/v). Il pH della porzione acquosa della fase mobile è stato aggiustato con acido acetico glaciale, la velocità di flusso è 0,6 ml min<sup>-1</sup>, lo spettrofotometro UV è stato settato a 284 nm (Altimari et al., 2012). Tempo di ritenzione di 4,5 min, limite di rilevamento 0,6 µM, limite di quantificazione 14 µM.

### **2.7.8 Rilascio dei farmaci dal film polimerico**

Gli studi di rilascio sono stati condotti usando il metodo di dissoluzione descritto nella USP XXIV a temperature inferiore (25°C) e superiore (40°C) al valore della LCST di ciascun polimero. Quantità note (circa 10 mg) di ogni matrice impregnata o incorporata sono state poste in 10 ml del mezzo di rilascio costituito da una soluzione acquosa (PBS, pH 7,0, 10<sup>-3</sup> M) alle temperature di 25°C e 40°C. Ad intervalli di tempo prestabili è stata prelevata una quantità del mezzo di rilascio (1,0 ml) che è stata analizzata mediante HPLC per calcolare la quantità di principio attivo presente, mentre altri 2,0 ml sono stati inseriti nel mezzo di rilascio per mantenere costante il volume. Le condizioni HPLC per ciascun principio attivo sono riportate nel precedente paragrafo.

I profili di rilascio pulsato sono stati ottenuti immergendo i polimeri caricati in tampone fosfato a pH 7,0 (10 ml, 10<sup>-3</sup> M) e alternando la temperatura a intervalli di tempo stabiliti, tra 25 e 40°C. Gli esperimenti di rilascio sono stati eseguiti stabilizzando gli idrogel a due differenti temperature iniziali in assenza di mezzo di rilascio. I campioni, a intervalli di tempo stabiliti, sono stati filtrati (Iso-Disc™ Filters PTFE 25-4 25 mm x 0.45 µm, Supelco) e analizzati tramite HPLC.

### **2.7.9 Analisi statistica**

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato, ed i risultati sono stati in accordo entro ± 5%, che è il margine di errore standard.

# CAPITOLO 3

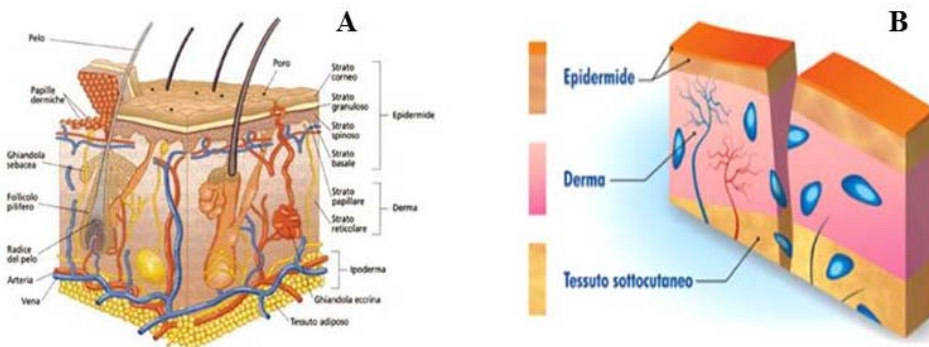
## Preparazione di un dispositivo elettro-modulabile per il rilascio di farmaci

### 3.1 Introduzione

La progettazione, sintesi e caratterizzazione di materiali polimerici innovativi, sensibili ad un campo elettrico, da utilizzare come dispositivi medicati per il rilascio controllato di farmaci a livello cutaneo, è stato un aspetto che è stato affrontato nel corso del dottorato di ricerca. Tra i diversi stimoli esterni utilizzati per la modulazione del rilascio di un farmaco da un dispositivo biomedico, il campo elettrico è il più convenzionale e conveniente dal punto di vista del controllo del segnale, soprattutto a livello cutaneo, in quanto è possibile con accuratezza modulare e gestire l'impulso elettrico. L'impiego di materiali poli-elettrolitici permette di conferire al materiale finale proprietà “*elettro-responsive*”, che permettono la modulazione, in termini di tempo e sito d'azione, della cessione di principi attivi. (Spizzirri e al., 2013a). L'applicazione cutanea prevista per questi dispositivi offre numerosi vantaggi terapeutici, in quanto si ha l'approccio con un tipo di terapia localizzata, minimizzando gli effetti tossici che possono essere legati alla via di somministrazione sistemica. Il progetto che è stato affrontato ha portato alla realizzazione di dispositivi attraverso l'inserzione di una garza di cotone all'interno della matrice polimerica al fine di migliorare le prestazioni meccaniche del materiale composito (Cirillo et al., 2015). Lo scopo ultimo del lavoro è quello di realizzare un sistema in grado di modulare il rilascio del farmaco in base alle esigenze, creando un dispositivo di tipo *on-demand*, in grado cioè di attivare il rilascio del principio attivo in particolari condizioni e di rallentarlo (o bloccarlo del tutto) in altre. La sintesi del composito è stata effettuata utilizzando specie monomeriche acriliche, mentre il farmaco testato è stato il Diclofenac sodico (DS). La metodica sperimentale è stata opportunamente ottimizzata e gli esperimenti di rilascio effettuati hanno permesso di valutare il *device* progettato come *carrier* per il rilascio transdermico di principi attivi da applicare sia in campo farmaceutico, sia biomedico.

### 3.2 Ferite cutanee

La pelle è il maggiore organo del corpo umano, che costituisce circa l'8% della massa corporea, e svolge un ruolo essenziale nel mantenimento dell'omeostasi, come barriera protettiva da danni di natura termica, chimica e meccanica e come organo sensoriale che capta gli stimoli provenienti dall'ambiente esterno. La cute intatta, non danneggiata, è costituita da tre strati principali che sono: *epidermide* (strato superficiale), *derma* (strato intermedio) e *ipoderma* (strato più profondo) (Figura 3.1) (Mayet et al., 2014):



**Figura 3.1:** *Struttura della pelle intatta (A) e della pelle lesa (B).*

Un ferita può essere definita come un'interruzione della normale struttura della cute causata da agenti esterni di natura fisica, chimica o termica, che impedisce alla pelle di svolgere le sue normali funzioni di barriera di difesa naturale e quindi promuove lo sviluppo di microflora batterica (Shemesh e Zilberman, 2014).

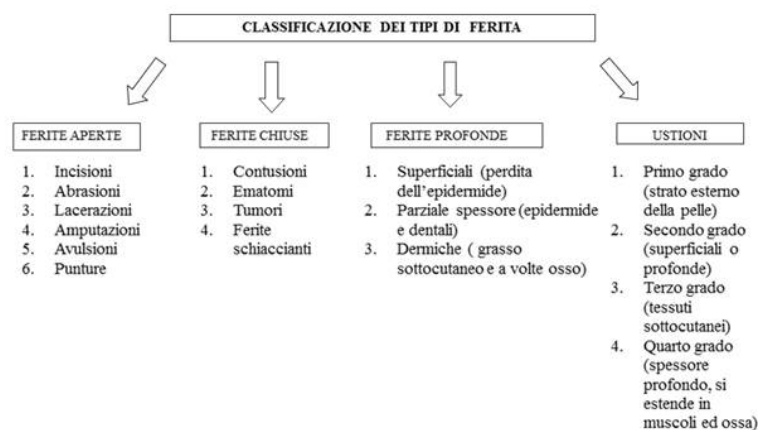
In relazione al processo di guarigione, le ferite possono essere classificate in:

- **Ferite cutanee acute**, prevedono un breve periodo di guarigione e sono causate da traumi come abrasioni, avulsioni, incisioni, contusioni e lacerazioni (Mayet et al. 2014). Queste ferite spesso comportano danni alla struttura vascolare sottostante portando al trasporto alterato di metaboliti e fattori di crescita, da e verso il sito della ferita, che ritardano il processo di guarigione (Cabodi et al., 2007).
- **Ferite cutanee croniche**, a differenza delle ferite acute, possono richiedere un lungo periodo di tempo per la guarigione, in genere superiore alle 12 settimane, e possono essere recidivanti (Mayet et al., 2014). Un esempio di ferite cutanee croniche sono quelle che si sviluppano in pazienti diabetici, che presentano un'alterata risposta ai processi di guarigione, e spesso non riescono a guarire per settimane o mesi quando vengono trattate con medicazioni cutanee tradizionali (Cabodi et al., 2007). Il



ritardato processo di guarigione può comportare un incremento di ulcerazioni e di casi di infezione delle ferite. Un esempio è l'ulcera del piede diabetico (DFUs, diabetic foot ulcers) (Moura et al., 2013), una complicazione cronica della neuropatia diabetica, che nei casi estremi può richiedere l'amputazione dell'arto.

In relazione alla tipologia le ferite possono essere classificate come segue (Figura 3.2):



**Figura 3.2:** *Classificazioni dei tipi di ferite.*

L'obiettivo principale della gestione di una ferita è quello di accelerare il processo di guarigione con minimo dolore per il paziente e scarsa o nulla formazione di tessuto cicatriziale residuo e impedire la proliferazione batterica nel sito della lesione (Mayet et al., 2014). Visti i differenti tipi di lesione e le diverse fasi nel processo di guarigione, non c'è una sola medicazione che può essere efficiente se applicata in tutte le situazioni. Tuttavia è possibile sviluppare e ottimizzare diversi materiali biocompatibili per l'allestimento di medicazioni che siano specifiche per il trattamento cutaneo di ciascuna ferita (Moura et al., 2013).

### 3.3 Classificazione e caratteristiche delle medicazioni topiche

Numerose sono le medicazioni topiche utilizzate per il trattamento di ferite cutanee più o meno complesse. Ogni tipo di ferita ha caratteristiche e tempi di guarigione diversi che richiedono differenti approcci terapeutici (Mayet et al., 2014). Una conoscenza approfondita delle principali categorie di prodotti per la cura delle lesioni, ed in particolare delle loro azioni, indicazioni e vantaggi può essere di grande aiuto nella scelta della medicazione più appropriata ai vari tipi di ferite. La classificazione delle medicazioni può essere fatta in base alla forma fisica, alla loro funzione, al materiale usato per allestire il dispositivo medicato,

alla loro applicazione. Ancora un altro criterio di classificazione suddivide le medicazioni in: medicazioni tradizionali, medicazioni avanzate, dispositivi per la guarigione delle ferite e prodotti per la rigenerazione della pelle (Mayet et al., 2014). Di seguito è riportata una tabella con i principali tipi di medicazioni e le specifiche proprietà di ognuna (Tabella 3.1).

**Tabella 3.1** *Classificazione delle medicazioni e loro proprietà.*

FORMA FISICA	MATERIALI/POLIMERI	AGENTI BIOATTIVI/ALTRI	APPLICAZIONI
Medicazioni cutanee tradizionali	Cotone; garze e bende di cotone	Possono essere usate in associazione con idrogel e idrocolloidi	Medicazioni primarie e secondarie
Wafer liofilizzati	Polimeri sintetici: poliuretani	Antibiotici e fattori di crescita	Medicazioni adesive e assorbenti
Idrocolloidi	Agenti che formano gel come: elastomeri, gelatina, pectina e adesivi	Agenti attivi come anestetici locali	Clinicamente vengono usati per medicare ferite umide e secche per l'allestimento di un ambiente ottimale per la ferita
Idrogel	Polimeri sintetici e naturali, polivinil pirrolidone e metacrilati	Antiinfiammatori, antimicrobici e anestetici locali	Medicazioni primarie rigonfiabili aventi proprietà idrofile
Medicazioni a base di films polimerici e films semipermeabili	Co-polimeri, omopolimeri e polimeri elasticizzanti sia naturali che sintetici	Incorporazione di agenti che accelerano il processo di guarigione come fattori di crescita, stabilizzatori e antimicrobici	Medicazioni primarie e secondarie con l'aggiunta di schiume, idrogel e idrocolloidi. Aggiungendo films semipermeabili viene favorito lo scambio gassoso e un ambiente umido.
Schiume per la guarigione delle ferite	Polimeri naturali e polisaccaridi. Matrici solide con particelle di gas disperse	Agenti terapeutici antidolorifici, antibatterici e antiinfiammatori	Rilascio controllato di farmaci e come matrice per la rigenerazione tissutale
Medicazioni multi strato	Polimeri naturali e sintetici	Agenti attivi come anestetici locali, antimicrobici e antiinfiammatori	Le medicazioni multi strato possono fornire proprietà terapeutiche e contemporaneamente adesione, adsorbimento, supporto meccanico e mantenimento di un ambiente umido
Nanofibre e scaffolds	Polimeri naturali, sintetici ed elettroconduttivi come chitosano, polivinil alcool e surfactanti	Agenti attivi come farmaci antiinfiammatori, antibiotici e antisettici	Medicazioni primarie e secondarie. Mimano le proprietà della pelle formando una pseudo pelle

I fattori che maggiormente influiscono sulla scelta della medicazione sono :

➤ Grado di essudazione della ferita.

Ad esempio nelle ferite croniche l'essudato presenta una maggiore concentrazione in metallo proteasi e una ridotta attività mitotica cellulare, caratteristiche che determinano il mantenimento di uno stato infiammatorio, bloccando l'insorgere dello stato proliferativo. L'essudato, sia in difetto che in eccesso, comporta un arresto se non un peggioramento dell'omeostasi della lesione. Quindi, il controllo dell'essudato rappresenta un fattore essenziale nella gestione delle lesioni cutanee. Le ferite che producono molto essudato devono essere trattate con medicazioni che ne assorbano l'eccesso, come schiume e alginati. Infatti se l'eccesso di essudato non viene rimosso la ferita può andare incontro a macerazione o proliferazione batterica.

➤ Proliferazione microbica nel sito di lesione.

Le ferite necrotiche richiedono un'elevata idratazione dei tessuti degenerati, che può essere raggiunta con l'utilizzo di medicazioni a base di idrogel o idrocolloidi contenenti un'elevata percentuale di acqua nelle loro matrici (circa il 70%). Queste medicazioni provocano un'idratazione massiva dei tessuti ricostituendo un ambiente umido ideale per l'autolisi.

Le ferite il cui processo di guarigione prevede riepitelizzazione, devono essere trattate con medicazioni non aderenti e che mantengono l'ambiente umido per favorire la produzione di collagene e quindi la rigenerazione dell'epitelio danneggiato (Moura et al., 2013). La medicazione deve proteggere la ferita dall'ambiente esterno e impedire la proliferazione di microflora batterica nell'area lesionata.

In generale possiamo dire che non esiste una singola medicazione che sia efficace nelle diverse fasi del processo di riparazione tissutale, ma la tecnologia in campo farmaceutico mira a soddisfare le necessità individuali in relazione al tipo di lesione e al confort del paziente.

### **3.4 Applicazione degli idrogel come medicazioni innovative ad uso topico**

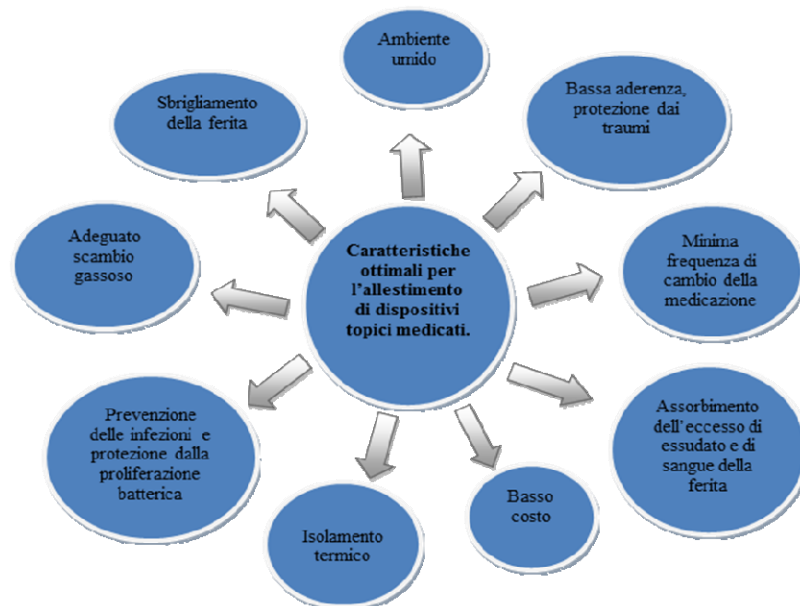
Negli ultimi anni particolare importanza è stata focalizzata sull'allestimento di medicazioni topiche ingegnerizzate a base di idrogel, contenenti agenti bioattivi, antimicrobici, analgesici, antiinfiammatori. per il rilascio controllato di farmaci in situ, che hanno quasi del tutto sostituito le medicazioni di garza tradizionali, per il trattamento delle ferite.

Le garze di cotone sono state ampiamente utilizzate in passato per l'allestimento delle medicazioni chirurgiche, e oggi occupano ancora una posizione predominante per il trattamento delle ferite post operatorie, traumatiche, ulcerose o innesti di pelle, soprattutto per la loro biocompatibilità e uso di risorse naturali sostenibili, con le quali vengono realizzate

(Hiriart-Ramirez et al., 2012). Questo tipo di medicazione gioca però solo un ruolo passivo e protettivo nel processo di guarigione delle ferite, proteggendole da stress meccanici. I vantaggi che questi *device* mostrano sono la facilità di applicazione, la familiarità e il basso costo, tuttavia tra gli svantaggi si ha l'esigenza di frequenti sostituzioni del bendaggio, che si satura facilmente in presenza di essudati; l'eccessivo assorbimento di liquidi da parte della garza, fino all'essiccamento della ferita, ritarda e impedisce il processo di guarigione in quanto si crea un ambiente sfavorevole; inoltre l'instaurarsi di un ambiente poco congruo può favorire la proliferazione batterica nel sito della lesione e la loro rimozione dalle ferite spesso può causare emorragie e traumi, in quanto la garza crea un coagulo, che essiccandosi, alla rimozione, può favorire processi di emostasi. Infine, esse non permettono un controllo spaziale e temporale della terapia e non permettono di monitorare lo stato della ferita dall'esterno (Cabodi et al., 2007).

Tutti questi limiti sono stati superati dallo sviluppo di medicazioni avanzate che presentano caratteristiche chimico-fisiche più idonee per il trattamento delle lesioni cutanee.

Le caratteristiche ottimali per l'allestimento di dispositivi cutanei medicati per la gestione di ferite complesse possono essere riassunte nel seguente schema (Figura 3.3) (Mayet et al., 2014):



**Figura 3.3:** *Allestimento di dispositivi topici medicali.*

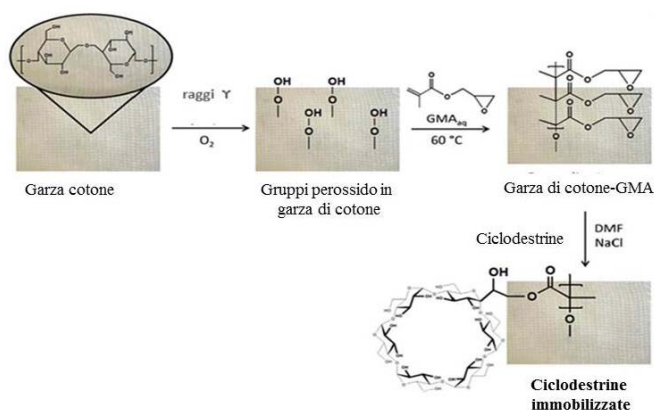
Gli idrogel, garantiscono il mantenimento di un ambiente umido nell'area della ferita per il loro elevato contenuto di acqua (80-90%), e promuovono il processo di rigenerazione dei tessuti; a differenza di altri materiali (es. idrocolloidi, alginati ecc..), gli idrogel non possono assorbire molto essudato e non sono quindi adatti per ferite che producono un'elevata quantità

di essudati, in quanto in questo caso la ferita andrebbe incontro a macerazione e infezione batterica per accumulo di fluido nel sito di lesione. L'elevato contenuto di acqua di questi materiali consente la reidratazione di tessuti non vitali, rendendo gli idrogel adatti alla medicazione di tessuti necrotici. Possono rimanere sulla ferita diversi giorni in quanto consentono un controllo esterno della lesione, buona ossigenazione e scambio gassoso. Inoltre la loro natura visco-elastica non provoca traumi e dolore durante la rimozione dalle ferite. Tuttavia la loro applicabilità è limitata dalla scarsa resistenza meccanica, dovuta alla presenza di molecole di acqua all'interno del reticolo polimerico. Idrogel con migliori proprietà meccaniche ed elastiche possono essere ottenuti con l'incorporazione di fibre idrofile di cotone nella matrice polimerica (Mayet et al., 2014). L'inserzione di garze di cotone nella matrice oltre ad aumentare la resistenza meccanica del polimero, conferisce al materiale particolari caratteristiche in termini di *swelling* e profili di rilascio terapeutico (Shemesh e Zilberman, 2014).

Le fibre idrofile di cotone inserite nei *device* polimerici, possono essere precedentemente funzionalizzate, in modo da conferire loro la capacità di legare agenti bioattivi e rilasciarli nell'area della ferita.

Un esempio riportato è la funzionalizzazione di garza di cotone con ciclodestrine caricate con agenti antimicrobici attraverso un processo di funzionalizzazione che prevede due steps (Figura 3.4) (Hiriart-Ramirez et al., 2012):

- Pre-irradiazione della garza con raggi gamma, per inserire funzioni perossidriliche libere e legame del glicidilmetacrilato (GMA) alla garza funzionalizzata.
- Formazione del legame covalente tra il complesso garza-GMA e le ciclodestrine (CDs).



**Figura 3.4:** Funzionalizzazione di garza di cotone con ciclodestrine.

Sulle garze funzionalizzate vengono poi caricati farmaci come antibiotici, analgesici, antiinfiammatori, anestetici locali che vengono rilasciati in maniera controllata nel sito di lesione.

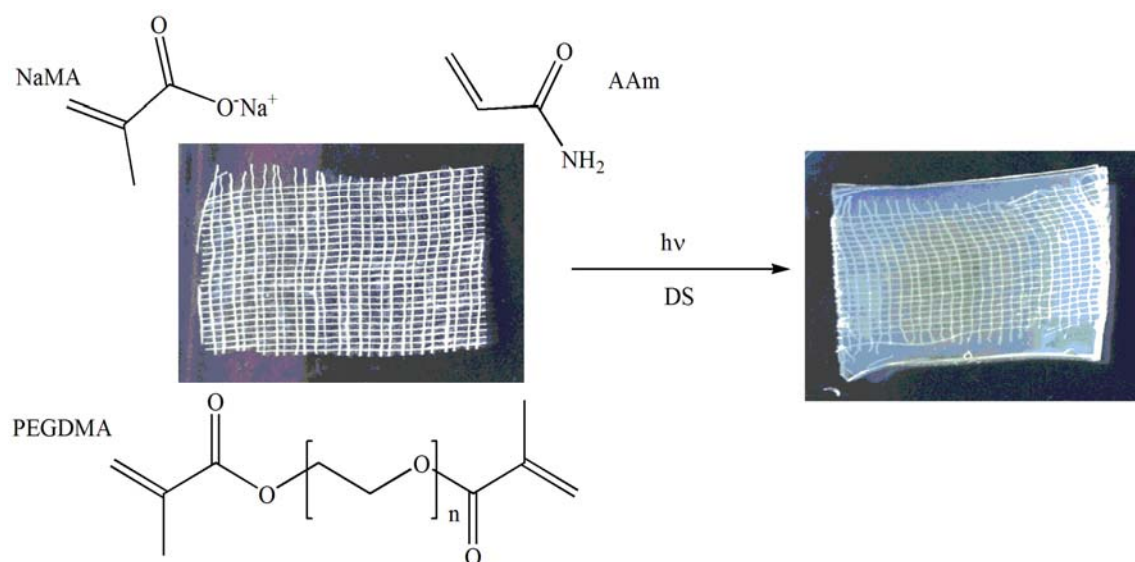
I sistemi, come quelli appena descritto, costituiti, cioè, da materiali di natura diversa, prendono il nome di “idrogel compositi”.

Diversi esempi di medicazioni sono progettate secondo una struttura multistrato al fine di garantire una migliore guarigione della ferita rispetto ai film omogenei. Tra questi ricordiamo gli idrogel a doppio strato costituiti da acido (DL-lattico-*co*-glicolico) (PDLGA) nello strato superiore e collagene spugnoso nello strato inferiore, rinforzato con fibre idrofile per una maggiore resistenza meccanica, su cui sono stati caricati farmaci come FANS e anestetici locali (Shemesh e Zilberman, 2014).

Lo strato superiore dell'idrogel è progettato per controllare l'umidità della ferita, prevenire la penetrazione batterica e permettere la protezione meccanica sul sito della lesione. Inoltre determina la cinetica di rilascio dei farmaci che vengono caricati sulle matrici. Lo strato inferiore di collagene spugnoso è invece deputato al riassorbimento degli essudati in eccesso presenti sulla ferita, va ad aderire in maniera efficiente al letto bagnato della ferita ed ospita il tessuto neoformato. In questo modo la medicazione può essere considerata come un “sostituto dermico” che favorisce l'instaurarsi di un ambiente ottimale. Gli idrogel a doppio strato possono essere costituiti da polimeri naturali e sintetici. Sebbene i polimeri naturali abbiano il vantaggio di essere simili o identici alle macromolecole del nostro organismo, questi subiscono una rapida degradazione *in vivo* da parte di alcuni enzimi come le proteasi. A confronto, le medicazioni a base di polimeri sintetici non promuovono pienamente l'adesione cellulare e la proliferazione, a causa della loro natura chimica superficiale, e non consentono l'adesione al letto della ferita, fattore che può portare allo sviluppo di infezioni batteriche secondarie. Questi limiti vengono superati dalle medicazioni a doppio strato ibride, in quanto combinano le proprietà vantaggiose dei polimeri naturali nello strato inferiore e presentano uno strato superiore sintetico resistente alla degradazione enzimatica. L'integrazione dei due strati distinti in un'unica struttura è fondamentale per garantire la delaminazione durante l'uso. L'impiego di questi dispositivi medicati applicati localmente sulle ferite, che consentono una rapida guarigione dei tessuti, apre nuove frontiere per il trattamento localizzato delle lesioni cutanee.

### 3.5 Sintesi di dispositivi compositi idrogel-garza

La sintesi di idrogel compositi costituiti da una garza di cotone e un sistema polimerico reticolato come dispositivi per il rilascio elettro-modulato di farmaci è schematicamente rappresentato in Figura 3.5. In particolare, il metacrilato di sodio (NaMA) è stato scelto come monomero funzionale, l'acrilammide (AAm) come plastificante e il polietilene glicole dimetacrilato (PEGDMA750) come agente reticolante.



**Figura 3.5:** Sintesi di idrogel compositi elettro-sensibili.

La polimerizzazione UV-indotta, per la presenza di un fotoiniziatore (Irgacure 2959) nella miscela monomerica, ha permesso di ottenere compositi contenenti garze di cotone all'interno in grado di modificare la propria affinità per il mezzo acquoso in funzione del voltaggio di un campo elettrico esterno applicato. La scelta del sodio metacrilato per la preparazione di idrogel elettro-sensibili è stata dettata dalle sue eccellenti proprietà ionizzabili, come riportato in letteratura (Morales et al., 2014). L'utilizzo dei monomeri idrofilici risulta molto importante, in quanto permette di condurre le reazioni di polimerizzazione in un mezzo acquoso, e quindi la realizzazione di un materiale totalmente privo di residui organici potenzialmente tossici, che comprometterebbero la biocompatibilità del polimero. L'inserzione della garza all'interno della matrice polimerica ha come obiettivo quello di creare dispositivi versatili, in grado di modulare le cinetiche di rilascio di principi attivi nel tempo.

Nello specifico sono state progettate e realizzate differenti composizioni monomeriche, variando sia il rapporto molare tra i monomeri funzionali ( $R_1 = n(\text{AAm})/n(\text{NaMA})$ ), che il quantitativo di reticolante rispetto alla carica monomerica totale ( $R_2 = ((n(\text{AAm})+n(\text{NaMA}))/n(\text{PEGDMA}))$ ) (Tabella 3.2), al fine di ottenere la migliore

composizione che consenta di inserire omogeneamente la garza all'interno della matrice polimerica e di ottimizzare la risposta allo stimolo elettrico indotto dall'esterno.

**Tabella 3.2:** *Composizione dei sistemi elettro-sensibili.*

<b>Sigla</b>	<b>AAm</b> (g/mmol)	<b>NaMA</b> (g/mmol)	<b>PEGDMA750</b> (g/mmol)	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>H<sub>1</sub>-G<sub>1</sub></b>	---	0,81/7,47	0,56/0,75	---	10,0
<b>H<sub>2</sub>-G<sub>2</sub></b>	---	0,81/7,47	1,87/2,49	---	3,0
<b>H<sub>3</sub>-G<sub>3</sub></b>	---	0,81/7,47	2,80/3,73	---	2,0
<b>H<sub>4</sub>-G<sub>4</sub></b>	0,53/7,47	---	2,80/3,73	---	2,0
<b>H<sub>5</sub>-G<sub>5</sub></b>	0,27/3,80	0,40/3,70	0,56/0,75	1,0	10,0
<b>H<sub>6</sub>-G<sub>6</sub></b>	0,27/3,80	0,40/3,70	1,87/2,49	1,0	3,0
<b>H<sub>7</sub>-G<sub>7</sub></b>	0,27/3,80	0,40/3,70	2,80/3,73	1,0	2,0
<b>H<sub>8</sub>-G<sub>8</sub></b>	0,35/4,92	0,28/2,59	0,56/0,75	1,9	10,0
<b>H<sub>9</sub>-G<sub>9</sub></b>	0,35/4,92	0,28/2,59	1,87/2,49	1,9	3,0
<b>H<sub>10</sub>-G<sub>10</sub></b>	0,35/4,92	0,28/2,59	2,80/3,73	1,9	2,0
<b>H<sub>11</sub>-G<sub>11</sub></b>	0,40/5,62	0,20/1,85	0,56/0,75	3,0	10,0
<b>H<sub>12</sub>-G<sub>12</sub></b>	0,40/5,62	0,20/1,85	1,87/2,49	3,0	3,0
<b>H<sub>13</sub>-G<sub>13</sub></b>	0,40/5,62	0,20/1,85	2,80/3,73	3,0	2,0

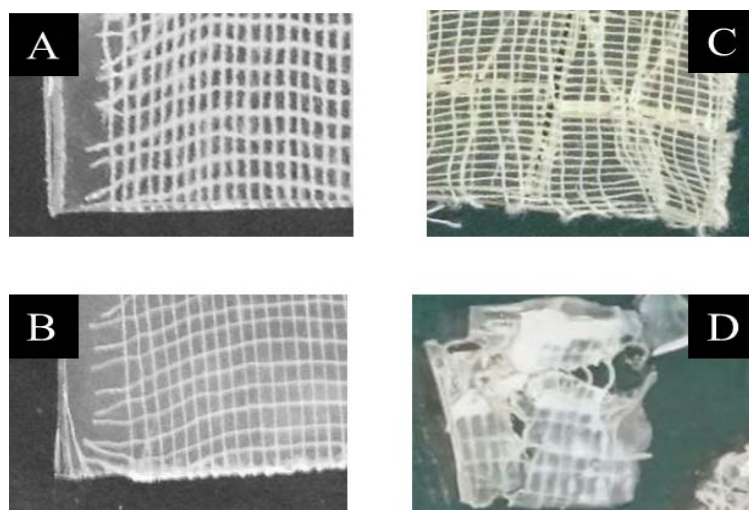
Volume di H<sub>2</sub>O = 4,0 mL; Iniziatore UV: Darocur 1173 (2,4% w/w); spessore film = 1,6 mm; H<sub>1-13</sub>: Idrogel di controllo; G<sub>1-13</sub>: compositi garza-idrogel, NaMA = Metacrilato di Sodio; AAm = Acrilammide; PEGDMA = poli-(etilene glicol) dimetacrilato 750, R<sub>1</sub> = AAm/NaMa (mol/mol); R<sub>2</sub> = (AAm+NaMA)/PEDGMA750 (mol/mol),

Le prime composizioni testate da G<sub>1</sub> a G<sub>3</sub>, contenenti solo NaMA e PEGDMA, hanno portato a film polimerici con scarsa resistenza meccanica che si sfaldavano durante la fase di essiccamento.

L'aggiunta di un comonomero con proprietà plasticizzanti, quale l'acrilammide (AAm), consente di migliorare la resistenza meccanica dell'idrogel e l'interazione con la garza (Liu et al., 2007).

Nelle composizione G<sub>4</sub> l'inserimento nella miscela di polimerizzazione del monomero plastificante, anche in bassa quantità, ha permesso di ottenere un materiale composito resistente, in cui la garza risulta incorporata omogeneamente nell'idrogel (Figura 3.6), ma che non è in grado di rispondere all'applicazione di un campo elettrico esterno per l'assenza del monomero funzionale.





**Figura 3.6:** *Materiali compositi in cui l'AAm è presente (A e B) o assente (C e D).*

Al fine di ottenere un materiale performante da un punto di vista delle proprietà sia meccaniche sia elettriche, campioni con diversi rapporti molari dei comonomeri, AAm e NaMA, e reticolante PEGDMA ( $R_1$  ed  $R_2$  in Tabella 3.1), sono stati preparati per bilanciare gli effetti delle specie monomeriche che conferiscono plasticità (AAm), sensibilità ad un campo elettrico (NaMA) e resistenza meccanica (PEGDMA). Inoltre, molta attenzione è stata rivolta alle composizioni in grado di portare un idrogel composito, elettrosensibile e resistente, in cui la garza risultasse omogeneamente inserita.

L'inserimento di basse quantità di AAm in alcuni campioni ( $R_1=1,0$ ), porta alla sintesi di materiali compositi ( $G_5$ - $G_7$ ) friabili che non superano la fase di essiccamento iniziale andando incontro a fenomeni di sfaldamento. Indipendentemente dalla quantità di PEGDMA750, un lieve aumento nella quantità di AAm ( $R_1=1,9$ ) permette la sintesi di materiali compositi ( $G_8$ - $G_{10}$ ) che pur rimanendo integri in seguito al processo di essiccamento non riescono a rimanere tali dopo la prima fase di rigonfiamento in un mezzo acquoso.

Anche campioni sintetizzati con una maggiore quantità di AAm ( $R_1=3,0$ ) e minore quantità di reticolante ( $G_{11}$ - $G_{12}$ ,  $R_2$  di 10,0 e 3,0, rispettivamente) sono stati scartati, perché non erano stabili durante il processo di reidratazione.

Infine è stata raggiunta la composizione monomerica ottimale, rappresentata da valori di  $R_1$  e  $R_2$ , rispettivamente pari a 3,0 e 2,0 che consente di ottenere il composito indicato con  $G_{13}$ .

La composizione  $G_{13}$ , grazie alla capacità di incorporare omogeneamente la garza, alla stabilità in seguito a ripetuti cicli di essiccamento/idratazione (10 cicli), è stata utilizzata per la sintesi degli idrogel compositi contenenti Diclofenac Sodico ( $G_{13\_DS}$ ).

Inoltre, per evidenziare l'influenza dell'inserimento della garza sulle proprietà di rigonfiamento in un mezzo acquoso in assenza e in presenza di un campo elettrico e sui profili

di rilascio, sono stati preparati idrogel di controllo non contenenti la garza, H<sub>13</sub> e H<sub>13\_DS</sub> in analogia con G<sub>13</sub> e G<sub>13\_DS</sub>.

