



# ScuDo

Scuola di Dottorato ~ Doctoral School

WHAT YOU ARE, TAKES YOU FAR

Tesi di Dottorato

Dottorato di Ricerca in Ingegneria Chimica (29° Ciclo)

# **Aerogel ibridi come supporti per farmaci a rilascio modificato**

A cura di

**Cristiano A. Bugnone**

\*\*\*\*\*

**Relatori:**

Prof. Mauro Banchero

Prof. Luigi Manna

Politecnico di Torino

2017

# Dichiarazione

Con la presente dichiaro che, i contenuti e l'organizzazione di questa tesi fanno parte del mio lavoro originale e non compromettono in nessuno modo i diritti di terze parti, inclusi quelli legati alla sicurezza dei dati personali.

Cristiano Agostino Bugnone

2017

\* Questa tesi è presentata nel parziale compimento dei requisiti del grado di **Dottore di Ricerca** nella scuola di dottorato del politecnico di Torino (ScuDo).

*Alla mia famiglia*



## Sommario

L'obiettivo di questa ricerca è la messa a punto di un nuovo metodo di produzione di aerogel ibridi silice/alginato, in forma di microsfele, da utilizzare come supporti per dispositivi farmaceutici a rilascio modificato.

Gli aerogel ibridi sono dei materiali di attuale interesse scientifico e molto promettenti nell'ambito delle applicazioni biomediche (capitolo 1). Tuttavia gli aerogel ibridi silice/alginato non sono ancora stati investigati a fondo, pertanto si è deciso di mettere a punto una nuova tecnica di sintesi che consenta di ottenere delle microsfele con elevate aree superficiali, abbia un'ampia flessibilità sulla scelta delle loro dimensioni e sia anche adattabile ad una produzione industriale. Successivamente si è sviluppata anche una nuova tecnica per rivestirle. Mentre le microsfele non rivestite sono state ideate con l'obiettivo di realizzare, una volta caricate di farmaco, dei dispositivi a rilascio rapido, quelle rivestite sono state pensate come supporti per dispositivi a rilascio prolungato.

La procedura di sintesi è alquanto complessa. Essa richiede la preparazione delle microsfele in forma di idrogel mediante un opportuno processo di gelificazione. Queste devono, poi, essere caricate di farmaco ed essiccate fino ad ottenere le microsfele di aerogel idonee all'applicazione di rilascio farmaceutico desiderato. Onde evitare problematiche legate al collasso della struttura del gel e mantenerne le elevate aree superficiali anche nella struttura essiccata (aerogel), quest'ultimo passaggio deve essere eseguito mediante un opportuno trattamento supercritico.

In primo luogo si è proceduto con la formazione di microsfele di alginato non ibride e senza rivestimento, seguendo una tecnica di emulsione, già consolidata da diversi lavori di letteratura (capitolo 2). Dopo aver individuato e risolto alcune problematiche, sono state apportate delle opportune modifiche a tale tecnica per poter ottenere delle microsfele ibride (capitolo 3). In particolare, la tecnica di emulsione è stata modificata disperdendo in olio una fase liquida costituita da una componente inorganica, che consiste in una miscela liquida acqua e tetrametil orto silicato, e una componente organica formata da una soluzione acquosa di alginato

di sodio. Le due componenti necessitano di essere preparate separatamente prima di essere miscelate e sottoposte al processo di gelificazione.

Per la produzione del rivestimento (capitolo 4), sono state scelte tre opzioni: un aerogel di alginato rinforzato con idrossipropil metil cellulosa, un aerogel di silice rinforzato con idrossipropil metil cellulosa e un aerogel di silice idrofobo. In tutti e tre i casi il rivestimento è stato formato con la tecnica dell'emulsione, disperdendo le microsferi ibride nella miscela che andrà a formare lo strato esterno.

Prima di procedere con l'essiccamento supercritico delle microsferi occorre sostituire l'acqua contenuta nelle porosità dell'idrogel con etanolo. In questo passaggio le microsferi vengono caricate anche con il principio attivo di interesse (ketoprofene). L'essiccamento (capitolo 5) ha richiesto la messa a punto delle condizioni operative più adatte alla sostituzione dell'etanolo con anidride carbonica allo stato supercritico e la successiva rimozione di quest'ultima senza danneggiare il reticolo delle microsferi. In particolare sono state messe a punto due procedure, una per le microsferi "bianche" (ovvero prive di farmaco) e una per le microsferi cariche di ketoprofene.

Le microsferi ibride sono state caratterizzate in termini di distribuzione granulometrica (in forma di idrogel) e di area superficiale (in forma di aerogel) (capitolo 6). Sono anche stati effettuati, inoltre, dei monitoraggi dell'area superficiale per unità di peso in un arco di tempo di 70 giorni per ottenere informazioni sulla conservazione dei campioni nel tempo.

Infine, sono stati effettuati i test di rilascio in vitro condotti a 37°C e pH 1,2 (capitolo 7) in modo da caratterizzare le proprietà dei dispositivi farmaceutici ottenuti. In seguito a questi test, le microsferi ibride non rivestite si sono rivelate degli ottimi candidati come supporti per farmaci a rilascio rapido. Dai test effettuati sulle microsferi rivestite si è osservato che la presenza dell'idrossipropil metil cellulosa nello strato esterno consente di aumentare notevolmente la capacità di carico di principio attivo delle microsferi (soprattutto se abbinata alla presenza di alginato); essa ha, inoltre, un moderato effetto ritardante sul rilascio del ketoprofene. Fra i tre rivestimenti esaminati, quello costituito da silice idrofoba si è rivelato essere il miglior candidato per il rilascio prolungato del principio attivo.



# Indice

Generalità sull'uso di microsfere di aerogel per il rilascio modificato di farmaci.....	- 17 -
1.1 Dispositivi a rilascio modificato.....	- 18 -
1.2 Profili di rilascio.....	- 19 -
1.2.1 Rilascio rapido.....	- 20 -
1.2.2 Rilascio prolungato.....	- 21 -
1.2.3 Rilascio ritardato.....	- 22 -
1.2.4 Profili di rilascio complessi.....	- 23 -
1.3 Carrier farmaceutici.....	- 24 -
1.3.1 Sistemi multistrato.....	- 26 -
1.3.2 Carrier nanostrutturati.....	- 27 -
1.4 Generalità sugli aerogel.....	- 28 -
1.4.1 Fluidi supercritici ed essiccamento.....	- 30 -
1.5 Aerogel per applicazioni biomediche.....	- 33 -
1.5.1 Aerogel di silice.....	- 33 -
1.5.2 Aerogel di alginato di calcio.....	- 36 -
1.5.3 Aerogel ibridi.....	- 40 -
1.6 Incorporazione del principio attivo.....	- 43 -
1.7 Formazione microsfere.....	- 44 -
1.7.1 Microsfere di Ca-Alg.....	- 46 -
1.7.2 Microsfere di silice.....	- 49 -
1.7.3 Microsfere ibride silice/alginato.....	- 50 -



1.7.4 Microsfere multistrato.....	50 -
1.8 Scopo della ricerca.....	51 -
Microsfere di alginato: prove preliminari e risultati della procedura operativa.....	55 -
2.1 Produzione microsfere di Ca-Alg.....	56 -
2.1.1 Materiali.....	56 -
2.1.2 Emulsione con elica marina (metodo di Poncelet).....	56 -
2.1.3 Metodo con ancoretta magnetica (metodo di Liu).....	62 -
2.2 Recupero, lavaggio e scambio solvente.....	65 -
2.2.1 Recupero delle microsfere.....	65 -
2.2.2 Lavaggio delle microsfere.....	69 -
2.2.3 Scambio di solvente.....	70 -
2.3 Conclusioni.....	72 -
Una nuova tecnica per la sintesi di microsfere ibride silice-alginato: prove preliminari e risultati.....	73 -
3.1 Introduzione.....	74 -
3.2 Preparazione fase acquosa.....	74 -
3.2.1 Preparazione componente inorganica.....	75 -
3.2.2 Preparazione componente organica.....	78 -
3.2.3 Miscelazione componente inorganica e componente organica.....	80 -
3.2.4 Scelta pH soluzione tampone.....	81 -
3.3 Formazione, recupero, invecchiamento e scambio solvente.....	82 -
3.3.1 Materiali.....	82 -
3.3.2 Formazione delle microsfere.....	83 -
3.3.3 Recupero e lavaggio microsfere ibride.....	84 -
3.3.4 Invecchiamento e scambio di solvente.....	85 -
3.4 Incorporazione ketoprofene.....	86 -

3.5 Conclusioni.....	88 -
Preparazione del rivestimento.....	91 -
4.1 Introduzione.....	92 -
4.2 Generalità HPMC.....	93 -
4.2.1 Solubilità e gelificazione dell'HPMC.....	95 -
4.2.2 Preparazione della soluzione di HPMC.....	97 -
4.3 Gel di Ca-Alg rinforzato con HPMC.....	98 -
4.3.1 Materiali.....	99 -
4.3.2 Dispersione del CaCO <sub>3</sub> .....	100 -
4.3.3 Formazione rivestimento.....	102 -
4.3.4 Recupero microsfele.....	105 -
4.3.5 Lavaggio e scambio di solvente.....	106 -
4.4 Rivestimento silicato rinforzato con HPMC.....	106 -
4.4.1 Materiali usati.....	106 -
4.4.2 Preparazione soluzione acquosa inorganica.....	107 -
4.4.3 Formazione del rivestimento.....	110 -
4.4.4 Recupero e lavaggio microsfele.....	111 -
4.5 Rivestimento idrofobo di silice.....	112 -
4.5.1 Materiali.....	112 -
4.5.2 Preparazione della soluzione acquosa inorganica.....	113 -
4.5.3 Formazione del rivestimento.....	114 -
4.5.4 Recupero, lavaggio e scambio di solvente.....	114 -
4.6 Conclusioni.....	115 -
Essiccamento supercritico.....	117 -
5.1 Introduzione.....	118 -
5.2 Condizioni di essiccamento.....	118 -
5.3 Descrizione dell'apparecchiatura di essiccamento supercritico.....	121 -

5.4 Sostituzione dell'etanolo.....	123 -
5.4.1 Sostituzione dell'etanolo per le sfere bianche.....	123 -
5.4.2 Sostituzione dell'etanolo per le sfere caricate con ketoprofene.....	125 -
5.5 Conclusioni.....	127 -
Caratterizzazione microsfele.....	129 -
6.1 Introduzione.....	130 -
6.2 Analisi granulometrica.....	130 -
6.2.1 Scelta del modello ottico.....	131 -
6.2.2 Curva di distribuzione granulometrica.....	132 -
6.2.3 Risultati.....	133 -
6.3 Area superficiale.....	140 -
6.3.1 Risultati.....	142 -
6.4 Invecchiamento.....	145 -
6.4.1 Analisi SAXS.....	145 -
6.4.2 Risultati.....	147 -
6.5 Conclusioni.....	148 -
Test di dissoluzione.....	149 -
7.1 Introduzione.....	150 -
7.2 Valutazione della quantità totale di ketoprofene caricato nelle microsfele.....	150 -
7.3 Test di rilascio in vitro.....	152 -
7.3.1 Le prove di dissoluzione secondo lo standard USP.....	152 -
7.3.2 Descrizione sistema di rilascio.....	154 -
7.4 Retta di taratura per le misure spettrofotometriche.....	156 -
7.5 Risultati.....	158 -
7.5.1 Microsfele ibride non rivestite.....	158 -
7.5.2 Microsfele con rivestimento Ca-Alg/HPMC.....	160 -

7.5.3 Microsfere con rivestimento silice/HPMC.....	- 168 -
7.5.4 Microsfere con rivestimento di silice idrofobo.....	- 170 -
7.6 Considerazioni finali.....	- 173 -
Conclusioni.....	- 175 -
Bibliografia.....	- 177 -

## Lista delle Figure

Figura 1.1 – Esempio di dispositivi farmaceutici monolitici (sinistra) e particolari (destra).....	19
Figura 1.2 – Profili di rilascio base dei dispositivi a rilascio modificato.....	20
Figura 1.3 – Comparazione dei livelli ematici di principio attivo rilasciato da formulazioni a rilascio prolungato e convenzionali. Fonte: Lee, J. H. e Yeo, Y., Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. Chem. Eng. Sci. (2014).....	21
Figura 1.4 – Rilascio ad impulsi di due dosi di ibuprofene, il test è stato eseguito a 37°C e pH 7,2. Fonte: U, Conte, P. Colombo, A. Gazzaniga, M.E. Sangalli, P. Giunchedi – Drug Dev. Ind. Pharm., 15 14-16 (1989) .....	23
Figura 1.5 – Profilo di rilascio di un dispositivo a rilascio sequenziale per la cura della parodontite. Fonte: S.C. Sundararaj et al. / Biomaterials 34 (2013) 8835-8842.....	24
Figura 1.6 – Rappresentazione schematica di un sistema matriciale (sinistra) e uno a serbatoio (destra).....	25
Figura 1.7 – Esempio di un sistema multistrato per il rilascio ad impulsi o sequenziale.....	26
Figura 1.8 – Diagramma di fase pressione/temperatura per un fluido generico Fonte: Z. Knez et al. / Energy 77 (2014) 235-243.....	30

Figura 1.9 – Schematizzazione del processo di essiccamento supercritico a bassa temperatura. Fonte: Soleimani Dorcheh e Abbasi, journal of materials processing technology 199 (2008) 10–26.....	32
Figura 1.10 – Diagramma di stato ternario TEOS-acqua-etanolo. Fonte: Soleimani Dorcheh e Abbasi, journal of materials processing technology 199 (2008) 10–26.....	34
Figura 1.11 – Struttura molecolare delle catene di alginato. Fonte J.P. Paques et al. / Advances in Colloid and Interface Science 209 (2014) 163–17.....	37
Figura 1.12 – Formazione del reticolo di Ca-Alg. Fonte: J.P. Paques et al. / Advances in Colloid and Interface Science 209 (2014) 163–171.....	39
Figura 1.13 – Tecniche di produzione gel in microsfere con l’intervallo dei diametri delle microsfere sui quali sono applicabili. Fonte: J.P. Paques et al. / Advances in Colloid and Interface Science 209 (2014) 163–171.....	45
Figura 1.14 – Concentrazione degli ioni $Ca^{2+}$ in soluzione liberati in funzione del pH per diversi sali insolubili. Fonte: D. Poncelet et al.: Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 155 (1999) 171–176.....	47
Figura 1.15 – Curve di rilascio dell’acido nicotinico impregnato nelle microsfere multistrato di Ca-Alg, come si può vedere l’aumento del numero degli strati riduce la velocità di rilascio del principio attivo. Fonte: A. Veronovski et al. / J. of Supercritical Fluids 79 (2013) 209–215.....	51
Figura 2.1 – Acido acetico in olio di paraffina.....	59
Figura 2.2 – Geometria del sistema di emulsione.....	61
Figura 2.3 – Microsfere essiccate prodotte con becher di diametro interno di 100 mm e con becher di diametro interno 70 mm.....	62
Figura 2.4 – Geometria dei sistemi di emulsione per stabilire la lunghezza dell’ancoretta magnetica più appropriata.....	64
Figura 2.5 – Microsfere ottenute con ancoretta di 29 mm e 44 mm.....	64

Figura 2.6 – Andamento della conducibilità elettrica al variare del rapporto di fase dell'emulsione. Fonte: Poncelet et al., Colloids and Surfaces: A Physicochem. Eng. Aspects 155 (1999) 171–176.....	66
Figura 2.7 – Microsfere ottenute dalla fase di recupero. Come si può vedere, a causa delle eccessive impurezze, le microsfere hanno l'aspetto di una poltiglia.....	67
Figura 2.8 – Sistema di recupero delle microsfere.....	68
Figura 2.9 – Microsfere recuperate con la nuova procedura.....	70
Figura 2.10 – Alcolgel di Ca-Alg prodotto in laboratorio.....	71
Figura 3.1 – Geometria del sistema di reazione per la reazione di idrolisi della fase inorganica per la formazione delle microsfere ibride.....	76
Figura 3.2 – Nell'immagine di sinistra si può vedere il sistema bifasico mentre, nell'immagine di destra, il sistema è diventato monofasico.....	77
Figura 3.3 – Migrazione dell'aria accumulata durante la dispersione del CaCO <sub>3</sub> nella componente organica verso la superficie con la formazione di una schiuma.....	79
Figura 3.4 – Geometria del sistema per la preparazione della componente organica.....	80
Figura 3.5 – Influenza del pH sulla velocità di reazioni di idrolisi e condensazione degli alcossidi silicei. Fonte: Soleimani Dorcheh e Abbasi, 2008, journal of materials processing technology, 199, 10–26.....	82
Figura 3.6 – Microsfere ibride ottenute in laboratorio dopo le operazioni di recupero e lavaggio.....	85
Figura 3.7 – Microsfere ibride a fine procedura di scambio di solvente.....	86
Figura 4.1 – Molecola della cellulosa e dell'HPMC.....	94
Figura 4.2 – Gel ottenuto da una soluzione di HPMC al 10% w riscaldata a 90°C.....	95

Figura 4.3 – Fasi della gelificazione di una soluzione di HPMC al 10% <sub>w/w</sub> .....	97
Figura 4.4 – Esito di una prova di formazione di microsfere di Ca-Alg/HPMC.....	100
Figura 4.5 - Acqua di lavaggio usata per le microsfere rivestite, la schiuma in superficie è data dall'HPMC rilasciate dalle microsfere.....	104
Figura 5.1 – Due campioni di aerogel ibridi Si/Ca-Alg ottenuti essiccando lo stesso volume di alcolgel ed eseguendo la depressurizzazione a 5 bar/min (sinistra) e 1 bar/min (destra).....	120
Figura 5.2 - Apparecchiatura utilizzata per l'essiccamento supercritico.....	122
Figura 5.3 – Cilindretto di vetro riempito di microsfere di alcolgel pronte per essere inserite nell'autoclave.....	123
Figura 5.4 – Rappresentazione schematica delle microsfere inserite in R.....	124
Figura 6.1 – Modello di diffrazione di un raggio laser che colpisce una particella in sospensione. Fonte: A. Eddie Setekleiv, H.F. Svendsen / Measurement 55 (2014) 133–141.....	131
Figura 6.2 – Curva di distribuzione granulometrica ottenuta da un campione di microsfere ibride prodotte con una velocità di rotazione dell'elica marina pari a 400 rpm.....	132
Figura 6.3 – Confronto curve di distribuzione granulometrica (●) IB200; (■) IB400; (▲) IB600.....	136
Figura 6.4 – Curve di distribuzione granulometrica ottenute da microsfere di Ca-Alg prodotte con le stesse condizioni di emulsione delle prove sperimentali (◆) 200 rpm; (■) 400 rpm; (▲); 600 rpm. Fonte: C.M. Silva et al. / International Journal of Pharmaceutics 311 (2006) 1–10.....	137
Figura 6.5 – Curva di distribuzione granulometrica bimodale che si potrebbe ottenere cambiando le condizioni di emulsione. Fonte: Poncelet et al., 1992 / Appl Microbiol Biotechnol (1992) 38, 39-45.....	139



Figura 6.6 – Modelli delle isoterme di adsorbimento. Fonte: Majid Naderi, Surface Measurement Systems, Ltd., Alperton, London, UK, 2015.....	140
Figura 6.7 – Esempio di isoterma di adsorbimento di tipo II. Fonte: <a href="http://openarchive.enea.it/bitstream/handle/10840/4483/RT-2013-7-ENEA.pdf?sequence=2">http://openarchive.enea.it/bitstream/handle/10840/4483/RT-2013-7-ENEA.pdf?sequence=2</a> .....	141
Figura 6.8 - Isoterma di adsorbimento ottenuta da analisi BET delle microsfere ibride delle microsfere ibride prodotte in laboratorio mentendo una velocità di rotazione dell’elica marina pari a 400 rpm.....	143
Figura 6.9 – Schema di un sistema di analisi SAXS. Fonte: <a href="http://coms-nano.jp/coms-nano3/?page_id=622">http://coms-nano.jp/coms-nano3/?page_id=622</a> .....	145
Figura 7.1 – Dimensione della girante a lame utilizzata per i test di dissoluzione imposte dagli standard USP. Fonte: The United States Pharmacopeial Convention © 2011.....	153
Figura 7.2 – Apparato utilizzato per le prove di rilascio.....	155
Figura 7.3 – Rappresentazione schematica del sistema utilizzato per i test di dissoluzione.....	155
Figura 7.4 – Curva di assorbanza molecolare ottenuta da una soluzione acquosa di ketoprofene. ....	156
Figura 7.5 - Retta di taratura del ketoprofene.....	157
Figura 7.6 – Profili di rilascio del campione IB (▲) e del ketoprofene allo stato cristallino (■).....	159
Figura 7.7 – Confronto profili di rilascio dei campioni IB (X); HPMC1 (◆); HPMC2.5 (■); HPMC5 (●); ketoprofene cristallino (▲).....	162
Figura 7.8 – Confronto del profilo di rilascio nel tratto iniziale tra il nucleo (+) e il campione HPMC1 (●).....	163
Figura 7.9 – Profili di rilascio dei campioni IB (X); HPMC2.5 (■); HPMC2.5_a (◆); ketoprofene cristallino (▲).....	166

Figura 7.10 – Profili di rilascio dei campioni IB (X); HPMC2.5 (■); HPMC2.5\_b (◆); ketoprofene cristallino .....168

Figura 7.11 - Curve di rilascio delle microsfele con rivestimento silicato contenente HPMC: (●) IB; (■) SiHPMC; ketoprofene cristallino (▲).....170

Figura 7.12 – Curva di rilascio ottenuta dalle microsfele con rivestimento idrofobo: (●) IB; (■) SiID; ketoprofene cristallino (▲).....172

Fig. 7.13 – Confronto curve di rilascio microsfele ibride rivestite e non rivestite. (×) IB; (■) HPMC2.5; (●) SiID; (◆) SiHPMC; ketoprofene cristallino (▲).....173

## Lista delle Tabelle

Tabella 1.1 – Valori di area superficiale e volume poroso di aerogel di alginato e di silice in forma monolitica e di microsfere Fonte: \* A. Veronovski et al. / Journal of Biomaterials Science 23 (2012) 873–886; \*\*M. Alnaief, I. Smirnova / J. of Supercritical Fluids 55 (2011) 1118–1123.....44

Tabella 1.2 – Valore dell’area superficiale di aerogel di Ca-Alg formati con il metodo diffusivo e il metodo della reticolazione interna. Fonte: \*A. Veronovski et al. /Journal of Biomaterials Science 23 (2012) 873–886; \*\*M. Alnaief et al. /Carbohydrate Polymers 84 (2011) 1011–1018.....49

Tabella 2.1 – Composizione delle fasi in emulsione per la produzione di microsfere da Ca-Alg seguendo il metodo di Poncelet et al.....58

Tabella 2.2 – Parametri di processo per la produzione di microsfere da Ca-Alg seguendo il metodo di Poncelet et al.....58

Tabella 2.3 – Geometria dell’elica marina usata per la produzione delle microsfere.....61

Tabella 2.4 - Composizione delle fasi in emulsione per la produzione di microsfere da Ca-Alg seguendo il metodo do Liu et al.....63

Tabella 2.5 – Parametri di processo per la produzione di microsfere di Ca-Alg seguendo il metodo do Liu et al.....63

Tabella 2.6 - Frazione volumica di etanolo delle soluzioni di scambio di solvente e i relativi tempi di immersione delle microsfere.....71

Tabella 3.1 – Condizioni operative per la reazione di idrolisi della componente inorganica per la preparazione delle microsfere ibride.....77

Tabella 32 – Condizioni operative per la rimozione del metanolo dalla componente inorganica.....78

Tabella 3.3 – Composizione della componente organica.....	80
Tabella 3.4 – Composizione delle fasi in emulsione per la produzione delle microsfele ibride.....	83
Tabella 3.5 – Parametri di processo per la formazione delle microsfele ibride.....	84
Tabella 3.6 - Condizioni operative e quantitativo di ketoprofene caricato in fase di scambio di solvente con una soluzione di etanolo al 3,6% w/w di ketoprofene.....	87
Tabella 4.1 – Classificazione USP dell’HPMC in base ai gruppi sostituenti.....	94
Tabella 4.2 – Valori di $T_{DISS}$ , $T_{CLOUD}$ e $T_{GEL}$ dell’HPMC utilizzata per le prove di formazione delle microsfele rivestite.....	96
Tabella 4.3 – Composizione della soluzione Na-Alg/HPMC.....	99
Tabella 4.4 – Composizione della fase acquosa per la formazione dello strato esterno delle microsfele multistrato.....	102
Tabella 4.5 – Composizione della fase oleosa.....	103
Tabella 4.6 – Parametri di processo per la formazione delle microsfele multistrato.....	103
Tabella 4.7 – Composizione della miscela per la preparazione del rivestimento di silice e HPMC ottenuta dall’unione della soluzione di HPMC con gli altri precursori.....	108
Tabella 4.8 – Composizione della soluzione idroalcolica di HPMC.....	109
Tabella 4.9 – Composizione della miscela dei precursori.....	109
Tabella 4.10 - Composizione della soluzione acquosa inorganica.....	110
Tabella 4.11 – Composizione soluzione acquosa inorganica usata per la formazione dello strato esterno idrofobo.....	113
Tabella 4.12 – Composizione della fase oleosa.....	114

Tabella 5.1 – Solubilità del ketoprofene in sc-CO <sub>2</sub> Fonte: Ahmadi Sabegh et al., 2012, Solubility of ketoprofen in supercritical carbon dioxide, J. of Supercritical Fluids 72 (2012) 191– 197.....	125
Tabella 6.1 – Composizione delle fasi usate per la produzione delle microsfere ibride sottoposte ad analisi granulometrica.....	134
Tabella 6.2 – Variabili di processo mantenute costanti nei processi di formazione delle microsfere ibride sottoposte ad analisi granulometrica.....	134
Tabella 6.3 – Confronto dei diametri medi delle microsfere ibride prodotte a differenti velocità di rotazione della girante.....	135
Tabella 6.4 – Confronto delle variabili statistiche delle curve di distribuzione delle microsfere ibride prodotte a differenti velocità di rotazione della girante.....	135
Tabella 6.5 – Valori dei diametri medi ricavati curve di distribuzione granulometrica ottenute da microsfere di Ca-Alg prodotte con le stesse condizioni di emulsione delle prove sperimentali. Fonte: *C.M. Silva et al. / International Journal of Pharmaceutics 311 (2006) 1–10.....	137
Tabella 6.6 - Risultati delle analisi BET sulle microsfere ibride essiccate.....	143
Tabella 6.7 – Confronto dell’area superficiale e volume poroso totale delle microsfere ibride prodotte in laboratorio con i risultati trovati in letteratura.....	144
Tabella 6.8 – Variazioni nel tempo del rapporto S/V ottenuto per mezzo di analisi SAXS del campione IB400.....	147
Tabella 7.1 – Nomenclatura e descrizione dei campioni sottoposti ai test di dissoluzione.....	151
Tabella 7.2 – Dimensioni standard USP per il recipiente da usare per i test di dissoluzione.....	153
Tabella 7.3 – Condizioni operative dei test di rilascio condotti con un mezzo di dissoluzione acido nel rispetto degli standard USP.....	154

Tabella 7.4 – Concentrazione delle soluzioni di ketoprofene utilizzate per la retta di taratura e il corrispettivo valore di assorbanza molecolare.....	157
Tabella 7.5 – Composizione della fase acquosa utilizzata per la formazione delle microsfele ibride (IB).....	158
Tabella 7.6 – Valori quantità di ketoprofene incorporata e di efficienza di rilascio, e tempi $t_{RIL}$ , $t_{10}$ , $t_{50}$ e $t_{90}$ ottenuti dal campione IB in confronto con il ketoprofene allo stato cristallino.....	159
Tabella 7.7 – Composizione della fase acquosa usata per produrre il rivestimento dei campioni HPMC1, HPMC2.5 e HPMC5.....	160
Tabella 7.8 – Valori quantità di ketoprofene incorporato, efficienza di rilascio e tempi $t_{RIL}$ , $t_{10}$ , $t_{50}$ e $t_{80}$ dei campioni HPMC1, HPMC2.5 e HPMC5 in confronto con le microsfele non rivestite (IB).....	161
Tabella 7.9 – Rapporto HPMC/Na-Alg nella fase acquosa usata per la preparazione del rivestimento delle microsfele ibride.....	164
Tabella 7.10 - Composizione della fase acquosa utilizzata per la formazione del rivestimento del rivestimento del campione HPMC2.5_a.2.....	164
Tabella 7.11 – Valori quantità di ketoprofene incorporata e di efficienza di rilascio, e tempi $t_{RIL}$ , $t_{10}$ , $t_{50}$ e $t_{80}$ dei campioni IB, HPMC2.5 e HPMC2.5_a.....	165
Tabella 7.12 - Composizione della fase acquosa utilizzata per la formazione del rivestimento del campione HPMC2.5_b.....	166
Tabella 7.13 – valori quantità di ketoprofene incorporata e di efficienza di rilascio, e tempi $t_{10}$ , $t_{50}$ , $t_{80}$ e $t_{RIL}$ dei campioni IB, HPMC1, HPMC2.5 e HPMC2.5_b.....	167
Tabella 7.14 – Composizione della fase acquosa inorganica usata per la formazione del rivestimento del campione SiHPMC.....	169
Tabella 7.15 – Valori quantità di ketoprofene incorporata e di efficienza di rilascio, e tempi $t_{10}$ , $t_{25}$ , $t_{50}$ e $t_{RIL}$ del campione SiHPMC e del campione IB.....	169

Tabella 7.16 – Composizione della fase acquosa usate per produrre lo strato esterno di silice idrofobo delle microsfere.....171

Tabella 7.17 – Valori quantità di ketoprofene incorporata e di efficienza di rilascio, e tempi  $t_{10}$ ,  $t_{25}$ ,  $t_{50}$  e  $t_{RIL}$  del campione SiID e del campione IB.....171

Tabella 7.18 – Valori quantità di ketoprofene incorporata, efficienza di rilascio e  $t_{RIL}$  dei campioni IB, HPMC2.5, SiHPMC e SiID.....173

# **Capitolo 1**

## **Generalità sull'uso di microsfere di aerogel per il rilascio modificato di farmaci**



## 1.1 Dispositivi a rilascio modificato

Nell'ambito delle applicazioni farmaceutiche i dispositivi a rilascio modificato per somministrazione orale riscuotono un grande interesse in quanto possono essere realizzati con predeterminate caratteristiche. A seconda del principio attivo d'interesse, oltre a consentire un controllo sul rilascio del principio attivo, esse possono anche permetterne il rilascio in determinate zone del corpo umano, proteggendolo da una sua possibile eliminazione prematura e migliorandone la assimilazione (Pinto, 2010; Siepmann et al., 2012).

Quando un dispositivo farmaceutico attraversa il tratto gastroenterico, incontra delle barriere fisiologiche e biochimiche che potrebbero ridurre gli effetti terapeutici del principio attivo limitandone la sua biodisponibilità. È quindi di attuale interesse scientifico trovare dei provvedimenti per superare tali limitazioni. Come esempio applicativo si potrebbero citare le terapie antitumorali in quanto in questo settore vi è un gran numero di agenti chemioterapici che presentano una bassa biodisponibilità. Dal momento che uno dei fattori che influenzano questo parametro è la velocità di rilascio dell'agente terapeutico, è consuetudine cercare di incrementarla per ottenere una maggior assimilazione dell'agente chemioterapico. Un altro esempio possono essere le terapie prolungate, dove si potrebbe rallentare la velocità del rilascio del principio attivo in modo tale da permetterne una sua costante e continua assimilazione nel tempo, oppure, come nel caso delle terapie per patologie intestinali, vi può essere il caso in cui il dispositivo di rilascio deve attraversare lo stomaco senza rilasciare l'agente terapeutico.

Una delle vie maggiormente investigate per modulare il profilo di rilascio consiste nell'incorporazione di uno o più principi attivi in una matrice solida porosa come, per esempio, un aerogel. In generale i dispositivi farmaceutici a rilascio modificato combinano la scienza farmaceutica con quella dei materiali ed il loro obiettivo principale è focalizzato sul trasporto degli agenti farmaceutici controllando la farmacocinetica e la farmacodinamica (Xia e Pack, 2014; Lovskaya et al., 2015; Debele et al., 2016). La ricerca per lo sviluppo dei dispositivi farmaceutici è anche giustificata da altri aspetti che possono essere (Wilding et al., 1995; Siepmann et al., 2012; Hacene et al., 2016):

- miglioramento delle prestazioni dei principi attivi già esistenti, in alternativa alla proposta di nuove molecole. In questo modo si va a migliorare la biodisponibilità di principi attivi noti e già testati nella terapia medica, utilizzando dosi inferiori rispetto alle forme convenzionali pur ottenendo gli stessi effetti clinici;

- riduzione degli effetti collaterali e del rischio di sovradosaggio;
- aumento del “benessere dei pazienti” tramite la riduzione del numero di somministrazioni di farmaco offrendo migliori effetti terapeutici;
- valore commerciale.

I dispositivi a rilascio modificato per somministrazione orale possono essere classificati in due forme (fig. 1.1):

- monolitica, in questo caso il dispositivo è costituito da una unità singola contenente un'unica dose di uno o più principi attivi;
- particolata, in questo caso il dispositivo è costituito da diverse unità discrete (es. microsfe), che possono essere uguali tra loro oppure suddivise in gruppi dotati ciascuno di specifiche caratteristiche.

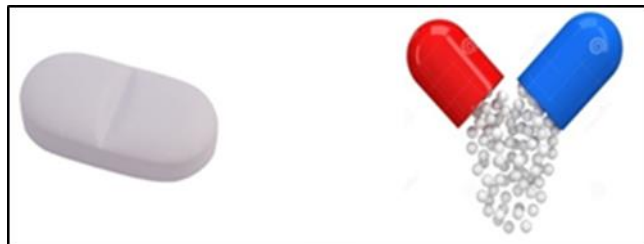


Figura 1.1 – Esempio di dispositivi farmaceutici monolitici (sinistra) e particolati (destra).

Nonostante sia possibile modulare il rilascio con ambedue i formati, i sistemi particolati sono preferibili in quanto è possibile aumentare la superficie di principio attivo esposta ai fluidi gastrointestinali migliorandone la biodisponibilità; inoltre la forma particolata aumenta la flessibilità d'impiego del dispositivo farmaceutico rendendolo idoneo anche ad altri tipi di somministrazione (García-González et al., 2011).

## 1.2 Profili di rilascio

Con i dispositivi a rilascio modificato, in linea di principio, è possibile modulare la cessione del principio attivo secondo infiniti profili. Tutti i potenziali profili di rilascio sono il risultato delle combinazioni dei seguenti profili di base (fig. 1.2):

- rilascio rapido;
- rilascio prolungato;
- rilascio ritardato.

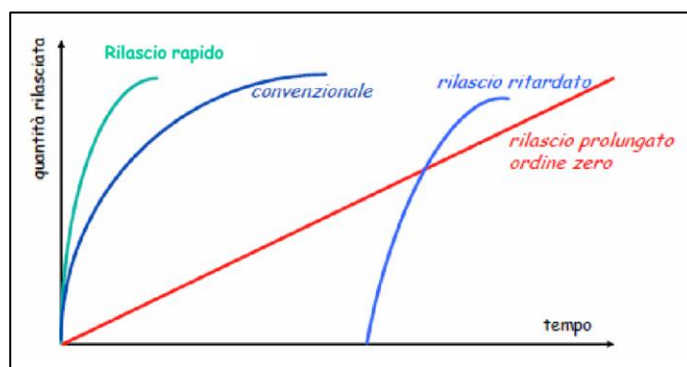


Figura 1.2 – Profili di rilascio base dei dispositivi a rilascio modificato.

### 1.2.1 Rilascio rapido

Per quanto riguarda l'efficacia dei trattamenti farmacologici, è molto importante che il principio attivo abbia un'alta biodisponibilità. Gli agenti terapeutici con una scarsa solubilità (come per esempio gli agenti chemioterapici o alcuni antinfiammatori) hanno, di conseguenza, una bassa biodisponibilità. In altre parole, se un farmaco è scarsamente solubile in acqua, soltanto una sua piccola parte potrà essere assimilata dal corpo umano con il rischio che la terapia non sia efficace (J. Siepmann e F. Siepmann, 2013).

Per tutti questi principi attivi si potrebbe ricorrere ai sistemi a rilascio rapido: in questo modo l'agente terapeutico viene disperso finemente in una matrice solida. Il principio attivo disperso, rispetto alla sua forma cristallina, presenta una più alta superficie esposta ai fluidi gastrointestinali comportando una maggiore solubilità. Per modulare la velocità di dissoluzione dei principi attivi solitamente si ricorre all'equazione di Noyes-Whitney (Willson e Sokoloski, 2004; Dokoumetzidis e Macheras, 2006; J. Siepmann e F. Siepmann, 2013):

$$\frac{dM}{dt} = \frac{DS}{h} \times (C_s - C) \quad (1.1)$$

dove:

- $dM/dt$  è la velocità di dissoluzione del solido;

- $M$  è la massa di solido disciolta al tempo  $t$ ;
- $D$  è il coefficiente di diffusione del soluto nella soluzione;
- $S$  è la superficie del solido esposta al solvente;
- $h$  è lo spessore dello strato di diffusione
- $C_s$  è la solubilità del solido alla temperatura operativa;
- $C$  è la concentrazione della soluzione al tempo  $t$ .

Come si può vedere dall'equazione (1.1), la velocità di dissoluzione del principio attivo aumenta all'aumentare della superficie esposta al solvente in cui avviene il rilascio.

### 1.2.2 Rilascio prolungato

Questi sistemi sono d'interesse nel campo delle terapie prolungate nel tempo. In queste situazioni sarebbe utile un dispositivo che rilasci il principio attivo lentamente mantenendo la sua assimilazione costante nel tempo, rimanendo all'interno degli indici terapeutici (MTC, ovvero minima concentrazione tossica e MEC, ovvero minima concentrazione efficace, fig. 1.3), in altre parole, non ci sono periodi di sottodosaggio e sovradosaggio durante la terapia. In questi dispositivi la velocità di rilascio segue una cinetica di ordine zero e le proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche sono stazionarie. (Siepmann et al., 2012).

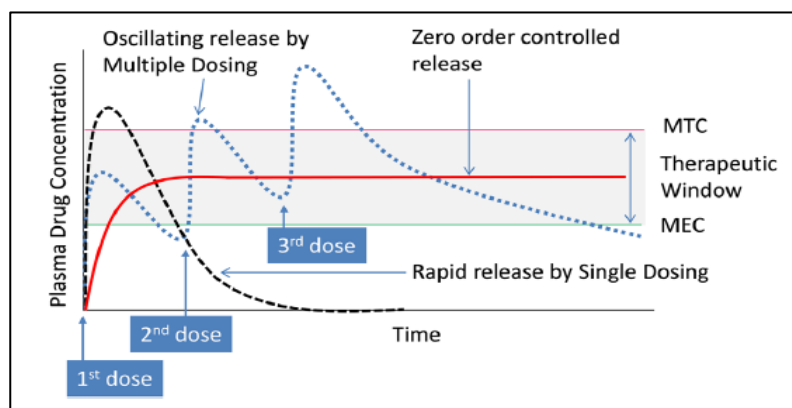


Figura 1.3 – Comparazione dei livelli ematici di principio attivo rilasciato da formulazioni a rilascio prolungato e convenzionali. Fonte: Lee, J. H. e Yeo, Y., Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. Chem. Eng. Sci. (2014).

Per ottenere una cinetica di rilascio di ordine zero si può agire disperdendo il principio attivo in una matrice solida che in seguito viene rivestita con una membrana permeabile sia all'acqua che al farmaco (i dispositivi di questo genere sono detti sistemi a serbatoio, vedere paragrafo 1.3). Quando il dispositivo si trova a contatto con i fluidi gastrointestinali, il farmaco, che si dissolve fino a raggiungere le condizioni di saturazione, diffonde dal cuore della matrice fino alla membrana ed in seguito diffonde attraverso la membrana. Tuttavia, con un sistema del genere, il rilascio non è perfettamente costante in quanto, quando la quantità di principio attivo rimasto all'interno del dispositivo è tale da non raggiungere le condizioni di saturazione, la velocità di rilascio comincerà a decrescere. Per ottenere un rilascio costante fino al completo consumo del principio attivo sarebbe più opportuno usare una pompa osmotica, in questo modo, nella matrice solida, vengono dispersi insieme al principio attivo degli eccipienti (solitamente polimeri solubili in acqua) che, in seguito all'idratazione dovuta al contatto con i fluidi gastrici, si rigonfiano facendo mantenere, all'interno del sistema, un livello di pressione osmotica tale da assicurare un rilascio costante del principio attivo anche quando non vi sono più le condizioni di saturazione (Siepmann et al., 2012).

### **1.2.3 Rilascio ritardato**

I dispositivi a rilascio ritardato sono utili nei casi come le terapie di patologie intestinali e i trattamenti con farmaci sensibili agli enzimi presenti nei fluidi gastrici. In questi dispositivi il principio attivo deve essere rilasciato dopo aver oltrepassato lo stomaco.

Le più comuni strategie consistono nella dispersione dell'agente terapeutico in una matrice solida che viene in seguito rivestita con una membrana di natura acida in modo tale che quando si trova a contatto con i fluidi gastrici questa si restringe, ostacolando il rilascio del principio attivo, mentre, quando si trova a contatto con i fluidi intestinali, questa si erode o si rigonfia rilasciando il principio attivo. Si potrebbe prendere come esempio un rivestimento fatto con il copolimero idrossipropil metilcellulosa-acetato maleato che si scioglie in soluzioni acquose a valori di pH compresi nell'intervallo 3–3,7 risultando così idoneo a rivestire un dispositivo che debba svolgere il rilascio nel duodeno. Come altro esempio si potrebbero citare i rivestimenti che interagiscono con determinate flore batteriche e sono in grado di rilasciare il principio attivo in determinate zone dell'intestino (Pinto, 2010).

### 1.2.4 Profili di rilascio complessi

Nel paragrafo 1.2 è stato detto che, combinando i profili di rilascio di base, si possono creare un'infinità di profili più complessi, come esempi applicativi si potrebbero menzionare:

- rilascio bimodale;
- rilascio a impulsi;
- rilascio sequenziale.

Con il rilascio bimodale, che è una combinazione del rilascio rapido con il rilascio prolungato, si può realizzare un dispositivo che rilasci immediatamente una data quantità di principio attivo, accelerando l'insorgere degli effetti terapeutici, per poi seguire una cinetica di ordine zero assicurando concentrazione plasmatica costante dell'agente terapeutico (Streubel et al., 2000).

Il rilascio a impulsi, invece, può essere applicato nel campo dei vaccini, terapie antitumorali e trattamenti delle allergie dove sono spesso richiesti degli impulsi ripetuti per ottenere specifiche risposte biologiche (Gandhi et al., 2015). Esso si ottiene combinando il rilascio rapido con il rilascio ritardato. In figura 1.4 si può vedere un esempio di rilascio ad impulsi di due dosi di ibuprofene. La figura mostra una cessione iniziale di principio attivo che rimane costante per poi aumentare in un secondo momento.