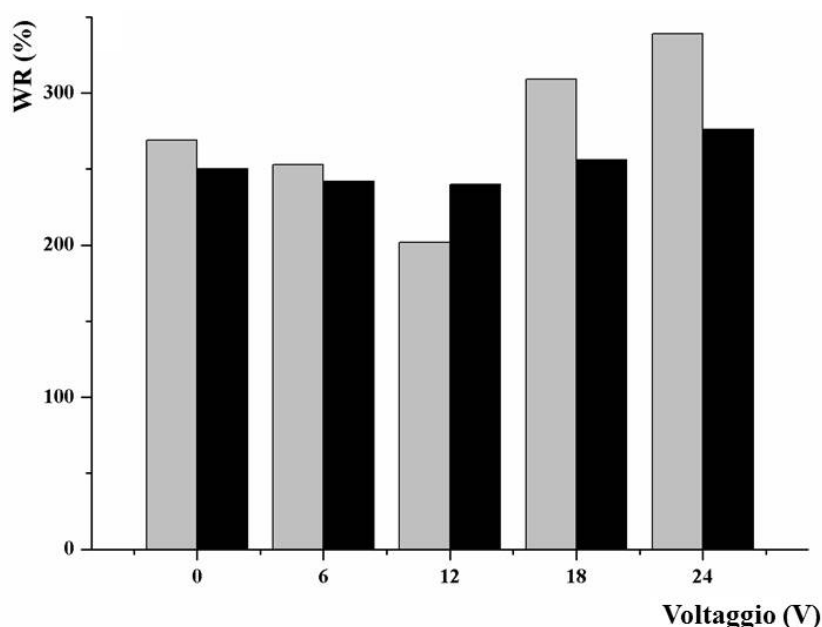
### 3.6 Determinazione del grado di rigonfiamento

Al fine di valutare l'applicabilità di tali idrogel nel rilascio controllato di farmaci e la loro risposta allo stimolo elettrico, sono stati eseguiti studi sulla loro capacità di rigonfiamento.

Il comportamento dei campioni G<sub>13</sub> e H<sub>13</sub> (con e senza garza) è stato studiato in assenza (0V) e in presenza di campo elettrico a diverso voltaggio (6V, 12V, 18V e 24V) ponendo i campioni da analizzare in un mezzo acquoso a temperatura ambiente. Il grado di rigonfiamento percentuale (WR%) è stato espresso come segue:

$$WR = \frac{W_s - W_d}{W_s} \times 100 \quad \text{Equazione 3.1}$$

Dove W<sub>s</sub> e W<sub>d</sub> rappresentano i pesi del materiale rigonfio e anidro rispettivamente. I dati riportati in Figura 3.7 e in Tabella 3.3 mostrano la percentuale di acqua incorporata dalle matrici polimeriche in funzione dei diversi voltaggi applicati.



**Figura 3.7:** Rigonfiamento dell'idrogel H<sub>13</sub> (grigio) e del composito G<sub>13</sub> (nero) a diversi voltaggi per 420 min.

**Tabella 3.3:** Proprietà di rigonfiamento degli idrogel  $G_{13}$  e  $H_{13}$ .

Idrogel	0 V		6 V		12 V		18 V		24 V	
	WR (%)	WR (%)	$S_{r6}$	WR (%)	$S_{r12}$	WR (%)	$S_{r18}$	WR (%)	$S_{r24}$	
<b>H<sub>13</sub></b>	269±2	253±2	0.94	202±2	0.75	309±2	1.15	339±2	1.26	
<b>G<sub>13</sub></b>	250±2	242±2	0.97	240±2	0.96	256±2	1.02	276±2	1.10	

Il rapporto di rigonfiamento ad una data tensione ( $S_{rx}$ ), calcolato secondo l'equazione 3.2, esprime la capacità del materiale di trattenere acqua in seguito all'applicazione di un campo elettrico.

$$S_{rx} = \frac{WR_x}{WR_0} \quad \text{Equazione 3.2}$$

Dove  $WR_x$  e  $WR_0$  sono l'assorbimento di acqua (%) rispettivamente a  $x$  V (6, 12, 18, 24V) e a 0 V. L'idrogel  $H_{13}$ , mostra il tipico comportamento di un idrogel elettro-reattivo, contenente gruppi carbossilici (Shiga e Kurauchi, 1990). Le analisi effettuate in presenza della garza (campione  $G_{13}$ ) hanno registrato percentuale di *swelling* leggermente diverso rispetto a  $H_{13}$ , alle tensioni applicate. A bassi valori di campo elettrico applicato (6 e 12 V) il comportamento dei due campioni è pressoché simile mostrando una leggera contrazione. L'effetto del campo elettrico, invece, diventa più evidente a tensioni più elevate (18 e 24V): il campione  $H_{13}$  va incontro a un maggiore grado di rigonfiamento, mentre i campioni con garza presentano una minore percentuale di rigonfiamento poiché risentono dell'effetto di resistenza ai movimenti di espansione/contrazione, dovute alla presenza al suo interno delle fibre idrofile di cotone. Le prove effettuate a 6V e a 12V hanno mostrato una minor percentuale di rigonfiamento rispetto a quella registrata a 0 V ( $S_r$  di 0,94 e 0,75 rispettivamente). Percentuali di rigonfiamento superiori ( $S_{r18} = 1,15$  e  $S_{r24} = 1,26$ ) si riscontrano a tensioni di corrente elettrica superiori, 18V e 24V, a causa della maggiore dissociazione dei gruppi carbossilici e del prevalere di forze di repulsione elettrostatica all'interno del reticolo polimerico (Jin et al., 2013). Quando si considera il comportamento dell'idrogel composito  $G_{13}$  si nota che la presenza della rete idrofila di fibre di cotone influenza le proprietà di rigonfiamento dell'idrogel, impedendo meccanicamente i movimenti di espansione/contrazione. Di conseguenza,  $G_{13}$ , pur mantenendo profili di *swelling/deswelling* paragonabili a quelli di  $H_{13}$ , mostra variazioni del grado di rigonfiamento inferiori a quelli di  $H_{13}$  ( $S_r$  compresi tra 0.96 e 1.10).

### 3.7 Determinazione della forza tensile

Le proprietà meccaniche dei campioni nello stato rigonfiato sono state investigate andando a determinare i valori di forza tensile ( $\sigma$ ) che misura il massimo carico di rottura dei materiali, secondo la seguente equazione:

$$\sigma = \frac{F_{\max}}{A} \quad \text{Equazione 3.3}$$

dove  $P_{\max}$  (N) rappresenta la massima pressione che può essere applicata prima della rottura, mentre  $A$  è la superficie ( $\text{mm}^2$ ).

Per  $G_{13}$   $\sigma$  è risultata essere dello stesso ordine di grandezza di quella della garza e uguale a  $0.3121 \pm 0.0862$  MPa, mentre per il corrispondente bianco, il valore di  $\sigma$  è stato al di sotto del limite di misurazione dello strumento. I risultati ottenuti hanno confermato come l'inserimento della garza migliora sensibilmente le proprietà meccaniche dell'idrogel.

### 3.8 Caricamento del farmaco

Le matrici  $H_{13}$  e  $G_{13}$  sono state caricate con diversi farmaci per testare la loro capacità di agire come *Drug Delivery Sistem*. Tuttavia, non tutti i farmaci testati si sono rivelati idonei al caricamento nelle matrici per problematiche di varia natura. Un primo tentativo di incorporazione del principio attivo nell'idrogel elettro-sensibile è stato effettuato con un antibiotico appartenente alla classe dei flurochinoloni, la Ciprofloxacina. L'incorporazione del farmaco è avvenuta durante il processo della polimerizzazione, mediante miscelazione con la soluzione monomerica, in quanto per impregnazione la percentuale di principio attivo, che veniva assorbito dalla matrice, risultava estremamente bassa. Tuttavia, il farmaco caricato nella matrice, seppure con un'elevata resa, presentava scarsa solubilità e stabilità nelle condizioni di polimerizzazione. Il caricamento di un altro antibiotico di diversa natura, l'Ampicillina Sodica nelle matrici polimeriche non ha migliorato le prestazioni del materiale data la scarsa percentuale di farmaco caricato (circa 6%), e la marcata tendenza della penicillina alla fotodegradazione.

Cambiando tipologia di agente terapeutico, un farmaco anti-infiammatorio non steroideo (FANS), il Diclofenac Sodico (DS), è stato testato per le sue proprietà analgesiche, in grado di ridurre il dolore, un sintomo comune di ferite cutanee acute e croniche (Price et al., 2008; Zor et al., 2010). Il DS è un farmaco che risulta stabile in soluzione acquosa, e nelle condizioni di polimerizzazione adottate. Il DS è stato caricato su campioni di  $H_{13}$  e  $G_{13}$  durante il processo

di polimerizzazione, per massimizzare le interazioni tra il farmaco e il *carrier*, con la formazione rispettivamente di materiali H<sub>13\_DS</sub> e G<sub>13\_DS</sub>.

### 3.9 Profili di rilascio del farmaco

Il profilo di rilascio del principio attivo dalle matrici è un evento che dipende da diverse variabili. Esso infatti può dipendere da molti fattori quali la capacità di idrorigonfiabilità della matrice, la natura delle interazioni farmaco-matrice, il grado di porosità della matrice, la relativa larghezza delle maglie polimeriche, le proprietà chimico-fisiche del farmaco e in particolare la sua solubilità nel mezzo esterno e le caratteristiche del mezzo esterno (forza ionica, pH, ecc).

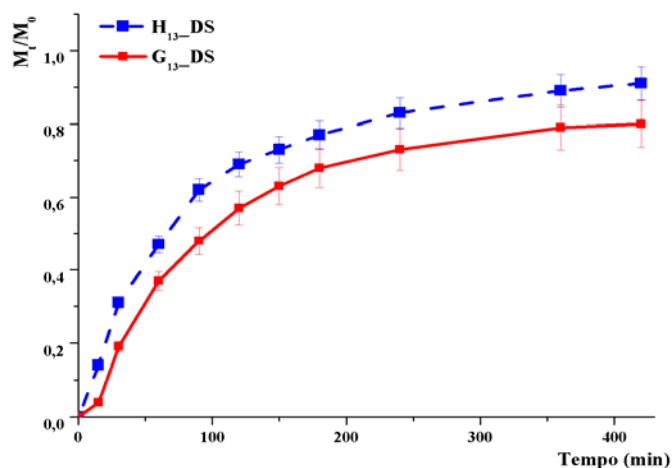
Il rilascio del principio attivo dai compositi realizzati è stato effettuato in mezzo acquoso la quantità di principio attivo rilasciata a intervalli di tempo regolari è stata espressa come percentuale di farmaco rilasciata al tempo  $t$  ( $M_t$ ) in rapporto alla quantità totale di farmaco caricata all'interno delle matrici ( $M_0$ ).

Per una caratterizzazione analitica dei profili di rilascio degli idrogel elettro-sensibili, sono stati applicati due diversi modelli matematici, i modelli proposti da Peppas-Sahlin e Reis, già descritti nel precedente capitolo (Peppas e Sahlin, 1989; Reis et al., 2007).

Il modello Peppas-Sahlin, applicabile per valori di  $M_t/M_0 \leq 0.95$ , fornisce indicazioni sulla dipendenza dal tempo dei parametri cinetici ( $K_1$  e  $K_2$ ) e permette un confronto tra i diversi meccanismi che intervengono nel rilascio di un agente terapeutico da una matrice polimerica di forma regolare. Tale modello prevede che il rilascio del farmaco dipende da due diversi contributi cinetici uno legato alla diffusione (Fickiano) e l'altro al grado di rigonfiamento. Un meccanismo di rilascio Fickiano si osserva quando  $K_1$  è significativamente superiore a  $K_2$ .

La cinetica di rilascio può essere inoltre descritta utilizzando il modello di Reis, valido per valori di  $M_t/M_0 \leq 1.0$ , considerando una cinetica di rilascio reversibile di primo o secondo ordine come descritto nel precedente capitolo.

Esperimenti preliminari di rilascio sono stati eseguiti in assenza di corrente elettrica; i dati ottenuti mostrano un rilascio inferiore per i campioni contenenti la garza G<sub>13\_DS</sub>, dovuto al fatto che la presenza della garza ostacola la diffusione del farmaco attraverso le maglie del reticolo composito riducendo il rigonfiamento del materiale (Figura 3.8).



**Figura 3.8:** Profili di rilascio registrati per i polimeri  $H_{13\_DS}$  e  $G_{13\_DS}$  in assenza di campo elettrico.

Applicando il modello Peppas-Sahlin ai profili di rilascio delle matrici  $G_{13\_DS}$  e  $H_{13\_DS}$ , sono state registrate delle buone correlazioni tra dati sperimentali e teorici come indicato dai valori degli scarti quadratici medi ( $R^2$ ) superiori, in entrambi i casi, a 0.90 (Tabella 3.4).

**Tabella 3.4** Parametri di rilascio secondo il modello di Peppas-Sahlin.

$$\frac{M_t}{M_0} = K_1 \cdot t^{1/2} + K_2 \cdot t$$

	Voltaggio	$R^2$	$K_1$	$Q_1$	$K_2$	$Q_2$
$H_{13\_DS}$	0	0,9700	0,0743	---	-0,0014	---
	6	0,9639	0,0685	0,92	-0,0011	0,79
	12	0,9946	0,0308	0,41	-0,0002	0,14
	18	0,9054	0,0420	0,57	-0,0003	0,21
	24	0,9716	0,0623	0,84	-0,0008	0,57
$G_{13\_DS}$	0	0,9367	0,0551	---	-0,0007	---
	6	0,9395	0,0548	0,99	-0,0007	1,00
	12	0,9831	0,0325	0,59	-0,0001	0,14
	18	0,9683	0,0192	0,35	-0,0004	0,57
	24	0,9579	0,0411	0,75	-0,0003	0,43

$$Q_{1-x} = \frac{K_1(x \text{ V})}{K_1(0 \text{ V})}; \quad Q_{2-x} = \frac{K_2(x \text{ V})}{K_2(0 \text{ V})}; \quad x = 6, 12, 18, 24 \text{ V}$$

La diffusione Fickiana del farmaco attraverso la matrice polimerica rigonfia è evidenziata dal fatto che  $K_1$  è quasi due ordini di grandezza superiore a  $K_2$ . Inoltre,  $G_{13\_DS}$  presenta un valore di  $K_1$  1,3 volte inferiore a  $H_{13\_DS}$ , evidenziando come la presenza della garza induca una riduzione della velocità di rilascio.

Ulteriori informazioni possono essere ottenute analizzando i dati raccolti sfruttando il modello di Reis (Tabella 3.5).

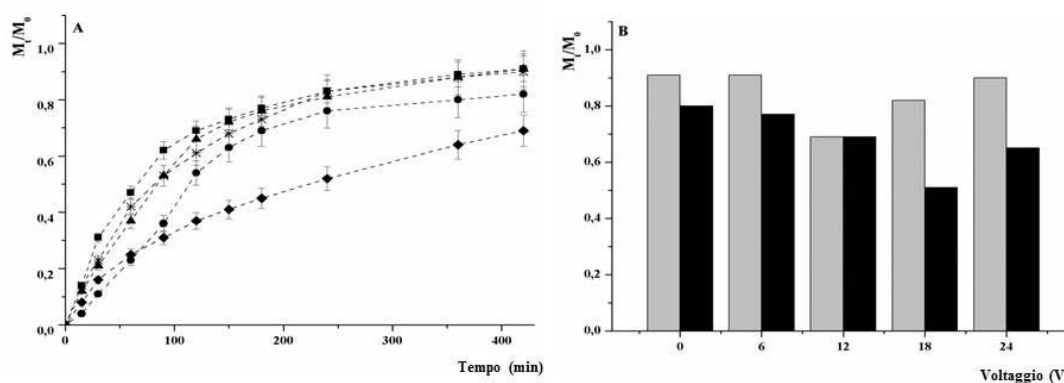
**Tabella 3.5** Parametri di rilascio secondo il modello di Reis.

		$\frac{M_t}{M_0} = M_{\max} (1 - e^{-(R_1/M_{\max})t})$		$\frac{M_t}{M_0} = \frac{M_{\max}(e^{\alpha(\frac{R_2}{M_{\max}})^t} - 1)}{1 - 2M_{\max} + e^{\alpha(\frac{R_2}{M_{\max}})^t}}$					
	Vtaggio	$R_1^2$	$R_2^2$	$M_{\max}$	$Q_3$	$\alpha$	$Q_4$	$t_{1/2}$	$Q_5$
<b>H<sub>13_DS</sub></b>	0	0,9957	0,9872	0,89	---	8,09		55,58	---
	6	0,9972	0,9790	0,89	1,00	8,09	1,00	62,31	1,12
	12	0,9907	0,9944	0,72	0,73	2,57	0,32	112,00	1,83
	18	0,9682	0,9404	0,85	0,96	5,67	0,70	93,52	1,68
	24	0,9981	0,9791	0,91	1,02	10,11	1,25	72,50	1,30
<b>G<sub>13_DS</sub></b>	0	0,9928	0,9826	0,82	---	4,56		71,95	---
	6	0,9954	0,9784	0,81	0,99	4,26	0,93	80,21	1,11
	12	0,9942	0,9870	0,76	0,93	3,17	0,70	122,51	1,70
	18	0,9953	0,9937	0,62	0,76	1,63	0,36	159,17	2,21
	24	0,9974	0,9947	0,68	0,83	2,13	0,47	82,69	1,15

$$Q_{3-x} = \frac{M_{\max}(x \text{ V})}{M_{\max}(0 \text{ V})}; Q_{4-x} = \frac{\alpha(x \text{ V})}{\alpha(0 \text{ V})}; Q_{5-x} = \frac{t_{1/2}(x \text{ V})}{t_{1/2}(0 \text{ V})}; x = 6, 12, 18, 24 \text{ V}$$

In questo caso l'effetto della presenza della garza è chiaramente evidenziato dalla differenza di valori  $\alpha$  e  $t_{1/2}$  per la matrice G<sub>13\_DS</sub> rispetto a H<sub>13\_DS</sub>. La diminuzione di  $\alpha$  indica una minore affinità del farmaco per il mezzo di rilascio, mentre la riduzione della velocità è evidenziata da un  $t_{1/2}$  1,4 volte maggiore. Nessuna differenza rilevante è stata invece registrata per  $M_{\max}$  (0,82 per G<sub>13\_DS</sub> e 0,89 per H<sub>13\_DS</sub>).

L'applicazione del campo elettrico influenza in modo significativo i profili di rilascio. Nel caso di H<sub>13\_DS</sub> (Figura 3.9), i profili di rilascio del DS risultano essere in accordo con i comportamenti di rigonfiamento della matrice polimerica.



**Figura 3.9:** (A) Profilo di rilascio del DS da H<sub>13\_DS</sub> a 0 V (■); 6 V (▲); 12 V (◆); 18 V (●); 24 V (\*). (B) Rilascio del DS da H<sub>13\_DS</sub> (grigio) and G<sub>13\_DS</sub> (nero) a differenti voltaggi dopo 420 min.

L'applicazione di tensioni di corrente in grado di indurre contrazione dell'idrogel (6 e 12V) ha determinato una riduzione del farmaco rilasciato, mentre a tensioni di corrente superiori (18 e 24 V), la maggiore quantità di farmaco rilasciata risulta in accordo con il pronunciato rigonfiamento della matrice polimerica con un conseguente aumento del rilascio di principio attivo, con i profili di rilascio a 24V comparabili con quelli ottenuti in assenza di campo elettrico.

Il modello di Peppas-Sahlin ha permesso di analizzare tutti i dati sperimentali per tutte le tensioni di corrente testate, evidenziando come il campo elettrico non modifichi il meccanismo di rilascio che è di tipo Fickiano a tutti i voltaggi testati.

Per evidenziare l'effetto della tensione esterna applicata, sono stati introdotti nel modello di Peppas-Sahlin alcuni parametri cinetici ( $Q_{1-x}$  e  $Q_{2-x}$ , Tabella 3.4) in base alle seguenti equazioni:

$$Q_{1-x} = \frac{K_1(x \text{ V})}{K_1(0 \text{ V})} \quad \text{Equazione 3.4}$$

$$Q_{2-x} = \frac{K_2(x \text{ V})}{K_2(0 \text{ V})} \quad \text{Equazione 3.5}$$

Tali parametri evidenziano le modifiche nel meccanismo di rilascio del farmaco in conseguenza dell'applicazione del campo elettrico. I valori  $Q_{1-x}$  e  $Q_{2-x}$  diminuiscono per x uguale a 6 e 12V, mentre aumentano a 18 e 24V, evidenziando che i rilasci sono rallentati a voltaggi più bassi e accelerati a voltaggi più alti (Tabella 3.4).

Analogamente per il modello di Reis, al fine di rendere più evidenti i risultati ottenuti sono stati introdotti alcuni parametri ( $Q_{3-x}$ ,  $Q_{4-x}$  e  $Q_{5-x}$ , tabella 3.5) secondo le seguenti espressioni:

$$Q_{3-x} = \frac{M_{\max}(x \text{ V})}{M_{\max}(0 \text{ V})} \quad \text{Equazione 3.6}$$

$$Q_{4-x} = \frac{\alpha(x \text{ V})}{\alpha(0 \text{ V})} \quad \text{Equazione 3.7}$$

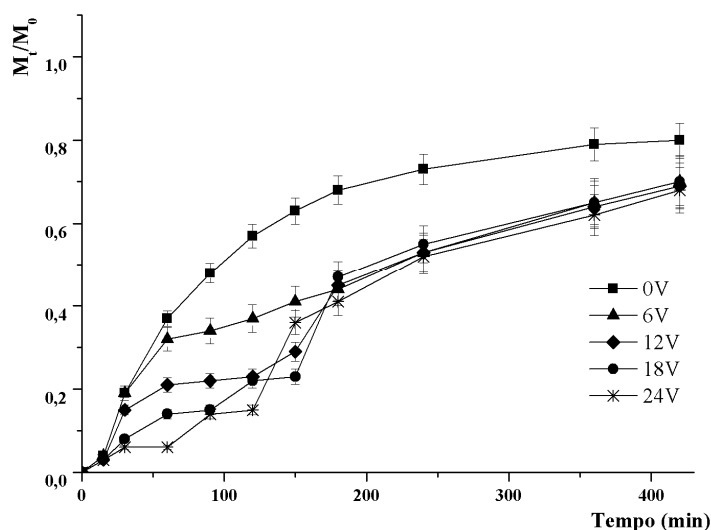
$$Q_{5-x} = \frac{t_{1/2}(x \text{ V})}{t_{1/2}(0 \text{ V})} \quad \text{Equazione 3.8}$$

dove x indica i diversi voltaggi applicati.



I valori  $Q_3$  e  $Q_4$  variano nel seguente ordine:  $Q_{x_6} \approx Q_{x_{24}} > Q_{x_{18}} > Q_{x_{12}}$ . I valori di  $Q_5$  hanno mostrato la correlazione tra le velocità di rilascio ( $t_{1/2}$ ) con e senza stimolazione elettrica (Tabella 3.5). Il valore più alto di  $Q_5$  è stato registrato a 12 V ( $Q_{5_{12}} = 1,83$ ), in quanto in queste condizioni si registra il maggiore grado di contrazione e il rilascio risulta essere più lento.

Un comportamento diverso è stato osservato per i campioni  $G_{13\_DS}$ . In questo caso, le tensioni esterne applicate comportano un minor quantitativo di DS rilasciato e i profili registrati presentano un andamento anomalo come si può osservare dalla figura (Figura 3.10).



**Figura 3.10:** Profilo di rilascio del DS da  $G_{13\_DS}$  a 0 V (■); 6 V (▲); 12 V (◆); 18 V (●); 24 V (\*).

Per spiegare questi profili di rilascio sono stati considerati due diversi fenomeni. Il primo effetto è dato dalla modulazione delle proprietà di rigonfiamento/contrazione in seguito all'applicazione di tensioni esterne, che rallentata o accelera la diffusione del farmaco. Inoltre, poiché il diclofenac sodico è una specie ionica, il rilascio deve tener conto della migrazione di ioni dall'idrogel composito verso il contro-elettrodo. Si potrebbe ipotizzare che la presenza della garza ostacoli il passaggio del farmaco provocando un rallentamento nei profili di rilascio, con accumulo di molecole di farmaco sulla superficie delle fibre di cotone. Quando le forze di repulsione tra i gruppi carbossilato (del DS e dell'idrogel composito contenente la garza) diventano dominanti, il rilascio risulta essere più veloce. In Figura 3.10 possiamo osservare che, aumentando i voltaggi, il rilascio di DS diminuisce nelle prime fasi (0-90 min), dove entrambi i fenomeni sono rilevanti.

Ad intervalli di tempo maggiori, si osservano due comportamenti differenti in funzione del voltaggio applicato. Quando è stata applicata una tensione di 6V, il rilascio è simile a una

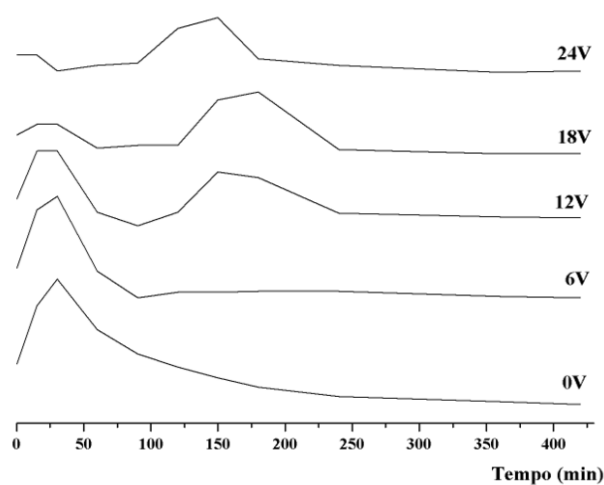
semplice diffusione attraverso il composto rigonfio, probabilmente perché la ionizzazione dei gruppi COOH è relativamente bassa e non si verifica alcuna modificazione significativa del profilo di rilascio. Aumentando le tensioni da 12V a 24 V, il rilascio è sensibilmente rallentato in conseguenza dell'accumulo molecole ionizzate di DS sulle fibre della garza. Dopo aver raggiunto un livello limite corrispondente al voltaggio di scarica, gli ioni DS vengono rilasciati nel mezzo circostante a causa del prevalere delle forze di repulsione elettrostatica tra le molecole di farmaco e i gruppi ionizzati dell'idrogel. Più alta è la tensione applicata, maggiore è la quantità di DS rilasciato al punto di scarico, che appare ritardato di 30 min quando i voltaggi esterni applicati sono 12V e 18V.

L'esistenza di fenomeni di carica/scarica sono chiaramente sottolineati nella Figura 3.11 in cui è riportato l'andamento della velocità di rilascio (RR) ai diversi voltaggi secondo la seguente equazione:

$$RR = \frac{d(M_t/M_0)}{dt} \quad \text{Equazione 3.9}$$

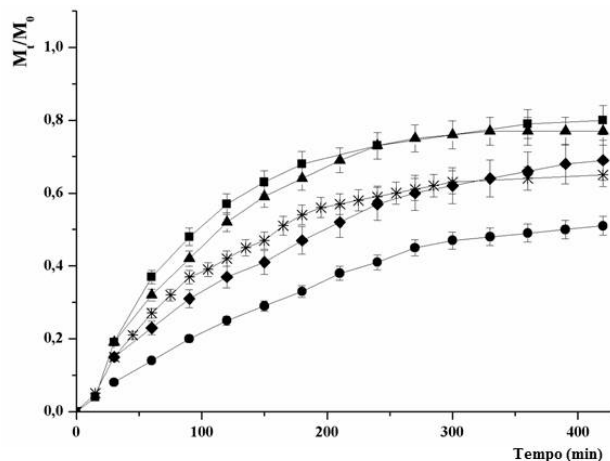
In assenza di tensione esterna il massimo della velocità di rilascio è stata registrata dopo 30 minuti per successivamente decrescere nel tempo. A conferma del ridotto grado di ionizzazione raggiunto per voltaggi bassi, applicando una tensione esterna di 6 V è stato registrato un andamento simile, mentre un diverso comportamento è stato riscontrato a voltaggi superiori.

In questi casi, infatti, è possibile osservare la presenza di un secondo picco generato dal fenomeno di carica/scarica. Tale effetto risulta essere più evidente applicando una tensione esterna di 18 V, rispetto a 12 V e si verifica prima quando il campo elettrico è settato a 24V.



**Figura 3.11:** Velocità di rilascio riferita al composito for  $G_{13\_DS}$  a 0, 6, 12, 18, and 24 V.

Per investigare ulteriormente gli effetti di carica/scarica precedentemente descritti, il campo elettrico esterno è stato alternativamente acceso e spento in esperimenti di tipo *ON-OFF* a specifici intervalli di tempo (15, 30, 60 e 90 min) e i dati raccolti riportati in Figura 3.12.



**Figura 3.12:** Profili di rilascio ON-OFF di DS da  $G_{13\_DS}$  a 0 V (■); 6 V (▲); 12 V (◆); 18 V (●); 24 V (\*).

Come previsto, l'accensione e lo spegnimento del campo elettrico ha scarsa influenza sul rilascio condotto a 6 V, il quale differisce di poco dal profilo registrato in assenza di tensione, mentre un consistente rallentamento nella velocità di rilascio è stato registrato a 12 e 18V. Tale comportamento può essere spiegato considerando la variazione del grado di *swelling* del composito e il concomitante impedimento causato dalla presenza della garza. In particolare, applicando una tensione esterna di 18 V, è stato riscontrato un rallentamento nel rilascio di DS più evidente causato dall'effetto della garza, mentre a 24 V l'effetto repulsivo tra le cariche negative supera l'impedimento generato dalla garza e la quantità di principio attivo rilasciata è maggiore.

I parametri cinetici relativi al modello di Peppas-Sahlin spiegano bene quanto descritto. L'applicazione di voltaggi pari da 6 a 18 V determina una riduzione dei valori di  $Q_1$  (0.59-0.35), mentre a 24 V il rilascio risulta essere accelerato ( $Q_{1\_24} = 0.75 > Q_{1\_18} = 0.35$ ). Anche i parametri cinetici relativi al modello di Reis risultano essere in accordo con il meccanismo di rilascio ipotizzato. A 18 V il rilascio risulta essere fortemente inibito, con valori di  $Q_{3\_18}$  e  $Q_{4\_18}$  molto bassi, rispettivamente di 0.76 e 0.36, e valori di  $Q_{5\_18}$  elevati (2.21), indicando che una quantità di farmaco inferiore è rilasciata lentamente nell'unità di tempo. Per quanto riguarda il rilascio a 6 V, anche in questo caso, risulta essere molto simile rispetto a quello a 0 V. Una modulazione versatile del rilascio del farmaco può essere invece raggiunta applicando tensioni di corrente esterne a 12 V e 24 V. Nel primo caso (12 V), quasi il 100% del farmaco

è stato rilasciato lentamente nel tempo ( $Q_{3\_12}$  e  $t_{1/2}$  di 0.93 e 122.5 min), mentre l'esperimento a 24 V ha evidenziato un rilascio minimo di DS dalla matrice polimerica ( $Q_{3\_24}$  di 0.83, con  $t_{1/2}$  di 82.69 min).

Quello che è emerso dall'analisi dei dati ottenuti è che, confrontando i comportamenti di  $H_{13}$  e  $G_{13}$ , appare chiaro che l'incorporazione della garza all'interno dell'idrogel, ha consentito un controllo più versatile sui profili di rilascio.

$H_{13\_DS}$  permette solo due possibilità di controllo sulla cinetica di rilascio, cioè a 0 V e 12 V. Al contrario, la presenza della garza in  $G_{13\_DS}$  estende notevolmente l'applicabilità del dispositivo, poiché quattro differenti cinetiche possono essere ottenute modificando la tensione e gli intervalli tra gli impulsi elettrici, con una singola formulazione che può essere utilizzata per diverse esigenze terapeutiche.

### 3.10 Conclusione

La progettazione e la sintesi, mediante la tecnica della polimerizzazione radicalica, di idrogel compositi contenenti garze di cotone, ha condotto alla realizzazione di un materiale innovativo che può trovare applicazione come medicazioni cutanee per il rilascio elettromodulato di Diclofenac Sodico. La sintesi di questi materiali è stata effettuata a partire da monomeri quali: sodio metacrilato, che conferisce al materiale le proprietà elettro-responsive, acrilammide, che funge da plastificante e polietilene glicole dimetacrilato, che funge da agente reticolante. Le condizioni di reazione e i rapporti stechiometrici tra i vari componenti monomerici (rapporto molare tra monomeri funzionali e reticolante) sono stati ottimizzati per ottenere un inserimento omogeneo della garza all'interno della matrice polimerica. L'obiettivo è quello di utilizzare l'inserzione della garza di cotone nell'idrogel elettrosensibile, per creare un dispositivo versatile in grado di modulare il rilascio di principio attivo in termini di tempo e velocità.

I risultati ottenuti hanno evidenziato come l'applicazione di un campo elettrico esterno influenzi le proprietà di *swelling* sia degli idrogel compositi che di quelli di controllo sintetizzati in assenza di garza. Inoltre, poiché l'inserimento della garza ostacola meccanicamente i movimenti di espansione/contrazione degli idrogel, si ha una minore entità della risposta allo stimolo elettrico. Nello specifico, l'applicazione di bassi voltaggi determina contrazione dell'idrogel, mentre a valori di campo più elevati si registra un rigonfiamento dovuto alla repulsione elettrostatica tra i gruppi ionizzabili degli idrogel.

Inoltre, l'applicazione di un campo elettrico esterno è in grado di modulare i profili di rilascio dell'agente terapeutico incorporato nelle matrici. Per l'idrogel di controllo si sono ottenuti

profili di rilascio più veloci nello stato rigonfio e più lenti nello stato contratto. Il rilascio dall'idrogel composito è influenzato sia dal comportamento di *swelling/deswelling* che dall'effetto di ritenzione della garza, che ostacola la migrazione di specie ioniche dalla rete polimerica, determinando anomali profili di rilascio. Con una regolazione sia del voltaggio che dell'intervallo di tempo tra gli impulsi elettrici, è possibile modulare i profili di rilascio a seconda delle esigenze terapeutiche, variando sia la velocità che la quantità totale di farmaco rilasciato.

### **3.11 Parte sperimentale**

#### **3.11.1 Materiali**

Metacrilato di sodio, acrilamide, polietilene glicole dimetacrilato e Diclofenac sale sodico sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co, Milano, Italia). Il fotoiniziatore Irgacure 2959 (1-[4-(2-idrossietossi)-fenil]-2-idrossi-2-metil-1-propan-1-one, con un massimo di assorbimento a 275 nm, acquistato da Ciba). Acqua, etanolo, metanolo, acetato di ammonio e acetonitrile sono stati acquistati dalla Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia) tutti di grado HPLC. Le garze di cotone incorporate nelle matrici polimeriche sono state acquistate da Artsana (Grandate, Italia).

#### **3.11.2 Strumentazione**

La polimerizzazione è stata iniziata da una lampada UV a mercurio ad alta pressione (Philips HPK 125, 500 mW cm<sup>-2</sup>, lunghezza d'onda 275 nm, tempo di irradiazione 10 min). I polimeri sono stati essiccati in stufa sotto vuoto a 40°C.

La determinazione di Diclofenac è stata effettuata mediante uno spettrofotometro UV-vis (Jasco V-530). La determinazione della Ciprofloxacina e Ampicillina sodica è stata effettuata mediante analisi HPLC utilizzando un cromatografo Jasco PU-2080 con iniettore Rheodyne 7725i (con loop da 20- $\mu$ L), un detector Jasco UV-2075 HPLC e un integratore Jasco-Borwin (Jasco Europe, Milano, Italia). Una colonna C<sub>18</sub> ( $\mu$ Bondapak, 10  $\mu$ m of 150 $\times$ 4.6 mm della Waters, Milano, Italia) è stata utilizzata come fase stazionaria a temperatura ambiente. Come fase mobile è stata utilizzata una miscela acquosa di acetato di ammonio/metanolo/acetonitrile (40/30/30, v/v/v). La fase mobile è stata filtrata, degassata ed eluita isocraticamente a 0,6 ml min<sup>-1</sup>; il detector UV opera a 284 nm (Cirillo e al., 2015).

Gli esperimenti al campo elettrico, per valutare la responsività dei polimeri, sono stati effettuati utilizzando una tensione elettrica esterna a 6,12,18 e 24 V applicata tramite un amplificatore Trek Model 677B, Trek Inc., New York, USA.

La misurazione di forza tensile è stata effettuata utilizzando una macchina universale MTS Criterion Model 42, con 5 kN di massimo caricamento e velocità costante di 2,0 mm min<sup>-1</sup>.