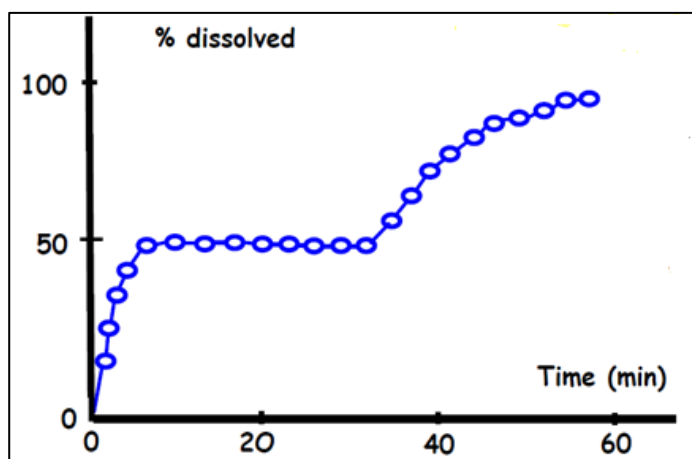


Figura 1.4 – Rilascio ad impulsi di due dosi di ibuprofene, il test è stato eseguito a 37°C e pH 7,2. Fonte: U, Conte, P. Colombo, A. Gazzaniga, M.E. Sangalli, P. Giunchedi – Drug Dev. Ind. Pharm., 15 14-16 (1989).

Il rilascio sequenziale, che si può ottenere combinando il rilascio rapido/prolungato con il rilascio ritardato, è utile nelle terapie dove sono necessari diversi principi attivi, come per esempio i trattamenti antitumorali. In questi casi le cellule cancerogene hanno una crescita aggressiva che è anche dovuta alla formazione di vasi sanguigni nel microambiente tumorale: ciò favorisce sia la crescita della massa tumorale che la diffusione delle metastasi. In questa situazione si può ricorrere ad un dispositivo che rilasci prima un agente angiodisgregatore ed in seguito l'agente chemioterapico (Luo et al., 2014). Un altro campo applicativo possono essere le cure per malattie degenerative dei tessuti; un esempio può essere un dispositivo a rilascio sequenziale per la cura della parodontite dove si potrebbero rilasciare in sequenza diversi agenti terapeutici (fig. 1.5) in modo da svolgere un'azione sia battericida che antiinfiammatoria favorendo la rigenerazione dei tessuti (Sundaraj et al., 2013).

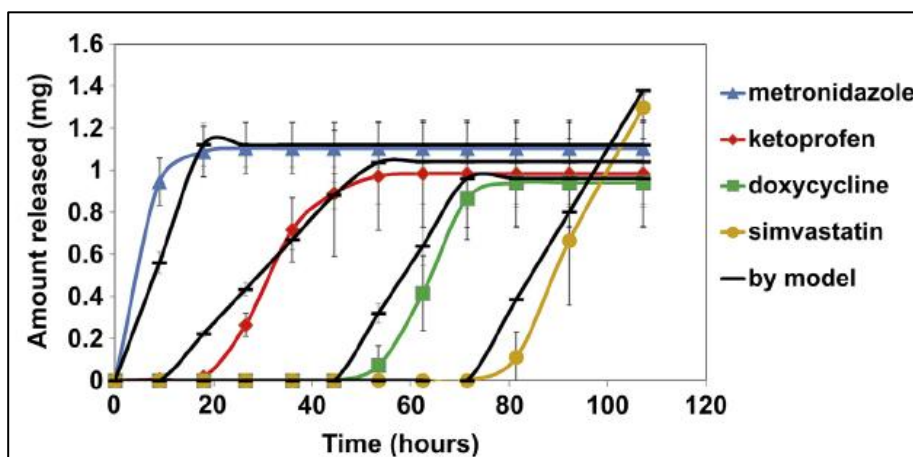


Figura 1.5 – Profilo di rilascio di un dispositivo a rilascio sequenziale per la cura della parodontite. Fonte: S.C. Sundararaj et al. / Biomaterials 34 (2013) 8835-8842.

### 1.3 Carrier farmaceutici

La modalità di rilascio del principio attivo è dovuta esclusivamente alla natura del supporto (o carrier) farmaceutico. Per questo motivo il carrier deve essere scelto

con molta cura. I dispositivi a rilascio modificato solitamente sono in due forme, riportate in figura 1.6 (Lee e Yeo, 2014; Hacene et al., 2016):

- sistemi matriciali;
- sistemi a serbatoio.

I sistemi matriciali sono i sistemi più semplici e sono costituiti da una matrice nella quale è stato disperso il principio attivo; il rilascio dipende dalle proprietà del materiale che costituisce la matrice. I sistemi a serbatoio, invece, sono costituiti da una matrice solida, nella quale è disperso uniformemente il principio attivo, e una membrana che ricopre la matrice. La cinetica di rilascio è dettata dalle proprietà chimico-fisiche della membrana che può avere una solubilità dipendente dal pH (utile per rilasci su sito specifico come, per esempio, le formulazioni gastro-resistenti) oppure può essere insolubile (utile per forme farmaceutiche a rilascio prolungato). In quest'ultimo caso il meccanismo di rilascio del farmaco è di tipo diffusivo (attraverso i micropori della membrana) e segue la legge di Fick.

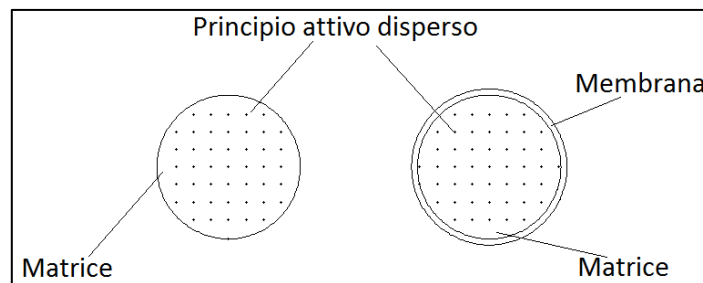


Figura 1.6 – Rappresentazione schematica di un sistema matriciale (sinistra) e uno a serbatoio (destra).

Il rilascio del principio attivo può essere dato da uno o più fra i seguenti meccanismi (Lee e Yeo, 2014):

- erosione, questo meccanismo può avvenire nei sistemi a matrice. In questo caso il sistema è formato da una matrice erodibile e la velocità di rilascio del principio attivo dipende dalla velocità del fronte di erosione della matrice. Le matrici che si erodono completamente non appena sono a contatto con l'acqua sono tipiche dei dispositivi a rilascio rapido.
- rigonfiamento, in questo caso la membrana di un sistema a serbatoio o la matrice stessa del dispositivo farmaceutico è formata da un polimero idrofilo rigonfiabile. Quando l'acqua diffonde nel polimero, quest'ultimo si



rigonfia provocando un rilascio del principio attivo. La velocità di diffusione del farmaco è controllata dalla velocità di diffusione dell'acqua nel polimero e dalla velocità dal rilassamento delle catene polimeriche;

- diffusione, nei sistemi a matrice il principio attivo diffonde attraverso i pori della matrice. In questi sistemi solitamente si ha un elevato rilascio iniziale seguito da una diminuzione della velocità di rilascio. Nei sistemi a serbatoio, invece, il principio attivo diffonde dal nucleo della matrice verso la membrana ed in seguito attraverso la membrana e la forza spingente è data dalla differenza di concentrazione del principio attivo attraverso la membrana;
- controllo osmotico, questo meccanismo può avvenire nei sistemi a serbatoio dove la matrice è costituita da un polimero semi-permeabile. In questo caso il principio attivo è rilasciato per mezzo di un flusso d'acqua che attraversa la membrana e diffonde nella matrice prelevando il principio attivo. Questo meccanismo si adatta ai dispositivi a rilascio prolungato;

I meccanismi prima descritti potrebbero anche avvenire simultaneamente, come nel caso dei sistemi rivestiti da una matrice rigonfiabile dove il rilassamento delle catene polimeriche della matrice porta ad una disgregazione della stessa ed è quindi anche erodibile.

### 1.3.1 Sistemi multistrato

I sistemi multistrato possono essere catalogati come un caso particolare dei precedenti sistemi a matrice e a serbatoio. Questi sistemi possono essere visti come una matrice composita (fig. 1.7) e possono prestarsi a realizzare dei profili di rilascio bimodale, ad impulsi o sequenziale (vedere paragrafo 1.2.4).

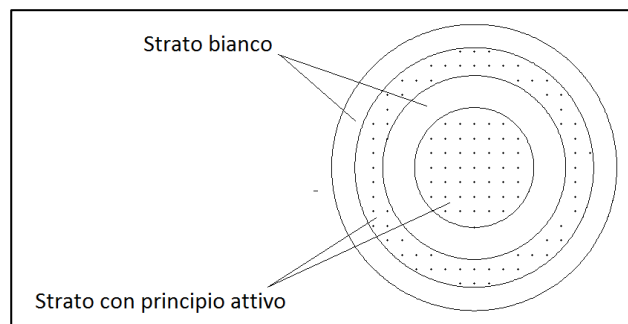


Figura 1.7 – Esempio di un sistema multistrato per il rilascio ad impulsi o sequenziale.

Per ottenere un rilascio bimodale si potrebbe realizzare un sistema provvisto di uno strato esterno composto da una matrice erodibile, che provoca il rilascio rapido iniziale del farmaco, e un nucleo non erodibile nel quale la velocità di rilascio è regolata dalla diffusione del principio attivo al suo interno (Streubel et al., 2000). Alternando uno strato erodibile nel quale è disperso un principio attivo con uno o più strati erodibili bianchi si può ottenere un sistema di rilascio ad impulsi (Gandhi et al., 2015). Se invece ogni strato destinato al rilascio del principio attivo viene caricato con un agente terapeutico diverso si può realizzare un dispositivo a rilascio sequenziale (Sundaraj et al., 2013, 2014).

I sistemi multistrato potrebbero essere impiegati anche per i dispositivi a rilascio prolungato. Per esempio si potrebbe creare una matrice composita formata da due strati, ciascuno dei quali contenente il principio attivo, dove il nucleo è progettato per immagazzinare elevate quantità di principio attivo mentre la funzione principale dello strato esterno è il controllo del rilascio. In alternativa, ricordando che i sistemi a serbatoio non riescono a seguire perfettamente la cinetica di ordine zero, i sistemi multistrato potrebbero essere usati per costruire una pompa osmotica (vedere paragrafo 1.2.4) dove il nucleo è formato del polimero rigonfiabile che assicura un opportuno livello di pressione osmotica, lo strato intermedio è la matrice dove è disperso il farmaco e lo strato esterno la membrana che regola la diffusione del principio attivo.

### **1.3.2 Carrier nanostrutturati**

I materiali con i quali realizzare i supporti farmaceutici devono essere scelti accuratamente. Questi, infatti, devono essere biocompatibili e non tossici, non devono inibire gli effetti terapeutici del farmaco e devono avere una adeguata stabilità inoltre è anche richiesta un'elevata capacità di incorporazione del principio attivo. Tra i possibili supporti che si possono impiegare, i carrier nanostrutturati riscuotono un grande interesse nel campo della ricerca sia per la loro alta capacità di incorporazione di principio attivo, dovuta ad un'elevata area superficiale e un elevato volume poroso, che per le loro proprietà chimico-fisiche che consentono di adattarli a diverse tipologie di somministrazione come per esempio quella orale, transdermica o nasale (Ulker e Erkey, 2014). Esempi di tali materiali sono il carbonio mesoporoso (Zhao et al., 2017), l'idrossiapatite mesoporosa (Shoing et al., 2017), i supporti a base di acido poli(lattico-co-glicolico) (Song et al., 2016) o i vetri bioattivi (Polo et al., 2017).

All'interno dell'ampia scelta tra i materiali da candidare come supporti nanostrutturati si è potuto assistere, negli ultimi decenni, ad un interesse sempre maggiore verso gli aerogel in quanto questi possiedono un'elevata area superficiale che permette di incorporare elevate quantità di principio attivo, sono biocompatibili, possono essere prodotti in qualsiasi forma e dimensione desiderata ed è possibile avere un controllo sulla loro nanostruttura (Ulker e Erkey, 2014). Gli aerogel si prestano sia per dispositivi a rilascio rapido che per quelli a rilascio prolungato (Lovskaya et al., 2015).

## **1.4 Generalità sugli aerogel**

Gli aerogel sono il materiale solido più leggero attualmente esistente, sono caratterizzati da un'elevata area superficiale dovuta ad un'alta porosità e i loro pori sono aperti. Tutte queste caratteristiche, insieme alla loro biocompatibilità, rendono questi materiali degli ottimi candidati nell'ambito delle applicazioni biomediche (Mehling et al., 2009; Ulker e Erkey, 2014). L'utilizzo degli aerogel come dispositivi a rilascio modificato può portare ad un miglioramento delle proprietà farmacocinetiche di principi attivi già conosciuti e ampiamente studiati. Questo è sicuramente vantaggioso rispetto allo sviluppo di nuovi farmaci che è molto oneroso in termini di tempo e costo (Lovskaya et al., 2015).

Gli aerogel sono stati sintetizzati per la prima volta nel 1931 da Samuel Kistler, il quale sosteneva che i gel fossero composti da una fase solida e una liquida indipendenti tra loro. Convinto della veridicità di questa ipotesi, Kistler era del parere che fosse possibile rimuovere la fase liquida ottenendo un solido secco con forma e dimensioni approssimativamente uguali a quelle del gel di partenza. Quest'operazione non è tuttavia possibile da effettuare con una semplice evaporazione della fase liquida. Se si procedesse in questo modo si provocherebbero, all'interno dei pori, delle pressioni capillari molto elevate con il conseguente danneggiamento strutturale del reticolo della fase solida (Fricke e Tillotson, 1997).

I gel essiccati per mezzo di un'evaporazione del solvente a pressione e temperatura ambiente sono chiamati xerogel e, rispetto agli aerogel, si presentano con una minor area superficiale e una drastica riduzione del volume dei pori proprio per i motivi prima descritti (Buisson et al., 2008). A titolo di esempio, gli xerogel di silice presentano un volume poroso approssimativamente pari a  $0,5 \text{ cm}^3/\text{g}$ , valore significativamente inferiore a quello del loro corrispettivo aerogel, che è all'incirca pari a  $2 \text{ cm}^3/\text{g}$  (Ulker e Erkey, 2014).

Al fine di ottenere un aerogel invece di uno xerogel, Kistler decise di inserire un gel di silice in un'autoclave portandolo a condizioni di pressione e temperatura tali da trasformare la sua fase liquida in condizioni supercritiche. Raggiunto questo stato la tensione superficiale si abbassò riducendo notevolmente la pressione capillare all'interno dei pori della fase solida e fu dunque possibile la rimozione del solvente del gel senza provocare danni strutturali alla fase solida (Fricke e Tillotson, 1997).

La procedura generale per la preparazione di un aerogel è fondamentalmente suddivisa in tre stadi (Soleimani Dorcheh e Abbasi, 2008; García-González et al., 2011; Ulker e Erkey, 2014):

- formazione di un gel (idrogel);
- invecchiamento e scambio di solvente;
- essiccamento del gel.

Per la formazione del gel solitamente si ricorre alla tecnica della polimerizzazione sol-gel e, generalmente, si miscelano uno o più precursori che reagiscono grazie alla presenza di un agente reticolante, ottenendo la formazione del reticolo. Solitamente il processo viene condotto in presenza di uno o più catalizzatori, per accelerare la formazione del reticolo, e di un solvente, per rendere il sistema omogeneo nel caso di precursori allo stato solido oppure in presenza di lacune di miscibilità tra i reagenti.

Durante la formazione del gel è anche possibile inserire degli additivi per modificare le caratteristiche del gel. Per esempio, aggiungendo del glicole polietilenico durante la formazione del gel di silice si può avere un maggior controllo sulle dimensioni dei pori e sulla resistenza meccanica del reticolo (Soleimani Dorcheh e Abbasi, 2008; Ulker e Erkey, 2014).

La fase di invecchiamento si rende necessaria in quanto, dopo la formazione del gel, il reticolo di quest'ultimo potrebbe avere una scarsa resistenza meccanica dovuta ad una incompleta conversione dei precursori. L'invecchiamento, dunque, consente di portare a compimento la reticolazione del precursore fornendo al gel una maggiore resistenza meccanica.

Lo scambio di solvente serve per rimuovere l'acqua contenuta nelle porosità del gel sostituendola con un solvente solubile in CO<sub>2</sub> supercritica, in genere etanolo o metanolo. Tale operazione è necessaria in quanto l'essiccamento del gel viene solitamente condotto usando la CO<sub>2</sub> allo stato supercritico (sc-CO<sub>2</sub>). Durante lo scambio di solvente si ha anche l'allontanamento delle impurezze presenti nei pori

del gel (Soleimani Dorcheh e Abbasi, 2008; García-González et al., 2011; Ulker e Erkey, 2014). Il prodotto finale, nel caso in cui la fase liquida sia stata sostituita con un alcol, viene chiamato alcolgel.

Dopo aver convertito l'idrogel in alcolgel è possibile procedere con l'essiccamento in condizioni supercritiche.

### 1.4.1 Fluidi supercritici ed essiccamento

Un fluido viene definito supercritico quando viene compresso e riscaldato al di sopra di una certa pressione e temperatura che individuano il punto critico del fluido (fig. 1.8).

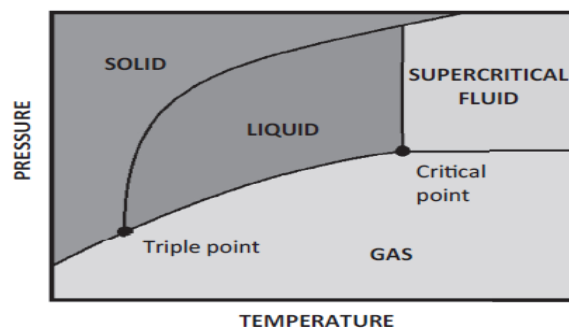


Figura 1.8 – Diagramma di fase pressione/temperatura per un fluido generico  
Fonte: Z. Knez et al. / Energy 77 (2014) 235-243.

Quando si raggiunge lo stato supercritico non vi è più distinzione tra liquido e gas in quanto il fluido acquisisce delle proprietà fisiche intermedie tra questi due stati. Come i gas, i fluidi supercritici occupano tutto il volume che hanno a disposizione e presentano alta diffusività e bassa viscosità ma la loro densità è paragonabile a quella dei liquidi. Questa condizione intermedia fra gas e liquido fa di loro degli ottimi solventi per diverse applicazioni; inoltre, poiché il potere solvente è legato alla densità del fluido, è possibile modularlo effettuando delle estrazioni selettive intervenendo solamente su pressione e temperatura.

I processi legati ai fluidi supercritici sono sostenibili, a basso impatto ambientale e sono considerati degli ottimi sostituti dei solventi organici. A livello industriale sono già usati nel campo alimentare e vengono sempre investigati nuovi possibili campi di utilizzo; ad esempio si potrebbero usare come mezzi per reazioni

chimiche e biochimiche, per processi di estrazione, per la sintesi nuovi materiali, per processi di tintura nell'industria tessile oppure per processi di essiccamento (Ramsey et al., 2009). Per quanto riguarda quest'ultima applicazione, si sfrutta il loro potere solvente nei confronti dei liquidi organici oltre alla capacità di asportare la fase liquida da una matrice solida senza generare tensioni superficiali all'interfaccia solido-gas-liquido che possano danneggiare o modificare la struttura della fase solida (Knez et al., 2014; Kondratenko et al., 2017). In campo farmaceutico possono trovare impiego per processi di cristallizzazione o come mezzo di reazione per prodotti intermedi e finali (Knez et al., 2014).

Il fluido più utilizzato per i processi supercritici è la CO<sub>2</sub> in quanto ha un punto critico relativamente basso (P = 73 bar e T = 31 °C) e presenta anche diversi vantaggi in quanto non è infiammabile, l'alta tensione di vapore (~60 bar) permette una sua totale rimozione dai materiali trattati, è inerte ai processi di ossidazione, ha una bassa viscosità, alta diffusività e una bassa tensione superficiale. La CO<sub>2</sub> ha un momento dipolare nullo dovuto alla simmetria centrale della molecola e una bassa polarizzabilità, tuttavia presenta una separazione di carica tra i due atomi di ossigeno e quello centrale di carbonio comportando un momento quadripolare pari a  $13 \times 10^{-40} \text{C} \times \text{m}^2$ . Per questo motivo è in grado di solubilizzare sia sostanze apolari che alcune sostanze polari tramite interazioni dipolo-quadripolo ma generalmente, a causa della sua bassa costante dielettrica, ha uno scarso potere solvente verso sostanze polari e specie ioniche. Inoltre, è anche in grado di dissolvere i polimeri che hanno deboli interazioni secondarie fra le catene e bassa tensione superficiale (Kondratenko et al., 2017).

Alla luce delle proprietà dei fluidi supercritici prima menzionate, l'essiccamento dei gel per la produzione degli aerogel può avvenire tramite due possibili vie (Soleimani Dorcheh e Abbasi, 2008):

- essiccamento supercritico ad alta temperatura;
- essiccamento supercritico a bassa temperatura.