### **3.11.3 Sintesi di polimeri elettro-sensibili**

Per la sintesi degli idrogel elettro-sensibili composti con garza (G<sub>13</sub>) e senza garza (H<sub>13</sub>, controllo), sono stati solubilizzati in 4.0 mL di acqua, AAm (0,40 g, 5,62 mmol) e NaMA (0,20 g, 1,85 mmol), degassati con azoto per 20 min. Alla soluzione sono stati poi aggiunti come reticolante il PEGDMA (2,80, 3,73mmol) e come fotoiniziatore, l'Irgacure 2959 al 2,4% rispetto alla carica monomerica. La soluzione ottenuta è stata posta in una cella di polimerizzazione formata da due lastre di vetro 10x10 cm<sup>2</sup>, separate da due distanziatori di Teflon (spessore 1,6 mm), all'interno dei quali era stata precedentemente sistemata la garza di cotone, unite tra loro utilizzando delle clips leganti. La polimerizzazione è stata iniziata ponendo la cella di polimerizzazione sotto la lampada UV. Gli idrogel ottenuti sono stati ampiamente lavati con acqua per eliminare le specie non reagite e essiccati in stufa, sotto vuoto a 40°C fino a peso costante. Sono state testate diverse composizioni variando i rapporti molari dei monomeri impiegati.

### **3.11.4 Caricamento del Diclofenac Sodico nelle matrici polimeriche**

Gli idrogel elettrosensibili sono stati caricati con il Diclofenac sodico. Il caricamento del farmaco è stato eseguito durante la sintesi degli idrogel, mediante incorporazione nella matrice polimerica, solubilizzando il DS nella miscela di polimerizzazione, in percentuale del 10% (m/m) rispetto alla carica monomerica totale. I film di idrogel ottenuti sono stati lavati con etanolo, per rimuovere le specie non reagite, ed essiccati fino a peso costante in stufa sotto vuoto a 40°C.

La determinazione della quantità di farmaco intrappolata è stata eseguita sottoponendo la matrice caricata di farmaco (circa 100 mg) a processo estrattivo tramite *soxhlet*, utilizzando come solvente di estrazione 200 ml di una miscela 3/7 v/v metanolo/acqua per 48 h e quindi 200 ml di etanolo per altre 48h. I solventi di estrazione sono stati analizzati tramite analisi HPLC al fine di determinare la concentrazione di ciascun farmaco e quindi la percentuale di principio attivo caricato dalle matrici.

### **3.11.5 Determinazione del grado di rigonfiamento**

Il grado di rigonfiamento dell'idrogel è stato misurato in acqua, sia in assenza che in presenza di una tensione esterna di corrente elettrica applicata mediante un generatore di corrente,

collegato a due elettrodi (6,12,18 e 24 V). Aliquote di polimero di circa 1 cm<sup>2</sup>, con e senza garza, sono stati tagliati da campioni essiccati, pesati e collocati in filtri di vetro con setto a porosità G3. I campioni sono stati lasciati a rigonfiare per 12h, immergendo i filtri in 5 ml di mezzo acquoso a 37,0±0,1°C. Successivamente l'acqua in eccesso è stata rimossa dai campioni, mediante tamponamento con un tessuto, al fine di eliminare l'umidità superficiale. Infine, i campioni sono stati pesati per valutare il grado di rigonfiamento degli stessi. Il contenuto percentuale d'acqua assorbita è stato determinato in assenza e in presenza del campo elettrico ai diversi voltaggi.

### **3.11.6 Determinazione della forza tensile**

La determinazione della forza tensile è stata condotta in accordo con ASTM D3039 (ASTM, 1995), usando un minimo di sei replicati (dimensioni: 75 mm larghezza, 10 mm profondità, 2 mm spessore) per ogni campione (H<sub>13</sub>, G<sub>13</sub>, e garza di cotone come controllo) che è portato al massimo rigonfiamento per immersione in acqua per 7 h.

### **3.11.7 Rilasci del farmaco dai film polimerici *in vitro***

I profili di rilascio di Diclofenac sodico dalle matrici polimeriche sono stati valutati, come descritto nella Farmacopea statunitense XXIV, sia in presenza che in assenza di una tensione esterna di corrente elettrica applicata (6, 12, 18, 24 V) (United States Pharmacopoeia XXIV). Quantità note (~ 1 cm<sup>2</sup>) di idrogel carichi con il farmaco, sono stati immersi in flaconi contenenti il mezzo di rilascio, acqua distillata (10 ml, pH = 7,0) a 37,0 ± 0,1°C. Ad intervalli di tempo prestabiliti (15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 360, 420 min) un'aliquota del mezzo di rilascio (1,0 mL) è stata filtrata (Iso-Disc<sup>TM</sup> Filtri PTFE 25-4 25mm x 0,45 µm, Supelco, Milano, Italia) ed è stata analizzata mediante HPLC per misurare la concentrazione di farmaco presente. Inoltre, in una serie di esperimenti, il campo elettrico è stato alternativamente attivato e disattivato (0 V condizione di partenza) ad opportuni intervalli di tempo (15, 30, 45, 60, 90 min) e il farmaco rilasciato è stato misurato come descritto precedentemente.

### **3.11.7 Analisi statistica**

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato, ed i risultati sono stati in accordo entro ± 5%, che è il margine di errore standard.

## CAPITOLO 4

### **Nanosfere di caseina rivestite: strumento innovativo per la somministrazione orale di farmaci**

#### **4.1 Introduzione**

Uno dei principali interessi dell'industria farmaceutica è rivolto verso materiali di origine naturale, in grado di minimizzare la tossicità e gli effetti collaterali generalmente associati all'uso di diversi polimeri sintetici.

Le proteine alimentari sono considerate dei sistemi molto promettenti per questo scopo, esse infatti oltre ad avere un elevato grado nutritivo presentano buone proprietà funzionali, hanno la capacità di interagire con una vasta gamma di composti attivi con gruppi funzionali sulla loro struttura primaria, offrendo così una varietà di possibilità per il legame reversibile di molecole attive riuscendo anche a proteggerle fino al loro rilascio nel sito desiderato all'interno del corpo (Chen e Subirade, 2008)

Generalmente, le proteine rappresentano buone materie prime poiché hanno una buona assorbibilità e una bassa tossicità anche per quel che riguarda i prodotti finali della loro degradazione. Sistemi basati su proteine come gelatina, collagene, caseina, albumina e alcune proteine del siero sono stati studiati come veicoli di farmaci e principi attivi. In particolare, una vasta gamma di formulazioni a base di queste proteine sono state utilizzate per la sintesi di sistemi polimerici come idrogel, microparticelle e nanoparticelle.

Un ruolo importante è rivestito dalle proteine del latte. Esse possono costituire veicoli naturali per il trasporto di molecole bioattive. La caseina, è poco costosa, facilmente disponibile, non tossica e altamente stabile, biocompatibile e biodegradabile (Katz e al., 2009).

Il seguente lavoro è finalizzato all'ottenimento di nanoparticelle reticolate pH sensibili a base di caseina e metacrilato di sodio. Come agente reticolante è stata invece impiegata la N-N'-Metilenbisacrilammide (Spizzirri e al., 2015).

Per la sintesi delle nanoparticelle la tecnica usata è stata la polimerizzazione per precipitazione, che ha consentito di ottenere particelle sferiche di dimensioni comprese tra i 200 e 270 nm.

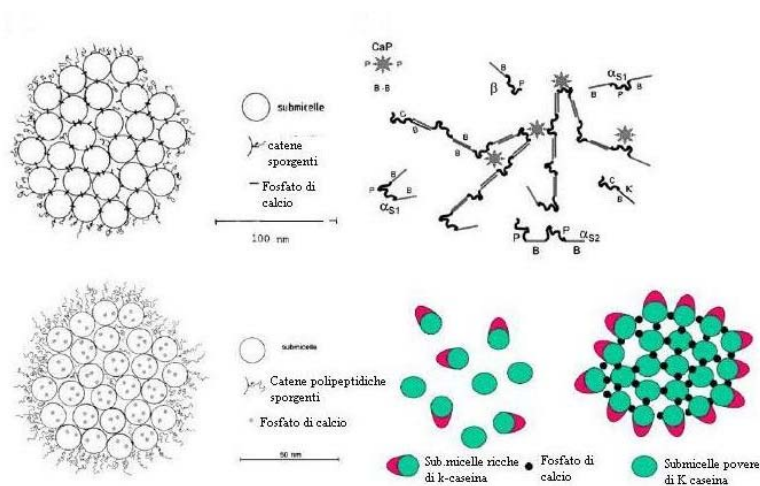


Sono state sintetizzate tre diverse matrici variando la quantità di caseina nel *feed* di polimerizzazione. La capacità dei materiali sintetizzati di rispondere alle variazioni di pH dell'ambiente circostante è stata valutata mediante esperimenti di *water uptake* in soluzioni acquose acide (pH 1,0) e basiche (pH7,4). Successivamente, al fine di testare l'applicabilità delle nanoparticelle come *carrier* di farmaci, le matrici sono state sottoposte a caricamento con una soluzione di Diclofenac sodico, uno dei farmaci analgesici non steroidei più utilizzati in terapia. È stato valutato quindi, il profilo di rilascio *in vitro* del farmaco in ambiente sia acido che basico, ottenendo anche in questo caso un andamento pH sensibile dei profili di rilascio. La cessione del farmaco è stata valutata anche in presenza degli enzimi presenti nel tratto gastrointestinale: pepsina e pancreatina. Infine, su tutte le matrici sono stati condotti studi di biodegradabilità in presenza degli stessi sistemi enzimatici. Poiché da tali esperimenti è emersa una forte sensibilità delle matrici alla degradazione da parte della pepsina, si è pensato di rivestire le nanoparticelle con una soluzione di acido poliacrilico. Lo scopo è stato quello di minimizzare la degradazione delle nanoparticelle nell'ambiente acido dello stomaco, migliorandone quindi i profili di rilascio del farmaco.

#### **4.2 La caseina: struttura, caratteristiche e proprietà**

La caseina è la principale proteina del latte costituita per il 94% da residui proteici e per il 6% da composti a basso peso molecolare chiamati nell'insieme fosfati di calcio colloidali. Essa è costituita principalmente da quattro fosfoproteine,  $\alpha S_1$ ,  $\alpha S_2$ ,  $\beta$ -, e  $\kappa$ -caseina, che nel latte bovino, si trovano approssimativamente in un rapporto di 4:1:4:1. I loro pesi molecolari si aggirano tra 19 e 25 kDa e il loro punto medio isoelettrico (pI) è compreso tra 4.6 e 4.8. Queste molecole hanno carattere anfifilico. I prodotti farmaceutici a base di caseina possono essere costituiti da una forma acida della proteina che ha una bassa solubilità in acqua o sotto forma di caseinato di sodio, che è facilmente solubile tranne vicino al suo punto isoelettrico. Nella sua struttura primaria la caseina è ricca di residui di prolina che tendono ad interrompere la struttura ad alfa-elica e i foglietti beta, e inoltre in questa struttura sono assenti ponti disolfuro. Si ottiene così una scarsa struttura secondaria e terziaria della proteina che quindi risulta essere abbastanza stabile al calore. L'elevato contenuto di prolina rende però la caseina molto sensibile alla degradazione proteolitica ed enzimatica a livello del tratto gastrointestinale. Una caratteristica interessante della caseina è il fatto che i residui amminoacidici di cui è costituita tendono ad auto-assemblarsi in strutture micellari stabili in soluzioni acquose. Le micelle di caseina sono composte dalle quattro fosfoproteine precedentemente menzionate, esse sono tenute insieme da interazioni idrofobiche e da ponti

costituiti da fosfato di calcio colloidale che sono associati a residui di serina fosforilati contenuti nelle catene laterali della struttura della caseina (Elzoghby et al., 2011). Nonostante i numerosi studi, non c'è ancora un unico modello che identifica la struttura e le proprietà delle micelle di caseina, ma ne esistono vari che si stanno via via aggiornando e completando. Il modello più recente ossia quello di Horne (Figura 4.1) è considerato il migliore, esso si basa sul fatto che i tre tipi di caseina ( $\alpha S_1$ ,  $\alpha S_2$ ,  $\beta$ -caseina) contengono dei centri di fosforilazione che possono legarsi ai cluster di fosfato di calcio colloidale creando dei punti di collegamento (De Kruif e al., 2012). Le code delle proteine che sporgono dai nanocluster si associano con altre proteine attraverso una serie di interazioni deboli, per formare una matrice più o meno omogenea. Le interazioni deboli che si creano sono legami ad idrogeno, interazioni idrofobiche, legami ionici e deboli interazioni elettrostatiche che portano ad auto associazione delle micelle. La superficie delle micelle, costituita da  $\kappa$ -caseina, crea uno strato idrofilo che stabilizza le micelle.



**Figura 4.1.** Rappresentazione grafica del Modello di Horne (2003).

### 4.3 Idrogel a base di caseina

Le proprietà e le applicazioni degli idrogel pH-sensibili sono stati descritti nel primo capitolo del presente lavoro, dove è stata messa in evidenza l'importanza che questi materiali ricoprono nell'industria farmaceutica come sistemi di veicolazione per ottenere un rilascio modulato e sito specifico di agenti terapeutici. La caseina possiede un certo numero di caratteristiche favorevoli idonee per lo sviluppo di idrogel e di altri biomateriali, tra queste caratteristiche ricordiamo l'alta idrofilia, la buona biocompatibilità, in particolare nelle applicazioni per il rilascio orale di farmaci, la bassa tossicità e l'elevata disponibilità di siti reattivi per la modificazione chimica. Le applicazioni di questi materiali presenti in letteratura

sono molte, e hanno prodotto molti risultati positivi. Ultimamente ha attirato una notevole attenzione la *transglutaminasi*, un enzima di origine naturale, che consente di reticolare le proteine del latte come la caseina producendo nuovi idrogel con una tecnica enzima assistita. La reazione di reticolazione indotta dall'enzima è stata portata avanti in condizioni blande, offrendo così un approccio maggiormente biocompatibile per generare in situ la matrice polimerica per intrappolare i farmaci senza l'uso di reticolanti chimici. Un altro recente lavoro riguarda anche la sintesi di idrogel pH sensibili a base di caseina per il rilascio di albumina sierica bovina (BSA)(Songa e al., 2009). Questo idrogel è stato preparato utilizzando la genipina, un estratto del frutto della gardenia, per reticolare la caseina in ambiente acquoso. In questo studio sono state sintetizzate tre matrici a base di caseina contenenti diverse quantità di genipina. La diversa quantità usata ha permesso di ottenere un aumento della resistenza meccanica dell'idrogel e inoltre si è notato che aumentando la genipina e la temperatura di reazione si otteneva una diminuzione del tempo di gelificazione. Sui materiali ottenuti sono stati inoltre condotti studi di *swelling* a differenti valori di pH, evidenziando che a pH 1,2 l'idrogel, risultando nello stato contratto, rilasciava una quantità di BSA molto minore rispetto a quando veniva posto in una soluzione tamponata a pH 7,4, in cui invece il materiale si trova nello stato rigonfio.

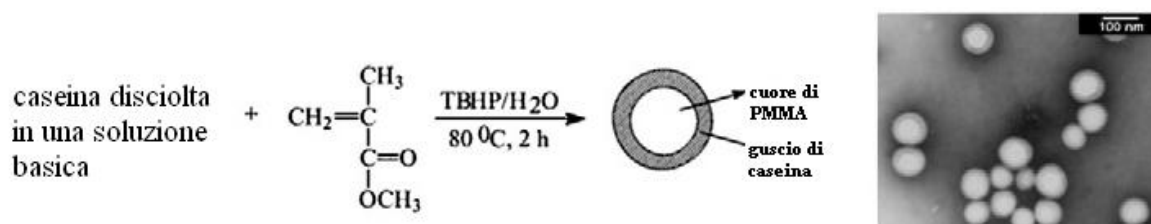
Il lavoro svolto negli anni precedenti ha quindi suggerito un importante campo di impiego per questi tipi di idrogel che possono essere utilizzati per veicolare i farmaci rispondendo selettivamente a stimoli esterni come le variazioni di pH.

#### **4.4 Microparticelle e nanoparticelle di caseina**

Sistemi di trasporto come microparticelle (dimensioni comprese tra 1  $\mu\text{m}$  e 1mm) e nanoparticelle (dimensioni comprese tra 1 nm e 100 nm) a base di proteine di origine naturale hanno attirato una notevole attenzione da diversi anni per il loro potenziale impiego come sistemi a rilascio controllato e prolungato di diversi farmaci. È noto da tempo che microsferi a base di albumina sierica bovina sono molto promettenti per l'uso clinico grazie alla loro stabilità a lungo termine e alla loro capacità di incorporare un'elevata percentuale di farmaco. Tuttavia, microparticelle e nanoparticelle a base di caseina possono rappresentare una valida alternativa all'albumina. Queste particelle sono relativamente poco costose e possiedono una migliore disperdibilità in sistemi acquosi e una notevole anfifilicità cioè, sono costituite sia da una porzione idrofila che da una idrofoba. Come precedentemente detto la caseina possiede carattere anfifilico ed quindi in grado di generare strutture micellari. L'anfifilicità diventa

importante dopo la fase di sintesi durante il caricamento del farmaco in quanto dà la possibilità di una facile e rapida dissoluzione in soluzioni acquose.

Per la sintesi di micro e nanoparticelle esistono varie tecniche tra cui: emulsione con reticolazione chimica, reticolazione enzimatica, coacervazione e complessazione elettrostatica in sistemi acquosi, complessazione ionica di copolimeri, gelificazione al calore e copolimerizzazione a innesto. Zhu e Li (2003) riuscirono a preparare delle nano particelle costituite da un nucleo di poli-metilmetacrilato ed un guscio esterno di caseina. Più in particolare, la caseina è stata fatta reagire con metilmetacrilato in presenza di ter-butilidroperossido come iniziatore radicalico. In questo modo si è ottenuto un materiale anfifilico in cui la caseina funge da porzione idrofila e le catene di metilmetacrilato da coda idrofoba (Figura 4.2). In ambiente acquoso, tale struttura forma micelle nanometriche di dimensioni comprese tra 80 e 130 nm con una ben definita morfologia. Questo processo è considerato molto valido e potrebbe essere utilizzato nella sintesi di vettori per la distribuzione e il rilascio dei farmaci.

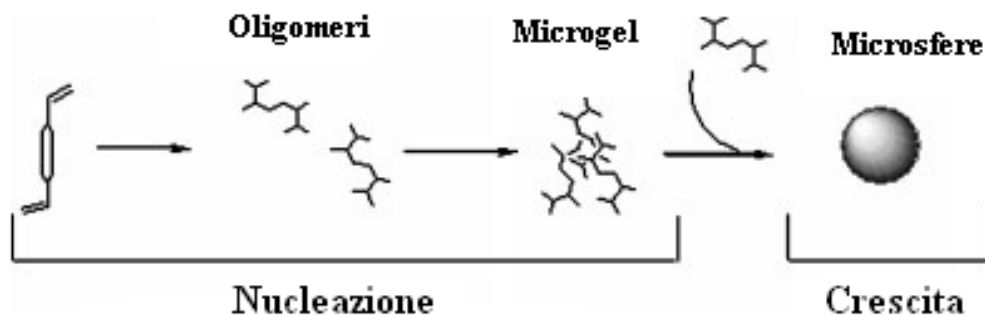


**Figura 4.2:** Sintesi di nanoparticelle con un nucleo definito di PMMA e un guscio di caseina.

Attualmente sono in atto esperimenti su nuove tecniche per la realizzazione di nanoparticelle a base di caseina. L'obiettivo è quello di trovare una tecnica ideale che possa conciliare aspetti vantaggiosi come il costo e la semplicità di sintesi. Una tecnica senz'altro innovativa è la polimerizzazione per precipitazione.

Essa è molto simile alla sintesi in bulk, l'unica vera differenza consiste nel diverso rapporto tra la quantità di solvente porogeno (in questo caso molto maggiore) e gli altri composti presenti nella miscela di reazione. L'eccesso di solvente porogeno impedisce la formazione del blocco solido. Questa tecnica ha il vantaggio di portare direttamente alla produzione di microsferi o nanosferi di dimensioni e forma regolari, evitando il processo di rottura, frantumazione e setacciatura che si devono compiere se si utilizzano le altre tecniche.

Il meccanismo molecolare che porta alla sintesi delle particelle desiderate è caratterizzato da due fasi: nucleazione e accrescimento delle sfere (Figura 4.3) (Puoci e al., 2004). La reazione inizia come al solito nella soluzione di polimerizzazione.



**Figura 4.3:** *Meccanismo della polimerizzazione per precipitazione.*

I monomeri e l'iniziatore vengono sciolti in un solvente organico e nel frattempo si formano gli oligomeri. Dopo un certo periodo di tempo la concentrazione degli oligomeri diventa sufficientemente elevata da consentire la polimerizzazione radicalica degli oligomeri a formare un microgel (nucleazione). Ogni microgel cresce di continuo catturando oligomeri presenti nel mezzo di reazione. Quest'ultimo effetto impedisce il verificarsi di ulteriori nucleazioni e quindi le dimensioni delle particelle prodotte sono abbastanza uniformi.

#### **4.5 Biodegradabilità degli idrogel per applicazioni farmaceutiche**

I materiali usati nelle applicazioni biomediche e farmaceutiche devono essere facilmente degradabili dall'organismo in modo da non costituire un pericolo dopo il loro utilizzo. Per mettere in evidenza le caratteristiche più importanti di degradazione ed erosione delle matrici polimeriche bisogna considerare alcuni parametri come il tipo di legame polimerico, il pH e la composizione del copolimero; questi parametri possono essere usati anche per controllare la velocità di degradazione. La degradazione conduce infine all'erosione del materiale ossia alla perdita di massa del polimero stesso. La ricerca in questo campo ha tuttavia evidenziato anche delle criticità in quanto i processi di degradazione potrebbero causare la perdita della stabilità chimica e meccanica dei materiali e la liberazione di materiali potenzialmente tossici. La conoscenza dei meccanismi chimico-fisici di erosione dei materiali polimerici è la chiave per poter giungere alla risoluzione di questi problemi. La distinzione tra polimeri biodegradabili e non degradabili è però arbitraria perché, anche se in minima percentuale, tutti i polimeri si degradano. Una probabile differenza che consente di assegnare il termine "biodegradabile" ad un polimero è il fatto che esso si degrada durante il suo impiego o immediatamente dopo; un

polimero non biodegradabile invece non si degrada o per farlo, richiede un tempo notevolmente superiore rispetto a quello destinato alla sua applicazione. Esistono diversi metodi di degradazione che comprendono: la foto-degradazione, la termo-degradazione, la degradazione chimica e quella meccanica. Per i biomateriali polimerici utilizzati in campo farmaceutico, oltre a questi metodi, riveste un ruolo importante anche la degradazione chimica tramite idrolisi o l'idrolisi catalizzata da enzimi. Quest'ultimo effetto è denominato biodegradazione e significa che il processo è regolato almeno in parte da un sistema biologico. La presenza di acqua innesca la degradazione chimica del polimero (Göpferich, 1996) portando alla formazione di oligomeri e monomeri. La degradazione complessiva cambia la microstruttura e la massa del polimero formando dei pori attraverso cui gli oligomeri e i monomeri vengono rilasciati. È proprio la liberazione di questi ultimi che porta alla perdita di peso del polimero. Lo sviluppo di polimeri biodegradabili è aumentato in modo esponenziale negli ultimi decenni creando nuove applicazioni per tali materiali. Nelle prime applicazioni essi venivano utilizzati come materiali a struttura riassorbibile (es. acido polilattico e poli-glicolico) in interventi chirurgici. Dal 1970 in poi questi polimeri hanno iniziato ad avere un impiego come *drug delivery systems*, venendo utilizzati proprio per somministrare i farmaci oralmente. Così facendo questi materiali vengono a contatto con i succhi gastrici e vanno incontro a digestione. La biodegradazione è operata in questo caso dagli enzimi del tratto gastrico (es. *pepsina*) e da quelli del tratto intestinale (es. *pancreatina*). Come è stato precedentemente detto, l'uso di proteine naturali per la sintesi di idrogel ne accentua la biodegradabilità perché sono proprio le proteine che spesso costituiscono l'involucro nel quale il farmaco viene disperso. Gli enzimi del tratto gastrointestinale, tagliano i residui proteici favorendo il rilascio del farmaco e il suo assorbimento. Per questo vengono condotti diversi studi di rilascio e biodegradabilità sui sistemi proposti per la veicolazione e il rilascio di terapeutici in modo da garantire la protezione del principio attivo in ambienti critici per la sua stabilità.

#### **4.6 Rivestimento di matrici polimeriche per applicazioni farmaceutiche**

Le matrici polimeriche come gli idrogel, come specificato più volte, costituiscono il veicolo per il trasporto di un principio attivo nell'organismo. Esse devono creare una sorta di rivestimento per il principio attivo per proteggerlo dall'ambiente esterno. Nelle somministrazioni orali il farmaco viene a contatto con ambienti in cui esistono costanti variazioni di pH e questo non garantisce la stabilità del principio attivo, che può andare incontro a fenomeni di degradazione e quindi a perdita della sua attività. Per aumentare la

stabilità e la protezione nei confronti di un bioattivo potrebbero essere usati materiali di origine naturale ma il loro successo dipende dal tipo di applicazione.

Ad esempio, chitosano e pectina (Ribeiro e al., 2014) sono polisaccaridi ampiamente utilizzati dall'industria. Il chitosano è un biopolimero cationico, estratto dall'esoscheletro dei crostacei, esso viene utilizzato come materiale portante nella sintesi di sistemi per il rilascio di farmaci a livello intestinale. Tuttavia, esso non resiste all'ambiente acido dello stomaco e questo costituirebbe uno svantaggio perché verrebbe persa la protezione per il farmaco perciò, bisogna apportare delle modifiche al fine di migliorare la stabilità del chitosano nello stomaco. La pectina al contrario, essendo un polisaccaride anionico, resiste alle condizioni di basso pH presenti nello stomaco e risulta essere resistente anche alla digestione da parte di alcuni enzimi ma allo stesso tempo è sensibile alle *pectinasi* presenti nel colon. Qui essa viene digerita favorendo il rilascio del principio attivo. Sono proprio queste le proprietà auspicabili per la sintesi di un ottimo sistema per il rilascio selettivo del farmaco.

Spesso però sono richiesti materiali di origine sintetica per ottenere un buon rivestimento e in alcuni casi questi materiali potrebbero provocare problemi di biocompatibilità, per questo motivo negli ultimi anni si sta cercando di sviluppare nuove tecniche di rivestimento delle matrici polimeriche, al fine di aumentarne la stabilità nei fluidi biologici. L'obiettivo principale è quello di riuscire ad utilizzare dei materiali di rivestimento biocompatibili e privi di tossicità ed inoltre l'interesse si sta spostando verso nuove tecniche che possano aumentare l'uniformità del rivestimento stesso.

I materiali usati per il rivestimento sono dei polimeri come ad esempio: Eudragit® (Ashford e al., 1993), acido poliacrilico (Carbopol®), idrossipropilmetilcellulosa (HPMC) (Gazzaniga e al., 1994), che hanno dimostrato di riuscire a veicolare il farmaco aumentando l'assorbimento a livello dell'intestino riuscendo, ad adeguate concentrazioni, ad essere metabolizzati dall'organismo.

I vantaggi rispetto all'uso di rivestimenti naturali potrebbero essere: una maggiore regolazione del rilascio del farmaco con il raggiungimento dei livelli desiderati, migliori proprietà meccaniche, una più uniforme formazione del film di rivestimento con conseguente aumento della stabilità, un aumento delle possibilità di sviluppo di sistemi per il rilascio del farmaco sito specifico.

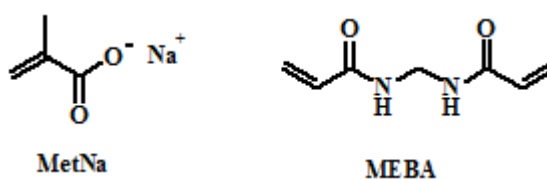
Un esempio di rivestimento utilizzato per modulare il rilascio del terapeutico, che usa proprio materiali sintetici, è la ricopertura di pellets di Lansoprazolo effettuato con Eudragit L e idrossipropilmetilcellulosa (Fang e al., 2014). Si è visto che i pellets rivestiti hanno dimostrato

sia un aumento della stabilità a livello gastrico, sia un aumento della biodisponibilità del principio attivo rispetto ai pellets non rivestiti.

Un altro materiale utilizzato come rivestimento è l'acido poliacrilico che, presentando gruppi carbossilici possiede caratteristiche di solubilità pH-dipendenti. In condizioni di elevato pH, i gruppi carbossilici tendono a ionizzarsi facilitando la dissoluzione del polimero; a pH più bassi invece i gruppi carbossilici non si ionizzano rendendo quindi il polimero insolubile. In tal modo viene promosso l'assorbimento nel farmaco nell'intestino e si favorisce una maggiore protezione del principio attivo nello stomaco.

#### 4.7 Sintesi degli idrogel

Idrogel pH-sensibili a base di caseina, metacrilato di sodio (MetNa) e metilenbisacrilammide (MEBA) (Figura 4.4) sono stati sintetizzati con lo scopo di realizzare delle nuove forme farmaceutiche da utilizzare come *drug delivery systems*.



**Figura 4.4:** Struttura del Metacrilato di sodio e della etilen bisacrilammide.

La caseina è la principale proteina del latte e possiede buone caratteristiche di inerzia chimica, idrofilia, nessun effetto cancerogeno, nessuna teratogenicità, biocompatibilità e biodegradabilità, che la rendono un materiale ottimale per l'uso in campo farmaceutico. Questa proteina, inoltre, presenta gruppi funzionali che ben si prestano alla modificazione chimica, consentendo quindi di impartire specifiche proprietà al materiale finale. I monomeri utilizzati per la sintesi degli idrogel, in particolare il metacrilato di sodio, hanno attribuito a ciascuna matrice proprietà caratteristiche che le rendono sensibili a piccole variazioni di pH, conferendo quindi la capacità di diventare ottimi veicoli per la somministrazione orale di farmaci. Possedendo infatti gruppi carbossilici acidi, il rilascio è favorito prevalentemente in ambiente basico, ovvero nei fluidi intestinali, quando l'idrogel si trova nella forma rigonfia. Al contrario, in ambiente acido, ovvero a livello gastrico, i gruppi carbossilici sono nella forma protonata, si verifica il collasso della matrice e la diffusione del farmaco avviene in misura molto minore.



La sintesi delle matrici polimeriche C100, C200, C300, è stata eseguita utilizzando diverse quantità di caseina e di agente reticolante, come riportato in Tabella 4.1.

Lo scopo è stato quello di verificare se e in che misura, variando la quantità di proteina e il grado di reticolazione dell'idrogel, è possibile modulare le caratteristiche funzionali del materiale corrispondente e quindi anche i profili di rilascio di un farmaco. La metodica di sintesi utilizzata per la realizzazione degli idrogel è la polimerizzazione per precipitazione innescata dall'iniziatore radicalico AIBN, in grado di generare radicali liberi a temperature superiori a 60°C.

**Tabella 4.1:** *Condizioni sperimentali della sintesi degli idrogel.*

<b>Idrogel</b>	<b>Caseina (mg)</b>	<b>MetNa (mg/mmol)</b>	<b>MEBA (mg/mmol)</b>
<b>C100</b>	100	400/3,70	560±1/3,63
<b>C200</b>	200	400/3,70	460±1/2,98
<b>C300</b>	300	400/3,70	360±1/2,33

Questo tipo di tecnica consente di ottenere in maniera semplice e poco laboriosa nanoparticelle di forma sferica regolare utilizzando un unico solvente organico, l'acetonitrile, e senza ricorrere a tecniche in emulsione sicuramente più complesse e dispendiose per via dei molteplici solventi organici da usare. È stato osservato che ci sono due parametri da rispettare per la buona riuscita della polimerizzazione, ossia l'uso di una temperatura di reazione stabile (60°C) per tutta la durata della reazione (24 h) e una rotazione costante del pallone in cui avviene la reazione. Ovviamente, è importante anche che tutta la quantità di caseina utilizzata per la sintesi di ogni matrice sia ben dispersa in soluzione in modo da garantire un *feed* di polimerizzazione omogeneo. Una volta sintetizzati, i polimeri sono stati sottoposti a cicli di lavaggio con solventi a polarità decrescente: acqua, etanolo, acetone ed etere per allontanare le impurezze residue dalla fase di sintesi e vengono poi fatti essiccare fino a costanza di peso ottenendo delle polveri. Le rese di ciascuna reazione sono in media di 800 mg su una carica totale di 1 g.

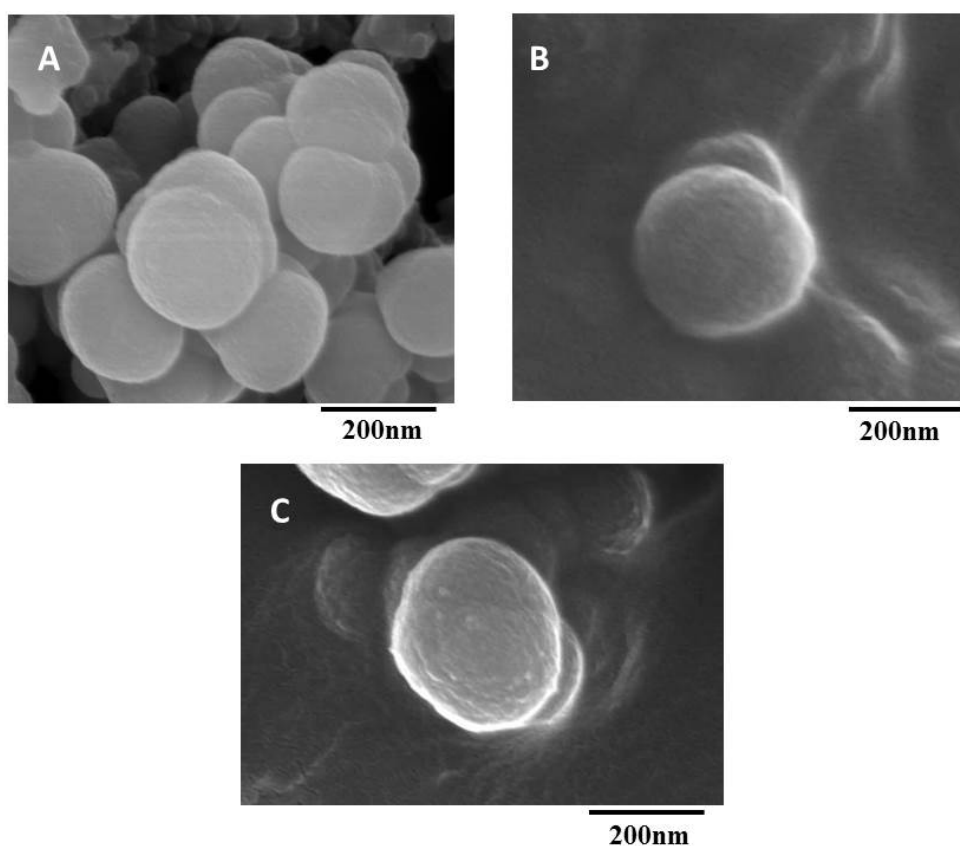
#### **4.8 Caratterizzazione degli idrogel**

Ciascun polimero è stato sottoposto ad una serie di analisi con lo scopo di determinarne le caratteristiche strutturali e morfologiche. Nello specifico, ogni resina è stata sottoposta ad analisi morfologica tramite microscopia a scansione elettronica (SEM) riuscendo così a evidenziare la precisa struttura degli idrogel. Sono state poi effettuate analisi tramite

spettroscopia FT-IR e analisi calorimetrica. È stato valutato anche il grado di rigonfiamento dei polimeri e la capacità di rilascio di un farmaco in fluidi a specifico pH. Si è poi posta l'attenzione sulla biodegradabilità delle particelle ottenute valutando la degradazione a contatto con specifici enzimi e il profilo di rilascio del farmaco in esse caricato.