Il primo metodo, messo a punto da Samuel Kistler sugli aerogel di silice, consiste nel portare allo stato supercritico il solvente contenuto nel gel (solitamente metanolo o etanolo) e successivamente nel rimuoverlo lentamente facendolo sfiatare a temperatura costante. Questo procedimento si può suddividere in tre stadi (Soleimani Dorcheh e Abbasi, 2008):

1. inserimento del campione in autoclave e raggiungimento delle condizioni di temperatura a pressione necessarie per portare il solvente del gel allo stato supercritico;

2. rimozione del solvente mediante un costante decremento della pressione a temperatura costante;
3. raffreddamento e prelievo del campione.

A causa di una temperatura operativa di norma superiore a 200°C (Soleimani Dorcheh e Abbasi, 2008), questa tecnica non è applicabile con gli aerogel composti da materiali termolabili.

L'essiccamento supercritico a bassa temperatura risolve il problema del trattamento di componenti termolabili e si effettua per mezzo di un'estrazione del solvente contenuto nel gel per mezzo della CO<sub>2</sub>. Questo metodo è preferibile al primo in quanto la CO<sub>2</sub>, oltre ad essere meno inquinante dei solventi organici, presenta i vantaggi legati alla sicurezza, ai costi e alla facilità di recupero prima menzionati (Veronovski et al., 2012). Questa tecnica, ideata nel 1985, generalmente può essere suddivisa nei seguenti stadi (Soleimani Dorcheh e Abbasi, 2008):

1. inserimento del campione in autoclave, riempimento e pressurizzazione con CO<sub>2</sub> (75-100 bar);
2. raggiungimento delle condizioni di temperatura (40°C) superiori al punto critico;
3. sostituzione del solvente del gel con la CO<sub>2</sub> seguita da una depressurizzazione a temperatura costante;
4. raffreddamento e prelievo dei campioni.

In figura 1.9 è mostrata la procedura schematica dell'essiccamento supercritico a bassa temperatura.

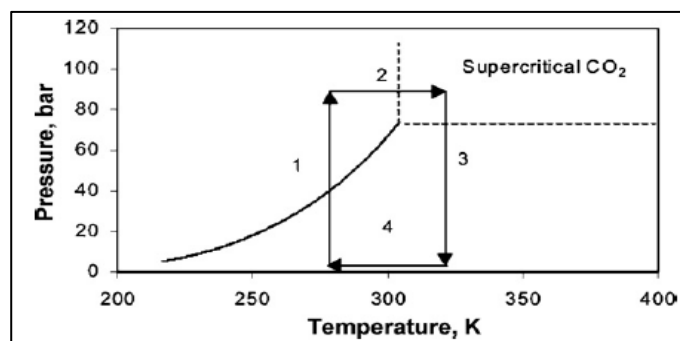


Figura 1.9 – Schematizzazione del processo di essiccamento supercritico a bassa temperatura. Fonte: Soleimani Dorcheh e Abbasi, journal of materials processing technology 199 (2008) 10–26.

## 1.5 Aerogel per applicazioni biomediche

Nel campo delle applicazioni biomediche riscuotono un grande interesse gli aerogel di polisaccaridi (García-González et al., 2011; Veronovski et al., 2012; Ulker e Erkey, 2014; Lovskaya et al., 2015) e di silice (Smirnova et al., 2004; Alnaief e Smirnova, 2010; Ciriminna et al., 2013; Ulker e Erkey, 2014; Lovskaya et al., 2015). Gli aerogel prodotti con questi materiali hanno un'area superficiale compresa tra 72 m<sup>2</sup>/g e 1040 m<sup>2</sup>/g e un volume dei pori compreso tra 0,1 cm<sup>3</sup>/g e 4,57 cm<sup>3</sup>/g (Alnaief e Smirnova, 2010; García-González et al., 2011).

### 1.5.1 Aerogel di silice

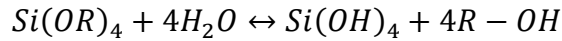
Gli aerogel di silice sono molto apprezzati nell'ambito delle applicazioni biomediche in quanto sono biocompatibili e possiedono un'ampia area superficiale abbinata ad una struttura dei pori aperta (con diametro medio dei pori compreso nell'intervallo 20 – 50 nm). La loro struttura chimica e le loro proprietà sono simili a quelle di un prodotto sviluppato da un'azienda tedesca, la Degussa, nel 1940, chiamato Aerosil. Gli aerogel di silice oggi sintetizzati sono più prestanti di questo prodotto in quanto il valore della loro area superficiale si aggira nell'intorno dei 1000 m<sup>2</sup>/g, mentre l'area superficiale dell'Aerosil era circa pari a 200 m<sup>2</sup>/g. Inoltre le proprietà degli aerogel possono essere controllate tramite opportuni accorgimenti in fase di preparazione del gel (Alnaief e Smirnova, 2010; Ulker e Erkey, 2014).

I precursori maggiormente utilizzati sono gli alcossidi di silice, fra cui il tetrametil orto silicato (TMOS) e il tetraetil orto silicato (TEOS), a causa del loro elevato grado di purezza. In particolare, il TMOS è preferibile al TEOS in quanto dà luogo ad una più rapida reazione di idrolisi e permette di ottenere aerogel con una maggiore area superficiale. Inoltre, il TMOS può essere facilmente combinato con altri alcossidi come, per esempio, il metil trimetil orto silicato (MTMS) con lo scopo, in questo caso, di aumentare l'idrofobia del gel (Soleimani Dorcheh e Abbasi, 2008).

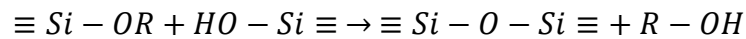
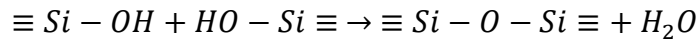
Gli alcossidi di silice, la cui formula generale è Si(OR)<sub>n</sub>, sono caratterizzati dalla presenza del legame covalente Si-O che è in grado di fornire una distribuzione ampia e casuale dei legami ≡Si-O-Si≡ che consentono di formare un reticolo tridimensionale disordinato. Il processo di gelificazione degli alcossidi può essere schematizzato in due stadi (Ulker e Erkey, 2014):



1. reazione di idrolisi



2. reazioni di condensazione



Inizialmente l'alcolossido, a contatto con acqua, subisce un'idrolisi parziale. Dopo essere stato idrolizzato subentra il processo di condensazione dove gli atomi di silicio si legano all'ossigeno mediante la reazione (disidratazione) di due gruppi ossidrilici (con conseguente formazione di una molecola d'acqua) oppure mediante la reazione (dealcolazione) di un gruppo ossidrilico con un alcossido (con conseguente liberazione di una molecola di alcol). Per ottenere la reazione di idrolisi bisogna usare un alcol come solvente, questo serve per colmare la lacuna di miscibilità (fig. 1.10) causata dalla parziale miscibilità tra l'acqua e gli alcossidi (Soleimani Dorcheh e Abbasi, 2008; Ulker e Erkey, 2014).

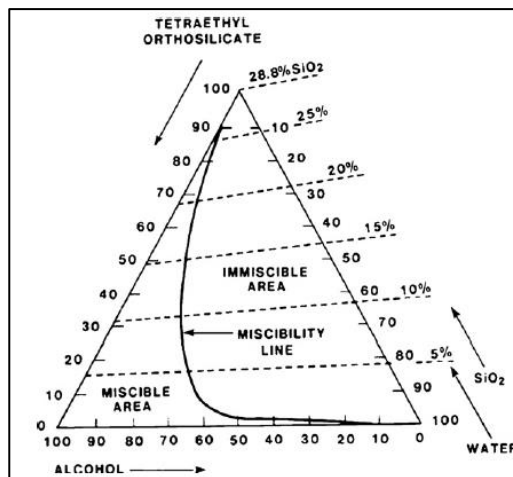


Figura 1.10 – Diagramma di stato ternario TEOS-acqua-etanolo. Fonte: Soleimani Dorcheh e Abbasi, journal of materials processing technology 199 (2008) 10–26.

Le reazioni sopra descritte possono avvenire in tre modi diversi (Soleimani Dorcheh e Abbasi, 2008):

- catalisi acida;
- catalisi basica;
- in due stadi con catalisi acida e basica.

Con la catalisi acida, che in genere viene eseguita usando acido cloridrico, solforico, nitrico, fluoridrico, acetico, ossalico e formico, i tempi di gelificazione sono piuttosto lunghi e aumentano al diminuire del pH; con questa tecnica si formano delle catene lineari aggrovigliate o ramificate casualmente. Con la catalisi basica, che viene effettuata aggiungendo dell'idrossido di ammonio (solitamente in soluzione acquosa  $10^{-2}$  M), si ottiene un reticolo più uniforme e con un elevato volume dei pori.

Le reazioni di idrolisi e condensazione sono influenzate dal pH in maniera differente: l'idrolisi è favorita dai valori bassi ( $< 3$ ), viceversa la condensazione è favorita da un pH basico (8-9). La catalisi a due stadi viene effettuata per promuovere tutte e due le reazioni, in questo modo prima viene aggiunto un catalizzatore acido e in seguito, dopo che è avvenuta la reazione di idrolisi, si aggiunge dell'idrossido di ammonio per accelerare la reazione di condensazione.

Al termine del processo di formazione del gel, il reticolo è principalmente costituito da  $\text{SiO}_2$ , tuttavia, lungo il reticolo saranno ancora presenti dei gruppi Si-OR e Si-OH dovuti alla non completa conversione delle reazioni di idrolisi e condensazione. In questo stato il gel è molto debole e, per aumentare la sua resistenza meccanica è consuetudine procedere ad uno stadio di invecchiamento immergendolo in una miscela acqua/alcol: in questo modo si portano a compimento le reazioni di idrolisi e condensazione fortificando il reticolo. Dopo aver effettuato l'invecchiamento si procede con lo scambio di solvente immergendo il gel in alcol puro, in questo modo vengono rimosse sia l'acqua che le impurità (Ulker e Erkey, 2014).

Gli aerogel di silice possono essere trattati sia con l'essiccamento ad alta temperatura che con quello a bassa temperatura. Con un trattamento ad alta temperatura si ha la conversione dei gruppi ossidrilici residui, acquisiti in seguito alla reazione di idrolisi e non consumati dalla reazione di condensazione, in gruppi alchili (corrispondenti a quelli dell'alcol utilizzato in fase di preparazione del gel)

ottenendo un aerogel con carattere idrofobo. Con l'essiccamento a bassa temperatura, invece, tale fenomeno non si verifica per cui si ottengono degli aerogel idrofili (Soleimani Dorcheh e Abbasi, 2008).

Ai fini del rilascio modificato di farmaci gli aerogel idrofili, che si disgregano completamente non appena vengono immersi in acqua, sono ottimi candidati per i dispositivi a rilascio rapido; viceversa, quelli idrofobi, quando non collassano dopo l'immersione in acqua e se il principio attivo viene rilasciato per diffusione, possono essere utilizzati come supporti per dispositivi a rilascio prolungato. Riguardo l'efficienza di rilascio, gli aerogel di silice idrofili, disgregandosi completamente, rilasciano più del 90% del farmaco caricato, mentre, nel caso degli aerogel idrofobi prodotti con il MTMS, ne viene rilasciato circa il 60% (Smirnova et al., 2004).

### **1.5.2 Aerogel di alginato di calcio**

Di recente, nel campo della ricerca sullo sviluppo dei dispositivi a rilascio modificato, si può assistere ad un notevole interesse riguardo i supporti fabbricati con i polisaccaridi. Questi materiali provengono principalmente da materie prime vegetali (come la cellulosa, l'amido di mais e l'alginato di sodio) e animali (come il chitosano). Il loro successo nel campo delle applicazioni biomediche è da attribuire alla loro elevata disponibilità, basso costo, biocompatibilità, bio-attività e non tossicità. Oltre a quanto appena detto, i polisaccaridi sono provvisti di un elevato numero di gruppi funzionali (come per esempio gruppi idrossilici e carbossilici) che possono essere sottoposti ad opportuni processi chimici modificando le loro proprietà chimico-fisiche con la conseguente possibilità di sviluppare dei dispositivi a rilascio modificato con differenti profili (vedere paragrafo 1.2) (Mehling et al., 2009; García-González et al., 2011; Debele et al., 2016).

Gli aerogel di polisaccaridi presentano dei valori elevati di area superficiale (70-680 m<sup>2</sup>/g) e porosità (90-99%) e questo attribuisce loro sia un'elevata capacità di incorporazione di principio attivo che la capacità di migliorarne la biodisponibilità. La struttura di questi gel è composta da un'alternanza di frazioni cristalline legate tra loro da catene amorfe.

Anche in questo caso gli aerogel vengono prodotti con il processo sol-gel (vedere paragrafo 1.4) e successivo essiccamento con sc-CO<sub>2</sub>. In fase di formazione del gel è molto importante effettuare la giusta scelta sulla quantità di precursore e dell'agente reticolante per poter ottenere degli aerogel con alte prestazioni in quanto

la struttura tridimensionale del gel è controllata principalmente dal grado di reticolazione delle catene del polisaccaride. (García-González et al., 2011).

In ambito farmaceutico un polisaccaride di grande interesse è l'alginato di sodio (Alnaief et al., 2011). Gli alginati sono copolimeri lineari dei residui dell'acido  $\beta$ -D-mannuronico (M) e  $\alpha$ -L-guluronico (G) con legame (1 $\rightarrow$ 4) a blocchi alternati con sequenza casuale (fig. 1.11). Se i gruppi carbossilici si trovano in forma acida, il polisaccaride, chiamato acido alginico, è insolubile in acqua. Quando l'alginato si trova nella forma del sale di sodio dell'acido alginico viene chiamato alginato di sodio (Na-Alg) ed è solubile in acqua (Masuelli e Illanes, 2014).

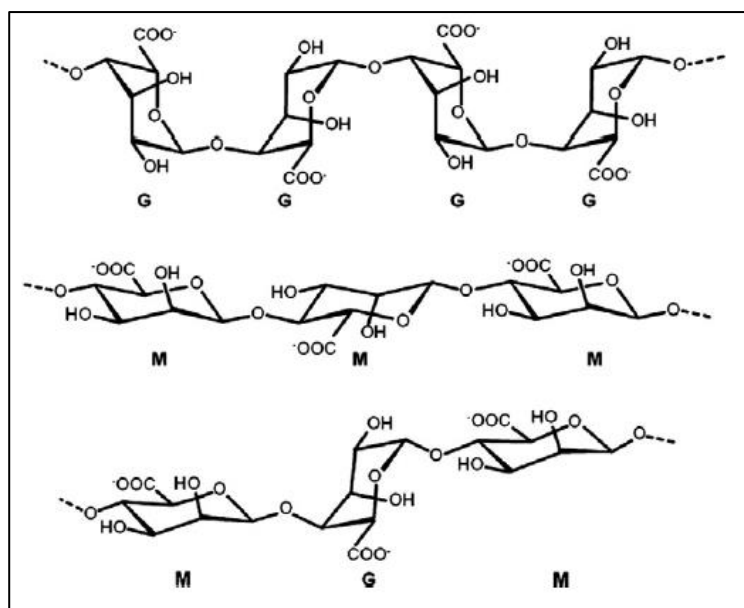


Figura 1.11 – Struttura molecolare delle catene di alginato. Fonte J.P. Paques et al. / *Advances in Colloid and Interface Science* 209 (2014) 163–171.

Gli alginati disponibili in commercio provengono principalmente da tre specie di alghe: la *Laminaria hyperborea*, l'*Ascophyllum nodosum* e la *Macrocystis pyrifera*. Sono anche ricavati, talvolta, da altre specie di alghe come la *Laminaria japonica*, l'*Eclonia maxima*, la *Lesonia negrescens* e la specie *Sargassum*. In tutte le specie menzionate l'alginato arriva a costituire fino al 40% del peso delle alghe dopo essiccamento. Sia la composizione chimica dell'alginato che la sequenza dei

blocchi M e G dipendono da quale tipo di alga è stato estratto; la viscosità delle soluzioni acquose di alginato dipende dal peso molecolare medio del polisaccaride (Rastello De Boissesson et al., 2004; Gombodtz e Wee, 2012).

Il Na-Alg è molto apprezzato anche per la sua bio-adesività che potrebbe essere vantaggiosa nell'ambito dei dispositivi a rilascio modificato. Con il termine 'bio-adesione' si intende l'adesione tra due superfici, di cui una è un substrato biologico. Se questo substrato è una mucosa si può anche usare il termine 'muco-adesivo'. In seguito a specifiche ricerche (Park e Robinson, 1984; Ch'ng et al., 1985; Chickering et al., 1992; Chickering e Mathiowitz, 1995) è stato dimostrato che i polimeri che presentano elevata densità di carica sono degli ottimi agenti muco-adesivi e che la muco-adesione è una conseguenza della penetrazione delle catene polimeriche nella mucosa lungo l'interfaccia; inoltre, i polimeri poli anionici, come l'alginato che è provvisto di gruppi carbossilici, hanno degli effetti di bio-adesione maggiori rispetto ai polimeri poli cationici o non ionici. I dispositivi di rilascio modificato muco-adesivi, aderendo alla mucosa gastrointestinale, permettono di allungare i tempi di residenza del farmaco e di diminuire le sue perdite aumentandone efficacia e biodisponibilità (Gombodtz e Wee, 2012).

Gli alginati possono anche essere modificati mediante reazioni di derivazione dei gruppi funzionali delle catene polimeriche; ad esempio si potrebbe rendere il Na-Alg idrofobo legando chimicamente opportuni gruppi funzionali, come delle corte catene polieteriche, lungo la catena del Na-Alg (Pawar e Edgar, 2012). Per mezzo di queste modifiche è dunque possibile migliorare le prestazioni dei dispositivi di rilascio a base di alginato.

La reticolazione del Na-Alg avviene in soluzione acquosa tramite reazione di scambio ionico tra lo ione  $\text{Na}^+$ , presente nei gruppi carbossilici del polisaccaride, con uno ione bivalente. Lo ione bivalente può essere di varia natura e ha influenza sul modulo di Young del reticolo del gel (Ouwere et al., 1998). I migliori risultati in termini di stabilità del reticolo si otterrebbero con gli ioni  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  ma la loro tossicità ne impedisce l'utilizzo, per questo motivo lo ione bivalente maggiormente usato nel campo delle applicazioni biomediche è il  $\text{Ca}^{2+}$  (Ouwere et al., 1998; Rastello De Boissesson et al., 2004). La reazione di scambio ionico coinvolge i gruppi carbossilici dei blocchi G, dove ciascun ione  $\text{Ca}^{2+}$  si lega a due catene di alginato formando in questo modo un reticolo detto a "scatola per uova" (fig. 1.12) (Rastello De Boissesson et al., 2004).

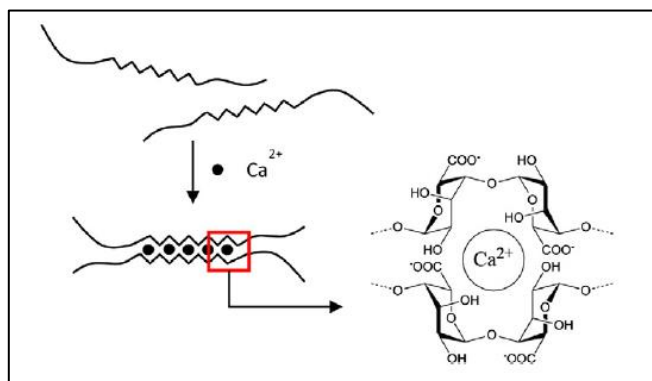


Figura 1.12 – Formazione del reticolo di Ca-Alg. Fonte: J.P. Paques et al. / *Advances in Colloid and Interface Science* 209 (2014) 163–171.

Le proprietà meccaniche e strutturali dei gel di alginato di calcio (Ca-Alg) possono essere regolate anche dalla scelta della fonte dello ione  $\text{Ca}^{2+}$ . Ad esempio, un sale di calcio a bassa solubilità riduce la velocità di gelificazione incrementando l'uniformità strutturale e la resistenza meccanica del reticolo (Rastello De Boisseson et al., 2004).

Gli aerogel di Ca-Alg hanno un'area superficiale compresa nell'intervallo 150 - 680  $\text{m}^2/\text{g}$  e un volume poroso compreso nell'intervallo 1,1 - 4,05  $\text{cm}^3/\text{g}$  (García-González et al., 2011). Hanno un comportamento sensibile al pH e si restringono in ambienti acidi (come i fluidi gastrici). (Rastello De Boisseson et al., 2004; Rayment et al., 2009; Veronovski et al., 2012; Masuelli e Illanes, 2014). Quando gli aerogel di Ca-Alg sono immersi in fluidi con pH 1,2 (valore tipico dei fluidi gastrici), gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  si allontanano dal reticolo e il Ca-Alg si converte in acido alginico; a causa della formazione di legami di idrogeno tra le catene dell'alginato, il gel continua ad avere una sua stabilità anche se la sua resistenza meccanica è diminuita. La perdita dei legami ionici e l'indebolimento strutturale permettono il rilascio del principio attivo per diffusione. Gli aerogel di Ca-Alg si prestano per dispositivi a rilascio rapido e in ambienti gastrici rilasciano all'incirca l'80% del principio attivo caricato (Silva et al., 2006).

Ricordando che per sottoporre un gel ad essiccamento supercritico bisogna rimuovere l'acqua in esso contenuta (vedere paragrafo 1.4, dopo la formazione del reticolo di Ca-Alg è necessario sostituire l'acqua con dell'etanolo. È sconsigliato immergere subito il gel in etanolo puro in quanto, a causa della differenza delle tensioni superficiali tra i due solventi, si avrebbe un cedimento strutturale del reticolo del gel. Per questo motivo si procede con uno scambio di solvente a sei

stadi dove in ogni stadio il gel di alginato viene immerso in una miscela acqua/etanolo con una frazione di etanolo sempre crescente fino ad arrivare al sesto stadio in cui il gel verrà immerso in etanolo puro. In questo modo le tensioni superficiali vengono ridotte gradualmente preservando il reticolo anche se, purtroppo, questo processo porta inevitabilmente ad un restringimento del gel (Mehling et al., 2009). In seguito allo scambio di solvente si può procedere con l'essiccamento supercritico che, a causa della bassa temperatura di degrado termico dell'alginato (all'incirca 140°C), è quello a bassa temperatura.

### **1.5.3 Aerogel ibridi**

Gli aerogel ibridi si stanno rivelando un settore di ricerca molto interessante in quanto permettono di combinare materiali organici e inorganici ottenendo i vantaggi di tutti due i componenti. Ad esempio sono stati combinati l'alginato con la pectina (Gonçalves et al., 2016) oppure il chitosano con la carbossimetil cellulosa e l'ossido di grafene (Wang et al., 2017) ottenendo, in quest'ultimo caso, un dispositivo gastroresistente. Ricordando le proprietà degli aerogel di silice e di alginato, viste rispettivamente nei paragrafi 1.5.1 e 1.5.2, si potrebbe ottenere un aerogel ibrido con un'alta area superficiale, una buona resistenza meccanica, idoneo al rilascio rapido, con un'alta efficienza di rilascio e, allo stesso tempo, anche bioadesivo e con la possibilità di essere adattato alle diverse esigenze tramite opportune modifiche strutturali. Questo renderebbe gli aerogel ibridi idonei per realizzare dispositivi farmaceutici ad elevata capacità di carico di farmaco aderenti alla mucosa gastrica, il che costituisce uno degli interessi di maggior attualità (Li et al., 2016; Bera et al., 2017). I risultati delle ricerche precedentemente svolte sugli aerogel ibridi hanno dimostrato che questi possono essere degli ottimi candidati per dispositivi a rilascio modificato. Ad esempio negli aerogel ibridi alginato/pectina, in fase di preparazione del gel, si ha una buona interazione tra i due reagenti che porta ad un miglior grado di reticolazione, una maggiore area superficiale e un minor restringimento, (Gonçalves et al., 2016), mentre, combinando il chitosano con la carbossimetil cellulosa e l'ossido di grafene, si possono sfruttare le proprietà gastroresistenti dei due polisaccaridi ma senza un brusco rilascio iniziale di principio attivo (Wang et al., 2017). Nonostante le interessanti applicazioni prima menzionate, il campo degli aerogel silice/alginato è ancora alquanto inesplorato (Lovskaya et al., 2015; Veres et al., 2015).

Ci sono diversi modi per produrre un gel ibrido silice/Ca-Alg. Per esempio, si potrebbe disperdere della silice mesoporosa in una soluzione di Na-Alg

procedendo, poi, con la gelificazione dell'alginato (Liu et al., 2013). In questo modo le particelle di silice si saldano alla matrice di alginato tramite interazioni intramolecolari tra i gruppi idrossilici provenienti dalla superficie delle particelle della silice colloidale e i gruppi carbossilici residui del Ca-Alg. Le inclusioni di silice colloidale così ottenute possono limitare il restringimento della matrice di alginato in fase di essiccamento.

Un altro metodo (Coradin e Livage, 2003) consiste nel preparare una matrice di silice mesoporosa, impregnarla con una soluzione di Na-Alg e, in seguito, procedere con la reticolazione di quest'ultimo. In questo caso, però, dopo un essiccamento tramite liofilizzazione, si è verificata una grossa riduzione dell'area superficiale e del volume poroso (passando rispettivamente da 1050 m<sup>2</sup>/g e 0,8 cm<sup>3</sup>/g a 435 m<sup>2</sup>/g e 0,3 cm<sup>3</sup>/g).

Un altro esempio di aerogel ibrido silice/Ca-Alg è stato ottenuto da Lim e collaboratori (Lim et al., 2009) che hanno rivestito delle microsfeere di Ca-Alg con uno strato siliceo rendendole resistenti agli ambienti intestinali.

I lavori sopra menzionati riguardano tutti la realizzazione di matrici ibride disomogenee. In questa sede si è più interessati alla produzione di una matrice ibrida omogenea miscelando la frazione organica con quella inorganica durante la fase di preparazione del gel. Anche in questo caso in letteratura sono state provate diverse soluzioni. Ad esempio sono stati prodotti degli aerogel silice/alginato usando il Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> (Raman et al., 2015) e mantenendo un rapporto in peso alginato/Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> pari a 5. Con questa tecnica è stato ottenuto un aerogel con area superficiale pari a 623 m<sup>2</sup>/g e volume poroso pari a 3,25 cm<sup>3</sup>/g.

Ricordando quanto detto nel paragrafo 1.4.3 i precursori che forniscono gli aerogel silicei con le aree superficiali più elevate (con valori nell'intorno dei 1000 m<sup>2</sup>/g) sono gli alcossidi di silice, in particolare il TMOS e il TEOS. Il problema che si riscontra nella produzione di aerogel ibridi silice/alginato con questi precursori è la lacuna di miscibilità che si viene a formare quando sono a contatto con acqua rendendo impossibile la formazione di una matrice ibrida omogenea. Questo problema verrebbe facilmente risolto con l'aggiunta di un alcol facendo diventare il sistema reattivo monofasico. Tuttavia, come si vedrà nel corso dei lavori della presente tesi, (capitolo 3), la presenza di un alcol potrebbe dare problemi nella formazione del gel. Un altro inconveniente legato all'uso dell'alcol è legato al fatto che i gel ibridi sono d'interesse anche nel settore dell'immobilizzazione di enzimi (Coradin e Livage, 2003; Shchipunov et al., 2004; Samueva et al., 2008). Pertanto



mettere a punto una tecnica produttiva senza ricorrere all'uso di alcol, che ha effetti inibitori sugli enzimi, allarga il campo di interesse di questo materiale ibrido.

Una tecnica per risolvere il problema della lacuna di miscibilità dei precursori silicei con l'acqua senza aggiungere alcol, consiste nel convertire il TEOS in tetrakis(2-idrossietil) ortosilicato (TIEOS): in questo modo il precursore siliceo diventa solubile in acqua ed è possibile la formazione di aerogel ibridi (Shchipunov et al., 2004).

Tenendo presente che gli alcossidi di silice in forma idrolizzata diventano totalmente miscibili con acqua (Coradin et al., 2003), è possibile ottenere un sistema omogeneo silice/alginato mantenendo in agitazione per un certo tempo gli alcossidi con l'acqua, in questo modo si ha la reazione di idrolisi all'interfaccia dei due reagenti per cui, in seguito a questa reazione, si passa da un sistema bifasico a uno monofasico. Seguendo questa tecnica sono stati prodotti degli aerogel ibridi silice/alginato in forma di microsfele (Lu et al., 2006) usando il TMOS come precursore siliceo con un valore dell'area superficiale e volume poroso rispettivamente pari a  $549 \text{ m}^2/\text{g}$  e  $1,27 \text{ cm}^3/\text{g}$ . Nei gel ibridi silice/alginato, usando il TMOS come precursore siliceo, la fase organica ed inorganica sono tenute salde per mezzo di interazioni intramolecolari tra i loro gruppi idrossilici (Coradin et al., 2003; Chernev et al., 2005; Chen e Lin, 2007).

Per quanto riguarda l'invecchiamento e l'essiccamento supercritico bisogna considerare quanto detto per gli aerogel di silice e di alginato. I gel di silice necessitano di un periodo di invecchiamento per portare a compimento le reazioni di idrolisi e condensazione rimanendo immersi in una miscela acqua/alcol per un determinato periodo di tempo ed in seguito devono essere immersi in etanolo puro per rimuovere l'acqua e le impurità. I gel di Ca-Alg, invece, non richiedono lo stadio di invecchiamento in quanto la reazione di scambio ionico è molto veloce mentre lo scambio di solvente viene realizzato immergendo il gel in diverse miscele acqua/etanolo a contenuto di etanolo crescente e, infine, in etanolo puro. Da qui è chiaro che, adottando anche per gli aerogel ibridi la stessa procedura di scambio di solvente dei gel di alginato, si ha simultaneamente l'invecchiamento dalla frazione silicea e lo scambio di solvente. Per quanto riguarda l'essiccamento supercritico, infine, dal momento che gli alcolgel ibridi contengono una frazione di alginato, che è termolabile, si procede con la modalità a bassa temperatura.

## 1.6 Incorporazione del principio attivo

Al fine di utilizzare gli aerogel in applicazioni farmaceutiche questi devono essere caricati con un principio attivo.

Ci sono tre possibili vie per poter caricare il farmaco nel gel (García-González et al., 2011; Ulker e Erkey, 2014):

- durante la formazione del gel;
- subito a valle della fase di scambio solvente;
- dopo l'essiccamento supercritico.

Aggiungere il principio durante la formazione del gel è una strategia semplice e flessibile, è adattabile a una moltitudine di sostanze ed elimina i lunghi tempi d'incorporazione richiesti dalle altre due tecniche. Per poter effettuare l'incorporazione seguendo questa strada è necessario che il principio attivo sia solubilizzabile o disperdibile nel sistema di gelificazione, sia stabile durante la formazione del gel oltre che stabile ed insolubile sia nel solvente usato durante lo stadio di scambio che in sc-CO<sub>2</sub>.

Se il principio attivo che si vuole incorporare interferisce con il processo di gelificazione oppure viene solubilizzato (e quindi asportato dal gel) durante la fase di scambio di solvente occorre procedere in un altro modo. È quindi necessario aggiungere uno stadio successivo alla normale procedura di scambio di solvente. Ad esempio, dopo aver sostituito l'acqua contenuta in un idrogel con l'etanolo, si immerge l'alcolgel in una soluzione di etanolo e principio attivo. In questo modo la velocità di diffusione del farmaco nei pori del gel dipende dalle dimensioni delle molecole e dei pori del gel e dalla concentrazione iniziale del principio attivo in soluzione. Questa tecnica, rispetto alla precedente, ha il vantaggio di permettere l'incorporazione di componenti sensibili ai valori di pH che si instaurano durante la formazione del gel o di componenti che comprometterebbero o interferirebbero con la formazione del reticolo. Tuttavia, questa tecnica richiede tempi più lunghi.

Infine, nel caso in cui si voglia procedere con l'incorporazione del principio attivo sul gel essiccato, si deve aggiungere uno stadio subito a valle del processo di essiccamento supercritico. In questo caso, dopo aver rimosso il solvente dal gel con un essiccamento supercritico, occorre mettere l'aerogel a contatto con della CO<sub>2</sub> nella quale è solubilizzato il principio attivo. L'incorporazione attraverso una fase supercritica migliora la diffusività all'interno dei pori dell'aerogel e si risolvono i problemi di incompatibilità in fase di formazione del gel e scambio di solvente;

tuttavia, questa può richiedere dei tempi molto lunghi, anche fino a 70 ore (Mehling et al., 2009).

## 1.7 Formazione microsfere

Come detto nel paragrafo 1.4, uno dei vantaggi degli aerogel è la vasta scelta sulla forma e le dimensioni che questi possono assumere. Nel campo dei dispositivi farmaceutici una delle forme preferibili è quella delle microsfere. Le microsfere, infatti, oltre a fornire una più ampia superficie di contatto tra il principio attivo e i fluidi del corpo umano, favorendo una più rapida dissoluzione e assimilazione del farmaco (García-González et al., 2011), possono essere utilizzate anche per dispositivi a somministrazione diversa da quella orale (come nasale o intestinale, Goncalves et al, 2016), semplicemente modulando le loro dimensioni.

Oltre alla maggiore flessibilità di utilizzo, sia gli aerogel di alginato che quelli di silice, quando sono in forma di microsfere, presentano un notevole incremento di area superficiale, se pur accompagnato da una leggera diminuzione del volume poroso rispetto ai corrispettivi monolitici (Alnaief e Smirnova, 2011; Veronovsky et al., 2012), come si può vedere dalla tabella 1.2.

**Tabella 1.2** – Valori di area superficiale e volume poroso di aerogel di alginato e di silice in forma monolitica e di microsfere. Fonte: \* A. Veronovski et al. / Journal of Biomaterials Science 23 (2012) 873–886; \*\*M. Alnaief, I. Smirnova / J. of Supercritical Fluids 55 (2011) 1118–1123.

Aerogel	Forma	Area superficiale m <sup>2</sup> /g	Volume poroso cm <sup>3</sup> /g
Ca-Alg*	Monolitico	139	0,84
	Microsfere	402	0,66
Silice** (TMOS)	Monolitico	982	4,13
	Microsfere	1068	3,54

Gli aerogel potrebbero essere prodotti sotto forma di elementi discreti semplicemente macinando quelli monolitici; tuttavia, quest'uso è sconsigliato nel campo dei dispositivi farmaceutici a causa dell'assenza di sfericità e di uniformità del particolato (García-González et al., 2011). Per la produzione di gel in microsfere, sono state sviluppate diverse tecniche avanzate basate sul getto della soluzione da gelificare attraverso un sistema provvisto di ugelli e aghi (fig. 1.13) che manda le gocce in una soluzione gelificante, consentendo di ottenere delle microsfere con diametri fino a 5  $\mu\text{m}$ . Queste tecniche a gocciolamento, tuttavia, rendono problematica una loro produzione industriale in quanto sarebbe necessario un numero di ugelli molto elevato; inoltre, l'impatto delle gocce con la soluzione gelificante potrebbe portare ad una deformazione delle microsfere.

Un metodo alternativo alle tecniche appena menzionate consiste nel creare un'emulsione contenente la soluzione da gelificare (fase dispersa) e una fase oleosa (continua). Questa tecnica offre un'ampia scelta di dimensioni delle microsfere, che possono ridursi fino alla scala delle nanosfere, e può consentire di realizzare più facilmente una produzione industriale (Paques et al., 2014).

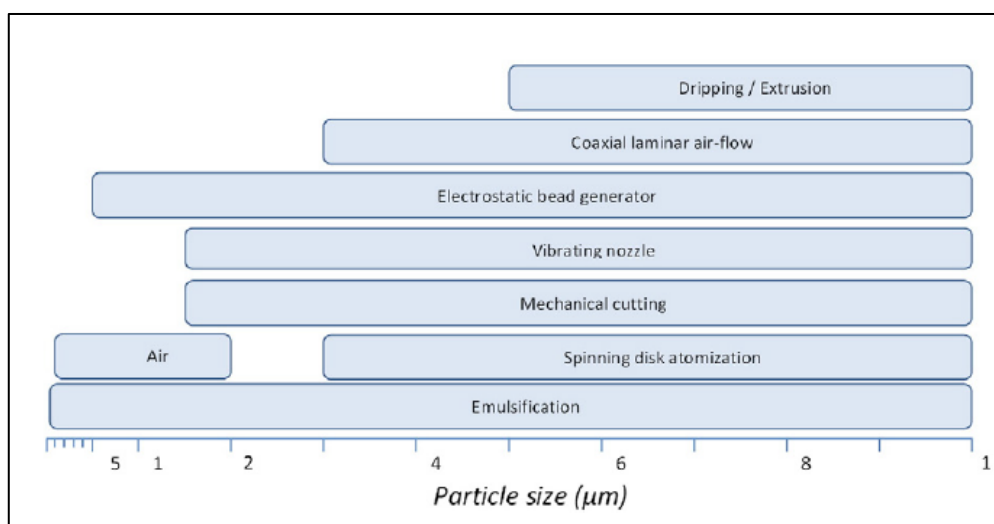


Figura 1.13 – Tecniche di produzione gel in microsfere con l'intervallo dei diametri delle microsfere sui quali sono applicabili. Fonte: J.P. Paques et al. / *Advances in Colloid and Interface Science* 209 (2014) 163–171.

### 1.7.1 Microsfere di Ca-Alg

Per la produzione delle microsfere di Ca-Alg i due metodi più ampiamente utilizzati (Alnaief et al., 2011) sono:

- metodo diffusivo;
- metodo della reticolazione interna.

Il primo metodo è più semplice e veloce. Brevemente, per la formazione delle sfere è necessario preparare una soluzione ad una data concentrazione di alginato (in genere si utilizzano concentrazioni dell'1% - 2%<sub>w/w</sub>) che viene versata goccia a goccia in una soluzione di un sale di calcio solubile (solitamente il cloruro di calcio). La soluzione può essere versata manualmente con una siringa oppure con una pompa dosatrice (Alnaief et al., 2011; Veronovsky et al., 2012). Questo metodo è definito 'diffusivo' perché la fonte degli ioni di calcio responsabili della reticolazione dell'alginato si trovano all'esterno delle gocce di alginato e queste reticoleranno diventando sfere tramite la diffusione del  $\text{Ca}^{2+}$  al loro interno. Con questa tecnica la reticolazione non è omogenea e si ottengono delle sfere con un grado di reticolazione elevata in superficie e basso al loro interno (Zhao et al., 2011); inoltre, è molto difficile realizzare una produzione su scala industriale di sfere con diametro <500  $\mu\text{m}$  (Paques et al., 2014). È stato valutato (Poncelet et al. 1992) che per una produzione industriale di sfere con un diametro pari a ~3 mm si potrebbe raggiungere una produzione pari a 24 L/h estrudendo la soluzione di Na-Alg con un solo ugello. Tuttavia, il numero di ugelli e aghi necessari per sostenere una produzione industriale è inversamente proporzionale alle dimensioni delle microsfere; infatti, per ottenere microsfere con un diametro  $\leq 500 \mu\text{m}$ , sarebbero richiesti migliaia di ugelli e aghi (Poncelet et al. 1992).

Per poter ottenere delle sfere con diametro inferiore ai 500  $\mu\text{m}$ , adattabile anche ad una produzione su scala industriale, è necessario seguire il metodo delle 'reticolazione interna' (Poncelet et al., 1992, 1999; Silva et al., 2006). Questa tecnica è così definita perché gli ioni di calcio vengono forniti da un sale insolubile che viene disperso nella soluzione di Na-Alg prima della formazione delle gocce (microsfere): la fonte degli ioni calcio si trova così all'interno delle gocce di Na-Alg (Alnaief et al., 2011). In questo modo si risolve anche il problema della reticolazione disomogenea in quanto, al momento della reticolazione, il sale fonte di calcio è disperso in maniera uniforme nelle gocce di Na-Alg.

Questo metodo venne ideato negli anni '90 (Poncelet et al., 1992, 1999) e consiste nel disperdere del  $\text{CaCO}_3$  in una soluzione di Na-Alg (detta anche fase

acquosa) ed in seguito creare un'emulsione tra la fase acquosa e una fase oleosa. Per creare l'emulsione sono state provate diverse giranti (a griglia, a elica marina e turbina Rushton) (Poncelet et al., 1992) la cui velocità di rotazione influenza le dimensioni delle microsfele finali: aumentando questo parametro si ha una diminuzione delle loro dimensioni in seguito alla maggiore turbolenza del sistema; tuttavia, velocità eccessivamente elevate potrebbero causare un eccessivo allargamento della loro distribuzione granulometrica riducendone l'uniformità dimensionale (Silva et al., 2006). Una volta che la fase acquosa si disperde in forma di gocce all'interno della fase oleosa è sufficiente provocare la solubilizzazione del  $\text{CaCO}_3$  inserendo dell'acido acetico glaciale nell'emulsione: ciò comporta la reticolazione delle gocce e la formazione delle microsfele di Ca-Alg.

In alternativa al  $\text{CaCO}_3$  si potrebbero anche usare altri sali di calcio insolubili come, per esempio, i sali citrato, idrogeno fosfato, ossalato e tartrato; tuttavia, molto spesso queste microsfele sono destinate all'incorporazione di sostanze sensibili ai pH acidi, per cui, è necessario scegliere un sale che liberi ioni  $\text{Ca}^{2+}$  ad un valore di pH che non sia minore di 5 (Poncelet et al., 1999). Come si può vedere dalla figura 1.14, il sale che meglio rispetta questo vincolo è il carbonato.

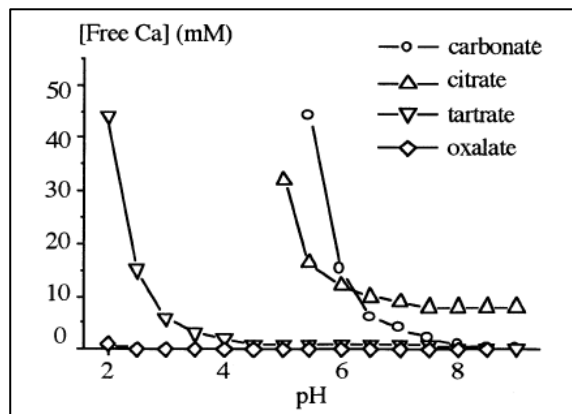


Figura 1.14 – Concentrazione degli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  in soluzione liberati in funzione del pH per diversi sali insolubili. Fonte: D. Poncelet et al.: *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 155 (1999) 171–176.

In letteratura (Silva et al., 2006) si riporta che per ottenere delle microsfele con un reticolo stabile strutturalmente bisogna mantenere un rapporto  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na-Alg} \geq 5\%_{w/w}$ . Tuttavia, nell'ambito delle applicazioni biomediche, è sconsigliabile

lavorare con un rapporto  $>17\%$  altrimenti l'elevato grado di reticolazione dell'alginato che ne consegue comporta un abbassamento dell'efficienza di rilascio in quanto il farmaco rimane intrappolato (Silva et al., 2006). Per quanto riguarda l'acido acetico, responsabile della solubilizzazione del  $\text{CaCO}_3$ , un aumento del rapporto molare acido/ $\text{Ca}^{2+}$  porta ad una maggiore disponibilità di ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , si consiglia un rapporto molare acido/ $\text{Ca}^{2+}$  che sia almeno pari a 3,5 in modo tale da consentire la completa solubilizzazione del carbonato (Silva et al., 2006).