#### 4.8.1 Analisi morfologica tramite SEM

La forma e le dimensioni delle particelle ottenute è stata verificata mediante SEM. Come è possibile osservare in Figura 4.5 tutti i campioni presentano forma sferica e dimensioni nanometriche. In particolare, il campione C100 è risultato possedere il diametro medio minore (204nm), mentre i campioni C200 e C300 hanno mostrato diametri medi leggermente superiori (234 e 265 nm, rispettivamente), probabilmente a causa del minor grado di reticolazione.

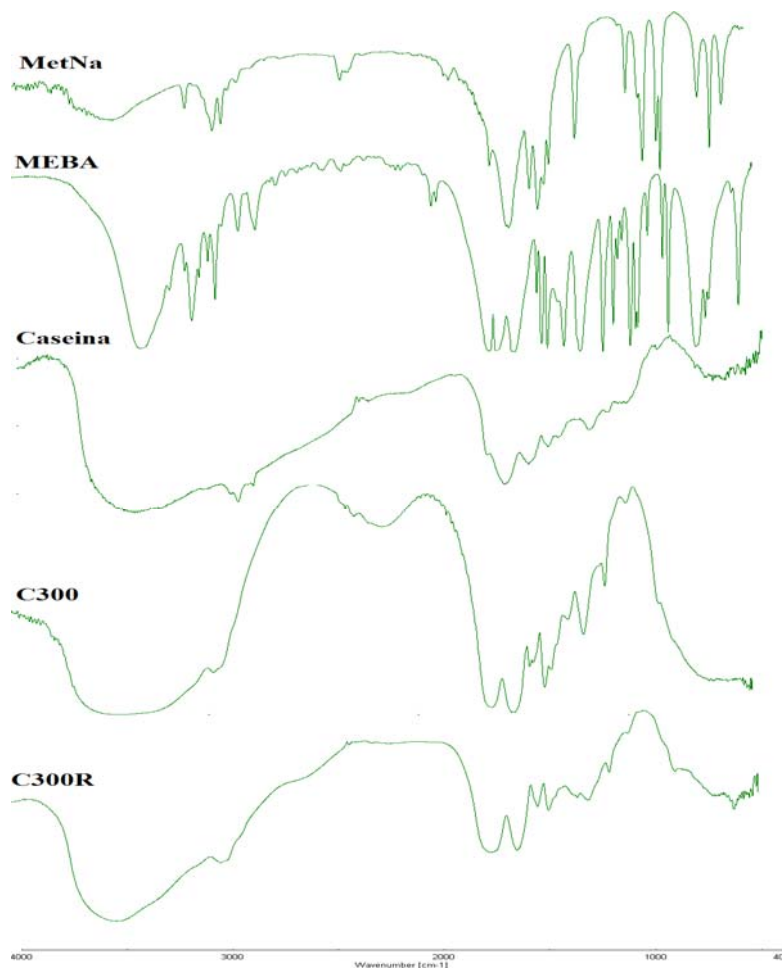


**Figura 4.5:** Micrografia a scansione elettronica dei campioni C100 (A), C200 (B) e C300 (C).

#### 4.8.2 Analisi FT-IR

Al fine di verificare l'effettiva inserzione di ciascun componente nella struttura dell'idrogel, sono stati effettuati degli spettri FT-IR (Figura 4.6). Da queste analisi si è potuto osservare

come tutti gli idrogel, di cui a fine esemplificativo sono riportati solo gli spettri del campione C300 e C300R, mostrino le tipiche bande di assorbimento dei gruppi ammidici della proteina a  $1645\text{ cm}^{-1}$  (stretching del C=O banda ammidica primaria) e a  $1595\text{ cm}^{-1}$  (bending dell'N-H banda ammidica secondaria), segno che la proteina è effettivamente entrata nella struttura polimerica, e la scomparsa della banda a  $917\text{ cm}^{-1}$  caratteristica del doppio legame carbonio-carbonio di MetNa e MEBA.



**Figura 4.6:** FT-IR di MetNa, MEBA, caseina e dei prodotti C300 e C300R.

#### 4.8.3 Determinazione del grado di rigonfiamento

Il grado di rigonfiamento di ciascun idrogel è stato determinato ponendo a contatto ciascuna matrice con soluzioni a pH acido, neutro e basico, allo scopo di mimare gli ambienti gastrico e intestinale. I valori delle percentuali di rigonfiamento sono riportate in Tabella 4.2, insieme ai valori di  $S_r$ , definito come il rapporto tra le percentuali di rigonfiamento a pH 7,4 e pH 1,0.

**Tabella 4.2:** Determinazione dell'affinità per il mezzo acquoso a diversi pH e parametri di caricamento del Diclofenac sodico per gli idrogel C100, C200 e C300.

Idrogel	Contenuto di acqua (%)			Caricamento del farmaco (%)	
	pH 1.0	pH 7.4	Sr	LE	DL
<b>C100</b>	351±3	404±3	1.2	63.1±1.8	6.31±1.5
<b>C200</b>	338±4	506±4	1.5	71.5±2.2	7.15±1.9
<b>C300</b>	290±3	523±5	1.8	42.0±1.5	4.20±1.1

LE = Percentuale di farmaco incorporata riferita alla quantità totale; DL = Quantità di farmaco riferita alla matrice polimerica.

I dati registrati possono essere giustificati dalla presenza dei gruppi pendenti acidi che conferiscono una maggiore affinità per il mezzo acquoso a pH 7,4, poiché si verifica la repulsione elettrostatica tra i gruppi carbossilici dissociati, favorendo il rigonfiamento del materiale. A pH acido invece, il reticolo polimerico è nello stato collassato per via della presenza dei gruppi acidi in forma indissociata. Questo si traduce in un massimo stato di *deswelling* della matrice, e in percentuali di rigonfiamento minori (Cirillo e al., 2010). Dai dati sperimentali emerge che tutte le matrici sintetizzate hanno un comportamento pH sensibile, e che la matrice C300 presenta la differenza più marcata tra i valori di rigonfiamento in ambiente acido e basico. (Figura 4.7). Questo comportamento può essere imputato al minor grado di reticolazione dell'idrogel che, a parità di monomero funzionale MetNa, presenta una minore quantità di agente reticolante, e una maggiore quantità di caseina.



**Figura 4.7:** Confronto tra lo swelling di C300 a pH 1,0 e 7,4.

Dai dati appare evidente che all'aumentare della quantità di caseina la percentuale di rigonfiamento aumenta, questa fa ipotizzare che matrici contenenti maggiori quantità di proteina possano dare una migliore reticolazione dell'idrogel migliorando la struttura del reticolo polimerico e favorendo il rigonfiamento. A sostegno di queste ipotesi è stato calcolato anche  $S_r$ , un parametro empirico che rappresenta una misura del grado di idrofilia delle matrici sintetizzate ed è calcolato come rapporto tra la percentuale di rigonfiamento dell'idrogel in ambiente basico e acido, rispettivamente. Esso aumenta all'aumentare dei valori di rigonfiamento a pH 7,4, quando la matrice pH sensibile si trova nello stato di massima affinità con il mezzo circostante.

#### **4.8.4 Degradazione enzimatica**

I sistemi nanoparticellari che vengono utilizzati per la veicolazione e la somministrazione di terapeutici per via orale sono stati introdotti principalmente per aumentare la biodisponibilità di quei farmaci che sono scarsamente assorbiti o che danno problemi di assorbimento perché sono molecole poco stabili e soggetti a degradazione migliorandone così la protezione (Maincent e al., 1986; Kreuter, 1991). In molti casi però la quantità di nanoparticelle in grado di svolgere adeguatamente tale funzione è relativamente bassa, in quanto vengono degradate già a livello gastrico (Eldridge e al., 1990). Per questo i parametri che regolano il rilascio del farmaco e la degradazione enzimatica della *carrier* polimerico giocano un ruolo fondamentale nell'assorbimento del farmaco. La degradazione enzimatica è quindi un fattore da prendere in considerazione durante la progettazione di una nuova forma farmaceutica. La biodegradabilità rappresenta una caratteristica importante e desiderabile nella progettazione di un dispositivo per il rilascio controllato di farmaci, ma deve essere anche opportunamente modulata, soprattutto quando si vuole direzionare la cessione del farmaco in uno specifico distretto dell'organismo, come per i dispositivi da somministrare per via orale. Nel presente lavoro la biodegradabilità enzimatica delle matrici è stata valutata in soluzioni mimanti gli ambienti dello stomaco e dell'intestino (Curcio e al., 2013). In particolare, ciascun campione preparato è stato incubato per 72h a 37°C con soluzioni di pepsina e pancreatina, due dei principali enzimi presenti nel tratto gastrico e intestinale. Dopo ciascun tempo di incubazione, è stata misurata perdita di peso di ciascun materiale, come mostrato in Tabella 4.3. Inoltre, in un altro esperimento, per simulare il transito gastrointestinale si è pensato di incubare i polimeri in pepsina per sole 2 h (questo è infatti il tempo medio di permanenza del cibo ingerito nello stomaco).

**Tabella 4.3:** Degradazione degli idrogel C100, C200 e C300 e degli idrogel ricoperti con acido poliacrilico (C100R, C200R e C300R) in soluzioni di pepsina e pancreatina.

IDROGEL	DEGRADAZIONE ENZIMATICA	
	Perdita di peso (%)	
	<i>Pepsina</i>	<i>Pancreatina</i>
<b>C100</b>	63.0±2.0	67.3±2.4
<b>C200</b>	67.0±2.1	68.1±2.2
<b>C300</b>	60.0±2.2	66.2±2.1
<b>C100R</b>	20.7±1.3	45.7±1.5
<b>C200R</b>	20.5±1.1	32.7±1.1
<b>C300R</b>	19.8±1.0	35.8±1.3

Il materiale ideale è quello in grado di resistere all'ambiente acido dello stomaco, in modo da proteggere il farmaco caricato, ma che a contatto con l'ambiente intestinale si degrada, favorendo la cessione completa del principio attivo, garantendone quindi i profili ottimali di biodisponibilità.

I dati sperimentali hanno mostrato che tutti i materiali sintetizzati subiscono una marcata degradazione sia in pepsina (60% di perdita in peso dopo 2h di incubazione) che in pancreatina (67% dopo 72h). Al fine di minimizzare questo effetto si è pensato di rivestire gli idrogel con un materiale gastroresistente a base di acido poliacrilico ottenendo i materiali denominati con le sigle C100R, C200R, C300R. I dati sperimentali hanno dimostrato che l'acido poliacrilico è in grado di proteggere l'idrogel dall'azione idrolitica della pepsina, riducendo la perdita in peso dei campioni dal 60 al 20%. Inoltre, nell'ambiente simulante il tratto intestinale gli stessi campioni rivestiti presentano una perdita in peso minore rispetto ai corrispettivi non rivestiti (45,7% per C100R, 32,7 % per C200R e 35,8 % per C300R).

#### 4.9 Caricamento del farmaco

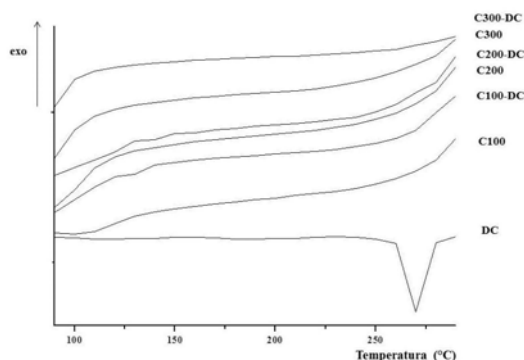
L'effettiva applicabilità dei sistemi come sistema per la veicolazione e il rilascio di un agente terapeutico è stata valutata mediante caricamento del Diclofenac (DC), un farmaco antinfiammatorio di comune utilizzo in terapia.

La scelta di questo farmaco è dovuta alle sue molteplici applicazioni soprattutto nel trattamento cronico delle infiammazioni e nell'artrite reumatoide. Il DC ha attività analgesica, antipiretica e antinfiammatoria, e sembra in grado di ridurre le concentrazioni intracellulari di acido arachidonico libero nei leucociti probabilmente alterandone il rilascio o la captazione. Il farmaco risulta essere selettivo verso la *ciclossigenasi di tipo 2* (COX-2), ma si manifestano

ugualmente effetti collaterali a livello gastrointestinale e sono stati riportati anche danni al sistema cardiovascolare, al fegato e ai reni associati al trattamento cronico con questo farmaco. Alcuni svantaggi di questo agente terapeutico sono correlati alla sua bassa emivita di circa due ore dovuta ad una fase di metabolismo e di eliminazione molto rapida. Per migliorare questi aspetti negativi sono richieste nuove forme farmaceutiche che possano minimizzarne gli effetti collaterali e aumentarne l'emivita riducendo così le dosi e il numero di somministrazioni giornaliere. Il caricamento è avvenuto mediante impregnazione di ciascuna matrice polimerica con una soluzione di farmaco e su ciascun materiale sono stati calcolati l'efficienza e il grado di caricamento, i cui valori sono riportati in Tabella 4.2. Come è possibile osservare, la matrice C200 possiede il valore di efficienza e di grado di caricamento più alti, probabilmente perché caratterizzata dagli ottimali rapporti monomero-reticolante-proteina.

#### 4.9.1 Analisi calorimetrica differenziale (DSC)

La dispersione uniforme del farmaco all'interno delle maglie della rete polimerica è un requisito importante per consentirne un rilascio controllato e prolungato nel tempo (Sairam e al., 2006). Se il principio attivo rimanesse relegato sulla superficie della matrice polimerica senza riuscire a penetrare la struttura, a causa ad esempio della scarsa affinità per la struttura dell'idrogel, si otterrebbe una cessione completa del farmaco nelle primissime ore di rilascio. L'effettiva incorporazione del farmaco nella rete polimerica è stata verificata mediante analisi calorimetrica a scansione differenziale (DSC). In Figura 4.8 sono riportati i termogrammi di ciascuna matrice caricata e non caricata, insieme al termogramma del farmaco libero, che mostra una temperatura di fusione di 275°C. Come è possibile osservare, le curve calorimetriche delle nanoparticelle caricate non mostrano alcun picco di fusione a 275°C, suggerendo che il farmaco è effettivamente uniformemente disperso nella matrice polimerica (Zhang e al., 2007).

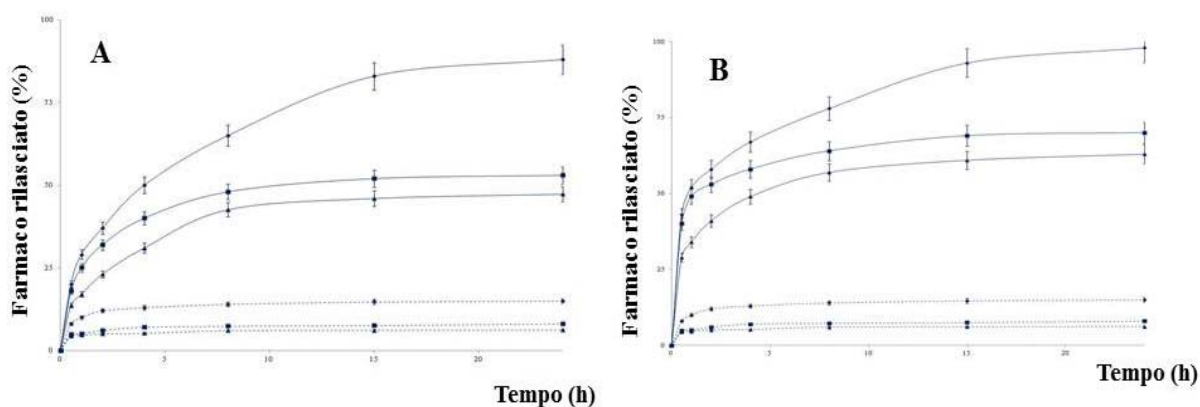


**Figura 4.8:** DSC delle nanoparticelle caricate e non caricate e del farmaco libero.

#### 4.10 Esperimenti di rilascio *in vitro*

Per valutare la potenziale applicazione dei materiali sintetizzati come sistemi a rilascio modificato di farmaci sono stati condotti diversi esperimenti di rilascio *in vitro*. Il profilo di rilascio di ogni matrice è stato valutato, usando esperimenti separati, sia in ambiente acido che in ambiente basico e ancora sia in assenza di enzimi che in presenza di essi. Come è possibile osservare in Figura 4.9A, in ambiente acido (HCl 0,1 N, pH 1,0) le percentuali di rilascio si arrestano nelle 24 ore in cui è stato condotto l'esperimento al 15% per il campione C100 e all'8% e 6% per C200 e C300, rispettivamente. Quando invece le matrici sono poste in ambiente basico (PBS  $10^{-2}$  M, pH 7,4) si nota un significativo incremento del rilascio del farmaco nel tempo.

Inoltre è possibile notare come, mentre per la matrice C100 la cessione del farmaco arriva quasi a completezza (88%) e sia meno controllata nel tempo, per i campioni C200 e C300 i profili di rilascio sono maggiormente controllati nel tempo ma le percentuali massime non superano mediamente il 50%. Probabilmente questo diverso comportamento è dovuto al fatto che nel campione C100, che presenta la quantità più alta di reticolante, la quantità di farmaco che rimane sulla superficie del polimero in fase di caricamento e non riesce a diffondere nelle maglie del reticolo è maggiore e viene rilasciata più velocemente.



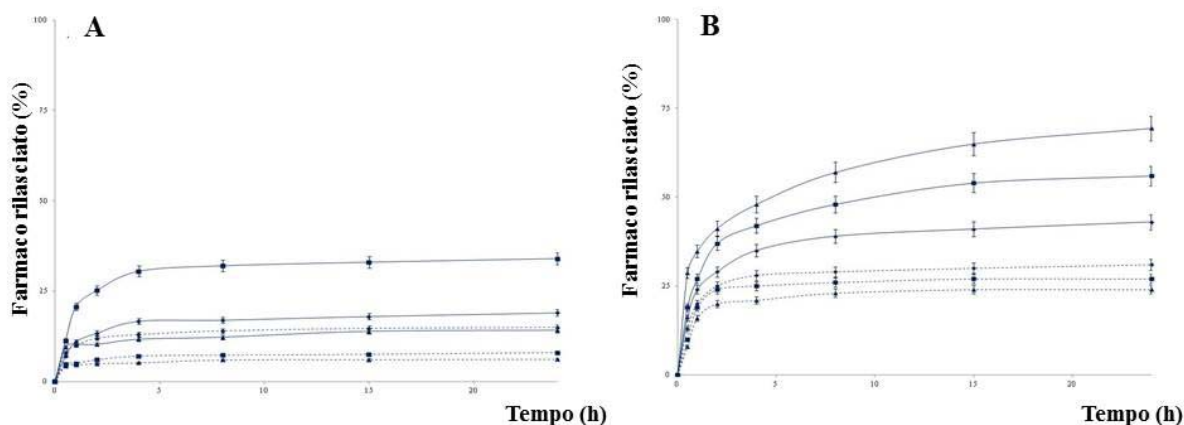
**Figura 4.9:** Profili di rilascio senza enzima (A) e con enzima (B) di: C100 (◆), C200 (■), C300 (▲) a pH 7,4 (—) e a pH 1(.....).

Gli esperimenti di rilascio sono stati poi condotti *in vitro* in presenza di pepsina e pancreatina (Figura 4.9B), al fine di testare in che misura gli enzimi proteolitici, degradando le matrici polimeriche, modificano i profili di rilascio del farmaco.

Anche in questo caso emerge che le percentuali di rilascio in ambiente acido si mantengono basse, il che indica che la degradazione della struttura polimerica da parte dell'enzima non



arriva a influenzare l'andamento del rilascio del farmaco. Quando i campioni si trovano nella soluzione di pancreatina, invece, le percentuali di rilascio aumentano sensibilmente rispetto ai valori registrati in solo tampone basico, raggiungendo il 98% per il campione C100 e il 70% e il 63% per C200 e C300, rispettivamente. Gli stessi esperimenti di rilascio sono stati effettuati anche sulle matrici rivestite in presenza o assenza dei sistemi enzimatici (Figura 4.10A e B).



**Figura 4.10** Profili di rilascio senza enzima ( A ) e con enzima ( B ) di: C100R (◆), C200R (■), C300R (▲) a pH 7,4 (—) e a pH 1(.....).

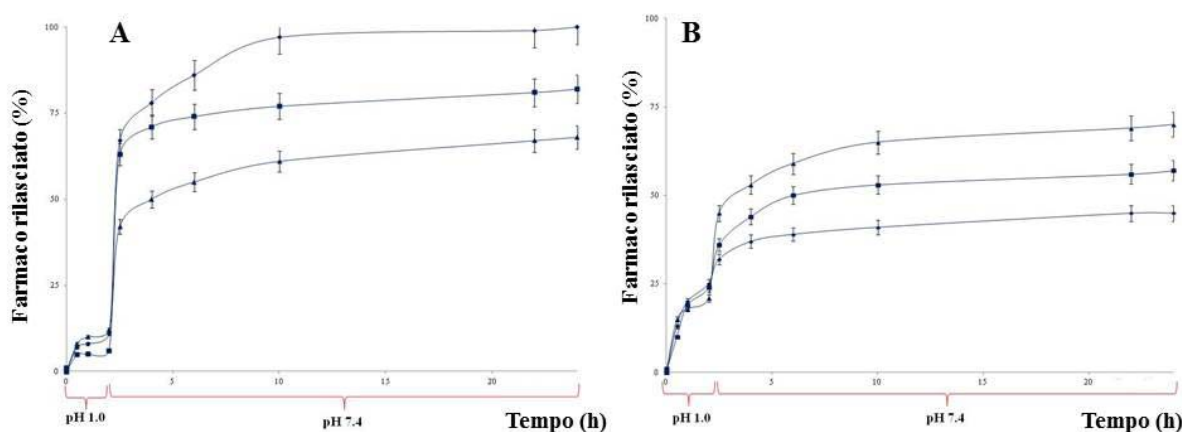
Dai grafici in Figura 4.10 A, si evince che la presenza del rivestimento con acido poliacrilico influenza significativamente le percentuali di rilascio in ambiente basico le quali, rispetto alle matrici non rivestite, risultano dimezzate. In acido cloridrico, invece, l'andamento dei profili di cessione non subisce variazioni significative.

Per quel che riguarda i rilasci enzimatici (Figura 4.10 B), mentre in pepsina le percentuali di rilascio rimangono pressoché inalterate, in pancreatina l'andamento è molto più lento rispetto alle corrispondenti matrici non rivestite. Questo comportamento potrebbe essere imputato al fatto che il rivestimento funge da barriera alla diffusione del principio attivo, che si trova a dover diffondere attraverso particelle con un rapporto volume/superficie maggiore rispetto ai campioni non rivestiti.

Infine, allo scopo di simulare il transito delle nanoparticelle a livello gastrointestinale sono stati eseguiti gli esperimenti di rilascio *in vitro* usando il metodo del cambiamento del pH (Spizzirri e al., 2012). I risultati ottenuti sono riportati nei grafici in Figura 4.11. Tali dati sono espressi, analogamente ai grafici precedenti, come percentuale di farmaco rilasciata nell'unità di tempo, ma l'esperimento viene condotto nelle prime due ore a pH 1,0 usando HCl 0,1 M e successivamente a pH 7 aggiungendo nella stesso mezzo di rilascio una soluzione di NaHPO<sub>4</sub> 0,4M. In Figura 4.11A sono riportati i profili di rilascio di C100, C200,

C300. Si può notare come nelle prime due ore il rilascio si mantenga molto basso, mentre già dopo mezz'ora dal cambio di pH si ottiene un aumento della percentuale di rilascio per tutti e tre i polimeri. Si passa infatti da una percentuale di rilascio minore del 15% a pH 1,0 a valori che superano il 60% per C100 e per C200 e il 40% per C300.

In Figura 4.11B vengono invece riportati i dati di rilascio degli idrogel rivestiti con il metodo del cambiamento di pH e in presenza di pancreatina. Anche in questo caso i dati sono coerenti con i precedenti esperimenti, con percentuali basse nelle prime due ore a pH 1,0 e un aumento della quantità di farmaco ceduta non appena si incrementa il pH e si aggiunge l'enzima. Per le matrici rivestite, tuttavia, il rilascio anche in questo caso non arriva a completezza, probabilmente perché il rivestimento protegge la matrice polimerica dall'azione idrolitica dell'enzima, ma si ottengono ugualmente dei valori accettabili che superano il 50% dopo le 24 ore.



**Figura 4.11:** Profili di rilascio di: C100 (◆), C200 (■), C300 (▲) (A) e C100R (◆), C200R (■), C300R (▲) (B).

#### 4.11 Analisi della cinetica di rilascio

Le particelle sintetizzate mostrano una geometria ben definita e pertanto è stato possibile analizzare la cinetica di rilascio del farmaco (Fickiana o non-Fickiana) attraverso l'equazione semi-empirica 2.12 di Peppas-Ritger descritta nel paragrafo 2.5 (Ritger e Peppas, 1987).

In questa equazione la quantità di farmaco rilasciata  $M_t/M_0$ , espressa in funzione del tempo  $t$ , permette di costruire una funzione dove il valore di  $n$  consente di stabilire la cinetica di rilascio. Considerando la forma perfettamente sferica dei materiali sintetizzati, un valore di  $n$  pari a 0,43 indica che la diffusione del farmaco attraverso la matrice polimerica segue un meccanismo di diffusione di tipo Fickiano, mentre se  $n = 0,85$  il meccanismo di trasporto viene denominato Caso II. Quando  $0,43 \leq n \leq 0,85$ , il meccanismo di trasporto che si verifica

può essere considerato intermedio tra i due, invece se  $n < 0,43$  la diffusione è pseudo-Fickiana, e le curve di assorbimento sono simili alle curve di tipo Fickiano, ma è necessario un tempo maggiore per raggiungere l'equilibrio. Infine un valore di  $n > 0,85$  implica che la velocità di trasporto del solvente (o del farmaco) aumenta quando si raggiunge l'equilibrio; questo tipo di cinetica viene denominata Super-Caso II. In Tabella 4.4 sono riportati tutti i valori di  $n$  calcolati per ciascun idrogel sintetizzato con e senza rivestimento.

**Tabella 4.4:** Parametri della cinetica di rilascio delle differenti formulazioni.

Idrogel	$M_t/M_0=Kt^n$ (Equaz. 2.12)			$M_t/M_0=K_1t^{1/2}+K_2t$ (Equaz. 2.13)		
	$K 10^3 (min^{-n})$	$n$	$R^2$	$K_1 10^3 (min^{-1/2})$	$K_2 10^3 (min^{-1})$	$R^2$
<b>C100</b>	28,1±0,60	0,41±0,01	0,99	30,3±0,60	-2,5±0,1	0,99
<b>C200</b>	26,4±0,90	0,25±0,03	0,94	26,6±0,60	-3,3±0,2	0,99
<b>C300</b>	19,4±0,80	0,31±0,03	0,95	20,2±0,60	-2,1±0,1	0,99
<b>C100R</b>	11,0±0,90	0,20±0,60	0,93	10,8±0,60	-1,5±0,1	0,93
<b>C200R</b>	20,1±1,10	0,20±0,20	0,87	20,2±1,20	-2,8±0,3	0,94
<b>C300R</b>	10,1±0,20	0,11±0,60	0,96	8,8 ±0,20	-1,2±0,1	0,96

Esperimenti di rilascio condotti *in vitro* in una soluzione di PBS  $10^{-2}$  M, pH 7,4.

Come mostrano i risultati, il parametro  $n$ , per gli esperimenti condotti in PBS a pH 7,4, è uguale a 0,41 per C100, facendo ipotizzare un rilascio di tipo pseudo-Fickiano che però si avvicina al meccanismo Fickiano. Per le altre matrici sia rivestite che non, i valori sono sensibilmente minori dimostrando così una cinetica di tipo pseudo-Fickiana.

Altre informazioni possono essere ottenute utilizzando i dati di rilascio secondo un altro modello presente in letteratura e anch'esso descritto nel paragrafo 2.5 e rappresentato dall'equazione 2.13 sviluppata da Peppas e Sahlin (1989).

Questo modello paragona due termini il primo dovuto alla diffusione del farmaco attraverso le maglie del reticolo polimerico secondo un meccanismo di tipo fickiano, il secondo considera tutti gli altri meccanismi diversi da quello diffusivi. Tale modello permette di ricavare informazione importanti sul meccanismo di rilascio paragonando i valori delle due costanti cinetiche che è possibile estrapolare. La Tabella 4.4 mostra i valori di  $K_1$  e  $K_2$  calcolati secondo l'equazione 2.13. In generale è possibile notare come per tutte le matrici i valori di  $K_1 t^{1/2}$  siano molto maggiori rispetto a quelli di  $K_2 t$  e questo indica che il contributo Fickiano alla diffusione del farmaco è predominante.

Una differenza tra le matrici non rivestite e quelle rivestite può essere evidenziata comparando sia i valori di  $n$  che quelli di  $K_1 t^{1/2}$ . Si nota infatti che, per le matrici rivestite

(C100R, C200R, C300R) tali valori sono minori rispetto agli idrogel non rivestiti (C100, C200, C300). Questo indica che in generale il contributo Fickiano alla diffusione è maggiore per le matrici non rivestite rispetto a quelle rivestite. Si può quindi concludere che il rilascio del Diclofenac a pH 7,4 dalle matrici sintetizzate in generale è influenzato da due fattori: la velocità di *swelling* del polimero e la diffusione del farmaco attraverso la rete polimerica dell'idrogel. Poiché, alla stessa temperatura, non ci sono differenze significative tra le cinetiche di diffusione del farmaco attraverso la rete polimerica, la velocità di rigonfiamento dell'idrogel risulta essere il fattore determinante.

Infine, le cinetiche di rilascio del farmaco sono state studiate anche in relazione all'esperimento condotto in pancreatina. Negli idrogel biodegradabili, la velocità di erosione della superficie esterna del polimero operata dall'enzima è il parametro chiave che determina il rilascio del farmaco (Curcio e al., 2013). Generalmente l'erosione del polimero è più veloce della diffusione del farmaco e così il farmaco viene rilasciato man mano che l'erosione del polimero procede. Hopfenberg e Hsu (1978) hanno sviluppato un modello matematico che considera il meccanismo di rilascio dipendente solo dai rapporti di erosione. Le equazioni 2.12 e 2.13 possono essere applicate anche per quantificare il contributo dell'erosione, oltre che del rigonfiamento, sulla diffusione del farmaco, e i parametri cinetici sono riportati nella Tabella 4.5 (Colombo e al., 2000).

**Tabella 4.5:** Parametri della cinetica di rilascio delle differenti formulazioni. Esperimenti di rilascio condotti in vitro in una soluzione di pancreatina 1mg/mL (PBS 10<sup>-2</sup> M, pH 7,4).

Idrogel	$M_t/M_0=Kt^n$ (Equaz. 2.12)			$M_t/M_0=K_1t^{1/2}+K_2t$ (Equaz. 2.13)		
	$K 10^3 (min^{-n})$	n	R <sup>2</sup>	$K_1 10^3 (min^{-1/2})$	$K_2 10^3 (min^{-1})$	R <sup>2</sup>
<b>C100</b>	50,6±0,7	0,20±0,01	0,98	47,1±3,9	-5,7±0,3	0,93
<b>C200</b>	47,5±1,2	0,13±0,01	0,96	33,5±1,2	-6,2±0,5	0,94
<b>C300</b>	35,6±1,4	0,20±0,02	0,96	34,2±2,1	-4,5±0,1	0,96
<b>C100R</b>	23,9±0,6	0,21±0,03	0,90	23,5±1,2	-3,1±0,1	0,97
<b>C200R</b>	28,4±0,9	0,23±0,03	0,93	28,2±1,3	-3,5±0,3	0,98
<b>C300R</b>	34,6±0,3	0,24±0,03	0,99	33,1±1,2	-4,0±0,5	0,96

I dati riportati evidenziano che anche in presenza dell'enzima, ciascun idrogel, per cui è stato calcolato il coefficiente *n* attraverso l'equazione di Ritger-Peppas, dimostra una cinetica di rilascio pseudo-Fickiana (*n* < 0,43), mentre il fatto che il termine  $K_1t^{1/2}$  sia più elevato rispetto  $K_2t$  indica che il meccanismo di rilascio predominante del DC è una diffusione Fickiana.

#### 4.12 Conclusione

Nel presente lavoro, è stata sintetizzata una nuova classe di idrogel pH-sensibili costituite da caseina, MetNa e MEBA, biocompatibili e biodegradabili. La tecnica usata per tale sintesi è stata la polimerizzazione per precipitazione. Tale tecnica ha permesso di ottenere delle nanoparticelle di forma sferica ben definita. L'uso della caseina ha apportato alle matrici numerose caratteristiche positive aprendo possibilità importanti per l'industria farmaceutica. Essa infatti è un materiale facilmente reperibile, poco costoso e ben tollerato dall'organismo. Le nanosfere sono state caratterizzate attraverso varie analisi tra cui la determinazione del grado di rigonfiamento a diversi pH e l'analisi della biodegradabilità enzimatica in presenza di pepsina e pancreatina, tipici enzimi del tratto gastro-intestinale. È stato osservato che la presenza delle funzioni carbossiliche del metacrilato di sodio rende i materiali sensibili alle variazioni di pH facendo dei polimeri sintetizzati dei buoni *carrier* gastrointestinali per una grande quantità di farmaci. In particolare, questo studio ha utilizzato come farmaco modello uno degli analgesici e antinfiammatori più usati in terapia: il Diclofenac sodico. Dagli esperimenti effettuati è emerso che il rilascio del farmaco è correlato alle proprietà di rigonfiamento dei polimeri a differenti valori di pH. Le percentuali maggiori si ottengono infatti a pH 7,4, ossia ai valori che simulano i fluidi intestinali. Gli studi di rilascio sono stati effettuati anche in presenza degli enzimi del tratto gastrointestinale e in particolare si è osservato che la presenza di una soluzione di pancreatina aumenta le percentuali di rilascio da ciascun idrogel facendo in modo che i rilasci si avvicinino maggiormente alla completezza rispetto ai rilasci effettuati in assenza di enzima. Questo comportamento è riconducibile ai fenomeni di degradazione enzimatica del reticolo polimerico che accelera il rilascio del farmaco. Sono stati effettuati anche esperimenti per testare la biodegradabilità di ciascun polimero. I dati sperimentali hanno riportato una buona degradazione per tutti i polimeri sia in una soluzione di pepsina che di pancreatina. Per minimizzare l'erosione superficiale operata dalla pepsina e quindi migliorare la biodisponibilità del farmaco caricato, ogni polimero è stato rivestito con acido poliacrilico. La presenza del rivestimento ha migliorato la degradazione della matrice minimizzandola quando posta a contatto con la pepsina, sebbene i profili di rilascio del farmaco siano rimasti pressoché inalterati.

Infine, in base alle equazioni semi-empiriche di Peppas-Ritger e Peppas Sahlin, sono stati determinati parametri che caratterizzano il tipo di cinetica di rilascio del farmaco dalle matrici, ottenendo che il rilascio del diclofenac, dipendendo fondamentalmente dalla velocità di rigonfiamento dell'idrogel, è prevalentemente di tipo diffusionale e segue una cinetica pseudo-Fickiana.

I risultati ottenuti suggeriscono che i materiali sintetizzati presentano delle buone potenzialità applicative come sistemi per il rilascio controllato e sito-specifico di farmaci da somministrare per via orale.

### **4.13 Parte sperimentale**

#### **4.13.1 Materiali**

Caseina, metacrilato di sodio, N,N'-metilenbiacrilammide (MEBA), fosfato monobasico di sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), fosfato bibasico di sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), carbonato di sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), pancreatina estratta dal pancreas suino, pepsina ottenuta dalla mucosa gastrica di suino, Diclofenac sodico sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO). L'acido poliacrilico (MM 1000 KDa) è stato acquistato dalla Rimital (Milano, Italia). L'iniziatore radicalico azoisobutirronitrile (AIBN) è stato purificato tramite le procedure standard di ricristallizzazione. I solventi usati: acetonitrile, etanolo, acetone, etere dietilico, metanolo, acido cloridrico (37% m/m), acqua sono stati acquistati da Carlo Erba reagenti (Milano, Italia).