Un altro aspetto importante del metodo riguarda la fase oleosa, che può essere composta sia da un olio vegetale che da un olio minerale. La viscosità dell'olio scelto influenza le dimensioni delle microsfele che si verranno a formare: il diametro delle microsfele diminuisce all'aumentare della viscosità dell'olio a causa della diminuzione della tensione superficiale e dell'aumento della stabilità dell'emulsione. Durante l'emulsione le gocce della fase acquosa potrebbero tuttavia coalescere. Per prevenire questo fenomeno occorre aggiungere un tensioattivo liposolubile, solitamente lo Span 80 (sorbitolo monooleato); l'aggiunta di questo componente comporta anche una riduzione del diametro delle microsfele in quanto agisce sulla tensione superficiale. Per quanto riguarda il rapporto fra la fase acquosa e quella oleosa, infine, un suo aumento porta ad una riduzione delle dimensioni delle microsfele (Poncelet et al., 1999; Silva et al., 2006).

In seguito alla formazione delle microsfele, si deve procedere con il loro recupero. Solitamente si interviene aggiungendo al sistema in emulsione un dato volume di acqua o di una soluzione acquosa di  $\text{CaCl}_2$  (questa seconda opzione consente di ottenere una maggior reticolazione del Ca-Alg). In questo modo avviene un'inversione di fase: la fase dispersa diventa quella oleosa e le microsfele si ripartiscono nella fase acquosa, divenuta, ora, la fase continua. A questo punto è sufficiente interrompere l'agitazione e rimuovere la fase oleosa: le microsfele possono così essere recuperate per filtrazione (Poncelet et al., 1999).

Il metodo della reticolazione interna appena descritto offre il grande vantaggio di consentire di ottenere delle microsfele di aerogel con una maggiore area superficiale, come si può vedere dalla tabella 1.3. La tabella riporta, a titolo di esempio, i valori delle microsfele di aerogel prodotte con una soluzione di Na-Alg al 1,5% in peso prodotte, rispettivamente, con il metodo diffusivo (Veronovsky et al., 2012) e con il metodo della reticolazione interna (Alnaief et al., 2011).

**Tabella 1.3** – Valore dell’area superficiale di aerogel di Ca-Alg formati con il metodo diffusivo e il metodo della reticolazione interna. Fonte: \*A. Veronovski et al. /Journal of Biomaterials Science 23 (2012) 873–886; \*\*M. Alnaief et al. /Carbohydrate Polymers 84 (2011) 1011–1018

metodo di formazione	area superficiale	volume poroso
	m <sup>2</sup> /g	cm <sup>3</sup> /g
diffusivo*	402	0,66
reticolazione interna**	590	4,10

### 1.7.2 Microsfere di silice

Anche per la produzione delle microsfere di aerogel di silice si ricorre alla tecnica dell’emulsione. La tecnica è molto simile a quella usata per gli aerogel di alginato vista nel paragrafo precedente; la differenza principale sta nella composizione della fase oleosa dove non è presente alcun reagente che inneschi la reticolazione ma deve essere saturata con etanolo (Alnaief e Smirnova, 2011).

Il metodo si basa sulla reticolazione del TMOS per mezzo di una catalisi a due stadi (vedere paragrafo 1.5.1). In breve, si prepara una miscela composta da TMOS, metanolo, acqua deionizzata e HCl e si tiene il sistema in agitazione per il tempo necessario a portare a termine la reazione di idrolisi. Il tempo di agitazione dipende dalla composizione della miscela. Terminata la reazione di idrolisi è possibile aggiungere dell’etanolo per poter modulare la densità del futuro aerogel. Successivamente, si aggiunge del NH<sub>4</sub>OH per promuovere la reazione di condensazione e si mette questa miscela in emulsione con una fase oleosa (Alnaief e Smirnova, 2011). Bisogna notare che il tempo che il precursore impiega a gelificare dipende dalla quantità di NH<sub>4</sub>OH. Questa, quindi, deve essere dosata in modo tale da avere il tempo necessario per la formazione delle gocce (che diventeranno microsfere) durante l’emulsione.

La fase oleosa possiede una percentuale di tensioattivo compresa nell’intervallo 1 – 10%<sub>w/w</sub>, che, come detto nel paragrafo 1.7.1, serve per evitare la coalescenza delle gocce. Come si è accennato in precedenza, la fase oleosa deve essere saturata con etanolo altrimenti parte di quello contenuto nelle gocce silicee diffonderebbe



nella fase oleosa portando ad un loro restringimento con conseguente diminuzione dell'area superficiale delle microsfele di aerogel finali (Alnaief e Smirnova, 2011).

### **1.7.3 Microsfere ibride silice/alginate**

I metodi per produrre delle microsfele ibride silice/alginate usando gli alcossidi di silice come precursori silicei (vedere paragrafo 1.5.3) sono ancora poco investigati in letteratura. Attualmente sono stati prodotti solo con il metodo diffusivo (Lu et al., 2006; Chen e Lin, 2007). In entrambi i casi si prepara una miscela ibrida di precursori da gelificare con il metodo diffusivo versandola goccia a goccia in una soluzione acquosa di  $\text{CaCl}_2$ .

Per preparare la miscela da far gelificare si possono prendere due strade. In una si prepara una soluzione di Na-Alg a cui si aggiunge il TMOS; successivamente si mette il sistema in agitazione provocando l'idrolisi del TMOS ottenendo una miscela omogenea (Lu et al., 2006). L'altra via consiste nel far avvenire prima l'idrolisi del TMOS, facendolo reagire con acqua e un catalizzatore acido; quando il sistema diventa omogeneo lo si miscela con una soluzione acquosa di Na-Alg (Chen e Lin, 2007).

Questa seconda strada consente di poter rimuovere il metanolo che si forma in seguito all'idrolisi del TMOS, per mezzo di un riscaldamento della miscela silicea, prima di miscelarla con la soluzione di alginato. Come si vedrà nel capitolo 4, la rimozione del metanolo può essere vantaggiosa per una possibile produzione di queste microsfele ibride con il metodo della reticolazione interna in quanto il  $\text{CaCO}_3$  è solubile in alcol per cui la presenza del metanolo potrebbe portare ad una reticolazione prematura del Na-Alg prima di creare l'emulsione.

### **1.7.4 Microsfere multistrato**

Attualmente le microsfele di aerogel multistrato sono poco investigate in letteratura. Al momento si è riscontrato che è possibile produrre microsfele multistrato non ibride ma costituite dal solo alginato con il metodo diffusivo (Veronovski et al., 2013). La tecnica consiste nel preparare delle microsfele di Ca-Alg che costituiscono il nucleo e vengono successivamente disperse in una nuova soluzione di Na-Alg per formare lo strato successivo. Ripetendo la tecnica di formazione delle microsfele più volte è possibile raggiungere un'elevata stratificazione (Veronovski et al., 2013). Come si può vedere dalla figura 1.15 con

gli aerogel di Ca-Alg multistrato si è stato riscontrato un significativo rallentamento nella velocità del rilascio del principio attivo (Veronovski et al., 2013).

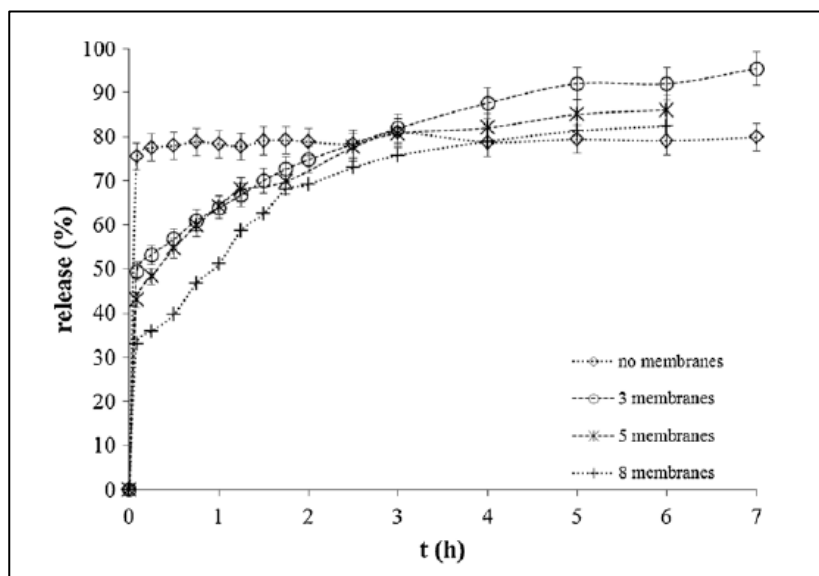


Figura 1.15 – Curve di rilascio dell'acido nicotinico impregnato nelle microsfele multistrato di Ca-Alg, come si può vedere l'aumento del numero degli strati riduce la velocità di rilascio del principio attivo. Fonte: A. Veronovski et al. / J. of Supercritical Fluids 79 (2013) 209–215.

## 1.8 Scopo della ricerca

I paragrafi precedenti hanno dimostrato come l'interesse scientifico per l'impiego nel settore farmaceutico degli aerogel ibridi fra cui, in particolare, quelli di silice/Ca-Alg, sia molto elevato ancorché alquanto inesplorato (Lovskaya et al., 2015; Veres et al., 2015). Quello che rende gli aerogel ibridi interessanti è la possibilità di accoppiare i pregi dei diversi materiali che li compongono. Gli aerogel di silice idrofili, ad esempio, presentano una elevata efficienza di rilascio in quanto sono in grado di liberare la quasi totalità del principio attivo in esso contenuto (Smirnova et al., 2004) e ciò li rende idonei al rilascio rapido in ambienti gastrici. Gli aerogel di Ca-Alg, invece, pur presentando una efficienza di rilascio inferiore (intorno all'80%) (Silva et al., 2006), sono bio-adesivi e quindi in grado di aderire alla mucosa gastrica, allungando i tempi di residenza del principio attivo aumentandone così l'efficacia (Gombodz e Wee, 2012).

In base a queste osservazioni si è deciso, come primo obiettivo, di incentrare l'attività di ricerca sullo studio degli aerogel ibridi silice/Ca-Alg come supporti per farmaci a rilascio rapido con l'intento di realizzare un dispositivo bio-adesivo che sia in grado di rilasciare, in ambienti gastrici, oltre il 90% del principio attivo in pochi minuti.

Ricordando che i sistemi particolati portano ad un aumento della superficie di principio attivo esposta ai fluidi gastrointestinali migliorandone la biodisponibilità (paragrafo 1.1, García-González et al., 2011), si è deciso di produrre gli aerogel ibridi in forma di microsfele di dimensioni ridotte (<500  $\mu\text{m}$ ). In letteratura, le microsfele di aerogel ibridi silice/Ca-Alg, sono state formate con il metodo diffusivo (Lu et al., 2006; Chen e Lin, 2007) visto nel paragrafo 1.7.1. In questo modo si ottengono degli aerogel ibridi con un valore dell'area superficiale (549  $\text{m}^2/\text{g}$ , Lu e al., 2006) paragonabile a quello degli aerogel di Ca-Alg inoltre, come detto nel paragrafo 1.7.1, il metodo diffusivo non è adattabile ad una produzione su scala industriale di microsfele di diametro ridotto. Per questi motivi si è pensato di mettere a punto una nuova tecnica di formazione delle microsfele ibride seguendo il metodo della reticolazione interna, solitamente usato per le microsfele non ibride di Ca-Alg (Poncelet et al., 1992, 1999; Silva et al., 2006). L'obiettivo del nuovo metodo è stato quello di ottenere delle microsfele con un valore dell'area superficiale paragonabile a quello degli aerogel di silice (~ 1000  $\text{m}^2/\text{g}$ ) offrendo altresì una ampia flessibilità di scelta delle loro dimensioni.

Come secondo obiettivo di quest'attività di ricerca si è cercato di creare un rivestimento per le microsfele ibride che le rendesse idonee anche per l'impiego come supporti per farmaci a rilascio prolungato. L'idea di creare un aerogel composto da un nucleo rivestito è nata dalla flessibilità di utilizzo di questi materiali (Ulker e Erkey, 2014). In questa sede si è deciso di creare un rivestimento che rallenti il rilascio del principio attivo.

In base ad alcuni riferimenti di letteratura (Lemoine et al., 1998; Liu et al., 2006; Nochos et al., 2008; Yadava et al., 2014; Okeke e Boateng, 2016) si è scelto di utilizzare l'idrossipropil metil cellulosa o ipromellosa (HPMC, vedere paragrafo 4.2) come eccipiente del rivestimento e di confrontarne le prestazioni con quelle di un rivestimento di silice idrofobo in quanto gli aerogel di silice idrofobi monolitici hanno già dimostrato di avere un'azione rallentante sul rilascio del principio attivo (Smirnova et al., 2004). Alla luce di queste considerazioni sono state prodotte microsfele ibride silice/Ca-Alg con tre tipi di rivestimento: il primo costituito da Ca-Alg e HPMC, il secondo costituito da silice e HPMC, il terzo costituito da silice idrofoba. Al fine di testare la capacità di rilascio, confrontando le prestazioni delle

differenti microsfere rivestite e non rivestite, queste sono state caricate con un principio attivo poco solubile in acqua, il ketoprofene, e sottoposte a opportuni test di dissoluzione.



## **Capitolo 2**

### **Microsfere di alginato: prove preliminari e risultati della procedura operativa**

## **2.1 Produzione microsfere di Ca-Alg**

Uno degli obiettivi di questa attività di ricerca è la messa a punto di un metodo di produzione di microsfere ibride silice/Ca-Alg adottando la tecnica della reticolazione interna (vedere paragrafo 1.7.1).

Dal momento che la tecnica della reticolazione interna costituisce una novità per quanto riguarda la produzione di microsfere ibride silice/Ca-Alg, si è deciso di mettere prima a punto un metodo per la produzione di microsfere (non ibride) di Ca-Alg partendo da lavori trovati in letteratura. Nel capitolo successivo si illustrerà, poi, come tale metodo è stato adattato alla produzione di microsfere ibride per mezzo di opportune modifiche.

I metodi di letteratura scelti sono stati i seguenti:

- emulsione con elica marina (Poncelet et al., 1999)
- emulsione con ancoretta magnetica (Liu et al., 2007)

Come si vedrà nei successivi paragrafi, si è deciso di procedere seguendo il metodo di Poncelet a cui sono state apportate alcune modifiche.

### **2.1.1 Materiali**

Na-Alg a media viscosità (Sigma-Aldrich; viscosità in soluzione acquosa al 2%<sub>w/w</sub> a 25°C:  $\geq 2000$  cP), CaCO<sub>3</sub> (Sigma Aldrich; purezza  $\geq 99,0\%$ ), olio di paraffina (Sigma Aldrich; densità 0,827-0,890 g/mL a 20 °C; viscosità dinamica 110 – 230 mPa·s), Span 80 (sorbitano monooleato; Sigma Aldrich), acido acetico glaciale (Sigma Aldrich; purezza  $\geq 99,7\%$ ), acqua deionizzata.

Come tensioattivo per il lavaggio delle microsfere è stato usato il Tween 80 (polietilenglicole sorbitano monooleato; P1754 Sigma Aldrich).

### **2.1.2 Emulsione con elica marina (metodo di Poncelet)**

Con questa tecnica, le microsfere sono ottenute preparando una fase acquosa che viene successivamente versata all'interno di una fase oleosa mantenuta in agitazione per mezzo di un'elica marina, creando un'emulsione dove la fase acquosa è dispersa all'interno della fase oleosa (che costituisce la fase continua). In questo modo la fase acquosa si trova sotto forma di gocce; a questo punto, con l'aggiunta di un apposito agente reticolante (acido acetico), le gocce vengono trasformate in microsfere.

Ricordando che il reticolo di Ca-Alg si ottiene mediante una reazione di scambio ionico tra gli ioni  $\text{Na}^+$  provenienti dal Na-Alg e gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  provenienti da un sale di calcio (vedere paragrafo 1.5.2), per ottenere la fase acquosa, si prepara una soluzione acquosa di Na-Alg ed in seguito gli si disperde del  $\text{CaCO}_3$ . Poiché il  $\text{CaCO}_3$  è insolubile in acqua la reazione di reticolazione avverrà soltanto dopo l'aggiunta dell'agente reticolante (acido acetico) in quanto esso determina la dissoluzione in acqua del sale di calcio. Il  $\text{CaCO}_3$  disperso nella soluzione di Na-Alg è sufficiente per ottenere un grado di reticolazione del Na-Alg tale da garantire alle microsfele una adeguata stabilità strutturale ma non la completa reticolazione del Na-Alg.

Nel metodo di Poncelet il  $\text{CaCO}_3$  viene disperso tramite agitazione meccanica. Tuttavia, prove preliminari di laboratorio hanno mostrato che la dispersione meccanica del  $\text{CaCO}_3$  comporta la formazione di bollicine d'aria. La presenza di queste bollicine può comportare la formazione di gocce di dimensioni diverse nel corso delle varie prove peggiorando, di conseguenza, la riproducibilità nella distribuzione dimensionale delle microsfele. Si è ritenuto quindi opportuno rimuovere tali bollicine per semplice degasamento naturale, ovvero lasciando la dispersione a riposo per un certo tempo. Durante il corso delle prove sperimentali, però, i tempi di riposo della dispersione sono stati ritenuti piuttosto lunghi, per questo motivo, il  $\text{CaCO}_3$ , è stato disperso tramite agitazione ad ultrasuoni (Liu et al., 2007). Procedendo in questo modo non viene inglobata aria e non è necessario lasciare a riposo la dispersione.

Un accorgimento osservato durante la messa a punto della dispersione del  $\text{CaCO}_3$  per mezzo degli ultrasuoni è stato quello della necessità di spargere il  $\text{CaCO}_3$  a “velo” sopra la soluzione di Na-Alg. Questo accorgimento serve per evitare la formazione di “cumuli” di  $\text{CaCO}_3$ , riducendo così i tempi per poter ottenere una dispersione sufficientemente omogenea.

La fase oleosa è composta da un olio (che può essere sia di origine naturale che minerale) contenente l'1%<sub>v/v</sub> di tensioattivo, lo Span 80. Nelle prove sperimentali eseguite in laboratorio si è scelto di utilizzare l'olio di paraffina.

Come accennato in precedenza, la fase acquosa sarà dispersa all'interno della fase oleosa in piccole gocce; a questo punto bisogna aggiungere all'emulsione dell'acido acetico glaciale, il quale solubilizza il  $\text{CaCO}_3$  disperso all'interno della fase acquosa comportando così la reticolazione delle microsfele per mezzo della conversione del Na-Alg in Ca-Alg.

Riassumendo, il metodo è composto dai seguenti passaggi:



- preparazione di una soluzione acquosa di Na-Alg;
- dispersione di CaCO<sub>3</sub> nella soluzione preparata al punto precedente;
- messa in agitazione della fase oleosa;
- introduzione della dispersione di Na-Alg/CaCO<sub>3</sub> nella fase oleosa;
- dopo 15 minuti aggiunta di 20 mL di olio di paraffina contenente acido acetico;
- interruzione dell'agitazione dopo un'attesa di 5 minuti.

Nella tabella 2.1 è riportata la composizione delle due fasi, nella tabella 2.2 i parametri di processo.

**Tabella 2.1** – Composizione delle fasi in emulsione per la produzione di microsfele da Ca-Alg seguendo il metodo di Poncelet et al.

	Componente	%
Fase acquosa, dispersa	Na-Alg	1,5 <sub>w/w</sub>
	CaCO <sub>3</sub>	0,3 <sub>w/w</sub>
Fase oleosa, continua	Span80	1,0 <sub>v/v</sub>
	Ac. acetico	0,3 <sub>v/v</sub>

**Tabella 2.2** – Parametri di processo per la produzione di microsfele di Ca-Alg seguendo il metodo di Poncelet et al.

Variabile	Valore
Rapporto di fase	30% <sub>v/v</sub>
Ca <sup>2+</sup> /Na-Alg	8,0% <sub>w/w</sub>
Ac Acetico/Ca <sup>2+</sup>	5,3 <sub>mol/mol</sub>
Velocità rotazione girante	200 rpm

Occorre precisare, però, che al primo approccio con questa tecnica non si è riusciti a produrre le microsfele perché il Na-Alg non si è convertito in Ca-Alg. Si è ipotizzato che la responsabilità di ciò fosse da attribuire alla lenta diffusione

dell'acido acetico nell'olio di paraffina a causa dell'elevata viscosità di quest'ultimo (quando si versa l'acido nella fase organica si vede la goccia di acido in mezzo all'olio di paraffina, vedere fig. 2.1).



Figura 2.1 – Acido acetico in olio di paraffina.

Nella procedura messa a punto da Poncelet, effettivamente, la fase oleosa utilizzata è l'olio di colza (il quale ha una viscosità diversa dall'olio di paraffina e, di conseguenza, cambia la diffusività dell'acido acetico al suo interno).

Prendendo spunto dalla tecnica di Liu illustrata nel paragrafo 2.1.2, si è provato a risolvere il problema introducendo l'acido acetico nella fase oleosa prima di versarvi la fase acquosa. Ricordando, infatti, quanto detto nel capitolo 1, è noto che la reazione di scambio ionico che porta alla formazione del reticolo di Ca-Alg è molto veloce; in particolare il tempo di reticolazione è più breve del tempo necessario per la formazione delle gocce di Na-Alg. Si può ipotizzare che, quando si usa olio di colza, la diffusività dell'acido acetico in esso sia molto veloce, per cui bisogna permettere alla fase acquosa di disperdersi in forma di gocce prima di aggiungere all'emulsione l'agente reticolante (acido acetico).

Quando si usa l'olio di paraffina, invece, la diffusività dell'acido acetico nell'olio è molto lenta, quindi, aggiungendo l'acido dopo la formazione delle gocce,

si dovrebbero aspettare dei tempi molto lunghi per far diffondere l'acido acetico portando alla reticolazione delle gocce, mentre, aggiungendo l'acido acetico nella fase oleosa prima di creare l'emulsione, la fase acquosa è in grado di disperdersi in gocce e reticolare dando origine alle microsfe.

L'ipotesi della lenta diffusività dell'acido acetico in olio di paraffina è avvalorata da un lavoro di letteratura (Ribeiro et al., 2005), dove per far reticolare le gocce di Na-Alg si attendono 60 minuti, mentre, nel lavoro di Poncelet, si attendono solo 5 minuti.

Per verificare quanto appena ipotizzato, dopo essersi accertati di poter ottenere delle microsfe di Ca-Alg con questa nuova procedura (vedere 2.1.3), sono state eseguite nuovamente delle prove sperimentali seguendo la procedura di Poncelet, questa volta aggiungendo l'acido acetico glaciale nella fase oleosa durante la preparazione della stessa.

Dopo essere riusciti a produrre delle microsfe con la tecnica di Poncelet, sono state eseguite delle prove sperimentali finalizzate alla ricerca dei dovuti accorgimenti per migliorarne la distribuzione granulometrica.

Gli accorgimenti trovati sono i seguenti:

- la fase acquosa viene caricata in una siringa prima di essere versata nella fase oleosa. In questo modo si ha una maggior precisione sul volume di fase acquosa che viene versato nella fase oleosa. Ciò garantisce una maggiore riproducibilità sul rapporto delle fasi contenute nell'emulsione nel corso delle varie prove sperimentali migliorando, di conseguenza, la riproducibilità delle dimensioni delle microsfe;
- si mette in agitazione la fase oleosa 10 minuti prima di versare la fase acquosa. Questo serve per avere una buona miscelazione dell'acido nell'olio di paraffina. Come tempo di agitazione si sono scelti 10 min perché, nel corso delle prove sperimentali, si è notato che, con questo tempo di agitazione, si ha un miglioramento sull'uniformità di distribuzione granulometrica delle microsfe;
- dopo aver versato la fase acquosa nella fase oleosa, si attendono 30 minuti prima di interrompere l'agitazione. Infatti, poiché sono state effettuate diverse modifiche dalla procedura originale, si è deciso di prolungare il tempo di emulsione per aver la certezza di ottenere una sufficiente reticolazione del Na-Alg.

Per quanto riguarda la scelta del becher nel quale far avvenire l'emulsione, inizialmente si era scelto un becher con un diametro interno di 100 mm, mentre, l'elica marina usata per le prove sperimentali ha la geometria riportata nella tabella 2.3

**Tabella 2.3** – Geometria dell'elica marina usata per la produzione delle microsfe.

Parametro	Valore	
De	62 mm	De = diametro interno pala
Di	44 mm	Di = diametro interno girante
Ds	7 mm	Ds = diametro stelo girante
Lp	14 mm	Lp = larghezza pala girante
Hp	12 mm	Hp = altezza pala girante

Dopo diverse prove sperimentali, si è scelto un becher con un diametro di 70 mm in quanto, è stato quello con cui si sono ottenuti i risultati migliori in termini di uniformità di distribuzione granulometrica delle microsfe. In figura 2.2 è riportata la geometria del sistema di emulsione.

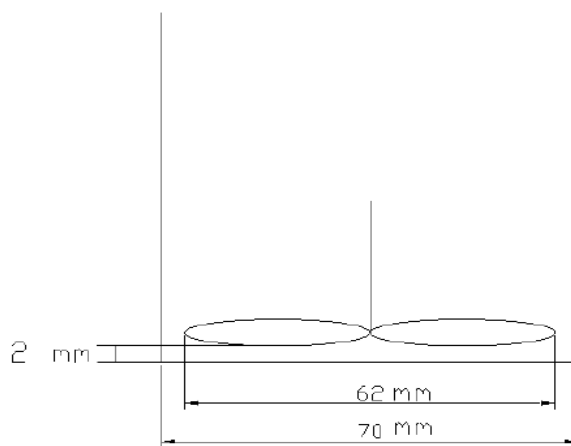


Figura 2.2 – Geometria del sistema di emulsione.

In figura 2.3 si può notare la differenza tra le microsfere essiccate prodotte con un becher del diametro interno di 100 mm (sinistra) che si presentano con dimensioni maggiori e forma irregolare rispetto a quelle prodotte con un becher del diametro interno di 70 mm (destra).



Figura 2.3 – Microsfere essiccate prodotte con becher di diametro interno di 100 mm (sinistra) e con becher di diametro interno 70 mm (destra).

La procedura finale per la produzione di microsfere di Ca-Alg secondo il metodo di Poncelet messa a punto in laboratorio è articolata in questo modo:

- preparazione di una soluzione acquosa di Na-Alg;
- dispersione del  $\text{CaCO}_3$  mediante agitazione ad ultrasuoni;
- preparazione della fase oleosa contenente acido acetico;
- caricamento di 15 mL della dispersione preparata in una siringa;
- introduzione della fase acquosa in un volume di 50 mL della fase oleosa (mantenuta in agitazione);
- interruzione dell'agitazione dopo una attesa di 30 minuti.

### **2.1.3 Metodo con ancoretta magnetica (metodo di Liu)**

Come fase acquosa si è scelto di usare del Na-Alg a media viscosità con una frazione in massa dell'1,5% esattamente come nel metodo di Liu e, in seguito, si è disperso del  $\text{CaCO}_3$  tramite agitazione ad ultrasuoni.

Riassumendo, si è proceduto in questo modo:

- preparazione di una soluzione acquosa di Na-Alg;

- dispersione del  $\text{CaCO}_3$  nella soluzione preparata al punto precedente;
- introduzione della dispersione nella fase oleosa (mantenuta in agitazione);
- interruzione dell'agitazione e recupero delle microsfere dopo una attesa di 5 min.

Il processo di formazione delle microsfere è stato fatto avvenire in un becher con diametro interno di 70 mm.

Nella tabella 2.4 è riportata la composizione delle due fasi, nella tabella 2.5 i parametri di processo.

**Tabella 2.4** - Composizione delle fasi in emulsione per la produzione di microsfere da Ca-Alg seguendo il metodo do Liu et al.

	Componente	%
Fase acquosa, dispersa	Na-Alg	1,5 <sub>w/w</sub>
	$\text{CaCO}_3$	0,3 <sub>w/w</sub>
Fase oleosa, continua	Span80	1,5 <sub>v/v</sub>
	Ac. acetico	0,2 <sub>v/v</sub>

**Tabella 2.5** – Parametri di processo per la produzione di microsfere di Ca-Alg seguendo il metodo do Liu et al.

Parametro	Valore
Rapporto di fase	20% <sub>v/v</sub>
$\text{Ca}^{2+}/\text{Na-Alg}$	8,0% <sub>w/w</sub>
Ac Acetico/ $\text{Ca}^{2+}$	5,3 <sub>mol/mol</sub>
Velocità agitazione	700 rpm

Per scegliere l'ancoretta magnetica si sono effettuate in parallelo due prove sperimentali: in una è stata usata un'ancoretta lunga 44 mm mentre l'altra prova è stata eseguita con un'ancoretta della lunghezza di 29 mm.

In figura 2.4 sono riportate le geometrie dei due sistemi di emulsione utilizzati per stabilire la lunghezza dell'ancoretta magnetica più appropriata.

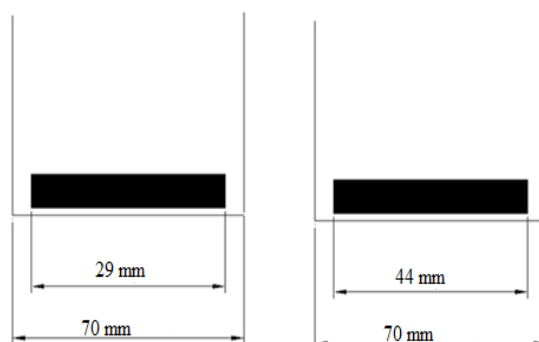


Figura 2.4 – Geometria dei sistemi di emulsione per stabilire la lunghezza dell'ancoretta magnetica più appropriata.

In figura 2.5 si possono osservare le microsfele ottenute con l'ancoretta di 29 mm e quella di 44 mm. Da questa figura è evidente che operando con l'ancoretta più lunga si ottengono microsfele più piccole e con una migliore distribuzione dei diametri, per questo motivo si è scelto di eseguire le prove successive utilizzando l'ancoretta lunga 44 mm.

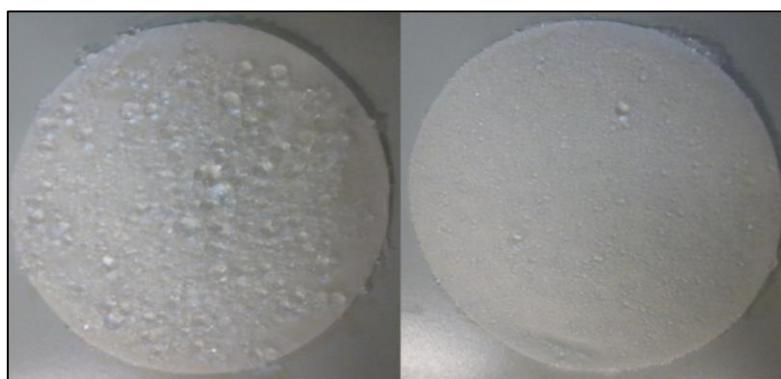


Figura 2.5 – Microsfele ottenute con ancoretta di 29 mm (sinistra) e 44 mm (destra).

Seguendo questa procedura, tuttavia, non si è mai riusciti ad ottenere delle microsfere con una distribuzione granulometrica unimodale pur variando la velocità di rotazione dell'ancoretta magnetica. Ciò significa che, per mettere a punto una procedura tale da consentire di ottenere delle microsfere con una distribuzione granulometrica unimodale sarebbe stato opportuno rivedere tutti i parametri di processo (concentrazione Na-Alg, rapporto fra le fasi acquosa ed oleosa, diametro becher e percentuale di Span 80 nella fase oleosa). Questo sarebbe stato molto oneroso in termini di tempo, pertanto si è preferito mettere a punto la procedura di formazione delle microsfere con l'elica marina già descritta nel paragrafo 2.1.1.

## **2.2 Recupero, lavaggio e scambio solvente**

### **2.2.1 Recupero delle microsfere**

Al termine del processo di formazione, le microsfere devono essere prelevate dalla fase oleosa e sottoposte a una sequenza di cicli di lavaggio. Il metodo maggiormente utilizzato per il loro recupero è la tecnica dell'inversione di fase dell'emulsione (Poncelet et al., 1999).

L'inversione di fase si ottiene aggiungendo all'emulsione una nuova fase acquosa, detta di recupero. In questo modo la fase oleosa diventa la fase dispersa e le microsfere si ripartiscono nella fase acquosa di recupero. In seguito è possibile recuperare le microsfere mediante filtrazione.

Per questa tecnica sono state provate tre diverse opzioni per la fase acquosa di recupero:

- soluzione acquosa di  $\text{CaCl}_2$  (Poncelet et al., 1999);
- acqua deionizzata (Liu et al, 2007);
- soluzione acquosa Tween 80 1%<sub>v/v</sub> (Lupo et al., 2014).

L'utilizzo di  $\text{CaCl}_2$ , pur presentando il vantaggio di consentire sia l'inversione di fase sia il completamento della reticolazione delle microsfere recuperate, grazie alla presenza degli ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , è la tecnica più complessa in quanto richiede la simultanea esecuzione di misure di conducibilità elettrica per determinare la corretta quantità di soluzione da aggiungere. Come si vede dalla figura 2.6 quando la fase dispersa è quella acquosa (w/o) la conducibilità elettrica dell'emulsione varia poco con l'aggiunta della soluzione di  $\text{CaCl}_2$  per poi variare velocemente quando



si ha l'inversione di fase ottenendo così un'emulsione o/w "instabile" dove, questa volta, la fase acquosa è la fase continua che contiene le microsfeere e le goccioline di fase oleosa. L'aggiunta eccessiva di soluzione, però, porterebbe a ottenere una soluzione o/w "stabile" rendendo impossibile il recupero delle sfere (Poncelet et al, 1999).

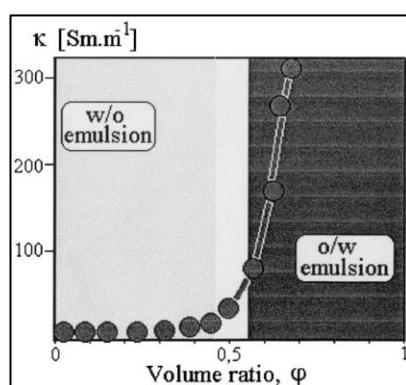


Figura 2.6 – Andamento della conducibilità elettrica al variare del rapporto di fase dell'emulsione. Fonte: Poncelet et al., Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 155 (1999) 171–176.

In alternativa si è proceduto ed eseguire il recupero delle microsfeere utilizzando acqua deionizzata e procedendo in questo modo:

- riduzione della velocità di rotazione dell'elica marina a 50 rpm (operazione condotta dopo aver completata la procedura di reticolazione delle microsfeere descritta nel paragrafo 2.1.1);
- aggiunta di 200 mL di acqua deionizzata;
- interruzione dell'agitazione dopo una attesa pari a 1 h;
- rimozione della fase oleosa;
- filtrazione della fase acquosa.

Con questa tecnica, però, la migrazione delle microsfeere dalla fase oleosa alla fase acquosa di recupero risulta molto lenta, di conseguenza, si hanno delle ingenti perdite di microsfeere a meno di allungare la durata della fase di agitazione fino a tempi superiori alle 3-4 ore a seconda del diametro delle microsfeere. Per chiarire

meglio il problema riscontrato si tenga presente che durante le prove sperimentali l'ammontare di microsfere con diametro medio  $< 200 \mu\text{m}$  recuperate era molto esiguo anche dopo 4 ore di agitazione.

Un altro inconveniente di questa procedura riguarda la difficoltà riscontrata nella pulizia delle microsfere recuperate. L'aspetto delle microsfere (riportato in fig. 2.7) era quello di una poltiglia ed il rilascio di impurezze proseguiva anche dopo molti cicli di lavaggio. Questo significa che il recupero delle microsfere con semplice acqua distillata è molto lungo e scarsamente efficiente.



Figura 2.7 – Microsfere ottenute dalla fase di recupero. Come si può vedere, a causa delle eccessive impurezze, le microsfere hanno l'aspetto di una poltiglia.

Al fine di risolvere gli inconvenienti sopra esposti si è provato a procedere al recupero delle microsfere provocando l'inversione di fase con acqua contenente l'1%<sub>V/V</sub> di Tween 80. In questo modo a seguito dell'inversione di fase, la presenza del tensioattivo favorisce la dispersione della fase oleosa in gocce molto fini facilitando la ripartizione delle microsfere nella fase acquosa.

Lavorando con la soluzione di Tween 80 effettivamente si ha avuto il vantaggio della riduzione del tempo di recupero, tuttavia, il prodotto ottenuto è ancora più sporco rispetto a quello ottenuto utilizzando semplice acqua deionizzata rendendo così necessario un ulteriore aumento del numero di cicli di lavaggio con conseguente drastica riduzione dell'efficienza di recupero delle microsfere.

Alla luce dei risultati delle prove preliminari sopra esposte si è deciso di procedere con l'inversione di fase con acqua deionizzata utilizzando alcuni accorgimenti per cercare di migliorare l'efficienza di recupero delle microsfere. Tali accorgimenti sono il risultato di parecchi esperimenti condotti in laboratorio e sono di seguito brevemente ricapitolati.

In primo luogo si è osservato che, lasciando l'emulsione a riposo per almeno 30 minuti al termine del processo di formazione delle microsfele, queste ultime decantano verso il fondo del becher facilitando il loro trasferimento nella fase acquosa di recupero. La seconda osservazione è stata che, per migliorare il recupero delle microsfele, è opportuno agitare la fase oleosa. Posizionando la girante all'interno della fase oleosa ed impostando la velocità di rotazione a 50 rpm si può dividere idealmente il becher in tre zone (fig. 2.8):

1. zona di agitazione dove si disperde la fase oleosa (in alto);
2. zona intermedia dove si ha il trasferimento delle microsfele nella fase acquosa di recupero;
3. zona di quiete dove si depositano le microsfele (in basso).



Figura 2.8 – Sistema di recupero delle microsfele.

La posizione della girante prima indicata è fondamentale in quanto si è osservato che se questa viene posizionata in basso ci sarebbe un'unica zona agitata comportando il ritrasferimento delle microsfele nella fase oleosa riducendo, di conseguenza, l'efficienza di recupero.

L'ultimo accorgimento è stato quello di attendere almeno 30 minuti prima di rimuovere la fase oleosa una volta completata l'inversione di fase. In questo modo

le goccioline della fase oleosa più fini che sono ancora disperse nella fase acquosa di recupero hanno il tempo di migrare verso la fase oleosa. In tal modo le microsfere ripartite nella fase acquosa di recupero saranno più pulite.

Infine, durante le prove di laboratorio si è provato a sottoporre a ripetere più volte la procedura sopra esposta per valutare se fosse necessario ripetere lo stadio di recupero delle microsfere in due o più cicli. Si è osservato che, effettivamente, effettuando un secondo ciclo di recupero, si ottiene nuovamente un quantitativo di microsfere significativo. Effettuando, invece, un terzo ciclo di recupero si è raccolto un quantitativo di microsfere molto scarso; pertanto, si è deciso di eseguire due soli cicli recupero.

Riassumendo, la procedura di recupero delle microsfere messa a punto in laboratorio è la seguente:

- interruzione dell'agitazione e attesa di almeno 30 minuti (dopo aver ottenuto la reticolazione delle microsfere descritta nel paragrafo 2.1.1);
- rimozione dell'elica marina e introduzione di 200 mL di acqua deionizzata;
- posizionamento dell'elica marina nella fase oleosa e agitazione del sistema a 50 rpm per 60 minuti;
- interruzione dell'agitazione ed attesa di 30 minuti prima della rimozione della fase oleosa;
- recupero della fase oleosa e ripetizione del ciclo di recupero delle microsfere secondo i punti di cui sopra.

### **2.2.2 Lavaggio delle microsfere**

Dopo alcuni test preliminari, la successiva fase di lavaggio è stata eseguita in questo modo:

- immersione delle microsfere in 100 mL di acqua deionizzata contenente l'1%<sub>v/v</sub> di Tween 80;
- raccolta delle microsfere tramite filtrazione ed immersione in 100 mL di acqua deionizzata;
- recupero delle microsfere tramite filtrazione;
- ripetizione degli ultimi due punti di cui sopra per altre tre volte.

Dalle prove in laboratorio si è visto che il risultato migliore si ottiene con una filtrazione sottovuoto con filtro Buchner. Le microsfere ottenute sono state infine conservate in frigorifero immerse in acqua deionizzata.

La figura 2.9 riporta una immagine delle microsfere ottenute con la procedura di recupero definitiva. Appare evidente la differenza rispetto alle microsfere raffigurate in figura 2.7.



Figura 2.9 – Microsfere recuperate con la nuova procedura.

### **2.2.3 Scambio di solvente**

Per poter essiccare le microsfere è necessario sostituire l'acqua contenuta nelle microsfere con un solvente (etanolo) solubile in  $sc\text{-CO}_2$ . Ciò viene effettuato con la procedura di scambio di solvente.

Come già detto nel capitolo 1, per quanto riguarda i gel di Ca-Alg, se si provasse a scambiare l'acqua contenuta al loro interno direttamente con l'etanolo si avrebbe un collasso del reticolo a causa della forte differenza di tensione superficiale tra i due solventi; pertanto è meglio procedere con una sostituzione a sei stadi (Mehling et al., 2009).

Nella tabella 2.6 sono riportati la frazione in volume di etanolo delle soluzioni di scambio di solvente e i tempi di immersione delle microsfere in ciascuna di esse. Si noti come il sesto stadio venga, in realtà, ripetuto due volte (6a e 6b) (Alnaief et al., 2011).

**Tabella 2.6** - Frazione volumica di etanolo delle soluzioni di scambio di solvente e i relativi tempi di immersione delle microsfe.

Stadio	Frazione etanolo	Tempo [h]
1	10%	7
2	30%	7
3	50%	7
4	70%	7
5	90%	7
6a	100%	7
6b	100%	24

Il volume di ogni soluzione di scambio è stato scelto pari a 50 mL.

La procedura di scambio solvente sopra descritta dà buoni risultati, tuttavia, richiede dei tempi molto lunghi. In seguito ad un approfondimento bibliografico (Mallepally et al., 2013) si è trovata una procedura di scambio solvente in agitazione (500 rpm); in questo modo gli stadi da 1 a 6a hanno una durata di soli 15 minuti ciascuno. L'ultimo dei due stadi con l'etanolo puro (6b) si effettua comunque in quiete e sempre per 24 ore per assicurare il completo allontanamento dell'acqua.



Figura 2.10 – Alcolgel di Ca-Alg.