#### **4.13.2 Preparazione delle nanoparticelle**

Le nanoparticelle di caseina sono state preparate attraverso la tecnica della polimerizzazione per precipitazione attraverso un processo di natura radicalica usando AIBN come iniziatore. Differenti quantità di caseina sono state disciolte in 10 ml di una soluzione acquosa di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10 mg  $\text{ml}^{-1}$  sotto agitazione magnetica. Nel pallone di reazione sono stati quindi inseriti 10 ml di acetonitrile contenenti 400 mg di metacrilato di sodio, N,N'-metilenbisacrilamide e AIBN. Il pallone di reazione è stato quindi posto in un bagnetto ad olio termostato a 6°C e mantenuto sotto rotazione continua (40 rpm) per 24 h. Allafine della reazione, le particelle formate sono state filtrate, lavate con etanolo (100 ml), acetone (100 ml), etere etilico (100 ml) e essiccate sotto vuoto fino a peso costante.

#### **4.13.3 Analisi FT-IR**

Gli spettri FT-IR sono stati effettuati su pasticche di KBr, utilizzando uno spettrofotometro Jasco FT-IR 4200 nel range di lunghezza d'onda 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Il segnale è stato ottenuto eseguendo 32 scan a una risoluzione di 1  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **4.13.4 Analisi morfologica e dimensionale**

Gli studi morfologici sono stati eseguiti tramite un microscopio a scansione elettronica Leica LEO 420; la superficie dei campioni è stata resa conduttrice mediante la deposizione di uno strato di oro (spessore  $\sim 300$  Å), effettuato sotto atmosfera di argon. La distribuzione dimensionale è stata effettuata utilizzando un processore di immagini Leica DMRB equipaggiato con uno stereomicroscopio Leica Wild 3D. Il processore di immagini calcola l'area delle particelle convertendola nel diametro equivalente.

#### **4.13.5 Determinazione del grado di rigonfiamento**

Le caratteristiche di *swelling* delle nanosfere di caseina sono state determinate controllando l'affinità per il mezzo acquoso a diversi valori di pH. Aliquote note di polimero, circa 50 mg, sono state poste in filtri da 5,0 ml di vetro sinterizzato ( $\varnothing$  10 mm; porosità, G3). I filtri sono stati pesati e posti in beaker contenenti una soluzione di HCl 0,1 M e di tampone fosfato  $10^{-3}$  M a pH 7,4, rispettivamente, per valutare la percentuale di *swelling* in ambienti simulanti i fluidi del tratto gastro-intestinale. Ad intervalli regolari di tempo, l'eccesso di soluzione è stata rimossa tramite percolazione a pressione atmosferica. Successivamente il filtro è stato centrifugato a 3500 rpm per 15 min. Il filtro contenente il prodotto viene quindi pesato. A questo punto la percentuale di rigonfiamento dell'idrogel viene determinata.

#### **4.13.6 Degradazione enzimatica delle nanoparticelle di caseina**

Aliquote note di ciascuna matrice (circa 50 mg) sono state incubate in un bagno ad acqua termostata a 37°C sotto costante agitazione (100 rpm) con:

- a) 10 ml di una soluzione di HCl 0,1 N contenente pepsina estratta dalla mucosa gastrica di suino avente una concentrazione finale di 0,8 mg/ml;
- b) 10 ml di una soluzione di tampone fosfato pH 7,4 contenente pancreatina estratta dal pancreas di suino avente una concentrazione finale di 1 mg/ml.

Le matrici sono state incubate per 72h sia in pepsina che in pancreatina e per 2 ore solo in pepsina per simulare il transito gastrointestinale. Trascorso il tempo di incubazione, i polimeri sono stati centrifugati a 8000 rpm per 10 minuti. Le soluzioni sono state allontanate e le stesse matrici sono state lavate con acqua distillata (3 x 5 ml) centrifugando e allontanando il liquido ad ogni lavaggio. I lavaggi con acqua sono stati effettuati per allontanare dai polimeri le tracce di prodotti di degradazione solubili, enzimi o altre impurità. Le nanoparticelle sono state congelate e successivamente liofilizzate. La percentuale di degradazione è stata calcolata basandosi sulla perdita di peso del materiale stesso.

#### **4.13.7 Rivestimento delle nanosfere di caseina**

Un'aliquota di polimero caricato di DC e vuoto (50 mg) viene inserita in un pallone da 10 ml insieme a 3,0 ml di una soluzione metanolica di acido poliacrilico (PAA) con concentrazione finale di 3,3 mg/ml. La soluzione ottenuta viene sonicata per circa 90 min per consentire la dispersione delle particelle e il palloncino viene poi posto sotto agitazione (40 rpm) per 30 min a temperatura ambiente. Successivamente il solvente viene evaporato e le nanosfere poste sotto vuoto fino a peso costante.

#### **4.13.8 Caricamento del farmaco**

L'incorporazione del Diclofenac sodico nelle nanoparticelle di caseina vuote è stata effettuata su 200 mg di matrice. La matrice è sospesa con 2,0 ml di una soluzione acquosa di farmaco 10 mg/ml e posta sotto continua e lenta agitazione rotatoria a 25°C per 72 h. Le nanoparticelle sono state quindi filtrate ed essiccate a pressione ridotta fino a costanza di peso. La percentuale che esprime l'efficienza di caricamento è stata determinata tramite analisi HPLC del solvente filtrato.

#### **4.13.9 Stabilità dei principi attivi a pH 1,0 e pH 7,4**

La stabilità del Diclofenac sodico è stata studiata a diversi pH (1,0 e 7,4) e a temperatura fisiologica. 10 mg di principio attivo sono stati incubati a 37°C in tampone fosfato  $10^{-3}$  M a pH 7,4. A determinati intervalli di tempo, corrispondenti agli stessi tempi degli esperimenti di rilascio, i campioni sono stati analizzati tramite analisi HPLC. Le analisi HPLC sono state condotte usando un cromatografo Jasco PU-2080 equipaggiato con iniettore Rheodyne 7725i (loop di 20  $\mu$ l), un detector Jasco UV-2075 e un integratore Jasco-Borwin. Per ottenere la separazione cromatografica è stata utilizzata a temperatura ambiente una colonna  $C_{18}$  a fase inversa ( $\mu$ Bondapak, 150 $\times$ 4.6 mm, diametro interno pari a 10  $\mu$ m acquistata dalla Waters)

Le condizioni cromatografiche per il Diclofenac sodico sono: la fase mobile è ammonio acetato/metanolo/acetonitrile (4/3/3, v/v). Il pH della porzione acquosa della fase mobile è stato aggiustato con acido acetico glaciale, la velocità di flusso è 0,6 ml min<sup>-1</sup>, lo spettrofotometro UV è stato settato a 284 nm (Altimari e al., 2012). Tempo di ritenzione di 4,5 min, limite di rilevamento 0,6  $\mu$ M, limite di quantificazione 14  $\mu$ M.

#### **4.13.10 Studi di rilascio *in vitro***

Gli studi di rilascio del farmaco da ciascun idrogel, sia non rivestito che rivestito, sono stati condotti a temperatura ambiente utilizzando come mezzi di rilascio: a) una soluzione di HCl



0,1 M pH 1,0 e b) una soluzione di PBS  $10^{-3}$  M a pH 7,4, simulando così i fluidi biologici gastrointestinali. Una quantità nota di polimero (circa 10 mg) caricato con il farmaco viene dispersa in un pallone contenente 10 ml di HCl 0,1 M in modo da simulare il pH dello stomaco. A vari intervalli di tempo, 2,0 ml del mezzo acido vengono prelevati, portati a pH neutro aggiungendo 1,0 ml di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,4 M e analizzati all'HPLC determinando così la quantità di farmaco rilasciata, in accordo al metodo riportato nella USP XXII e riferito alle particelle rivestite. Analogamente, l'esperimento viene effettuato su tutte le matrici disperdendo la quantità nota di polimero in un pallone e aggiungendo 10 ml di tampone fosfato. Anche in questo caso sono stati prelevati 2,0 ml di soluzione e analizzati.

#### **4.13.11 Studi di rilascio *in vitro* in presenza di enzimi**

Esperimenti di rilascio *in vitro* sono stati condotti su tutte le matrici, rivestite e non rivestite, in presenza degli enzimi del tratto gastrointestinale sia a pH acido che basico. La soluzione di pepsina a concentrazione finale di 0,8 mg/ml è stata preparata sciogliendo il quantitativo necessario dell'enzima in una soluzione acquosa di HCl 0,1M. La soluzione di pancreatina a concentrazione finale 1mg/ml è stata preparata sciogliendo l'enzima in tampone fosfato ( $10^{-3}$  M, pH 7,4), tramite agitazione magnetica. Quantità note di polimero (10 mg) sono state disperse in 1,0 ml delle soluzioni di pepsina e pancreatina, rispettivamente, e inserite in membrane da dialisi. Ciascuna membrana è stata chiusa e inserita in un pallone con 9,0 mL di HCl per il rilascio gastrico e 9,0 mL di tampone fosfato a pH 7,4 per il rilascio intestinale, rispettivamente. I palloni sono stati posti in un bagno termostato a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  sotto continua agitazione. A intervalli regolari di tempo, 2,0 ml di ciascun mezzo di rilascio sono stati prelevati e la quantità di farmaco rilasciata è stata determinata tramite HPLC. Per il rilascio in ambiente acido, prima della determinazione le soluzioni prelevate sono state portate a pH neutro aggiungendo 1,0 ml di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,4 M.

#### **4.13.12 Studi di rilascio simulanti il passaggio gastrointestinale**

Il rilascio del farmaco dagli idrogel è stato infine valutato usando il metodo del cambiamento del pH, per simulare un vero e proprio rilascio gastrointestinale. 10 mg di ciascuna matrice caricata con il farmaco è stata inserita in una membrana da dialisi in cui inizialmente è stato aggiunto 1,0 ml di HCl. Questa membrana è stata successivamente inserita in una vial contenente 9,0 ml di HCl 0,1 M mantenendo il recipiente sotto continua agitazione in un bagno ad acqua termostato a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  per due ore. Ad intervalli di tempo regolari 2,0 ml di soluzione vengono prelevati e sostituiti con 2,0 ml di HCl fresco. Prima dell'analisi HPLC, le

aliquote prelevate sono state neutralizzate aggiungendo 1,0 ml di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,4 M. Trascorse le due ore, la membrana da dialisi è stata aperta e in essa sono stati inseriti 0,5 ml di una soluzione di pancreatina 1 mg/ml in  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,4 M. Esternamente alla membrana vengono invece aggiunti 4,5 ml di  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,4 M, ottenendo un volume totale di 13,5 ml. Il pH del mezzo è portato da 1 a 7,4, simulando così il passaggio nell'intestino (metodo riportato USP XXII, test di rilascio, metodo A). Anche in questo esperimento, a intervalli regolari di tempo, 2,0 ml di soluzione sono stati prelevati e sostituiti con 2,0 ml di mezzo fresco.

#### **4.13.13 Analisi statistica**

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato, ed i risultati sono stati in accordo entro  $\pm$  5%, che è il margine di errore standard.

# CAPITOLO 5

## Idrogel sensibili a pH e temperatura con proprietà antiossidanti modulabili

### 5.1 Introduzione

*"Un medicamento è considerato stabile quando, in un determinato periodo di tempo, le sue proprietà essenziali non cambiano o cambiano entro limiti tollerabili, se conservato in un recipiente adatto, in condizioni definite di temperatura, di umidità e di esposizione alla luce".*  
(Farmacopea Italiana ).

Quanto riportato dalla Farmacopea Ufficiale Italiana, consente di affermare che la stabilizzazione di una preparazione farmaceutica è auspicabile sia prevedendo specifiche condizioni di conservazione e uso di adeguati contenitori, sia indicando una data limite di validità, sia, in casi molto particolari, operando un sovradosaggio controllato del principio attivo. Il concetto di corretta conservazione include diversi aspetti pratici che vanno dalla preservazione dall'inquinamento microbico e fungino (*preservation*), passando per la scelta del materiale di confezionamento (*packaging*), alla conservazione vera e propria (*storage*) e infine all'etichettatura dei contenitori (*labeling*) (Mehta e Bryani, 2017).

Poiché le preparazioni farmaceutiche sono complesse miscele di composti reattivi dal punto di vista fisico e chimico, ne consegue che le loro caratteristiche possono modificarsi in seguito al contatto tra i diversi componenti, con il contenitore o per effetto degli agenti esterni.

Più specificatamente le principali cause di alterazione delle formulazioni farmaceutiche possono essere classificate secondo alcuni criteri in (Szabo e al., 2016):

- Alterazioni fisiche con il contenitore: adsorbimento e estrazione.
- Interazioni con l'ambiente: gas atmosferici, luce, umidità, differenze di pressione, temperatura.
- Interazioni fisico-meccaniche: shock da impatto, compressione, abrasione.
- Interazioni biologiche: contaminazioni microbiologiche, contaminazioni animali, contaminazioni da parte dell'uomo.

Le alterazioni fisiche prevedono alterazioni dello stato di aggregazione o di dispersione, della durezza e consistenza, variazioni della solubilità e variazioni organolettiche.

I fenomeni alla base di tale deterioramento, sono individuabili nella perdita di acqua o nel suo adsorbimento, nella perdita di costituenti volatili, nella crescita di cristalli, polimorfismo, modificazioni dello stato fisico e fenomeni di migrazione o di estrazione.

Le principali conseguenze delle alterazioni fisiche risiedono nelle modifiche organolettiche del preparato, così come nelle variazioni della biodisponibilità del preparato e, non ultimo, nella mancata uniformità di dosaggio.

Le alterazioni chimiche sono la conseguenza diretta di reazioni di idrolisi, ossidazione, riduzione, isomerizzazione, foto-alterazione, polimerizzazione e reazioni enzimatiche; tutte le reazioni appena citate dipendono dalla struttura del farmaco, dalla presenza di eccipienti, dalla confezione, dalle radiazioni elettromagnetiche, dalla presenza di ossigeno e dal tasso di umidità nell'ambiente. Le conseguenze di tali alterazioni chimiche consistono nella perdita del contenuto del principio attivo, nell'alterazione della biodisponibilità e nell'eventuale comparsa di tossicità e immunogenicità.

Quando avviene una reazione chimica e quindi, si verifica un'alterazione in un sistema, è opportuno studiare sia i fattori che la influenzano che la velocità con cui questa alterazione avviene.

Molti principi attivi ed eccipienti che entrano nella costituzione di forme farmaceutiche sono soggetti a processi di decomposizione di varia natura. Le conseguenze principali dei processi di degradazione sono:

- Variazione del contenuto di principio attivo all'interno delle preparazioni farmaceutiche dopo un certo periodo di conservazione.
- Cambiamento delle proprietà organolettiche, cambiamento di colore e decolorazione, della formulazione;
- Formazione di prodotti secondari di degradazione che possono risultare particolarmente nocivi e/o tossici.

Altre forme di instabilità, come la decomposizione catalizzata da enzimi o la crescita di microrganismi (muffe, lieviti, funghi ecc.) sono altrettanto importanti e devono essere prese in considerazione per un'attenta valutazione generale della stabilità dei medicinali.

A tal proposito la ricerca scientifico-farmaceutica pone l'attenzione su una classe importante di materiali polimerici, quali gli idrogel, che possono essere utilizzati come biosensori, per il

rilascio controllato di farmaci e quindi come drug delivery systems e come *carrier* protettivi nei confronti delle sostanze trasportate.

Gli idrogel sono materiali polimerici ampiamente studiati grazie anche alle loro proprietà di biodegradabilità e biocompatibilità ma soprattutto grazie alla loro capacità di rispondere a vari stimoli quali specie chimiche, di enzimi, campi magnetici ed elettrici, variazioni di temperatura e di pH, luce, ecc. Per tale motivo vengono denominati materiali intelligenti o *smart polymers*, ed è evidente che tale versatilità abbia suscitato notevole interesse nel campo della tecnologia farmaceutica.

Il presente lavoro affronterà il problema della protezione e stabilizzazione dell'acido folico (AF), principio attivo suscettibile al danno ossidativo, mediante la progettazione di un sistema polimerico in grado di preservare il farmaco in condizioni favorevoli alla degradazione. La prima parte del lavoro ha riguardato la sintesi e la caratterizzazione di matrici polimeriche contenenti gruppi funzionali fenolici capaci di conferire proprietà antiossidanti al materiale. Tali sistemi sono stati realizzati mediante una reazione di copolimerizzazione radicalica a partire da acido metacrilico (MAA), N-isopropilacrilamide (NIPAAm) ed etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) come agente reticolante, in presenza di un composto polifenolico capace di partecipare alla reazione di polimerizzazione innestandosi nelle catene polimeriche in crescita attraverso la formazione di legami covalenti. Nello specifico sono state preparati materiali reticolati contenenti (+)-catechina (CT) e quercetina (QE), composti polifenolici dalle spiccate proprietà antiossidanti e *scavenger* nei confronti dei radicali liberi (Curcio e al., 2015).

Le matrici sono state caratterizzate dal punto di vista chimico-fisico mediante valutazione del grado di rigonfiamento a diversi valori di temperatura e pH, spettroscopia FT-IR, analisi morfologica e analisi calorimetrica a scansione differenziale (DSC) e successivamente testate al fine di dimostrarne le proprietà preservanti per l'acido folico in specifiche condizioni di stress ossidativo per il composto in esame quali l'irraggiamento UV.

## **5.2 Stabilità dei farmaci**

Partendo dal presupposto che non esistono farmaci assolutamente stabili, in quanto le condizioni ambientali, i mezzi e le tecniche di produzione, la stessa natura della forma farmaceutica utilizzata ne condizionano la stabilità nel tempo, possiamo definire un parametro molto importante: la stabilità, cioè il periodo che intercorre tra il momento della preparazione del farmaco ed il momento in cui la sua potenza non appare ridotta di un valore superiore al 10% (Colombo e al., 2004).

Tale definizione presuppone però che i prodotti di degradazione siano identificati e privi di qualsiasi effetto, in caso contrario bisognerà considerare un farmaco stabile solo fintanto che esso non è soggetto ad alterazioni d'alcun tipo. Infatti, è ben noto, che la stabilità di un principio attivo non soltanto può alterare le proprietà organolettiche ma, anche inficiarne l'attività farmacologica e determinare la comparsa di effetti non desiderati. Quindi è di vitale importanza garantire mediante dimostrazione che il preparato medicinale, nella dose e forma utilizzate, sia sicuramente efficace ed innocuo per la salute del consumatore; ciò comporta la necessità di conoscere le alterazioni che esso può subire, nonché di prevedere l'influenza che i diversi fattori esercitano sul decorso di queste reazioni. I fattori che condizionano la stabilità di un medicamento sono di natura fisica, chimica e biologica: tempo di conservazione, temperatura, pH, luce, contenitore, umidità ossidazione, contaminazione biologica, incompatibilità con sostanze associate.

Il tempo per il quale un prodotto si mantiene inalterato può variare notevolmente: da pochi giorni per alcune soluzioni acquose idrolizzabili a svariati anni per certi farmaci in forme di compresse, è comunque opportuno valutare il tempo in funzione delle condizioni di conservazione, della temperatura, del pH, della concentrazione e di altri fattori. È noto che gradienti di temperatura influenzano criticamente la stabilità dei farmaci e delle forme farmaceutiche finite; ad esempio un aumento di temperatura può provocare il rammollimento o la fusione di preparati solidi, mentre una sua diminuzione può provocare il congelamento di fasi acquose come ad esempio nelle emulsioni. È possibile aumentare notevolmente la stabilità di alcune preparazioni farmaceutiche, riducendo la temperatura di conservazione, per esempio passando dalla temperatura ambiente a quella di un frigorifero.

Anche il pH è un fattore determinante per la stabilità, ciò vale non soltanto per reazioni di tipo idrolitico (in genere soggette ad una catalisi acido-base specifica), ma anche per quelle di tipo ossidativo, di racemizzazione ecc.

Ogni sostanza ha un pH ottimale al quale la sua stabilità è massima, così quando il minimo di decomposizione (cioè il massimo di stabilità), per un dato composto si raggiunge a pH 7,0, significa che l'effetto degli ioni  $H^+$  e  $OH^-$  è praticamente equivalente; quando invece il massimo di stabilità si trova a  $pH < 7,0$  (pH acidi), significa che l'effetto degli ioni  $OH^-$  è più nocivo (come ad esempio per l'acido acetilsalicilico) e, viceversa a  $pH > 7,0$  (pH basici).

È essenziale perciò assicurare, mediante l'impiego di soluzioni tampone, accuratamente scelte, il mantenimento dei limiti ottimali di pH, che garantiscono la maggiore stabilità e, nello stesso tempo, la migliore azione biologica del farmaco.

Anche la scelta del veicolo condiziona notevolmente la stabilità di una preparazione, ad esempio l'acqua è spesso causa di reazioni idrolitiche e, in virtù dell'ossigeno atmosferico che contiene disciolto in quantità più o meno apprezzabili, anche di fenomeni ossidativi.

Fondamentale è il tipo di contenitore utilizzato per la conservazione che deve fornire garanzia di protezione del farmaco dagli agenti esterni quali l'umidità, i gas, gli aromi e la luce. L'interazione del farmaco con l'ambiente può infatti provocare degradazioni ossidative a causa dell'ossigeno atmosferico, fotolisi o polimerizzazione innescate dalla luce, idrolisi per azione dell'umidità dell'aria.

Il materiale di confezionamento deve inoltre essere chimicamente e fisicamente inerte nei confronti del farmaco, onde evitare fenomeni di migrazione contenitore-contenuto, adsorbimento dei principi attivi o conservanti, da parte del contenitore, estrazione di particelle da parte del contenuto.

Un'altra possibile causa di instabilità di un preparato medicinale va ricercata nelle incompatibilità che possono esserci tra i diversi medicinali associati in una stessa forma farmaceutica o tra i medicinali e gli eccipienti; tali interazioni conducono a modificazioni imprevedibili in base alla natura delle sostanze prese singolarmente e, ovviamente indesiderate.

In definitiva, l'instabilità rappresenta il fattore limitante la conservabilità di un farmaco, che resterà quindi limitata a quel periodo entro il quale le caratteristiche della particolare formulazione in termini dell'attività, tossicità, uniformità, biodisponibilità ecc., restano immutate ovvero variano entro limiti stabiliti.

### **5.2.1 Alterazioni fisiche**

Le formulazioni farmaceutiche possono considerarsi miscele di sostanze fisicamente e chimicamente reattive, pertanto le loro caratteristiche possono modificarsi sia per azione intrinseca dei composti sia per interazione con agenti esterni (Szabo e al., 2016). Tali interazioni sono responsabili di modifiche fisiche, chimiche e microbiologiche della forma farmaceutica.

Tra le alterazioni fisiche, suscitano maggiore interesse quelle che possono instaurarsi in determinate forme farmaceutiche finite, siano esse allo stato solido, semisolido o liquido.

In forme farmaceutiche solide e semisolide può, ad esempio, verificarsi una variazione dello stato di aggregazione e di dispersione delle particelle che a loro volta provocano una variazione della velocità di dissoluzione del preparato, oppure una variazione del grado di durezza e di consistenza con conseguente modifica del tempo di disaggregazione e/o della

velocità di rilascio del principio attivo con ovvie conseguenze sulla biodisponibilità di quest'ultimo. Nel caso di preparazioni farmaceutiche allo stato liquido o semisolido, una perdita d'acqua per evaporazione può causare l'allontanamento dei costituenti volatili ed una variazione della solubilità dei componenti, con conseguenti fenomeni di precipitazione, variazione delle caratteristiche reologiche, della consistenza e del titolo.

Al contrario, l'assorbimento d'acqua (igroscopicità) può provocare anch'esso una variazione delle caratteristiche reologiche e della consistenza della preparazione ed anche esporre i componenti a fenomeni di degradazione nel caso in cui questi sono incompatibili con l'acqua. Nel caso di preparazioni bifasiche quali sospensioni, emulsioni e soluzioni colloidali, possono verificarsi perdite d'omogeneità a causa di fenomeni di flocculazione, separazione, sedimentazione e coalescenza. Fenomeni di crescita cristallina possono verificarsi in condizioni di super-saturazione conseguenti a sbalzi termici oppure in presenza di forme cristalline metastabili o di solidi dispersi in grado di essere adsorbiti sulla superficie dei cristalli e fungere da nuclei per la formazione di strutture più grossolane. Va menzionata infine, la possibile esistenza di modificazioni cristalline differenti dello stesso composto, fenomeno noto come polimorfismo e comune a molte sostanze. È stato dimostrato che per ragioni termodinamiche, la velocità di dissoluzione e, conseguentemente la biodisponibilità, possono essere significativamente influenzate dalla particolare struttura polimorfa presente nella formulazione. Pare, infatti, che le modificazioni polimorfe metastabili (con alta energia d'attivazione) abbiano migliore solubilità rispetto alle forme stabili e, questo è stato dimostrato per diversi composti provvisti di attività farmacologica, come il Metilprednisolone, il Fenilbutazone e il Cloramfenicolo. Tra le alterazioni di tipo fisico rientrano anche quelle provocate dalle radiazioni elettromagnetiche, la cui azione è regolata da due aspetti, secondo cui, l'irraggiamento può agire solo se le radiazioni sono state assorbite da parte di gruppi cromofori e che l'alterazione considerata, può corrispondere ad una reazione chimica solo se necessita di un certo apporto di energia che deve avere un certo valore limite.

### **5.2.2 Alterazioni chimiche**

L'instabilità chimica di un prodotto farmaceutico ha indubbe ripercussioni su efficacia e sicurezza della terapia, potendo essa comportare una diminuzione del contenuto in principio attivo e/o modifiche della biodisponibilità. Può verificarsi anche un incremento della tossicità del preparato a seguito della formazione di prodotti di degradazione di diversa natura.



Le reazioni chimiche più comuni di degradazione dei farmaci sono l'idrolisi e l'ossidazione. Altri fenomeni degradativi che partecipano alla loro instabilità sono la racemizzazione, la decomposizione fotochimica e, più raramente, processi di polimerizzazione.

### **5.2.2.1 Reazioni di idrolisi**

Le reazioni di idrolisi sono quelle che avvengono tra una determinata sostanza e l'acqua, generalmente vengono classificate in: idrolisi ionica e idrolisi molecolare.

Nel gruppo delle reazioni di idrolisi ionica rientrano tutte quelle che intercorrono tra l'acqua e i composti acidi e/o basi deboli, cioè composti di natura salina. Queste reazioni danno luogo a soluzioni acide o basiche, in virtù del tipo di composto salino che ha reagito, con la formazione di un equilibrio istantaneo.

Nella seconda classe rientrano tutte quelle reazioni che determinano, con un processo irreversibile e cineticamente più lento rispetto all'idrolisi ionica, la scissione di una molecola in due o più derivati. Questo tipo di reazioni sono particolarmente importanti nel caso della decomposizione di sostanze presenti in forme farmaceutiche acquose (soluzioni, sospensioni, emulsioni), ma possono aver luogo anche nel caso di forme farmaceutiche solide (polveri, granulati, compresse, ecc.), se l'acqua viene a contatto con la formulazione durante le fasi di preparazione, sotto forma di vapore acqueo o umidità, oppure come acqua di cristallizzazione presente negli eccipienti.

Gli esteri, le ammidi, i nitrili e i lattami sono i principali gruppi funzionali che possono essere suscettibili di degradazione idrolitica. Il processo di idrolisi è spesso catalizzato da ioni idrogeno, dando luogo a catalisi acida specifica, da ioni ossidrili ottenendo una catalisi basica specifica e, in molti casi da entrambe queste specie. Un esempio di idrolisi acido-base catalizzata che riguarda il gruppo estereo è dato dalla reazione che porta alla decomposizione della procaina, della cocaina, della fisostigmina e della Tetracaina, mediante rotture del legame acile-ossigeno. L'idrolisi dei gruppi ammidici determina la rottura di questo legame ed i tipici esempi sono il processo idrolitico base-catalizzato della Dibucaina, l'idrolisi della Ergometrina e il Cloramfenicolo (Carvalho e al., 2015). La decomposizione idrolitica dell'anello lattamico si ha, invece, per Benzodiazepine, Penicilline e Cefalosporine (Gerratana, 2012).

Ovviamente, in situazioni in cui un principio attivo subisce in soluzioni reazioni di idrolisi acido-base catalizzate, devono essere attuate diverse strategie per la sua stabilizzazione operando principalmente sul pH che sicuramente ha un ruolo cruciale in questo tipologie di reazioni. Mediante esperimenti di cinetica di degradazione in un ampio *range* di pH si

determina il valore al quale corrisponde il massimo grado di stabilità del medicamento, e solo successivamente si passa alla formulazione del prodotto. Con questo approccio non si arresta il processo di degradazione del medicamento, ma se ne rallenta drasticamente la velocità con cui avviene la reazione di idrolisi. Ovviamente si deve tener presente che il valore di pH è fondamentale per l'assorbimento dello stesso, infatti, anche minime variazioni di pH, possono invalidare quest'ultimo aspetto e rendere nulla la somministrazione. A tal proposito è opportuno trovare un compromesso tra i due differenti aspetti ugualmente importanti.

In altri casi, si può ottenere una riduzione del processo idrolitico del medicamento variando la costante dielettrica della formulazione farmaceutica mediante l'aggiunta di solventi non acquosi come l'alcol etilico, il glicole propilenico o la glicerina. Poiché i processi di idrolisi sono accelerati proprio dalla presenza di solventi acquosi, ridurre l'aliquota totale di acqua sostituendola in parte con solventi non acquosi, limita la decomposizione dell'intero medicamento. Ulteriori strategie prevedono l'aggiunta di sostanze che siano in grado di formare dei complessi con la molecola idrolizzabile, come la caffeina, nel caso delle soluzioni acquose di Benzocaina, di Procaina e dell'Ametocaina (Zhao e al., 2014). Un altro approccio prevede il supplemento di tensioattivi scelti in base alla natura chimico-fisica del principio attivo, in modo tale che quest'ultimo venga inglobato all'interno della struttura micellare e protetto dall'eventuale innesco di una reazione idrolitica (Bunjés, 2011).

#### **5.2.2.2 Reazioni di isomerizzazione, racemizzazione e polimerizzazione**

Le reazioni di isomerizzazione e di racemizzazione sono caratterizzate dalla variazione del principio attivo in un suo isomero ottico o geometrico (Chondrogianni e al., 2014). I diversi isomeri di un principio attivo sono connotati di una variazione nell'attività farmacologica, maggiore, inferiore o addirittura nulla rispetto al principio attivo adoperato nella formulazione farmaceutica. Nel caso della reazione di racemizzazione si ha la formazione di una miscela racemica otticamente inattiva, caratterizzato da una perdita dell'attività. Una soluzione di adrenalina a pH acido determina una significativa diminuzione dell'attività biologica della stessa; nelle reazioni di isomerizzazione, se i due isomeri geometrici hanno differente attività terapeutica, la potenza del principio attivo viene notevolmente abbassata.

Le reazioni di polimerizzazione prevedono l'innesco di reazioni tra molecole dello stesso principio attivo che portano alla formazione di macromolecole quali dimeri, oligomeri o polimeri ad elevato peso molecolare (Ariza-Carmona e al., 2015), che nel caso delle amminopenicilline sono in grado di determinare nell'uomo reazioni allergiche di tipo pennicilloil-

specifiche; è importante dunque inibire tali processi, al fine di bloccare l'innesco di reazioni allergiche dall'esito spiacevole.

### **5.2.2.3 Reazioni di decomposizione fotochimica**

L'attività terapeutica di molti principi attivi può essere compromessa dalle radiazioni elettromagnetiche, in virtù della fotosensibilità degli stessi composti farmaceutici (Khalilian e al., 2016). Le innumerevoli reazioni di fotodegradazione prevedono meccanismi molto complessi e solo di alcune sono state individuate strategie atte ad evitare tali processi, sebbene l'utilizzo di contenitori di vetro colorato e la conservazione in ambienti bui al riparo dalla luce, sembrano essere i metodi più perseguiti. Molti principi attivi sono il bersaglio elettivo di queste reazioni, come: Clorpromazina, Idrocortisone, Riboflavina, Acido ascorbico e Acido folico (Broeke e al., 1994; Scalia e al., 2013).

### **5.2.2.4 Reazioni di ossidazione**

Tra i più importanti processi di decomposizione dei principi attivi si trovano oltre alle reazioni di idrolisi, le reazioni di ossidazione (Ghouchi-Eskandar e al., 2012; Haham e al., 2012). Le molecole soggette a tali processi presentano gruppi funzionali quali: alcoli, fenoli, ammine e sistemi insaturi. I promotori di queste reazioni possono essere l'ossigeno atmosferico, per le formulazioni solide, per quelle liquide, invece, si possono avere catalizzatori costituiti da sostanze e/o ioni presenti nella formulazione stessa, il pH è anche un valore da considerare, assieme all'esposizione a radiazioni elettromagnetiche e alla temperatura. Una molecola può subire processi degradativi in virtù del suo potenziale standard di ossidazione o riduzione, se questo è elevato e positivo, la molecola ha buone capacità riducenti e facilmente il composto subirà il processo di decomposizione, viceversa, se il valore risulta basso e negativo, la sostanza risulta essere un buon ossidante e difficilmente sarà bersaglio di reazioni di ossidazione. In base a quanto detto, anche i principi attivi possono essere soggetti a tali degradazioni, pertanto l'aggiunta di sostanze con un potenziale standard di ossidazione superiore al farmaco stesso può preservare la formulazione aumentandone la stabilità. Le reazioni di decomposizione ossidativa hanno inizio con la rimozione di un atomo elettropositivo o di un elettrone, oppure con l'addizione di un atomo elettronegativo o ancora con l'addizione/rimozione di un radicale. In generale sono tutte reazioni radicaliche a catena. Le reazioni radicaliche a catena prevedono tre differenti stadi: inizio, propagazione e terminazione; nello stadio di inizio, l'ossigeno molecolare, gli agenti fisici come luce e calore, gli agenti chimici come i metalli di transizione o altre sostanze presenti nella formulazione

farmaceutica, mediano direttamente la formazione della specie radicalica, quest'ultima, è responsabile della propagazione del processo ossidativo. La reazione che meglio esemplifica ciò che avviene nella fase di inizio può essere espressa come riportato in Tabella 5.1:

**Tabella 5.1:** *Reazione di formazione di radicali liberi.*

$R-H + In^* \rightarrow R^* + In-H$	R-H = sostanza presente nella formulazione farmaceutica; In* = agente chimico o fisico che catalizza l'iniziazione.
$R^* + O_2^* \rightarrow R-O-O^*$ (radicale perossidico)	La fase di propagazione prevede che i radicali generati nella prima fase possano interagire con l'ossigeno molecolare atmosferico per dare origine ai radicali perossidici, secondo la reazione:
$R-OO^* + R-H \rightarrow ROOH + R^*$ $R-OO^* + R=R \rightarrow R-OO-R-R^*$	I radicali perossidici sono responsabili della fase di propagazione, poiché strappano un radicale idrogeno da un'altra molecola organica oppure si addizionano ad un doppio legame:
$R^* + R-OO^* \rightarrow R-OO-R$ $R^* + R^* \rightarrow R-R$ $2R-OO^* \rightarrow R-OO-OO-R \rightarrow PNR$ PNR = prodotti non reattivi	Nella fase di terminazione, i radicali si combinano tra di loro per dar luogo a specie non reattive:

L'autossidazione è una reazione non catalizzata tra un composto e l'ossigeno molecolare, è una tipica reazione per le sostanze quali acidi grassi insaturi, presenti in oli e grassi di origine naturale, può avere inizio attraverso la formazione di radicali liberi che originano da composti organici per azione della luce, del calore o di tracce di metalli.

Nel caso dell'ossidazione catalizzata dalla luce, la radiazione UV può promuovere il primo stadio del processo di decomposizione; per ciò che riguarda l'ossidazione catalizzata dalla luce, anche un aumento di 10° C fa aumentare la velocità di reazione da 2 a 4 volte.

### 5.3 Metodi per prevenire o ritardare i processi ossidativi

Le strategie adottate per interferire con i processi degradativi di tipo ossidativo, prevedono sostanzialmente l'inibizione dell'innesco della prima fase o la promozione della fase di terminazione. Quando il processo ossidativo è indotto dalla luce, si può ricorrere all'utilizzo di contenitori in vetro ambrati, i quali sono in grado di schermare le radiazioni elettromagnetiche nel campo UV-Visibile, l'unico inconveniente è costituito dal rilascio, da parte del vetro ambrato, di metalli pesanti, che a loro volta sono in grado di promuovere la stessa degradazione. A tal proposito, i metalli pesanti possono essere sequestrati mediante l'utilizzo di agenti chelanti come EDTA, acido citrico, inositolo e acido tartarico (Iemma e al.

2005). Un altro espediente è rappresentato dal controllo del pH della formulazione farmaceutica, partendo dal presupposto che il potenziale riduttivo è funzione anche della concentrazione degli ioni  $H^+$  secondo un rapporto di proporzionalità diretta in base a quanto si evince dall'equazione di Nerst, abbassando i valori di pH si può prevenire il processo ossidativo di molti principi attivi. Si può evitare il contatto con l'ossigeno atmosferico mediante il riempimento di tutti gli spazi all'interno del contenitore o l'eventuale aggiunta di gas inerte come l'anidride carbonica o l'azoto. Per ciò che riguarda la promozione della fase di terminazione gli agenti elettivi sono gli antiossidanti, la cui principale caratteristica è quella di possedere un potenziale riduttivo più basso rispetto ai principi attivi ossidabili, pertanto la reazione ossidativa avverrà con l'agente antiossidante e non con il farmaco. In linea generale, i composti antiossidanti possono esercitare i loro effetti attraverso differenti meccanismi, come la neutralizzazione delle specie reattive (*scavenging activity*), possono sequestrare gli ioni metallici di transizione (*chelation activity*) oppure sono in grado di inibire l'attività enzimatica di particolari sistemi implicati a loro volta nella formazione di radicali liberi o addirittura bloccarne la sintesi a livello della loro espressione genica (Spizzirri e al., 2009). Qualunque sia il meccanismo con il quale operano gli antiossidanti, lo scopo è quello di prevenire o diminuire la progressione dello stress ossidativo a livello cellulare o in un sistema chimico come quello rappresentato da una formulazione farmaceutica.

Gli agenti antiossidanti più utilizzati sono tocoferoli, butilidrossianisolo, tioglicerolo, sodio bisolfito e tanti altri; l'antiossidante deve possedere appropriati requisiti, come:

- Deve essere inerte nei confronti degli altri componenti della formulazione;
- Deve essere stabile e attivo in un ampio *range* di pH;
- Non tossico e non irritante;
- Attivo a basse concentrazioni;
- Compatibile con tutte le sostanze presenti nella formulazione;
- Non deve dare origine a reazioni che impartiscono colorazione al preparato;
- Deve essere stabile in tutte le fasi di lavorazione.

Ovviamente la scelta dell'agente antiossidante da utilizzare interesserà una specie piuttosto che un'altra anche in base alle caratteristiche chimico-fisiche della formulazione farmaceutica, in altri termini sulla lipofilia o idrofilia del preparato.

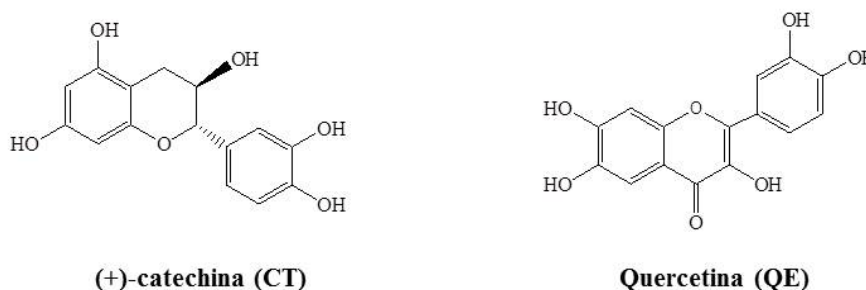
Molti studi, nell'ultimo decennio, sono stati orientati verso l'applicazione di un'ampia varietà di composti antiossidanti in trattamenti medici come: acido ascorbico,  $\alpha$ -tocoferolo, acido

trans-ferulico, (+)-catechina, quercetina, acido  $\alpha$ -lipoico e molti altri. Oltre al loro utilizzo usuale, che prevede appunto la preservazione dalla degradazione del farmaco, sono allo stesso tempo agenti stabilizzanti per matrici polimeriche a loro volta facilmente ossidabili. I recenti sviluppi scientifici hanno evidenziato uniche e innovative proprietà delle sostanze antiossidanti, che spaziano da caratteristiche chimico-fisiche alla stabilità nel tempo fino alla resistenza meccanica, diventando così appetibile bersaglio di interesse in molti ambiti, dal biomedicale all'ingegneria tissutale.

Il presente lavoro è stato svolto in continuità con gli studi intrapresi dal gruppo di ricerca, focalizzando l'attenzione su due agenti antiossidanti in particolare la quercetina (QE) e la (+)-catechina (CT), adeguatamente inseriti in un reticolo polimerico, le cui caratteristiche verranno di seguito discusse.

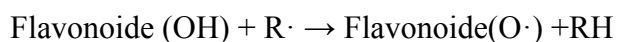
#### 5.4 Flavonoidi: (+)-Catechina e Quercetina

I flavonoidi sono dei prodotti largamente distribuiti nel regno vegetale e pertanto consumati quotidianamente sotto forma di frutta, legumi e bevande quali vino e the. A tale gruppo appartengono più di 6000 composti naturali, tra i quali appunto la quercetina e la (+)-catechina. L'interesse per questi composti si è amplificato a seguito della scoperta del "paradosso francese" corrispondente ad un basso tasso di mortalità per malattie cardiovascolari osservato nella popolazione mediterranea che consuma abitualmente vino rosso a fronte di un alto consumo di grassi saturi e elevati valori plasmatici di colesterolo. Tutti i flavonoidi derivano da una struttura base costituita da due anelli fenolici tenuti insieme da un eterociclo, le varie sostituzioni sugli anelli danno origine ai differenti composti (Carullo e al., 2017). In figura 1 sono riportate le strutture di CT e QE.



**Figura 5.1:** *Formala di struttura di (+)-catechina (CT) e quercetina (QE).*

Tra le proprietà dei flavonoidi meglio descritte si ritrova l'attività antiossidante e la loro capacità di inibire i radicali liberi: radicale idrossile ( $\text{OH}\cdot$ ), l'anione superossido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) e i radicali perossilipidici, secondo la generica reazione di seguito schematizzata:



I radicali liberi si presentano in molteplici situazioni come:

- l'anossia che genera la produzione dell'anione superossido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ),
- l'infiammazione che corrisponde alla produzione dell'anione superossido da parte della NADPH-ossidasi sulla membrana dei leucociti attivati e dalla dismutazione di molti radicali idrossili reattivi ( $\text{OH}\cdot$ ),
- l'auto-ossidazione dei lipidi durante uno stress ossidativo, in cui le specie radicaliche, libere da ogni controllo, vanno ad attaccare le proteine, i recettori cellulari, gli enzimi, gli acidi nucleici (favorendo l'insorgenza di mutazioni deleterie all'origine dell'insorgenza di diverse forme tumorali) e i lipidi, in particolare le LDL dell'intima vascolare, determinando l'inizio della cascata aterogena.

I flavonoidi oltre a possedere attività chelante e antiradicale, sono in grado di inibire la carcinogenesi, l'angiogenesi, la proliferazione cellulare e il potenziale invasivo e metastatico delle cellule tumorali, presentano effetti protettivi vascolari, proprietà anti-epatotossiche, proprietà antiallergiche ed antinfiammatorie (Colomer e al., 2017). Quest'ultimi aspetti sebbene non rientrino come oggetto del presente studio, meritano per importanza di essere menzionati.

Le innumerevoli potenzialità di queste sostanze, soprattutto per l'aspetto antiossidante, giustificano la copiosa letteratura scientifica di quest'ultimo decennio. In particolar modo è stato dimostrato un legame diretto tra stress ossidativo e lo sviluppo di patologie quali cancro, malattie cardiovascolari e neurodegenerative. Per quanto concerne l'industria farmaceutica e cosmetica, l'interesse nei confronti dei materiali polimerici con caratteristiche antiossidanti è correlato non solo alla loro attività biologica, ma anche alla loro capacità di protezione dell'intera formulazione dalla degradazione. Infatti, una limitazione all'uso di alcune promettenti formulazioni farmaceutiche e cosmetiche è rappresentata dall'elevata instabilità delle stesse o dei costituenti che portano inevitabilmente alla riduzione della loro efficienza.

I materiali polimerici di recente sviluppo contenenti anche agenti antiossidanti ha portato all'ottenimento di materiali eccezionali sotto ogni punto di vista, accorpendo in un'unica struttura quelle che sono le caratteristiche "intelligenti" dei primi alla stabilità nei confronti dello stress ossidativo dei secondi (Spizzirri e al., 2011b).

Le strategie praticabili sono diverse e si compongono quasi sempre di più stadi. Un primo approccio consiste nella funzionalizzazione della molecola antiossidante con un gruppo polimerizzabile e successiva sua copolimerizzazione con adatti comonomeri. L'inconveniente di questa tecnica risiede nel difficile recupero e purificazione del monomero antiossidante ottenuto. La seconda tecnica prevede invece la derivatizzazione della struttura polimerica preformata con funzioni molecolari antiossidanti, il limite in questo caso è invece rappresentato dalla realizzazione delle appropriate condizioni di reazione. La tecnica proposta in questo elaborato di tesi prevede invece l'ottenimento di polimeri con proprietà antiossidanti mediante l'ancoraggio, tramite *grafting* molecolare, di una molecola antiossidante su una matrice polimerica in presenza di iniziatori radicalici in condizioni blande. Così facendo, si ottiene una matrice polimerica attraverso l'innesto delle molecole polifenoliche quali CT e QE all'interno del reticolo tridimensionale in crescita. Quest'ultima strategia accanto agli svantaggi legati al difficile controllo della posizione di attacco sulla struttura polifenolica e alla conseguente perdita di alcune funzionalità chimiche responsabili dell'attività antiossidante, presenta a suo favore il principale vantaggio della semplicità di esecuzione della reazione di polimerizzazione, il recupero agevole e la purificazione efficace del prodotto di reazione. Inoltre, l'accertata attività antiossidante e la capacità preservante nei confronti dell'Acido Folico concorrono a rendere il materiale interessante quale veicolo efficiente per la stabilizzazione di molecole facilmente degradabili.

La letteratura riporta differenti preparazioni polimeriche con proprietà antiossidanti, che spaziano dall'uso medico a quello cosmetico fino all'uso alimentare, data l'elevata versatilità e biocompatibilità dei materiali stessi. A tal proposito meritano di essere menzionati i seguenti sistemi, come la progettazione di nanoparticelle polimeriche a base di PLGA (copolimero biocompatibile a base di poli D,L-lattato-co-glicolide) per l'incapsulazione e il rilascio controllato di Quercetina e (+)-Catechina, in modo particolare, i profili di rilascio si sono dimostrati riproducibili e stabili. *In vitro* questi sistemi si sono dimostrati pH-sensibili, dal momento che rilasciano grandi quantità di flavonoidi in condizioni acide e quindi possono essere sfruttate per il rilascio sito-specifico e come sistemi antiossidanti per le proprietà dei flavonoidi in esse contenute (Pool e al., 2012).



I flavonoidi sono stati oggetto di studio anche come *active packaging*, ovvero nell'utilizzo di imballaggi antiossidanti in grado di rilasciare in maniera controllata sostanze che preservano il contenuto alimentare, in alternativa agli antiossidanti sintetici come idrossitoluene butilato (BHT) o idrossianiloso butilato (BHA), usati tradizionalmente nell'imballaggio. Tra i flavonoidi, la (+)-Catechina e la Quercetina sembrano essere le migliori molecole capaci di diffondere attraverso i materiali di imballaggio per raggiungere i prodotti alimentari in essi contenuti o per posizionarsi all'interfaccia tra i due componenti. Queste molecole sono state introdotte in film polimerici a base di polietilene tereftalato (PET) (Colon e Nerin, 2012), etilvinil alcol (EVOH) (Lopez de Dicastillo e al, 2011; Lopez de Dicastillo e al., 2012) o materiale biodegradabile come l'acido poliacrilico (PLA) (Corrales e al., 2009; Iñiguez-Franco e al., 2012). Tuttavia, in queste applicazioni ancora deve essere modulato il rilascio di un'adeguata quantità di molecole antiossidanti capaci di poter essere utilizzate anche per l'imballaggio di sostanze a lunga scadenza (Castro-Lopez et al., 2013).

Interessante è l'attenzione rivolta verso la sintesi e caratterizzazione di cellulosa con proprietà antiossidanti grazie alla presenza di acido ferulico, lipoico e  $\alpha$ -tocoferolo. Questo studio ha dimostrato che il sistema presenta una spiccata attività antiossidante e in modo particolare la cellulosa ferulata è quella che più di tutti mostra ottima protezione nei confronti della perossidazione lipidica indotta dai radicali liberi (Trombino e al., 2008). Da questi risultati è nata l'idea di legare covalentemente porzioni ferulate alla cellulosa per produrre un *carrier* che protegga farmaci suscettibili allo stress ossidativo per preparazioni destinate all'uso topico e somministrazione orale (Trombino e al., 2009).

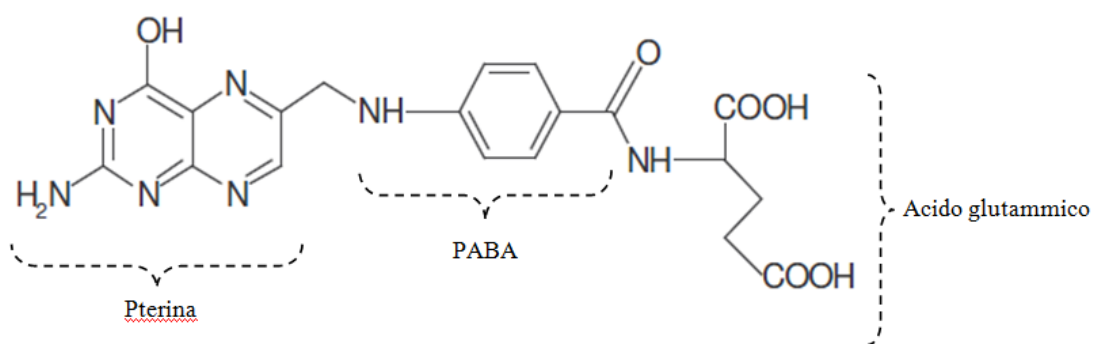
È ormai noto l'uso biomedicale di materiali polimerici, dalle protesi ai tessuti ingegnerizzati, come è ormai noto anche il problema di degradazione degli stessi materiali, un recente studio, ha dimostrato come è possibile rendere il polietilene (PE), ampiamente utilizzato in questo ambito, stabile all'attacco ossidativo mediante l'inserzione di Curcumina. L'effetto stabilizzante del materiale ottenuto è stato verificato mediante l'attività *scavenger* nei confronti dei radicali liberi, i quali sono anche responsabili dell'estrusione del PE. In modo particolare è stato dimostrato che l'effetto stabilizzante della Curcumina naturale è di gran lunga superiore a quella sintetica, ed è ulteriormente esaltata con l'aggiunta di antiossidanti secondari contenenti il fosforo (Tátraaljai e al., 2013). Sulla stessa linea, il PE è stato reso materiale antiossidante grazie all'ancoraggio di molecole di quercetina (Tátraaljai e al., 2014). Proprio in virtù di questa versatilità, si è scelto di utilizzare nel presente lavoro due agenti antiossidanti, la CT e la QE, derivati dei flavonoidi, la prima a struttura molecolare di base del tipo flavan-3-olo e la seconda di tipo flavonolo e di inserirli in un sistema in grado di

modificare la propria affinità per il mezzo acquoso in funzione della temperatura e del pH del mezzo circostante.

La disponibilità di materiali in grado di rispondere a doppi stimoli può mostrare elevate potenzialità in varie applicazioni, soprattutto come sistemi per il rilascio modulato di farmaci, infatti la risposta combinata a pH e temperatura è utile per proteggere farmaci dalla degradazione.

## 5.5 Acido Folico

L'Acido Folico (AF) noto anche come vitamina B<sub>9</sub> o come acido pteroil-l-glutammico, strutturalmente è costituito da tre porzioni: un anello pteridinico legato con un ponte etilenico all'acido p-amminobenzoico, unito a sua volta all'acido glutammico da un legame ammidico (Figura 5.2).



**Figura 5.2:** Struttura dell'Acido Folico.

L'AF è una sostanza indispensabile per l'organismo, perché in qualità di cofattore enzimatico, partecipa a numerosi processi metabolici:

- sintesi di purine e pirimidine (essenziali per la sintesi del DNA e RNA);
- conversione dell'omocisteina in metionina e di serina in glicina;
- metabolismo dell'istidina;
- mantenimento dell'omeostasi dell'eritropoiesi.

L'acido folico non può essere sintetizzato dall'organismo, ma il suo fabbisogno giornaliero viene soddisfatto attraverso un corretto apporto dietetico. Esso è contenuto nei vegetali freschi verdi, in alcuni funghi, frutta, fegato e lievito. La richiesta di folato è di circa 0,2 mg/die, valore che aumenta durante la gravidanza e l'allattamento; ma, la biodisponibilità dei folati

nelle diete è molto variabile, addirittura inferiore di gran lunga rispetto a quello di sintesi. I folati naturali, presenti come poliglutammati, non sono assorbibili in quanto tali e vengono convertiti nella forma monoglutammica nella parte superiore dell'intestino tenue, da qui si giustifica il perché del migliore assorbimento dell'acido folico di sintesi, costituito solo dalla forma monoglutammica che non richiede la conversione enzimatica.

L'acido folico viene somministrato per via orale e una volta assorbito attraverso l'ileo, viene trasportato negli epatociti e nelle cellule del midollo osseo, dove subisce un processo riduttivo che si articola in due fasi, convertendo l'acido folico in diidrofolato (FH<sub>2</sub>) e tetraidrofolato (FH<sub>4</sub>), questi due coenzimi folici, tra loro interconvertibili, costituiscono un fattore chiave in almeno due vie metaboliche importanti: la biosintesi delle basi nucleotidiche e nel ciclo della metilazione. La carenza di folati è uno dei deficit vitaminici più comuni, tale mancanza associata a quella della vitamina B<sub>12</sub>, determina una difettosa sintesi del DNA nella cellula in fase proliferativa, ciò spiega perché il sistema emopoietico è particolarmente sensibile alla carenza di questi micronutrienti.

La carenza di AF durante la gravidanza può causare difetti del tubo neurale perché si instaura una condizione di iperomocistinemia per ridotta conversione della omocisteina a metionina. I disturbi del tubo neurale, come la spina bifida, l'anencefalia e l'encefalocele, rappresentano un'importante causa di morte infantile e di seria disabilità fisica; ma, la carenza di questo micronutriente è associata anche ad un'alterata attività neurologica che interessa soprattutto la sfera cognitiva e affettiva. I disturbi neuropsichiatrici sono relativi alla sfera affettiva appunto, caratterizzati da una tendenza alla depressione. L'associazione di uno stato depressivo a deficit di folati sembrerebbe giustificato dall'interazione di questi ultimi sul metabolismo della serotonina. I soggetti con basse concentrazioni sia di folati che di vitamina B<sub>12</sub>, possono presentare un aumento del rischio di sviluppare la malattia di Alzheimer.

L'acido folico è uno dei cofattori principali della sintesi delle basi puriniche degli acidi nucleici. Nelle cellule neoplastiche, dove la replicazione del DNA e duplicazione cellulare si verificano molto più rapidamente, la deplezione dei folati può provocare un'inibizione della crescita tumorale. Su questo principio si basa l'utilizzo dei farmaci antifolati come chemioterapici sebbene paradossalmente, sembra che elevati livelli di folati siano protettivi contro alcuni tipi di neoplasie. Alcuni studi su neoplasie colon-rettali hanno evidenziato che se la carenza del micronutriente viene adeguatamente compensata con supplementi sintetici prima dell'insorgenza della neoplasia, la crescita cellulare risulta inibita, mentre, se avviene dopo, la duplicazione cellulare sembra essere facilitata. Sembrerebbe quindi che i folati abbiano un doppio ruolo apparentemente antagonista: di profilassi da un lato e cancerogeno

dall'altro. Rimane però certo che una ricca dieta a base di folati è in grado di ridurre il rischio di cancro mammario nelle donne.

Il sistema immunitario è ugualmente coinvolto, in modo particolare le cellule Natural Killer, che intervengono nella risposta immune non specifica e contribuiscono all'eliminazione sia di cellule neoplastiche che di cellule infettate da agenti virali. Alcuni studi hanno evidenziato che l'integrazione di Acido Folico in gravidanza rende il sistema delle cellule Natural Killer più efficiente, purché la sua concentrazione ematica non raggiunga livelli troppo elevati, in tal caso l'attività risulta diminuita.

L'accumulo di omocisteina, per carenza di folati, risulta tossico per le cellule endoteliali, in particolar modo, l'ossidazione del gruppo tiolico dell'omocisteina, con conseguente produzione di radicali liberi, determina perossidazione lipidica svolgendo un ruolo attivo nelle fasi iniziali del processo di aterosclerosi. Rappresenta dunque un fattore di rischio per l'insorgenza di patologie vascolari e coronopatie.

L'acido folico è una vitamina che subisce facilmente il processo di degradazione, per questo è stata scelta come modello di sostanza facilmente ossidabile che potesse essere impiegata per testare l'efficacia delle matrici polimeriche sintetizzate. È una molecola altamente instabile, in modo particolare, in ambiente acido e quando è sottoposta a radiazioni elettromagnetiche che rientrano nello spettro dell'ultravioletto, inoltre, se l'acido folico viene sottoposto alla contemporanea combinazione di questi due fattori, cioè ambiente acido e radiazioni ultraviolette, la velocità di decomposizione è maggiore. D'altra parte risulta essere stabile in ambiente alcalino o neutro e in condizioni di oscurità e asciutto.

Diversi studi hanno dimostrato che il folato è vulnerabile alla degradazione UV. Per esempio, *in vitro* è stato dimostrato che la forma sintetica del folato, l'Acido Folico, è fotosensibile ai raggi UVA (Akhtar e al., 2003; Off e al., 2005; Juseniene e al., 2009). Tali studi hanno dimostrato che quando l'AF è esposto agli UVA, subisce fotolisi e viene scissa in diversi fotoprodotti (Vorobey e al., 2006). È stato dimostrato anche, che un metabolita biologico del folato, presente nel corpo umano, come il 5-MTHF (5- metiltetraidrofolato) è sensibile ai raggi UVB (280-320 nm), ma non agli UVA(320-400 nm) (Steindal e al., 2006).

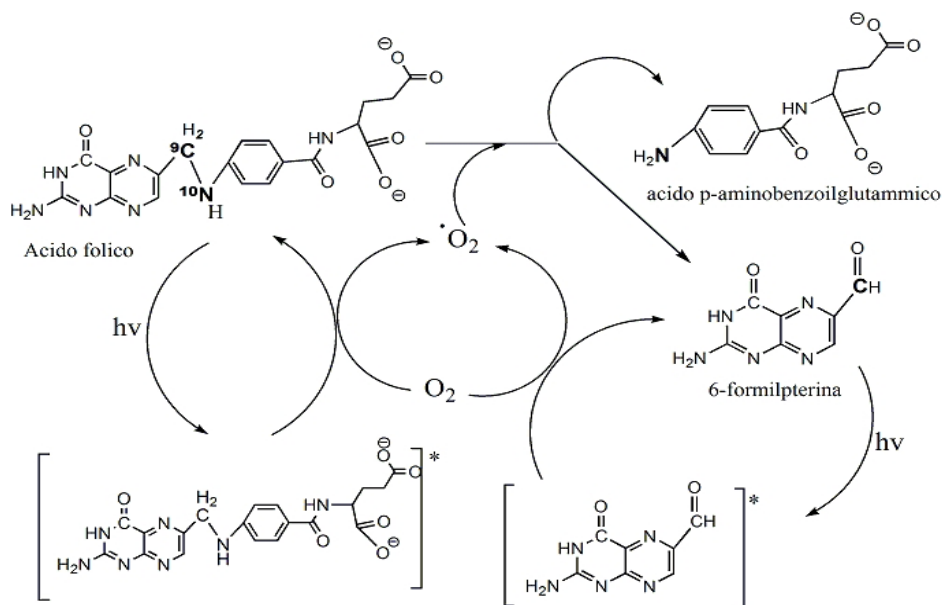
Sia i raggi UVA che UVB vengono assorbiti dall'AF, il 5-MTHF invece assorbe gli UVB, mentre l'assorbimento nello spettro UVA è minima. Le radiazioni UVC (100-280 nm) vengono invece, assorbite da entrambi i composti (Steindal e al., 2006). Da questi studi, quindi sembrerebbe che solo gli UVB siano responsabili della principale causa di degradazione dell'AF. Tuttavia occorre tener presente che gli UVB non penetrano la pelle in profondità a tal punto da raggiungere la circolazione cutanea e, quindi non è imputabile per una diretta

diminuzione della quantità di folato nel sangue. Gli UVA, che al contrario penetrano in profondità la pelle, degradano direttamente il 5-MTHF, ecco perché gli UVA possono essere considerati una causa diretta di degradazione del suddetto composto (Fukuwatari e al., 2009).

La recente scoperta di composti fotosensibili come flavine e porfirine, che hanno la capacità indiretta di degradare il 5-MTHF durante l'esposizione ai raggi UV, ha fornito un meccanismo biologicamente plausibile per la degradazione UV *in vivo* di folati (Steindal e al., 2008; Tam e al., 2009). Sia le flavine che le porfirine sono fotosensibili naturali presenti nel sangue e, producono specie reattive all'ossigeno (ROS), quando esposti a radiazioni UV (Steindal e al., 2008). È la produzione dei ROS che porta alla degradazione del 5-MTHF (Borradale e Kimlin, 2012). Ecco perché è importante proteggere l'AF, non soltanto per una questione finalizzata all'ambito tecnico-farmacologico, ma anche per un concetto legato all'instabilità del composto in generale.

In uno studio in cui è stato valutato l'effetto del pH sulla degradazione del folato, è stato riportato che a valori di pH inferiori a 5, il processo degradativo è significativo, poiché queste condizioni facilitano la disgregazione della molecola in acido p-minobenzoilglutammico e 6-formilpterina attraverso la rottura ossidativa che coinvolge il legame tra C<sub>9</sub> e N<sub>10</sub> (Akhtar e al., 2003). Come è stato riportato nel paragrafo sulla fotodegradazione, la maggior parte dei meccanismi coinvolti non sono conosciuti, per l'Acido Folico sono stati proposti diversi meccanismi di reazione (Lorente e al., 2011).

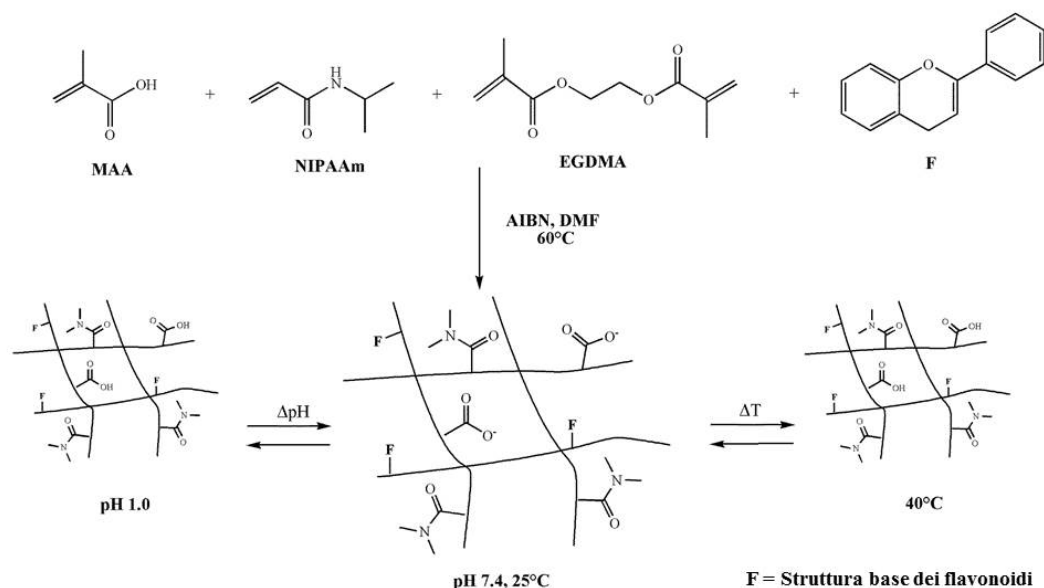
Il meccanismo proposto da Thomas prevede che a seguito di irraggiamento con un fascio di luce ultravioletta, si genera la specie reattiva all'ossigeno (O<sub>2</sub><sup>·</sup>), responsabile della scissione del legame tra C<sub>9</sub> e N<sub>10</sub> e della successiva formazione dei prodotti di degradazione. Ovviamente la reazione prevede il coinvolgimento di numerosi stadi di reazione, rendendo l'intero processo particolarmente complesso. La velocità di degradazione aumenta all'avanzare della fotolisi, invece che diminuire per esaurimento del reattivo, tale anomalia è stata giustificata dal fatto che all'avanzare della fotolisi, aumenta la concentrazione della 6-formilpterina che è in grado di generare a sua volta la specie reattiva O<sub>2</sub><sup>·</sup>, con un'efficienza circa di cinque volte superiore rispetto all'AF, e ciò si riflette in una maggiore produzione dei prodotti di degradazione dello stesso. La Figura 5.3 riporta il meccanismo appena descritto.



**Figura 5.3:** Meccanismo di degradazione dell'Acido Folico.

## 5.6 Sintesi degli idrogel per la protezione dell'Acido Folico

Al fine di sintetizzare matrici polimeriche dalle spiccate caratteristiche antiossidanti e stabilizzanti nei confronti del farmaco in esso contenuto e che mantenessero le loro proprietà in condizioni di stress ossidativo si è scelto di utilizzare due monomeri particolari: Acido Metacrilico e N-isopropilacrilamide. Il primo, in virtù della sua natura chimica, mostra un cambiamento nello stato di ionizzazione in seguito alla variazione di pH della soluzione in cui è a contatto, ciò provoca un cambiamento conformazionale che a livello macroscopico si traduce in una diversa responsività della matrice (*swelling-deswelling*), rendendo il reticolo polimerico pH-sensibile; il secondo monomero mostra una termosensibilità negativa che si riflette in un comportamento particolare, al di sopra della sua LCST, le interazioni deboli tra le catene polimeriche vengono meno, provocando una contrazione del materiale, impedendo qualsiasi processo diffusivo con ultima caratteristica di rendere l'idrogel termo-sensibile. In questo modo è stato ottenuto un *dual-stimuli responsive polymers* che con l'aggiunta delle molecole fortemente antiossidanti come (+)-Catechina e Quercetina si è trasformato in un materiale altamente performante nella veicolazione, rilascio e protezione di farmaci altamente instabili. Entrambe le sostanze sono state scelte anche per la loro struttura chimica in cui la presenza di diversi gruppi funzionali permette la loro partecipazione al processo di polimerizzazione radicalica portando alla formazione di punti di reticolazione aggiuntivi che rendono l'intera struttura molto più stabile, rispetto al solo utilizzo come agente reticolante dell'etilenglicoldimetacrilato (Figura 5.4).



**Figura 5.4:** Schema di sintesi degli idrogel dual-stimuli responsive con proprietà antiossidanti.

Al fine di valutare le capacità dei materiali sintetizzati, contenenti CT e QE, indicati rispettivamente PC e PQ, di preservare l'Acido Folico dal danno ossidativo è stata sintetizzata una matrice di controllo (PB), realizzata nelle stesse condizioni di reazione, ma in assenza della molecola antiossidante. PB pur mantenendo integre alcune proprietà come l'idrofilia e la struttura in termini tridimensionali, non ha manifestato alcuna caratteristica di preservazione.

**Tabella 5.1:** Composizione chimica degli idrogel sintetizzati.

IDROGEL	COMPOSIZIONE				ANTIOSSIDANTE		RESA (%)
	NIPAAm (mg/mmol)	MAA (mg/mmol)	EGDMA (mg/mmol)	AIBN (mg/mmol)	CT (mg/mmol)	QU (mg/mmol)	
PB	400/3.53	600/6.97	200/1.01	150/0.91	-	-	82±3
PC	400/3.53	600/6.97	200/1.01	150/0.91	190/0.65	-	75±1
PQ	400/3.53	600/6.97	200/1.01	150/0.91	-	250/0.83	86±2

Le reazioni sono state condotte in 5,0 ml di DMF a 60°C. NIPAAm = N-isopropilacrilamide; MAA=Acido metacrilico; EGDMA =Etilen glicole di metacrilato; AIBN =2,2'-azobis(isobutirronitrile); CT= (+)-Catechina; QU =Quercetina .

La sintesi delle matrici PB, PC e PQ come riportato in Tabella 5.1 presentano un rapporto fisso di proporzionalità tra la quantità di MAA e NIPAAm, che rappresenta il rapporto monomerico ideale per l'ottenimento di un materiale con le caratteristiche desiderate. Il *feed* di polimerizzazione è stato sottoposto per 24 h a 60°C, utilizzando come iniziatore radicalico l'AIBN, e sotto continua agitazione, fino all'ottenimento di un blocco solido. Il prodotto è stato poi frantumato finemente e setacciato per poter essere poi purificato. La quantità di

flavonoide nella miscela di polimerizzazione è stata accuratamente scelta ed è stata quella che ha condotto al materiale più performante. Quantità più basse hanno condotto alla sintesi di idrogel con scarse proprietà antiossidanti, mentre quantità maggiori rallentavano notevolmente il processo di polimerizzazione conducendo a un materiale non facilmente maneggiabile.

La purificazione è stata eseguita mediante l'utilizzo di una serie solventi a polarità crescente: acqua, etanolo, acetone ed etere etilico, in modo tale che si potessero allontanare tutte le impurezze, infine è stato essiccato per allontanare anche le ultime tracce di solvente utilizzato per il lavaggio, ottenendo così una resa media di reazione per i tre polimeri, i cui valori sono riportati in Tabella 5.1. L'assenza di CT e QE non legati covalentemente è stata assicurata tramite analisi HPLC effettuata sulle acque di lavaggio, procedendo con la purificazione fin tanto che nessun picco ai tempi di ritenzione di CT e QE è stato registrato nel cromatogramma. Inoltre un confronto tra il flavonoide presente nei solventi di lavaggio e quello nativo tramite HPLC e <sup>1</sup>HNMR ha confermato come le condizioni di reazione non determinino alcuna variazione nella struttura dello stesso.

## 5.7 Caratterizzazione delle matrici sintetizzate

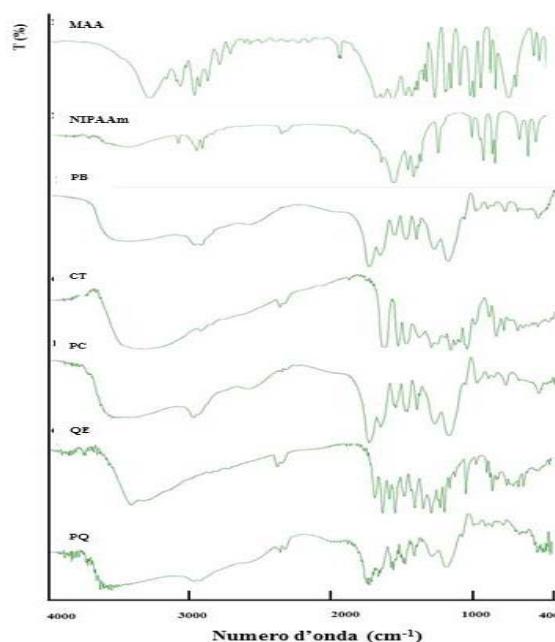
I polimeri sintetizzati PC e PQ assieme al polimero di controllo PB sono stati poi oggetto di studi specifici per la loro caratterizzazione, tramite analisi calorimetrica e FT-IR. Inoltre è stato valutato il grado di rigonfiamento, analizzata la capacità *scavenger* nei confronti dei radicali DPPH e ABTS e determinata la quantità dei gruppi fenolici disponibili. Infine, dopo caricamento dell'Acido Folico, è stato possibile caratterizzare le capacità antiossidanti dei polimeri in differenti condizioni, variando la temperatura, il pH del mezzo di rilascio in presenza di una sorgente di radiazioni UV.

### 5.7.1 Caratterizzazione chimico-fisica

L'instaurarsi di interazioni covalenti tra la matrice polimerica e le porzioni antiossidanti CT e QE è stato dimostrato tramite spettrofotometria FT-IR (Figura 5.5). Gli spettri registrati mostrano la presenza dei picchi caratteristici delle porzioni flavonoiche. Nello specifico, la banda presente a 1526 cm<sup>-1</sup> può essere attribuita alla *stretching* del legame C=C della porzione aromatica dei due composti. In aggiunta, la presenza di tutte le specie monomeriche all'interno del reticolo polimerico è confermata dai segnali a 1745, 1678 e 1243 cm<sup>-1</sup> che possono essere attribuite agli stretching dei legami C=O, C-N e C-O dei residui acrilici. La scomparsa della banda a 917 cm<sup>-1</sup> attribuibile al doppio legame C=C delle funzioni



metacriliche conferma l'assenza di specie monomeriche non reagite all'interno della matrice polimerica.



**Figura 5.5:** Spettro FT-IR delle specie iniziali e degli idrogel sintetizzati.

L'analisi termica è stata effettuata mediante l' utilizzo di un calorimetro a scansione differenziale, che si basa sulla registrazione di entalpia del materiale in esame in funzione della temperatura. L'analisi è stata effettuata mediante la registrazione dei termogrammi per i polimeri PB, PC e PQ, un'aliquota di ciascun campione è stata riscaldata da 20 a 50°C.

Dai dati ottenuti e riportati in Tabella 5.2, si evince che tutti i campioni presentano un valore di LCST superiore a quello di una soluzione di idrogel puro a base di pNIPAAm. In assenza di molecole antiossidanti, dunque nel caso di PB il valore è pari a 36,6°C indice del fatto che vi è un elevato grado di idrofilia, parametro, che si riduce con l'inserzione della (+)-Catechina in PC e Quercetina in PQ con un valore di LCST pari a 34,7°C per entrambe le matrici, è chiaro che si ha una diminuzione di tale valore, proprio per la presenza di molecole eterocicliche aromatiche.

### 5.7.2 Determinazione del grado di rigonfiamento

I reticoli polimerici sintetizzati, in relazione ai monomeri presenti nel *feed* di polimerizzazione (MAA e NIPAAm), presenteranno una compatibilità termodinamica con l'acqua che permette loro di rigonfiarsi in specifiche condizioni, determinandone quello che viene definito *swelling* del polimero e, in condizioni completamente opposte al rigonfiamento, si ha invece il processo descritto come *deswelling* delle matrici. Nel caso specifico, essendo

dei sistemi *dual-stimuli responsive*, dovrebbero mostrare per la presenza di MAA valori di rigonfiamento massimi a pH neutro e minimi o nulli a pH acido e, per la presenza di NIPAAm a valori di temperatura al di sotto della propria LCST, dovrebbe mostrare una prevalenza di interazioni tra i legami a idrogeno nelle varie parti idrofile della struttura, che si traduce in un maggiore grado di rigonfiamento, al contrario, a temperature superiori alla LCST, i legami a idrogeno si indeboliscono mentre prevalgono le interazioni idrofobiche procurando una contrazione della matrice.

Gli studi sul comportamento *swelling-deswelling* delle matrici sintetizzate è stato affrontando utilizzando due soluzioni una a pH 1,0 costituita da HCl 0,1 mol/l, e un'altra con tampone fosfato (0,01 mol/l) a pH 7,4, poste alle temperature di 25°C e 40°C. Tutti gli esperimenti sono stati condotti per 24 h, in modo da permettere alle matrici di raggiungere il massimo grado di rigonfiamento in tutte le condizioni testate. I dati ricavati espressi come percentuale di rigonfiamento (WR (%)) secondo l'equazione 3.1 sono riportati in Tabella 5.2.

**Tabella 5.2:** Parametri chimico-fisici delle matrici polimeriche.

Idrogel	Analisi calorimetrica	Affinità per il mezzo WR%							
	LCST (°C)	pH 1.0			pH 7.4			Q <sub>25</sub>	Q <sub>40</sub>
		WR <sub>25</sub>	WR <sub>40</sub>	S <sub>r1</sub>	WR <sub>25</sub>	WR <sub>40</sub>	S <sub>r7</sub>		
<b>PB</b>	36,6	26±3	21±2	1,2	339±4	182±4	1,9	13,0	8,7
<b>PC</b>	34,7	48±4	41±3	1,2	533±4	249±3	2,2	11,1	6,1
<b>PQ</b>	34,7	43±2	33±3	1,3	650±6	363±4	1,8	15,1	11,0

$$S_{r1} = \frac{WR_{25}}{WR_{40}} \text{ a pH 1,0; } S_{r7} = \frac{WR_{25}}{WR_{40}} \text{ a pH 7,4; } Q_{25} = \frac{WR_{pH7.4}}{WR_{pH1}} \text{ a 25°C; } Q_{40} = \frac{WR_{pH7.4}}{WR_{pH1}} \text{ a 40°C.}$$

L'effetto del particolare stimolo esterno sull'affinità per il mezzo acquoso può essere meglio evidenziato sfruttando due parametri empirici S<sub>r</sub> e Q. S<sub>r</sub> rappresenta il rapporto tra i valori di WR% registrati alle diverse temperature (25 e 40°C) per ogni valore di pH (S<sub>r1</sub> a pH 1,0 e S<sub>r7</sub> a pH 7,4), mentre Q è il rapporto tra i valori di WR% a pH 1,0 e 7,4 alle temperature settate (Q<sub>25</sub> a 25°C e Q<sub>40</sub> a 40°C) (Cirillo e al., 2011).

La sensibilità al pH delle matrici sintetizzate è chiaramente evidente dai dati di WR% registrati e può essere ascritta alla presenza dei gruppi carbossilici presenti in catena laterale. In particolare, è possibile notare valori di WR% più alti a pH 7,4 rispetto a pH 1,0 a causa delle repulsioni elettrostatiche tra le funzioni carbossiliche che, a valori di pH di poco

superiori alla neutralità, si presentano nella loro forma deprotonata. PQ mostra il comportamento pH-sensibile più marcato ad entrambe le temperature, come evidenziato dai valori calcolati di  $Q_{25}$  e  $Q_{40}$ , a causa del comportamento maggiormente acido di QE rispetto a CT, come evidenziato dai valori di pKa che risultano essere di 6,44 per QE e 9,0 per CT. Tale comportamento permette alle porzioni di QE covalentemente legate alla catena polimerica di partecipare più attivamente ai processi che determinano il rigonfiamento della matrice.

Andando ad analizzare il comportamento dei materiali alle diverse temperature è possibile osservare piccole differenze a pH 1,0, dove la contrazione determinata dal valore di pH è predominante. In generale tutti gli idrogel mostrano maggiore affinità per il mezzo acquoso a 25°C rispetto 40°C, anche se i valori di  $S_{r1}$  dei materiali si discostano di poco dall'unità.

Al contrario, a pH 7,4 l'effetto della temperatura appare evidente. I valori di WR% a 40°C risultano circa la metà di quelli registrati a 25°C (valori di  $S_{r7}$  tra 1,8 e 2,2), a causa del predominare delle interazioni idrofobiche tra i gruppi isopropilici presenti in catena laterale.

I dati di rigonfiamento registrati risultano estremamente utili nella determinazione di alcuni parametri strutturali delle matrici stesse. In particolare, utilizzando l'equazione di Flory-Rehner nella forma proposta da Kulkarnin e al. (2000), è stato possibile determinare il peso molecolare medio tra due punti di reticolazione,  $\bar{M}_c$ , definito:

$$\bar{M}_c = -d_p v_{m,1} \phi^{1/3} [\ln(1 - \phi) + \phi + \chi \phi^2]^{-1} \quad \text{Equazione 5.1}$$

dove  $v_{m,1}$  è il volume molare del mezzo di rigonfiamento,  $\chi$  è il parametro di interazione di Flory-Huggins e  $\phi$  è la frazione volumetrica di polimero nello stato rigonfiato che è determinata misurando la quantità di fluido trattenuto dall'idrogel, tramite la seguente equazione (Cirillo e al., 2014):

$$\phi = \left[ \left( \frac{d_p}{d_s} \right) \left( \frac{w_p - w_0}{w_0} \right) + 1 \right]^{-1} \quad \text{Equazione 5.2}$$

dove  $d_p$  e  $d_s$  sono la densità di polimero e solvente ( $\text{g/cm}^3$ );  $w_0$  e  $w_\infty$  il peso del polimero secco e dopo aver raggiunto il Massimo del rigonfiamento.

Il valore di  $\chi$  è stato calcolato sperimentalmente in accordo alla seguente equazione:

$$\chi = [\phi(1 - \phi)^{-1} + N \ln(1 - \phi) + N\phi] \left[ 2\phi - \phi^2 N - \phi^2 T^{-1} \left( \frac{d\phi}{dT} \right)^{-1} \right]^{-1} \quad \text{Equazione 5.3}$$

dove  $(d\phi/dT)$  è la pendenza ottenuta riportando in grafico la frazione di volume in funzione della temperatura (in K), mentre N è calcolato in accordo alla seguente equazione:

$$N = \left( \frac{\phi^{3/2}}{3} - \frac{2}{3} \right) \left( \phi^{1/3} - \frac{2}{3} \phi \right)^{-1} \quad \text{Equazione 5.4}$$

Il valore di  $\bar{M}_c$  è utilizzato per determinare il diametro medio dei pori in accordo con la seguente equazione:

$$\xi = 0.071 \phi^{-1/3} (\bar{M}_c)^{1/2} \quad \text{Equazione 5.5}$$

Quest'ultimo parametro, calcolato ai pH e alle temperature testate è riportato in Tabella 5.3.

**Tabella 5.3:** Parametri strutturali degli idrogel in accordo all'equazione di Flory-Rehner.

Idrogel	Diametro medio dei pori (nm)			
	pH 1,0		pH 7,4	
	25°C	40°C	25°C	40°C
PB	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	9,2 ± 0,4	3,9 ± 0,4
PC	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,2	18,4 ± 0,5	5,8 ± 0,4
PQ	0,8 ± 0,2	0,6 ± 0,1	24,0 ± 0,6	10,0 ± 0,5

Dai dati riportati si evince chiaramente come le variazioni di temperatura e di pH abbiano un effetto drammatico sulle matrici sintetizzate. In particolare, i valori calcolati a pH 7,4 risultano due ordini di grandezza più grandi rispetto a quelli registrati a pH 1,0, mentre la temperatura ha un effetto più risotto, come già notato per i valori di WR%. Focalizzando

l'attenzione a un determinato valore di pH e analizzando i valori alle diverse temperature si nota come le dimensioni dei pori diminuiscano passando da 25 a 40°C; tale effetto appare poco evidente a pH 1,0 in quanto l'idrogel a causa del valore di pH si trova già in uno stato collassato, per cui la variazione di temperatura non modifica significativamente il valore di  $\xi$ . Confrontando i dati relativi alle due matrici sintetizzate, si nota come, a parità di mezzo di rigonfiamento, la matrice contenente le porzioni di QE mostra una risposta più marcata rispetto a quella contenente CT e comunque in entrambi i casi l'introduzione in catena laterale delle porzioni flavonoiche modifica sensibilmente la capacità dell'idrogel di rispondere allo stimolo esterno.

### 5.8 Determinazione dell'attività antiossidante in funzione della temperatura

L'attività antiossidante delle matrici sintetizzate, dipende dalla quantità dei gruppi fenolici disponibili (TFG) che sono in grado di interagire, inibendoli, con i radicali liberi, pertanto la determinazione di tali gruppi è alla base della descrizione di una matrice che debba presentare caratteristiche preservanti nonché antiossidanti. Il saggio di Folin-Ciocalteu con opportune modifiche è stato scelto per determinare questo parametro a diverse temperature (Spizzirri e al., 2010). Il reagente di Folin-Ciocalteu contiene un derivato del Mo (VI) che viene facilmente ridotto dai gruppi fenolici a una specie che assorbe specificatamente ad una stabilita lunghezza d'onda del visibile. Il reattivo è costituito da una miscela di acido fosfotungstico e acido fosfomolibdico, che per reazione con i fenoli, si riducono rispettivamente a ossido di tungsteno e ossido di molibdeno dal tipico colore blu, con un massimo di assorbimento a 760 nm. Ponendo a contatto ogni idrogel sintetizzato (PB, PC e PQ) con tale reagente a due diverse temperature (25 e 40°C) sono stati registrati i dati riportati in Tabella 5.4 che riporta i gruppi fenolici disponibili espressi come equivalenti di CT (o QE) (mg per g di polimero). In tali esperimenti appare evidente come il polimero PB, mancante di gruppi funzionali che possano interagire con il reattivo, non interferisce con la determinazione.

**Tabella 5.4:** *Proprietà antiossidanti degli idrogel sintetizzati.*

Idrogel	Proprietà antiossidanti					
	TFG (mg/g)		ABTS IC <sub>50</sub> (mg/mL)		DPPH IC <sub>50</sub> (mg/mL)	
	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C
<b>PB</b>	-	-	-	-	-	-
<b>PC</b>	1,3 ± 0,2	0,8 ± 0,7	4,45 ± 0,3	15,2 ± 0,4	2,6 ± 0,1	19,3 ± 0,2
<b>PQ</b>	1,0 ± 0,1	0,5 ± 0,1	25,2 ± 0,4	61,4 ± 1,0	12,2 ± 0,1	-

*TFG: Gruppi fenolici totali.*

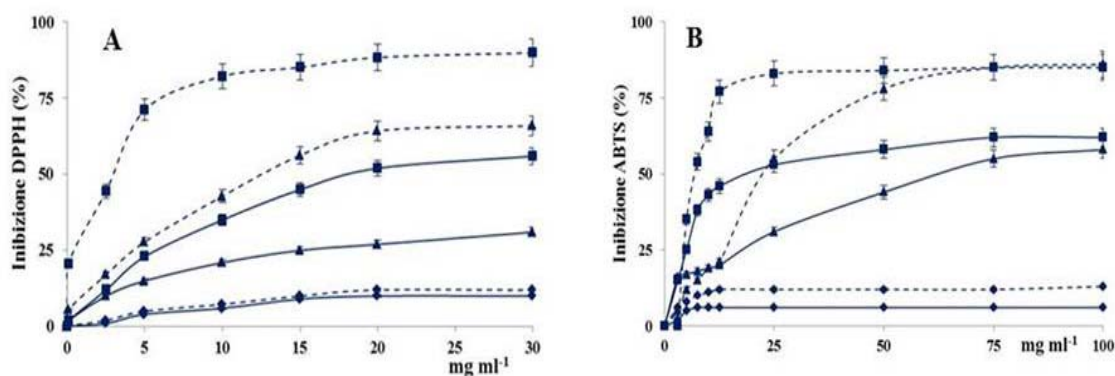
I dati registrati mostrano per entrambi i polimeri una maggiore quantità di TFG a 25°C, poiché l'interazione tra le matrici, che si trovano nello stato rigonfiato, e il reattivo risulta massimizzata. In particolare, la differenza tra le due matrici (1,3 and 1,0 mg di flavonidi per PC e PQ, rispettivamente) alla stessa temperatura è una conseguenza della diversa reattività del flavonoide durante il processo di *grafting* molecolare. Innalzando la temperatura a valori superiori alla LCST si osserva il collasso dell'idrogel e di conseguenza i gruppi fenolici presenti risultano meno accessibili al reattivo utilizzato (0,8 e 0,5 mg di flavonidi per PC e PQ, rispettivamente). Il risultato finale è che il valore di TFG registrato diminuisce sensibilmente.

Per poter valutare la capacità *scavenger* degli idrogel sintetizzati, sono stati allestiti due saggi di inibizione radicalica, utilizzando il DPPH come radicale lipofilo e il radicale cationico ABTS come idrofilo. In entrambi i casi, l'aggiunta di molecole antiossidanti ne determina la loro riduzione per trasferimento di idrogeno o di elettroni da parte dell'agente antiossidante al radicale utilizzato, che a livello macroscopico si traduce in una variazione di assorbanza attraverso la quale è possibile quantificare la capacità antiossidante delle sostanze in esame, dal momento che la variazione dell'assorbanza è proporzionale alla quantità di antiossidante presente. Al fine di valutare la modulabilità delle proprietà antiossidanti delle matrici realizzate, i test sono stati eseguiti a due diverse temperature (25 e 40°C), cui le matrici si trovano rispettivamente nello stato rigonfiato e collassato.

Il test del DPPH ci consente di apprezzare una graduale decolorazione della soluzione etanolica di DPPH, originariamente rosso porpora, quando è a contatto con sostanze antiossidanti in grado di ridurre il radicale stesso. La misurazione spettrofotometrica avviene a 517 nm, valore riconducibile alla banda caratterizzata dal massimo assorbimento del radicale (Pyrzynska e Pełkal, 2013). La riduzione di assorbanza registrato a questa lunghezza d'onda risulta direttamente proporzionale all'effetto antiossidante del materiale testato.

Il test dell'ABTS permette la valutazione dell'attività *scavenger* dei materiali in ambiente acquoso, attraverso la misurazione di una graduale decolorazione della soluzione contenente il radicale ABTS<sup>•+</sup> blu-verde che assorbe ad una specifica lunghezza d'onda pari a 734 nm, quando è posta a contatto con molecole antiossidanti. Anche in questo caso il test è stato condotto sia a 25°C che a 40°C.

Per entrambi i saggi, il risultato è stato espresso come IC<sub>50</sub>, cioè la quantità di antiossidante in grado di ridurre del 50% la concentrazione iniziale di DPPH (Figura 5.6A) e ABTS (Figura 5.6B). I valori di IC<sub>50</sub> sono riportati in Tabella 5.4,



**Figura 5.6:** Inibizione DPPH(%) e ABTS(%) per PB (◆); PC (■); PQ (▲) a 25°C (---) e 40°C (—).

In entrambi i saggi, la capacità antiossidante di PB non è rilevante in quando non è presente alcun effetto *scavenger* né verso radicali idrofili, né verso radicali lipofili, il che è ovvio dal momento che manca, nella propria struttura, di componenti aventi proprietà antiossidanti.

Gli idrogel contenenti le porzioni antiossidanti, invece, mostrano una buona attività *scavenger* nei confronti di entrambi i radicali, con effetti più pronunciati a 25°C, temperatura alla quale le funzioni fenoliche risultano più accessibili. Andando ad analizzare le differenze tra i due polimeri alla stessa temperatura appare chiaro come la matrice PC sia più performante rispetto a PQ nei confronti di entrambi i radicali. Inoltre, la matrice contenente CT presenta proprietà antiossidanti meglio esplicate nei confronti del radicale lipofilo rispetto a quello idrofilo. In presenza del radical DPPH alla concentrazione pari a 2,5 mg/ml di matrice PC è registrata un'inibizione del 50%, che supera il 75% per concentrazioni di 10 mg/ml, l'inibizione si mantiene al di sopra di questo valore per tutte le altre concentrazioni utilizzate, fino a raggiungere un valore costante di poco superiore all'85%, per concentrazioni superiori a 20 mg/ml; in presenza, invece, del radicale ABTS<sup>+</sup> occorre una concentrazione poco superiore ai 10 mg/mL per avere un'inibizione del 50% e per raggiungere il 75% di inibizione, occorre utilizzare concentrazioni pari a 20 mg/ml, solo dopo la concentrazione di 25 mg/ml si apprezza un'inibizione superiore al 75% che diviene pressoché costante quando la concentrazione di PC è 50 mg/ml.

Anche per la matrice PQ si ha un'ottima capacità *scavenger* per entrambi i radicali alla temperatura di 25°C, ma, in questo caso occorre precisare due aspetti. Il primo, è quello di delineare la migliore attitudine verso uno o l'altro radicale espressa dalla matrice PQ ed estrapolare come secondo aspetto, quale tra i due idrogel PC e PQ si presta di più a svolgere un'attività preservante; affinché PQ possa inibire del 50% il radicale DPPH occorre una concentrazione di 15 mg/ml, il valore massimo di inibizione invece, si attesta intorno al 68% con concentrazioni sempre crescenti, ma, che non sono in grado di raggiungere e superare il

75% come nel caso della matrice PC. Per il saggio con l'ABTS il discorso varia, innanzitutto si raggiunge lo stesso valore di inibizione percentuale massima che si ha con PC ma, a concentrazioni nettamente superiori rispetto a quelle utilizzate per l'idrogel contenente CT, infatti, occorre una concentrazione pari a 75 mg/ml affinché l'inibizione sia costante, lo stesso discorso vale per avere un'inibizione del 50%, dove serve una concentrazione di 25 mg/ml contro i 10 mg/ml di PC. Paragonando i due risultati, anche in questo caso, si ha una maggiore attività inibente nei confronti di uno o l'altro radicale, sebbene per PQ sembrerebbe quasi paritaria. In realtà se da un lato occorre una quantità minore di matrice per inibire del 50% il DPPH rispetto a quella richiesta per inibire del 50% l'ABTS, il valore di massima inibizione non va oltre il 68%, al contrario per inibire l'ABTS serve una quantità di poco superiore a quella richiesta per avere lo stesso effetto nel DPPH, ma in questo caso, il valore massimo inibente si attesta a quello registrato per PC seppur a minore concentrazione.

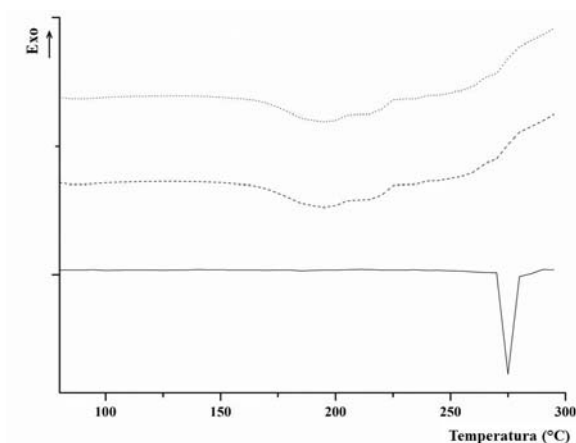
In conclusione, dai dati raccolti, entrambi gli idrogel PC e PQ nel saggio con il radicale cationico ABTS sono efficaci, ma la migliore efficienza è attribuibile a PC per le minori quantità di polimero richieste; nell'inibizione del radicale DPPH, PC sembrerebbe sia efficace che efficiente poiché inibisce con concentrazioni minori il radicale e a valori percentuali maggiori rispetto a quelle richieste da PQ.

### **5.9 Determinazione dell'attività antiossidante in funzione del pH**

Al fine di valutare le variazioni dell'attività antiossidante dei materiali sintetizzati in mezzi a diversi pH è stato messo a punto un esperimento in cui è stata testata l'abilità della matrice nella preservazione di molecole, come le vitamine, che possono subire fenomeni di ossidazione. A tale scopo, l'acido folico è stato scelto per la sua instabilità nei processi ossidativi indotti dalle radiazioni UV. L'AF è stato caricato all'interno delle matrici PB, PC e PQ tramite impregnazione e i valori di efficienza di caricamento (LE%) calcolati per tutti i polimeri è stato del 100% con una percentuale di vitamina caricata nella matrice dopo essiccamento (DL%) pari al 10%.

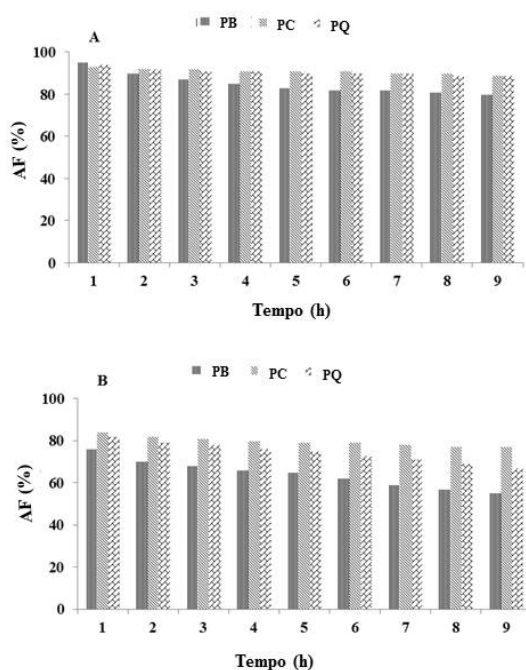
La dispersione uniforme della vitamina all'interno del reticolo polimerico è stato confermato tramite analisi calorimetrica che ha evidenziato l'assenza del picco di fusione della vitamina (275°C) nei polimeri PC e PQ caricati con AF (Figura 5.7).





**Figura 5.7:** Calorimetria a scansione differenziale di AF (—), PC (- - -) e PQ (.....)caricati con AF.

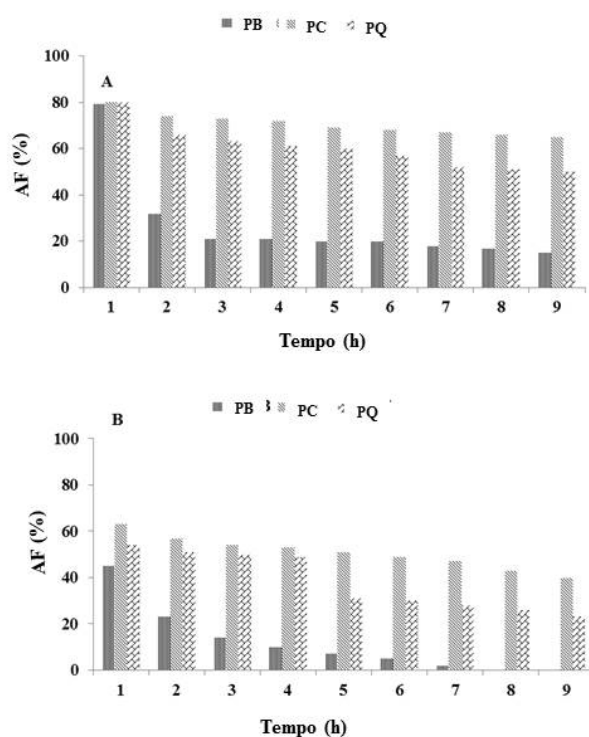
I polimeri impregnati sono stati sospesi in un mezzo in condizioni di pH (1,0 e 7,4) e temperatura (25 e 40°C) controllati e la quantità di vitamina rilasciata è stata registrata in presenza di radiazione UV. La quantità di vitamina preservata è stata calcolata comparando i dati raccolti con quelli ottenuti negli esperimenti condotti in assenza di radiazione. Le percentuali di preservazione sono riportati in Figura 5.8 per gli esperimenti condotti a pH 1,0 e Figura 5.9 per quelli a pH 7,4. I risultati mostrano chiaramente che l'efficienza preservante decresce nel tempo e dipende sia dal rigonfiamento dell'idrogel, sia dalla presenza delle porzioni antiossidanti. A pH 1,0, tutti gli idrogel si presentano nello stato collassato, indipendentemente dalla temperatura del mezzo, trattenendo la vitamina che rimane principalmente inalterata dopo 9 h di irradiazione.



**Figura 5.8:** Percentuale di preservazione di AF a pH 1,0 per PB, PC e PQ a 25°C (A) e 40°C (B).  $p < 0.05$

I valori di degradazione registrati in queste condizioni sperimentali sono stati dell'11% e del 23% per PC e dell'11% e del 33% per PQ rispettivamente a 25 e 40°C. Entrambi i polimeri mostrano la stessa efficienza a 25°C, mentre a 40°C la matrice PC appare più performante, in accordo con i dati di attività antiossidante riportati negli esperimenti sopra descritti. Dai dati registrati utilizzando la matrice PB appare evidente come il principale aspetto da considerare sia lo stato collassato dell'idrogel, più che la presenza delle porzioni antiossidanti, che protegge fisicamente la vitamina preservandola da processi degradativi. I valori calcolati per PB risultano infatti di poco superiori a quelli delle matrici antiossidanti e pari al 20% a 40°C e 45% a 25°C.

Aumentando il pH a valori tali da determinare l'evidente rigonfiamento del polimero, l'azione esercitata dalle porzioni antiossidanti appare evidente e anche la temperatura influenza sensibilmente la quantità di vitamina preservata dai processi degradativi.



**Figura 5.9:** Percentuale di preservazione di AF a pH 7,4 per PB, PC e PQ a 25°C (A) e 40°C (B).  $p < 0.05$

A tale valore di pH la matrice PB si è dimostrata totalmente incapace di proteggere la vitamina dal danno ossidativo, infatti solo il 15% appare inalterato a 40°C, e questa percentuale si abbassa all'1% a 25°C dopo 9h di irradiazione. Al contrario, l'AF è stato preservato per il 65% a 25°C e per il 36% a 40°C da PC, mentre per PQ i valori registrati sono stati rispettivamente di 50 e 23%. Anche in questo caso, la maggiore attività antiossidante

riscontrata per la matrice PC rispetto a PQ si manifesta in un' aumentata capacità di preservare la vitamina in esame dal danno ossidativo ad entrambe le temperature.

L' analisi di questi dati conferma come la contemporanea presenza nel reticolo polimerico di gruppi idrofobici e funzioni carbossiliche conferisce all' idrogel la possibilità di modulare la propria affinità per il mezzo acquoso in funzione della temperatura e del pH di quest' ultimo. Tale modulabilità si manifesta in un' efficiente regolazione delle proprietà antiossidanti delle matrici che appaiono particolarmente evidenti quando l' idrogel si trova nello stato rigonfiato (pH 7,4 e 25°C).

Da un punto di vista industriale, particolarmente interessanti sono i risultati registrati sottoponendo lo stesso materiale a cinque cicli successivi di degradazione ossidativa. In tali condizioni la capacità delle matrici di preservare AF dal danno ossidativo appare inalterato.

## 5.10 Conclusioni

L' introduzione tramite reazione di *grafting* radicalico di CT e QE in idrogel contenenti MAA e NIPAAm, come elementi in grado di conferire sensibilità al pH e alla temperatura, è stata proposta come un' efficace strategia in grado di modulare le proprietà antiossidanti di queste molecole a struttura flavonoica.

La determinazione del grado di rigonfiamento ha confermato che la presenza di MAA nel *feed* di polimerizzazione conferisce ai materiali capacità di modificare la propria affinità per il mezzo acquoso in funzione del pH, grazie alla ionizzazione delle funzioni carbossiliche. In aggiunta, i residui isopropilici del NIPAAm rendono il grado di rigonfiamento strettamente correlato alla temperatura del mezzo, con maggiore affinità matrice-solvente a valori di temperatura inferiori alla LCST, che per polimeri in esame è compresa nel *range* 34,7-36,6°C. L' attività antiossidante dei materiali sintetizzati è risultata più evidente nel momento in cui l' idrogel si trova nello stato rigonfiato (pH 7,4 e 25°C), condizione in cui le funzioni antiossidanti risultano più libere di esplicare la loro azione nei confronti delle specie radicaliche e di preservare specifiche molecole dal danno ossidativo. In particolare, nel presente lavoro AF è stato caricato all' interno delle matrici polimeriche e in esperimenti di rilascio condotti in presenza di radiazioni UV è stata notata come la presenza di porzioni antiossidanti permetta agli idrogel di proteggere la vitamina dal danno ossidativo. Tale effetto è evidente a pH 7,4 e ad entrambe le temperature testate, in particolare per la matrice PC, mentre a pH 1,0, il collasso della matrice funge esso stesso da protettivo nei confronti di AF anche in assenza delle funzionalità antiossidanti.

L'alta applicabilità industriale di questi materiali è data dalla possibilità di attivare/disattivare, in funzione del pH e della temperatura, la capacità dei materiali proposti di fungere da sistemi macromolecolari antiossidanti.

## 5.11 Parte sperimentale

### 5.11.1 Materiali

Acido Metacrilico, N-isopropilacrilamide, Etilenglicole dimetacrilato, 2,2'-azobis(isobutirronitrile) (AIBN), (+)-Catechina idrata, Quercetina, Acido Folico, 2,2'-difetil-1-picrilidrazile (DPPH), acido 2,2'-azino-bis(3-etilbezotiazolin-6-sulfonico) (ABTS), persolfato di potassio, acido fosfotungstico e acido fosfomolibdico (reattivo di Folin-Ciocalteu), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA). N,N-dimetilformammide, acqua, etanolo, acetone, metanolo, dietilere, acido cloridrico 37% (m/m) (Reagent Grade o HPLC Grade) sono stati acquistati dal Carlo Erba reagenti (Milano, Italia).

### 5.11.2 Strumentazione

Gli spettri FT-IR sono stati effettuati su pastiglie di KBr, utilizzando uno spettrofotometro Jasco FT-IR 4200 nel range di lunghezza d'onda 4000-400 cm<sup>-1</sup>. Il segnale è stato ottenuto eseguendo 100 scan a una risoluzione di 1 cm<sup>-1</sup>. Le analisi calorimetriche sono state effettuate utilizzando un calorimetro a scansione differenziale Netzsch DSC 200 PC riscaldando circa campione rigonfiato (2 giorni in acqua fino al raggiungimento del massimo *swelling*) da 25°C a 55°C sotto azoto con una velocità di flusso pari a 25 ml/min e un riscaldamento di 3°C al minuto. In una differente procedura per verificare la dispersione uniforme del farmaco all'interno della matrice polimerica, un'aliquota di matrice secca impregnata di principio attivo è stata scaldata da 80°C a 300°C sotto azoto con una velocità di flusso pari a 25 ml/min e un riscaldamento di 10°C al minuto. Gli spettri di assorbimento sono stati registrati utilizzando uno spettrofotometro Jasco V-530 UV-Vis. Le analisi cromatografiche sono state effettuate utilizzando un sistema HPLC composto da una pompa Jasco BIP-I, un detector Jasco UV2075 Plus settato a 280 nm, e da un iniettore Rheodyne 7725i, munito di un loop da 20 µl. È stata utilizzata una colonna C<sub>18</sub> a fase inversa (Tracer Excel 120-ODS-A 5µm di diametro interno, Teknocroma). La fase mobile utilizzata per l'eluizione, è una miscela di metanolo/ tampone fosfato (PBS 0,01 M pH 8,0), nel rapporto 25/75 (v/v) con un flusso di 0,7 ml min<sup>-1</sup> (Spizzirri et al., 2013b). La lampada utilizzata per la degradazione UV è una lampada (UV 4500 Lx ± 500 Lx). Il liofilizzatore utilizzato è Micro Modulyo, Edwards. Gli spettri <sup>1</sup>H-

NMR sono stati registrati utilizzando lo strumento Bruker VM-300 ACP e usando DMSO-d<sub>6</sub> come solvente.

### **5.11.2 Sintesi degli idrogel**

La sintesi degli idrogel è stata effettuata per polimerizzazione radicalica in bulk. Più precisamente è stata realizzata in una fiala munita di agitatore magnetico e tappo a tenuta mediante la solubilizzazione di 600 mg di MAA e 400 mg di NIPAAm in 5 ml di DMF seguita dall'aggiunta di 200 mg di EGDMA e 100 mg di AIBN. Alla miscela sono state aggiunte opportune aliquote di CT e di QE (50; 100; 150; 200; 250; 300 mg). La reazione è stata condotta in un bagno ad olio termostato a 60°C per 24h, sotto continua agitazione. Al termine della reazione il prodotto è stato finemente frantumato e setacciato per poter ottenere particelle dalle dimensioni omogenee. Successivamente i polimeri sono stati sottoposti a lavaggio esaustivo acqua (3x50 ml), etanolo (3x50 ml), acetone (3x50 ml), etere etilico (3x50 ml), per allontanare tracce di solvente, specie non reagite e sottoprodotti. Al termine dei lavaggi, il prodotto è stato essiccato fino a costanza di peso. Nelle stesse condizioni di reazione, è stato preparato il polimero di controllo, caratterizzato dall'assenza del polifenolo in fase di preparazione.

### **5.11.3 Determinazione del grado di rigonfiamento**

Il grado di rigonfiamento degli idrogel è stato determinato per verificare l'affinità per i mezzi acquosi degli idrogel, ponendo tali polimeri a contatto con soluzioni acquose a differente pH e diversi valori di temperatura. Secondo tale procedura: aliquote di 50mg di ciascuna matrice secca sono state poste in filtri di vetro (Ø 10 mm, porosità G3), precedentemente bagnati con la stessa soluzione utilizzata per il saggio specifico, centrifugati e tarati per escludere dai calcoli la quantità di acqua trattenuta dal filtro stesso. I filtri con la matrice sono stati posti in una soluzione di HCl (0.1 mol/l pH 1,0) e in una soluzione di tampone fosfato (PBS 0,01 mol/l pH 7,4). Gli esperimenti sono stati condotti sia a 25°C sia a 40°C, utilizzando un bagno termostato, fino al raggiungimento dell'equilibrio di rigonfiamento.

A intervalli di tempo pari a 1h, 4h e 24h è stato eliminato l'eccesso di soluzione prima con percolazione a pressione atmosferica, seguita da centrifugazione a 3500 rpm per 15 min. Ciascun campione rigonfio contenuto nel filtro è stato infine pesato, ottenendo la percentuale di rigonfiamento WR%.

#### 5.11.4 Determinazione dell'effetto scavenger sul radicale DPPH

L'attività *scavenger* degli idrogel ottenuti è stata valutata mediante l'utilizzo del metodo colorimetrico DPPH-test, apportando delle modifiche rispetto a quello riportato in letteratura. Il DPPH (2,2-difenil-1-picrildrazile) è un radicale azotato libero stabile, che in soluzione etanolica è caratterizzato da un'intensa colorazione rosso porpora e che decolora quando viene ridotto in presenza di una molecola dotata di capacità antiossidante. Mediante misurazione spettrofotometrica a 517 nm della variazione di assorbanza della soluzione di DPPH, dopo reazione con un composto antiossidante, è possibile quantificare la capacità riducente della sostanza in esame, sia che essa agisca con trasferimento di idrogeno, sia che agisca per cessione di elettroni. Il risultato viene generalmente espresso come IC<sub>50</sub>, cioè la quantità di antiossidante in grado di ridurre del 50% la concentrazione iniziale di DPPH. Diverse aliquote di matrice in esame (10 , 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 mg) sono state disperse in 10 ml di soluzione etanolica di DPPH (10<sup>-4</sup> M) e incubate al buio per 10 min sotto continua agitazione alla temperatura in esame (25 e 40°C). Dopo allontanamento del materiale solido in sospensione mediante centrifugazione (5 min/4000 rpm) è stata valutata l'assorbanza dei campioni alla lunghezza d'onda di 517 nm. Per tutti i campioni l'attività *scavenger* è stata valutata in termini di diminuzione dell'assorbanza del radicale, la quale è proporzionale alla carica antiossidante presente nel campione. L'attività *scavenger* è stata espressa come percentuale di inibizione del DPPH, calcolata con la seguente equazione:

$$inhibition(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad \text{Equazione 5.6}$$

dove A<sub>0</sub> è l'assorbanza di uno standard preparato nelle stesse condizioni ma in assenza di polimero, mentre A<sub>1</sub> è l'assorbanza della miscela contenente il polimero in esame.

#### 5.11.5 Determinazione dell'effetto scavenger sul radicale ABTS

Si tratta di un metodo analitico per determinare la capacità dell'attività antiossidante dei materiali in esame nei confronti del radicale cationico ABTS. Tramite uno spettrofotometro UV-Vis viene misurata l'assorbanza di una soluzione contenente il radicale ABTS<sup>•+</sup>, generato per ossidazione dell'ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonato), una sostanza incolore che nella forma radicalica si colora assorbendo a lunghezze d'onda caratteristiche nel *range* del visibile. L'aggiunta alla soluzione di ABTS<sup>•+</sup> di sistemi antiossidanti, che possono

agire tramite cessione sia di idrogeno che di un elettrone, determina la riduzione del radicale alla forma incolore, con conseguente decolorazione della miscela di reazione. Tale decolorazione, proporzionale alla quantità di antiossidante presente, può essere misurata come diminuzione dell'assorbanza ad uno specifico intervallo di tempo e ad una specifica lunghezza d'onda (734 nm). La misura del potere antiossidante basata sull'utilizzo dell'ABTS permette la misurazione di sostanze antiossidanti sia idrofile che lipofile in un ampio *range* di pH. Anche in questo caso, la procedura utilizzata si discosta da quella presente in letteratura. Ad una soluzione acquosa di ABTS (7 mM) è stato aggiunto persolfato di potassio con concentrazione finale della soluzione 2,45 mM, per dare origine alla formazione del radicale  $ABTS^{\cdot+}$ , la miscela è stata poi lasciata a riposo a temperatura ambiente e al riparo dalla luce per 16h. Per questo saggio, diverse aliquote (6; 10; 15; 20; 25; 50; 100; 150; 200 mg) dei differenti idrogel PB, PC e PQ, sono stati sospesi in 2,0 ml della soluzione di  $ABTS^{\cdot+}$ , incubati per 5 minuti al riparo dalla luce sia a 25°C che a 40°C e successivamente centrifugati a 4000 rpm per 5 minuti. La soluzione surnatante è stata analizzata tramite spettrofotometria UV-Vis a 734 nm. Anche in questo caso, come nel saggio con DPPH, l'attività *scavenger* è stata espressa in termini di  $IC_{50}$  previa estrapolazione della inibizione (%), ricavata sempre dall'equazione 5.6.

#### **5.11.6 Determinazione dei gruppi fenolici disponibili**

Un'aliquota di 20 mg dei polimeri PB, PC e PQ posti in matracci da 10 ml, sono addizionati di 6,0 ml di H<sub>2</sub>O distillata, 1,0 ml del reagente di Folin e dopo 3 min, di 3,0 ml di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2% p/p). Le miscele così ottenute vengono mantenute sotto continua agitazione e al riparo dalla luce per 24 h, quindi centrifugati a 400 rpm per 5 minuti. Le soluzioni recuperate sono state analizzate tramite UV-Vis determinando l'assorbanza a 760 nm contro un campione di controllo allestito nelle stesse condizioni di reazione in assenza della matrice polimerica. Come per gli altri saggi, gli esperimenti sono stati condotti a 25 e 40°C. La quantità totale dei gruppi fenolici disponibili, presenti negli idrogel, è stata espressa in  $\mu$ moli di antiossidante ((+)-Catechina per PC e Quercetina per PQ) per grammo di polimero, utilizzando un'equazione ottenuta dalle rette di taratura costruite con soluzioni a diversa concentrazione di CT e QE, rispettivamente. Le rette di taratura sono state realizzate mediante determinazione dell'assorbanza di soluzioni a concentrazioni note dell'agente antiossidante (8,0; 16,0; 24,0; 32,0 e 40,0  $\mu$ M), a 25°C e 40°C.

### 5.11.7 Analisi calorimetrica

Le analisi calorimetriche sono state eseguite sugli idrogel PB, PC e PQ mediante una procedura standard che prevede l'utilizzo di circa 2 mg di ciascun campione poste in un crogiolo di alluminio munito di coperchio ermetico. Le analisi termiche sono state effettuate riscaldando il campione da 80°C a 300°C sotto azoto, con una velocità di flusso di 25 ml/min e un riscaldamento di 10°C/min. La stessa analisi è stata condotta anche sulle stesse matrici precedentemente bagnate, lasciate in acqua distillata per tre giorni. In questo caso, l'analisi calorimetrica è stata eseguita riscaldando il campione da 20°C a 50°C sotto azoto, con una velocità di flusso di 25 ml/min e un riscaldamento di 1°C/min.

### 5.11.8 Caricamento del farmaco nelle matrici

Il caricamento dell'Acido Folico all'interno delle matrici PB, PC e PQ è stata effettuata secondo la tecnica dell'impregnazione. Tale metodologia prevede la sospensione di 200 mg di matrice polimerica in 2,0 ml di soluzione (10 mg/ml) di AF in PBS 10<sup>-3</sup> mol/l (pH 8,0) al riparo dalla luce a temperatura ambiente e sotto continua agitazione. Trascorse 72 h, la sospensione è stata filtrata, le matrici impregnate sono state recuperate e la soluzione analizzata per determinare la quantità di vitamina all'interno di ciascuna matrice.

### 5.11.10 Valutazione del grado di preservazione del farmaco

Per poter delineare al meglio le caratteristiche delle matrici in termini di capacità di preservazione del farmaco in esso contenuto, sono stati allestiti una serie di saggi in diverse condizioni di pH e temperatura in presenza di uno stress ossidativo quale l'irraggiamento UV. La quantità di AF presente in soluzione è stata determinata mediante analisi HPLC, e la percentuale di farmaco preservata dalla degradazione ossidativa (PFA) è stata valutata confrontandola con quella rilevata nelle stesse condizioni operative ma in assenza di stress. Tutti gli esperimenti sono stati effettuati sui polimeri funzionalizzati PC e PQ e sul polimero di controllo PB. I risultati ottenuti sono stati espressi tramite la seguente equazione:

$$PFA(\%) = \frac{C_x}{C_i} \times 100$$

*Equazione 5.7*

dove  $C_x$  è la concentrazione di AF nella soluzione dopo irraggiamento UV a tempo  $x$  selezionato, mentre  $C_i$  è la concentrazione di una soluzione di AF in assenza irradiazione e tenuta nello stesso tempo al riparo dalla luce.



#### **5.11.11 Valutazione dell'AF in soluzione a pH 1.0 e 7.4**

La quantità di farmaco che dalle matrici impregnate PB, PC e PQ passa in soluzione acquosa a pH 1,0 e 7,4 è stata determinata alle due temperature di riferimento, 25 e 40°C. Circa 10 mg di ciascuna matrice impregnata con AF sono stati sospesi in 10 ml di una soluzione di HCl (0,1 mol/l, pH 1,0) o tampone fosfato ( $10^{-3}$  mol/l, pH 7,4) per 24h e, a intervalli di tempo stabiliti sono stati prelevati 2,0 ml di soluzione e analizzati mediante HPLC. I campioni provenienti dalle soluzioni acide sono stati neutralizzati prima della determinazione HPLC. Test di degradazione mediante irraggiamento UV.

In esperimenti separati, circa 20 mg di ciascun idrogel impregnato con AF (PB, PC e PQ) sono stati sospesi in 10 ml di soluzione a pH 1,0 (HCl 0,1 mol/l) e 7,4 (PBS  $10^{-3}$  mol/l) a 25°C per 24 h sotto irraggiamento UV. A intervalli di tempo stabiliti sono stati prelevati 2,0 ml di soluzione e analizzati mediante HPLC. I campioni provenienti dalle soluzioni acide sono stati neutralizzati prima della determinazione HPLC. Lo stesso saggio è stato effettuato a 40°C ponendo i campioni in un bagno termostato. Le condizioni di degradazione sono state preventivamente testate su soluzioni standard di AF libero.

#### **5.11.12 Studi di riutilizzo della matrici sintetizzate**

La possibilità di riutilizzare gli idrogel antiossidanti nella protezione di AF da fenomeni ossidativi è stata valutata effettuando gli esperimenti per cinque cicli successivi ai valori di pH e temperatura precedentemente testati. Dopo ogni ciclo, gli idrogel sono stati estensivamente lavati con PBS (0,1 M, pH 8,0) e acqua per rimuovere ogni traccia di AF e i solventi di lavaggio analizzati tramite HPLC. Gli idrogel sono stati quindi seccati fino a peso costante, ricaricati con una nuova soluzione di AF e utilizzati nuovamente.

#### **5.11.13 Analisi statistica**

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato, ed i risultati sono stati in accordo entro  $\pm$  5%, che è il margine di errore standard.

## Bibliografia

- Akhtar M.J., Khan M.A., Ahmad I. *J. Pharmaceut. Biomed.* 31 (2003) 579.
- Akhtar, J.; Ataullah, K.; Ahmad, I.; *J. Pharma. Biomed. Anal.* 31 (2003) 579-588.
- Albin J., Horbett T.A., Miller S.R., Ricker N.L. *J. Control. Rel.* 6 (1987) 267.
- Altimari I., Spizzirri U.G., Iemma F., Curcio M., Puoci F., Picci N. *J. Appl. Polym. Sci.* 125 (2012) 3006.
- Aoki T., Kawashima M., Katono H., Sanui K., Ogata N., Okano T., Sakurai Y. *Macromolecules* 27 (1994) 947.
- Ariza-Carmona L., Martín-Romero M.T., Giner-Casares J.J., Camacho L. *J. Colloid Interface Sci.* 459 (2015) 53.
- Ashford M., Fell J.T., Attwood D., Sharma H., Woodhead P.J. *Int. J. Pharm.* 91 (1993) 241.
- ASTM Year Book Tensile Test on Polymeric Matrix Composites-ASTM 3039/3039 M Standard 1995;08.02:117-125.
- Bassil M., Davenas J., El Tahchi, M. *Sensor Actuat. B. Chem.* 134 (2008) 496.
- Beltran S., Baker J.P., Hooper H.H., Blanch H.W., Prausnitz J.M. *Macromolecules* 24 (1991) 549.
- Bester-Rogac M. *Acta Chim. Slov.* 56 (2009) 70.
- Blanchette J., Kavimandan N., Peppas N.A. *Biomed. Pharmacoth.* 58 (2004) 142.
- Borradale D.C., Kimlin M.G. *Nutrition Rev.* 70 (2012) 414.
- Brannon-Peppas L., Harland R.S. in "Studies in Polymer Science ", Vol . 8, pp. 278 Elsevier Science Pub., Amsterdam, New York, USA (1990).
- Broeke L.T., Ouijja E.H., Bojarski J., Henegouwen G.M.J.B.V. *Photochem. Photobiol.* 59, (1994) 140.
- Bromberg L.E., Ron E.S. *Adv. Drug Del. Rev.* 31(1998) 197.
- Bromberg L.E., Ron E.S. *Adv. Drug Del. Rev.*31 (1998) 197.
- Bunjes H. *Curr. Opin. Colloid In.* 16 (2011) 405.
- Cabodi M., Cross V.L., Qu Z., Havenstrite K.L., Schwartz S., Stroock A.D., *J. Biomed. Mat. Res. B* 82 (2007) 210.
- Carullo G., Cappello A.R., Frattaruolo L., Badolato M., Armentano B., Aiello F. *Future Med. Chem.* 9 (2017) 79.
- Carvalho A.C.L.M., Fonseca T.S., De Mattos M.C., De Oliveira M.C.F., De Lemos T.L.G., Molinari F., Romano D., Serra I. *Int. J.Mol. Sci.* 16 (2015) 29682.

- Castro López M., López de Dicastro C., López Vilariño M., González Rodríguez M. J. *Agric. Food Chem.* 61 (2013) 8462.
- Chatterjee I., Wu D., Gandhi O. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 33 (1986) 486.
- Chen G.H., Hoffman A.S. *Nature* 373 (1995) 49.
- Chen L., Subirade M. *Delivery and Controlled Release of Bioactives in Foods and Nutraceuticals*, N. Garti (Ed.), Woodhead Publishing Ltd., UK, (2008) 251-278.
- Chondrogianni N., Petropoulos I., Grimm S., Georgila K., Catalgol B., Friguet B., Grune T., Gonos E.S. *Mol. Aspects Med.* 35 (2014) 1.
- Cirillo G., Iemma F., Spizzirri U.G., Puoci F., Curcio M., Parisi O.I., Picci N. *J. Biomat. Sci.* 22 (2011) 823.
- Cirillo G., Nicoletta F.P., Curcio M., Spizzirri U.G., Picci N., Iemma, F. *React. Funct. Polym.* 83 (2014) 62.
- Cirillo G., Spataro T., Curcio M., Spizzirri U.G., Nicoletta F.P., Picci N., Iemma F. *Mat. Sci. Eng. C* 48 (2015) 499.
- Cirillo G., Spizzirri U.G., Curcio M., Spataro T., Picci N., Nicoletta F.P., Iemma F. *Int. J. Polym. Mat.* 65 (2016) 442.
- Colombo P., Bettini R., Santi P., Peppas N.A. *Pharm. Sci. Technol. Today* 3 (2000) 198.
- Colombo P., Castellani P.L., Gazzaniga A., Menegatti E., Vidale E. *Principi di Tecnologie Farmaceutiche* 2004, cap. 8, pp.234-248.
- Colomer R., Sarrats A., Lupu R., Puig T. *Curr. Drug Targets* 18 (2017) 147.
- Colon M., Nerin C. *J. Agri. Food Chem.* 60 (2012) 9842.
- Corrales M., Han J.H. Tauscher, B. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44 (2009) 425.
- Crank J., Park G.S. *Diffusion in Polymers* p.452 Academic Press, London, New York (1968).
- Creque H., Langer J. *Diabetes* 29 (1980) 37.
- Curcio M., Puoci F., Spizzirri U.G., Iemma F., Parisi O.I., Cirillo G., Picci N. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 11 (2010) 652.
- Curcio M., Altimari I., Spizzirri U.G., Cirillo G., Vittorio O., Puoci F., Picci N., Iemma F. *J. Nanopart. Res.* 15 (2013) 1581.
- Curcio M., Spizzirri U.G., Cirillo G., Spataro T., Picci N., Iemma F. *Int. J. Polym. Mat.* 64 (2015) 587.
- Dautzenberg H., Gao Y., Hahn M. *Langmuir* 16 (2000) 9070.
- De Kruif C.G., Huppertz T., Urban V.S., Petukhov A.V. *Adv. Col. Int. Sci.* 171 (2012) 36.
- Diamandis E.P., Christolopus T.K. in *"Immunoassay"* Accademic Press, New York (1996).
- Ding Z., Chen G., Hoffman A.S. *J. Biomed. Mater. Res.* 39 (1998) 498.

Edelman E., Kost J., Bobech H., Langer R. J. *Biomed. Mater. Res.* 19 (1985) 67.

Eldridge J.H., Hammon C.J., Muelbroek J.A. *J. Contr. Rel.* 11 (1990) 205.

Elzoghby A.O., El-Fotoh W.S.A., Elgindy N.A. *J. Contr. Rel.* 153 (2011) 206.

Ende M.T., Peppas N.A. *J. Control. Rel.* 48 (1997) 47.

Eyring H. *J. Chem. Phys.* 4 (1936) 283.

Fang Y., Wang G., Zhang R., Liu Z., Xiaohui W., Cao D. *AAPS PharmSciTech.* 15 (2014) 513.

Feil H., Bae Y.H., Kim S.W. *Macromolecules* 25 (1992) 5528.

Firestone B.A., Siegel R.H. *J. Appl. Pol. Sci.* 43 (1991) 901.

Flory P.J. in "Principles of Polymer Chemistry", p. 672, Cornell Univ. Press, Ithaca, New York (1953).

Flory P.J., Renher J. Jr. *J. Chem. Phys.* 11(1943) 512.

Fujishige S., Kubota K., Ando I. *J Phys. Chem.* 93 (1989) 3311.

Fukuwatari T., Fujita M., Shibata K. *Biosci Biotech. Bioch.* (2009) 322.

Gazzaniga A., Iamartino P., Maffione G., Sangalli M.E. *Int. J. Pharm.* 108 (1994) 73.

Gerratana B. *Med. Res. Rev.* 32 (2012) 254.

Ghouchi-Eskandar N., Simovic S., Prestidge, C.A. *Int. J. Pharm.* 384 (2012) 423.

Gil E., Hudson S. *Progr. Polym. Sci.* 29 (2004) 1173.

Gnog J.P., Nitta T., Osada Y. *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 9583.

Göpferich A. *Biomaterials* 17 (1996) 103.

Gupta P., Vermani K., Garg S. *Drug Del. Today* 7 (2002) 569.

Haham M., Ish-Shalom S., Nodelman M., Duek I., Segal E., Kustanovich M., Livney Y.D. *Food Funct.* 3 (2012) 737.

Heller J., Baker R.W., Gale R.M., Rodin J.O. *J. Appl. Pol. Sci.* 22 (1978) 1991.

Heller J., Trescony P.V. *J. Pharm. Sci.* 68 (1979) 919.

Heller J. *J. Control. Rel.* 8 (1988) 111.

Hickey A.S., Peppas N.A. *J. Membr. Sci.* 107 (1995) 229.

Hiriart-Ramirez E., Contreras-Garcia A., Garcia-Fernandez M. J., Concheiro A., Alvarez-Lorenzo C., Bucio E. *Cellulose* 19 (2012) 2165.

Hirotsu S., Hirokawa Y., Tanaka T. *J. Chem. Phys.* 87 (1987) 1392.

Hirotsu S. *Adv. Polym. Sci.* 110 (1993) 1.

Hoffman A.S. *J. Control. Release* 6 (1987) 297.

Hollinger J.O. in "Biomedical Application of Synthetic Biodegradable Polymer", CRC

Hopfenberg H.B., Hsu K.C. *Polym. Eng. Sci.* 18 (1978) 1186.

- Horbett T.A., Kost J., Ratner B.D., Singh M. in "Polymers as Biomaterials ", p 193, Plenum Press, New York (1984).
- Horkay F., Tasaki I., Basser P.J., *Biomacromolecules* 1 (2000) 84.
- Hovgaard L., Brondsted H. J. *Contr. Rel.* 36 (1995), 159.
- Hsu C.S., Block L.H. *Pharm. Res.* 13 (1996) 1865.
- Iemma F., Trombino S., Puoci F., Cirillo G., Spizzirri U.G., Muzzalupo R., Picci N. *Macromol. Biosci.* 5 (2005) 1049.
- Iñiguez-Franco F., Soto-Valdez H., Peraltra E., Ayala-Zavala J.F., Aura, R., Gámez-Meza N. *J. Agric.Food Chem.* 60 (2012) 6515.
- Inoue T., Chen G., Nahamae K., Hoffman A.S. *Polym. Gels Network* 5 (1997) 561.
- Irie M. *Adv. Polym. Sci.* 110 (1993) 49.
- Ishihara K., Muramoto N., Fuji H., Shinihara I. *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* 23 (1985) 2841.
- Ito Y., Casolaro M., Kono K., Imamishi Y. *J. Control. Rel.* 10 (1989) 195.
- Jackson N., Cordero N., Stam F. *J. Polym. Sci, Part B: Polym. Phys.* 51 (2013), 1523.
- Jackson N., Verbrugghe P., Cuypers D., Adesanya K., Engel L., Glazer P., Dubruel P., Shacham Y., Mendes E., Herijgers P., Stam F., *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 62 (2015a) 399.
- Jackson N., Stam F. *J. Appl. Polym. Sci.* 10 (2015b) 1002.
- Jin S., Gu J., Shi Y., Shao K., Yu X., Yue G., Jin S. *Eur. Polym. J.* 49 (2013) 1871.
- Juzeniene A., Tam T.T., Iani V., Moan J. *Free Radical Bio. Med.* 47 (2009) 1199.
- Kaneko Y., Nakamura S., Sakai K., Kikuchi A., Aoyagi T., Sakurai Y., Okano T. *Polym. Gels Network* 6 (1998) 333.
- Kaneko Y., Saki K., Kikuchi A., Sakurai Y., Okano T. *Macromol. Symp.* 109 (1996) 41.
- Kashyap N., Kumar N., Ravi Kumar M.N.V. *Crit. Rev. Ther. Drug Car. Syst.* 22 (2005) 107.
- Katz Y., Rajuan N., Goldberg M., Cohen A., Heyman E., Leshno M. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123 (2009) S211.
- Khalilian M.H., Mirzaei S., Taherpour A.A. *Journal Mol. Model.* 22 (2016) Article number 270
- Kim S.W., Bae Y.H. in "Transport Process in Pharmaceutical Systems" p 547 M.Dekker, New York (2000).
- Kim B., La Flamme K. Peppas N.A. *J. Appl. Pol. Sci.* 89 (2003) 1606.
- Klouda L., Mikos A.G. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (2008) 34.
- Korotych O., Samchenko Yu., Boldeskul I., Ulberg Z., Zholobak N., Sukhodub L. *Mater. Sci. Eng. C* 33 (2013) 892.

Kost J., Noecker E., Kunica E., Langer R. J. *Biomed. Mater. Res.* 19 (1986) 935.

Kost J., Wolfrum R., Langer R. J. *Biomed. Mater. Res.* 21 (1987), 1367.

Kost J., Leong K., Langer R. *Makromol. Chem. Makrom. Symp.* 19 (1988) 275.

Kost J., Langer R. *Adv. Drug Del. Rev.* 46 (2001) 125.

Kreuter J. *Adv. Drug Del. Rew.* 7 (1991) 71.

Kuckling D., Adler H.J., Arndt P.K.F., Ling L., Habicher W.D. *Macromol. Chem. Phys.* 201 (2000) 273.

Kulkarni R.V., Sa B. S. *Appl. Biomater. Biomech.* 13 (2009) 1865.

Kulkarni A.R., Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Dave A.M., Mehta M.H. *J. Control. Release* 63 (2000) 97.

Kurisawa M., Terano M., Yui N. *J. Biom. Sci. Polym. Ed.* 8 (1997) 691.

Langer R., Peppas N.A. *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. Pys.* 61 (1983) C23.

Langer R., Tirrell D.A. *Nature.* 428 (2004) 487.

Liu D., Tian H., Zhang L. *J. Appl. Polym. Sci.* 106 (2007) 130.

Lopez de Dicastillo C., Nerin C., Alfaro P., Catala R., Gavara R. *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 7832.

Lopez de Dicastillo C., Gómez-Estaca J., Catala R., Gavara R. *Food Chem.* 131 (2012) 1376.

Lorente C., Petroselli G., Dántola M., Oliveros E., Thomas A.H. *Pteridines* 22 (2011) 111.

Maincent P., Le Verge R., Sado P., Couvreur P., Devissaguet J.P. *J. Pharm. Sci.* 75 (1986) 955.

Mamada A., Tanaka T. Kungwachakun D., Irie M. *Macromolecules* 23 (1990) 1517.

Mayet N., Choonara Y. E., Kumar P., Tomar L. K., Tyagi C., Du Toit L. C., Pillay V. *J. of Pharm. Sci.* 103 (2014) 2211.

Mehta P., Bhayani D. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 136 (2017) 111.

Minghonga W., Bao B., Chen J., Xu Y., Zhou S., Ma Z.-T. *Rad. Phys. Chem.* 56 (1999) 341.

Miyata T., Asami N., Uragami T. *Nature* 399(1999) 766.

Miyata T., Uragami T., Nakamae K. *Adv. Drug Del. Rev.* 54 (2002) 79.

Morales D., Palleau E., Dickeyand M. D., Velez O.D. *Soft Matter* 10 (2014) 1337.

Moura L.I.F., Dias A.M.A., Carvalho E., de Sousa H. *Acta Biomaterialia* 9 (2013) 7093.

Murdan A.S. *J. Control. Release* 92 (2003) 1.

Narasimhan B., Peppas N.A. *J. Pharm. Sci.* 86 (1997) 297.

Narasimhan B., Peppas N.A. *Encyclopedia of Controlled drug Delivery* pp. 921, Wiley, New York (1999).

- Off M.K., Steindal A.E., Porojnicu A.C., Juzeniene A., Vorobey A., Johnsson A., Moan J. *Photochem. Photobiol.* 80 (2005) 47.
- Okano T., Yamada N., Okuhara M., Sakai H., Sakurai Y. *Biomaterials* 16 (1995) 297.
- Park K. in “Controlled Release: Challenges and Strategies”. ACS Washington (1997);
- Peppas N.A., Merrill E.W. *J. Polym. Sci., Polym. Chem.* 14, (1976) 441.
- Peppas N.A., Barr-Howell B.D., *Hydrogel in Medicine and Pharmacy*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp 27; (1979).
- Peppas N.A., Meadows D.L. *J. Membr. Sci.* 16 (1983) 361.
- Peppas N.A., Sahlin J.J. *Int. J. Pharm.* 57 (1989) 169.
- Peppas N.A., Langer R. *Science* 263 (1994) 1715.
- Peppas N.A. *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* 2 (1997) 531.
- Peppas N.A., Huang Y., Torres-Lugo M., Lowman A.M. *J. Contr. Rel.* 62 (1999) 81.
- Peppas N.A., Bures P., Leobandung W., Ichikawa H. *Eur J Pharm Biopharm.* 50 (2000) 27-46.
- Peppas N.A. *Int. J. Pharm.* 277 (2004), 11.
- Petrusic S., Lewandowski M., Giraud S., Jovancic P., Bugarski B., Ostojic S., Koncar V. *J. Appl. Polym. Sci.* 124 (2012) 890.
- Pitt C.G. *Pharm. Int.* (1986) 88.
- Pool H., Quintanar D., De Dios Figueroa J., Marinho C., Bechara H., Mendoza S. *J. Nanomat.* 2012 (2012) Article number 145380.
- Prange M.M., Hooper H.H., Prausnitz J.M., *AIChE J.* 35 (1989) 803.
- Price P.E., Fagervik-Morton H., Mudge E.J., Beele H., Ruiz J.C., Nyström T.H., Lindholm C., Maume S., Melby-Østergaard B., Peter Y., Romanelli M., Seppänen S., Serena T.E., Sibbald G., Soriano J.V., White W., Wollina U., Woo K.Y., Wyndham-White C., *Int. Wound J.* 5 (2008) 159.
- Principi T., Goh C.C.E., Liu R.C.W., Winnik F.M. *Macromolecules* 33 (2000) 2958.
- Puoci F., Iemma F., Muzzalupo R., Spizzirri U.G., Trombino S., Cassano R., Picci N. *Macromol. Biosci.* 4 (2004) 22.
- Pyrzynska K., Pełkal A. *Anal. Method.* 5 (2013) 4288.
- Reis A.V., Guilherme M.R., Rubira A.F., Muniz E.C. *J. Colloid Interface Sci.* 310 (2007) 128.
- Ribeiro A., Alcântara C.S., Darder M., Aranda P., Araújo-Moreira F.M., Ruiz-Hitzky E. *Int. J. Pharm.* 463 (2014) 1.
- Ritger P.L., Peppas N.A. *J. Control. Release* 5 (1987) 23.

Sairam M., Babu V.R., Naidu B.V.K., Aminabhavi T.M. *Int. J. Pharm.* 320 (2006) 131.

Sawahata K., Hara M., Yasunaga H., Osada Y. *J. Contr. Rel.* 14 (1990) 253.

Scalia S., Marchetti N., Bianchi A. *Molecules* 18 (2013) 574.

Schild H.G. *Prog. Polym. Sci.* 17 (1992) 163.

Seok Gil E., Hudson S.M. *Prog. Polym. Sci.* 29 (2004) 1173.

Serres A., Baudys M., Kim S.W. *Pharm. Res.* 13 (1996) 196.

Shemesh M., Zilberman M. *Acta Biomaterialia* 10 (2014) 1380.

Shiga T., Kurauchi T. *J. of Appl. Polym. Sci.* 39 (1990) 2305.

Shiga T., Hirose Y., Okada A., Kurauchi T. *J. Appl. Poly. Sci.* 46 (1992) 635.

Shiwen Y., Genqui L., Feihua X. *J. Macromol. Sci. A Pure Appl. Chem.* 48 (2011) 198.

Songa F., Zhanga L.M., Yangb C., Yanb L. *Int. J. Pharm.* 23 (2009) 41.

Spizzirri U.G., Peppas N.A. *Chem. Mat.* 17 (2005) 6719.

Spizzirri U.G., Iemma F., Puoci F., Cirillo G., Curcio M., Parisi O.I., Picci N. *Biomacromolecules* 10 (2009) 1923.

Spizzirri U.G., Parisi O.I., Iemma F., Cirillo G., Puoci F., Curcio M., Picci, N. *Carbohydr. Polym.* (2010) 79 333.

Spizzirri U.G., Iemma F., Puoci F., Xue F., Gao W., Cirillo G., Curcio M., Parisi O.I., Picci N. *Polym. Adv. Technol.* 22 (2011a) 1705.

Spizzirri U.G., Altimari I., Puoci F., Parisi O.I., Iemma F., Picci N. *Carbohydr. Polym.* 84 (2011b) 517.

Spizzirri U.G., Iemma F., Altimari I., Curcio M., Puoci F., Picci N. *J. Mater. Sci.* 47 (2012) 3648.

Spizzirri U.G., Hampel S., Cirillo G., Nicoletta F.P., Hassan A., Orazio V., Picci N., Iemma F. *Int. J. Pharm.* 448 (2013a) 115.

Spizzirri U.G., Cirillo G., Curcio M., Altimari I., Picci N., Iemma, F. *React. Funct. Polym.* 73 (2013b) 1030.

Spizzirri U.G., Cirillo G., Curcio M., Spataro T., Picci N., Iemma F. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 41 (2015) 2006.

Steindal A.H., Juzeniene A., Johnsson A., Moan J. *Photochem. Photobiol.* 82 (2006) 1651.

Steindal A.H., Tam T.T.T., Lu X.Y. Juzeniene A., Moan J. *Photochem. Photobiol.* 7 (2008) 814.

Suzuki A., Tanaka T. *Nature* 346 (1990) 345.

Suzuki A., Ishii T., Maruyama Y. *J. Appl. Phys.* 80 (1996) 131.

Szabó P., Zelkó R. Antal, I. *Curr. Pharm. Design* 22 (2016) 5019.



- Tam T.T.T., Juzeniene A., Steindal A.H., Iani V., Moan J. J. Photochem. Photobiol. B. 94 (2009) 201.
- Tanaka T. Phys Rev Lett 40 (1978) 820.
- Tátraaljai D., Kirschweng B., Kovács J., Földes E., Pukánszky B. Eur. Polym. J. 49 (2013) 1196.
- Tátraaljai D., Földes E., Pukánszky B. Polym.Degrad. Stabil. 102 (2014) 41.
- Trombino S., Cassano R., Bloise E., Muzzalupo R., Leta S., Puoci F., Picci, N. Macromol. Biosci. 8 (2008) 86.
- Trombino S., Cassano R., Bloise E., Muzzalupo R., Tavano L., Picci N. Carbohydr. Polym. 75 (2009) 184.
- Tyle P., Agrawala P. Pharm. Res. 6 (1989) 355.
- United States Pharmacopoeia XXIV, National Formulary 19 (Interpharm Press, Inc, Englewood)
- Vakkalanka S.K., Brazel C.S., Peppas N.A. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 8 (1996) 119.
- Venkateswara Rao A., Sandya S., Vasavi P., Sunitha G., Panikumar D.A. J. App. Pharm. 6 (2014) 36.
- von Recum H.A., Kim S.W., Kikuchi A., Okuhara M., Sakurai Y., Okano T J. Biomed. Mater. Res. 40 (1998) 631.
- Vorobey P., Steindal A. E., Off M.K., Vorobey A., Moan J. Photochem. Photobiol. 82 (2006) 817.
- Wang X., Qiu X., Wu C. Macromolecules 31 (1998) 2972.
- Washington R.P., Steinbock O. J.Am. Chem. Soc. 123 (2001) 7933.
- Yong Q., Park K. Adv. Drug Del. Rev. 53 (2001) 321.
- Yong-Hee K., Bae Y.H., Kim S.W., J. Contr. Rel. 28 (1994) 143.
- Yoshida R., Uchida K., Kaneko Y., Sakai K., Kikuchi A., Sakurai Y., Okano T. Nature 374 (1995) 240.
- Zhang H., Gao S. Int. J.Pharm. 329 (2007) 122.
- Zhang X., Li Y., Hu Z., Littler C.L. J. Chem. Phys. 102 (1995) 551.
- Zhao X., Chen W., Liu Z., Guo J., Zhou Z., Crommen J., Moaddel R., Jiang Z. J. Chromat. A 1367 (2014) 99.
- Zhu J., Li P. J. Polym. Sci. A 41 (2003) 3347.
- Zor F., Ozturk S., Bilgin F., Isik S., Cosar A. Burns, 36 (2010) 501.