## 2.3 Conclusioni

Riassumendo, in seguito alle prove sperimentali si è deciso di produrre microsferi di alginato seguendo il metodo di Poncelet con alcune modifiche. Le modifiche effettuate sono le seguenti:

- l'acido acetico viene inserito durante la preparazione della fase oleosa per prevenire il problema della lenta diffusività dell'acido nell'olio di paraffina. La fase oleosa deve, inoltre, essere messa in agitazione 10 minuti prima dell'aggiunta della fase acquosa per assicurare una miscelazione omogenea tra acido acetico e olio di paraffina;
- il tempo di formazione delle microsferi è stato portato a 30 minuti per assicurare una sufficiente reticolazione delle microsferi.

Rispetto al metodo di Poncelet tali modifiche hanno comportato una semplificazione della procedura operativa (in quanto non occorre più aspettare la formazione delle gocce prima di aggiungere l'acido) nonché una maggiore accuratezza nel dosaggio dell'acido acetico. A questo bisogna aggiungere che si ottiene anche una riduzione del tempo di formazione delle microsferi; infatti, secondo la procedura definitiva, le microsferi si ottengono dopo 30 minuti dalla formazione dell'emulsione, mentre, preparando le microsferi aggiungendo l'acido acetico in un secondo momento, si dovrebbero attendere 15 minuti per la formazione delle gocce e poi bisognerebbe attendere 60 minuti per la loro reticolazione.

Per quanto riguarda il recupero delle microsferi, infine, sono stati messi a punto parecchi accorgimenti per migliorarne l'efficienza e ridurre i tempi del processo. Tali accorgimenti, che riguardano i tempi di decantazione, il posizionamento dell'elica marina durante l'inversione di fase, la scelta del numero di cicli di recupero, non si basano su indicazioni di letteratura ma sono il frutto di parecchi esperimenti preliminari e hanno consentito di ottenere delle microsferi più pulite ed in maggior quantità.

## **Capitolo 3**

### **Una nuova tecnica per la sintesi di microsfere ibride silice-alginato: prove preliminari e risultati**



## 3.1 Introduzione

In questo capitolo verrà descritta la messa a punto di un metodo innovativo per la produzione di microsfere ibride silice/Ca-Alg. L'obiettivo è realizzare delle microsfere che abbiano elevate aree superficiali (caratteristica delle microsfere di silice) e siano bio-adesive (caratteristica delle microsfere di Ca-Alg).

Attualmente, da letteratura, le microsfere ibride vengono prodotte con il metodo diffusivo (vedere paragrafi 1.5.2 e 1.7.3). Con tale metodo si ottengono microsfere con aree superficiali nell'intorno dei  $550 \text{ m}^2/\text{g}$  e un volume poroso di circa  $1,27 \text{ cm}^3/\text{g}$  (Lu et al., 2006); inoltre, utilizzando il metodo diffusivo, la produzione di microsfere con diametro medio  $< 500 \text{ }\mu\text{m}$  risulta difficoltosa (vedere paragrafo 1.5.2).

Dal momento che le aree superficiali dei gel di silice possono superare i  $1000 \text{ m}^2/\text{g}$  si è pensato di proporre un nuovo metodo di sintesi delle microsfere ibride per potenziare al meglio questa caratteristica della componente silicea sul prodotto finale ed ottenere microsfere ibride con aree superficiali superiori a  $600 \text{ m}^2/\text{g}$ . Per questo motivo si è deciso di produrre le microsfere ibride mettendo a punto un metodo di reticolazione interna (vedere paragrafo 1.5.2) in quanto, con questa tecnica, è possibile ottenere microsfere con diametri molto ridotti (è possibile produrre anche nanosfere, Pasques et al., 2014) e aree superficiali maggiori rispetto a quelle che si ottengono realizzando microsfere con il metodo diffusivo.

## 3.2 Preparazione fase acquosa

Per la formazione di microsfere ibride silice/Ca-Alg si segue a grandi linee la procedura di formazione di microsfere di Ca-Alg vista nel capitolo precedente effettuando, però, alcune modifiche.

In primo luogo occorre realizzare una fase acquosa idonea per la formazione delle microsfere ibride. Essa sarà costituita da due diverse componenti:

- una componente inorganica composta da una miscela di acqua e del precursore siliceo;
- una componente organica costituita da una soluzione acquosa di Na-Alg in cui viene disperso del  $\text{CaCO}_3$ .

Per la componente inorganica, come precursore siliceo, si è scelto il TMOS. Le motivazioni di questa scelta sono espone nel paragrafo 3.2.1

Le due componenti sopra menzionate sono state preparate separatamente per poi essere miscelate in uno stadio successivo (vedi paragrafo 3.2.3). Tale decisione è stata presa in quanto si è osservato che se la fase acquosa viene preparata miscelando tutti i componenti si verifica una gelificazione prematura del Na-Alg. Questo fenomeno può essere spiegato dal fatto che, durante la reazione di idrolisi del TMOS (ricordando che la reticolazione del TMOS è un processo a due stadi dove si ha prima la reazione di idrolisi ed in seguito la reazione di condensazione con la conseguente reticolazione, vedere paragrafo 1.5.1), si crea un ambiente acido, probabilmente a causa della formazione dei gruppi silanolicci (Si-OH) (Coradin et al., 2003). Si è dedotto che questa acidità porta alla solubilizzazione del  $\text{CaCO}_3$  causando una gelificazione prematura del Na-Alg. Inoltre, la presenza del Na-Alg accelera la reazione di condensazione del TMOS (Lu et al., 2006), per cui, tenendo a contatto prolungato la componente organica con la componente inorganica si avrebbe una gelificazione del precursore silicato.

Facendo, invece, avvenire separatamente la reazione di idrolisi del TMOS e la dispersione del  $\text{CaCO}_3$  nella soluzione di Na-Alg, le due diverse componenti si troveranno in contatto solo durante la loro miscelazione. Procedendo in questa maniera è quindi possibile preparare una fase acquosa che permetta di produrre delle microsfere ibride.

### **3.2.1 Preparazione componente inorganica**

Per quanto riguarda la componente silicea delle microsfere ibride, la reazione di idrolisi avviene tra il precursore siliceo e l'acqua. Solitamente, per la preparazione dei gel di silice, come solvente, si usa una miscela  $\text{H}_2\text{O}$ /alcol in modo tale da non avere lacune di miscibilità, ottenendo in questo modo un sistema monofasico (vedere paragrafo 1.5.1).

Per quanto riguarda la formazione di microsfere ibride, dovendo miscelare la componente inorganica con la componente organica descritta nel paragrafo successivo (e contenente  $\text{CaCO}_3$ ), si è preferito evitare di utilizzare alcol perché si è supposto che quest'ultimo andrebbe a solubilizzare parte del  $\text{CaCO}_3$  portando ad una indesiderata reticolazione del Na-Alg. A questo bisogna aggiungere che, solitamente, per la preparazione dei gel di silice è necessario utilizzare HCl come catalizzatore. Anche l'uso di HCl andrebbe evitato in questo caso onde evitare la solubilizzazione del  $\text{CaCO}_3$ .

Per ovviare ai problemi sopra esposti e tenendo presente che gli alcossidi silicei se pur inizialmente insolubili in acqua sono in essa totalmente miscibili una volta

idrolizzati (Coradin et al., 2003), si è scelto di usare il TMOS come precursore per la componente inorganica perché durante le prove sperimentali si è notato che a contatto con l'acqua esso è instabile, permettendo così di ottenere la reazione di idrolisi anche senza l'uso di HCl. Questa opzione permette dunque di ottenere la reazione di idrolisi senza catalizzatore acido mantenendo il sistema in condizioni monofasiche anche senza la presenza di alcol.

È importante mettere in evidenza che, durante la preparazione della componente inorganica, il TMOS deve dare solamente la reazione di idrolisi. La reazione di condensazione, che corrisponde alla gelificazione (vedere paragrafo 1.5.1), avviene dopo la miscelazione della componente inorganica con la componente organica.

Dal momento che la reazione di idrolisi del TMOS senza l'uso di un catalizzatore richiederebbe comunque tempi molto lunghi, si è osservato, mediante prove preliminari, che è possibile ridurre comunque il tempo di reazione mantenendo il sistema in agitazione. Perciò si è scelto di far avvenire la reazione di idrolisi in un becher con diametro interno di 46 mm e di tenere la componente inorganica in agitazione con ancorotta magnetica. In figura 3.1 è rappresentata la geometria del sistema di reazione.



Figura 3.1 – Geometria del sistema di reazione per la reazione di idrolisi della componente inorganica per la formazione delle microsferi ibride.

È possibile stabilire quando la reazione di idrolisi è avvenuta anche facilmente ad occhio nudo in quanto il sistema, inizialmente bifasico, si presenta torbido per poi diventare limpido a reazione avvenuta quando si sono raggiunte le condizioni

di monofasicità (Chen e Lin, 2007) (figura 3.2); inoltre, durante le prove di laboratorio si è notato che questa reazione sviluppa calore.

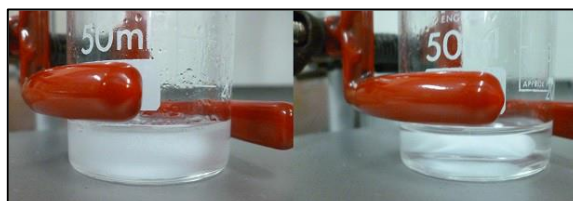


Figura 3.2 – Nell’immagine di sinistra si può vedere il sistema bifasico mentre, nell’immagine di destra, il sistema è diventato monofasico.

Nella tabella 3.1 sono riportate le condizioni operative della reazione di idrolisi della componente inorganica.

**Tabella 3.1** – Condizioni operative per la reazione di idrolisi della componente inorganica per la preparazione delle microsfele ibride.

Parametro	Valore
TMOS/ H <sub>2</sub> O	1/1 <sub>v/v</sub>
velocità rotazione	700 rpm
tempo	60 min

Un altro inconveniente che si è dovuto prendere in considerazione è legato alla formazione di metanolo come sottoprodotto dell’idrolisi del TMOS. Come detto prima, la presenza di alcol nella componente inorganica deve essere evitata per impedire la parziale solubilizzazione del CaCO<sub>3</sub> durante la successiva miscelazione con la componente organica. Per questo motivo, è necessario rimuovere questo sottoprodotto di reazione.

La rimozione del metanolo può avvenire per mezzo di un’agitazione a caldo della soluzione di H<sub>2</sub>O e TMOS dopo che è avvenuta la reazione di idrolisi (Chen e Lin, 2007). Dal momento che l’agitazione avviene a caldo, il tempo e la velocità di agitazione devono essere scelti con cura in modo da evitare la gelificazione della componente inorganica. Dopo alcuni test preliminari si è scelto di procedere alla

rimozione del metanolo mediante agitazione magnetica a 200 rpm per 5 minuti su piastra riscaldata a 65°C. Durante i test preliminari prima menzionati si è anche notato che, nelle condizioni in cui viene preparata la componente inorganica, la gelificazione avviene sempre dopo 7 minuti indifferentemente dal volume della soluzione.

Data la buona riproducibilità del tempo di gelificazione della componente inorganica si può ritenere che durante la fase di rimozione a caldo del metanolo questa soluzione raggiunga sempre lo stesso grado di idrolisi prima di essere miscelata con quella di Na-Alg.

Nella tabella 3.2 sono riportate le condizioni operative della fase di rimozione del metanolo.

**Tabella 3.2** – Condizioni operative per la rimozione del metanolo dalla componente inorganica.

Parametro	Valore
velocità di rotazione	200 rpm
temperatura	65°C
tempo	5 min

### 3.2.2 Preparazione componente organica

Per la preparazione della componente organica (contenente Na-Alg), rispetto al capitolo precedente, si sono dovute effettuare alcune modifiche:

- tipo di alginato: si è preferito usare il Na-Alg a bassa viscosità in modo da permettere un efficace e rapido miscelamento con la componente inorganica, pur mantenendo una bassa velocità di agitazione evitando così la gelificazione prematura della fase acquosa. In questo modo si evita anche di inglobare bollicine d'aria (lavorando con una soluzione a bassa viscosità l'aria inglobata migra rapidamente verso la superficie della soluzione, vedere fig. 3.3) che, come già spiegato nel paragrafo 2.1.1, peggiorano la riproducibilità della distribuzione dimensionale delle microsfele. Nel corso delle prove sperimentali si è notato che, per

ottenere una buona dispersione del  $\text{CaCO}_3$ , la velocità di rotazione dell'ancoretta magnetica non deve essere  $< 350$  rpm;

- aggiunta di una soluzione tampone a pH 6,00: il suo ruolo è quello di “proteggere” il  $\text{CaCO}_3$  dall'ambiente acido creato dalla reazione di idrolisi del TMOS evitandone la sua prematura solubilizzazione nella soluzione acquosa.

Il valore di pH della soluzione tampone è stato scelto in base a considerazioni effettuate durante la miscelazione della componente organica con quella inorganica e che verranno illustrati nel paragrafo 3.2.4;

- dispersione  $\text{CaCO}_3$ : si è preferito procedere con una dispersione tramite agitazione meccanica con ancoretta magnetica piuttosto che con la dispersione ad ultrasuoni. Quest'ultima, infatti, porta ad un aumento della temperatura della dispersione che accelera la reticolazione del gel di silice.

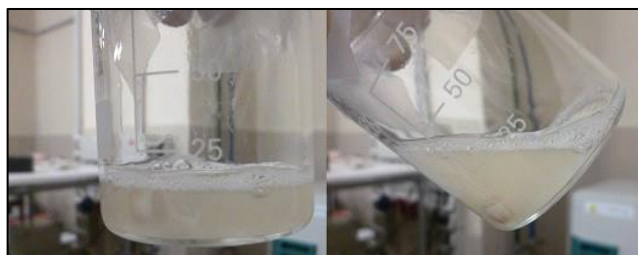


Figura 3.3 – Migrazione dell'aria accumulata durante la dispersione del  $\text{CaCO}_3$  nella fase organica verso la superficie con la formazione di una schiuma.

In figura 3.4 è raffigurato il sistema dove si prepara la componente organica, mentre, nella tabella 3.3, è riportata la composizione della componente organica.



Figura 3.4 – Geometria del sistema per la preparazione della componente organica.

**Tabella 3.3** – Composizione della componente organica.

Componente	% <sub>w/w</sub>
Na-Alg	2,7
Soluzione tampone	1,4
CaCO <sub>3</sub> /Na-Alg	45

### 3.2.3 Miscelazione componente inorganica e componente organica

Per miscelare la componente inorganica con la componente organica si è scelto di versare la componente inorganica nel becher contenente la componente organica.

La componente organica viene mantenuta in agitazione con ancoretta magnetica a 350 rpm fin quando le viene disperso al suo interno del CaCO<sub>3</sub>. Si è deciso di procedere in questo modo perché si è notato che, con le soluzioni di Na-Alg a bassa viscosità, interrompendo l'agitazione si ha la precipitazione del CaCO<sub>3</sub>.

La gelificazione della componente inorganica, come detto nel paragrafo 3.2, viene velocizzata dalla presenza di Na-Alg; inoltre, anche la velocità di agitazione accelera la gelificazione di questa fase. Durante lo svolgimento delle prove sperimentali si è osservato che, con una velocità di rotazione dell'ancoretta magnetica < 200 rpm, è possibile miscelare le due componenti senza avere una gelificazione prematura della componente inorganica.

Un'altra considerazione importante da fare è relativa alla temperatura della componente inorganica. Come detto in 3.1.2, questa fase, viene riscaldata a 65°C

per rimuovere il metanolo che si forma durante la reazione di idrolisi del TMOS. Durante le prove sperimentali si è notato che un aumento della temperatura promuove la velocità della reazione di condensazione del TMOS, per questo motivo, la componente inorganica, deve essere adeguatamente raffreddata prima di essere miscelata con la componente organica altrimenti si ha una sua gelificazione prematura anche con basse velocità di rotazione dell'ancoretta magnetica durante la miscelazione. In sintesi, la miscelazione delle due componenti si svolge in questa maniera:

1. preparazione della componente organica;
2. preparazione della componente inorganica;
3. caricamento della componente inorganica in una siringa e raffreddamento per contatto con acqua corrente a circa 18 °C per un minuto;
4. riduzione della velocità di agitazione della componente organica a 50 rpm;
5. introduzione della componente inorganica in quella organica.

Al punto 5 è molto importante avere cura di versare la componente inorganica nel centro del becher. In alcuni esperimenti si è provato a versare questa soluzione sia nel centro che in prossimità della parete del becher. Quando la soluzione veniva versata in prossimità della parete, probabilmente a causa della maggiore velocità periferica del fluido indotta dall'ancoretta magnetica, si osservava una gelificazione prematura della componente inorganica.

### **3.2.4 Scelta pH soluzione tampone**

Nel paragrafo 3.2.2 si è detto che, nella preparazione della componente organica, bisogna utilizzare una soluzione tampone a pH 6,00. Di seguito verranno esposte le motivazioni della scelta di questo valore di pH.

Inizialmente si era scelto di utilizzare una soluzione tampone a pH 7,00. Tale opzione, pur risolvendo il problema della prematura solubilizzazione del  $\text{CaCO}_3$ , rende la realizzazione delle microsfele ibride possibile ma molto difficoltosa e poco riproducibile. Infatti il valore di  $\text{pH}=7$  è molto prossimo a quello ottimale (vedere figura 3.5) per la velocità della reazione di condensazione del TMOS. Ciò comporta una gelificazione prematura del TMOS causata dalla accelerazione della velocità della reazione di condensazione legata, appunto, alla scelta di tale pH.



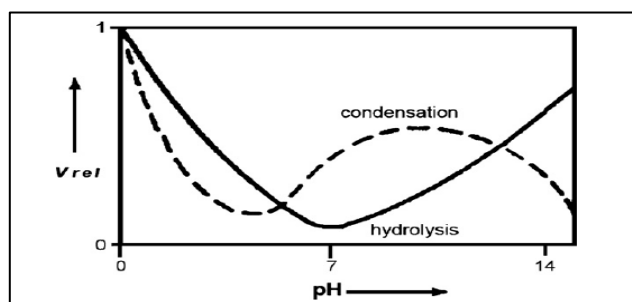


Figura 3.5 – Influenza del pH sulla velocità di reazioni di idrolisi e condensazione degli alcossidi silicei. Fonte: Soleimani Dorcheh e Abbasi, 2008, journal of materials processing technology, 199, 10–26.

Per risolvere questo problema sono state eseguite delle prove con soluzione tampone a pH 4,00 e 6,00. Si sono ottenuti buoni risultati con entrambi i valori di pH, tuttavia, si è deciso di utilizzare il tampone a pH 6,00 in quanto più vicino alla neutralità. In questo modo il processo di formazione di microsferi ibride può essere idoneo anche per il successivo intrappolamento (ad esempio, farmaci) di sostanze sensibili a valori di pH acidi.

### 3.3 Formazione, recupero, invecchiamento e scambio solvente

#### 3.3.1 Materiali

Per la fase organica sono stati usati: Na-Alg a bassa viscosità (Sigma-Aldrich; viscosità in soluzione acquosa al 1%<sub>w/w</sub> a 25°C: = 4-12 cP), CaCO<sub>3</sub> (Sigma Aldrich; purezza ≥ 99,0%), soluzione tampone pH 6,000 (Z655120 Sigma Aldrich, accuratezza valore di pH a 25°C: 0,002), acqua deionizzata.

Per la fase inorganica sono stati usati: TMOS (Sigma Aldrich, purezza ≥ 98,0%), acqua deionizzata.

Per la fase oleosa sono stati usati: olio di paraffina (Sigma Aldrich; densità 0,827-0,890 g/mL a 20°C; viscosità dinamica 110 – 230 mPa·s), Span 80 (sorbitano monooleato; Sigma Aldrich), Acido acetico glaciale (Sigma Aldrich, purezza ≥ 99,7%).

Per il lavaggio delle microsfere, lo scambio di solvente e l'incorporazione di principio attivo sono stati usati rispettivamente Tween 80 (polietilenglicole sorbitano monooleato; Sigma Aldrich), etanolo (Sigma Aldrich, purezza  $\geq 99,8\%$ ).

### 3.3.2 Formazione delle microsfere

La preparazione della fase oleosa per le microsfere ibride differisce da quella eseguita per la preparazione di microsfere di alginato solamente per quanto riguarda il dosaggio di acido acetico. Come si può vedere dalla figura 3.5, al variare del pH varia la velocità della reazione di condensazione del TMOS, di conseguenza anche la velocità di reticolazione delle microsfere ibride subisce delle variazioni. Per questo motivo si è scelto di lavorare con un pH costante procedendo con un eccesso di acido acetico. In questo modo non ci sono variazioni di pH dopo il consumo di acido da parte del  $\text{CaCO}_3$  durante la reticolazione del Na-Alg.

La procedura di formazione delle microsfere ibride si svolge esattamente come quella per le microsfere di Ca-Alg (vedere paragrafo 2.1.2).

Nella tabella 3.4 è riportata la composizione della fase acquosa ottenuta dalla miscela della componente inorganica e organica e della fase oleosa, nella tabella 3.5 i parametri di processo della formazione delle microsfere ibride.

**Tabella 3.4** – Composizione delle fasi in emulsione per la produzione delle microsfere ibride.

	Variabile	% w/w
Fase acquosa, dispersa	$C_{\text{Na-Alg}}$	1,4
	$C_{\text{CaCO}_3}$	0,5
	$C_{\text{Sol tamp pH 6,00}}$	0,8
	Na-Alg/TMOS	6,3
Fase oleosa, continua	$C_{\text{Span80}}$	1,1
	$C_{\text{Ac. acetico}}$	1,3

**Tabella 3.5** – Parametri di processo per la formazione delle microsfere ibride.

Variabile	Valore
Rapporto di fase	30% <sub>v/v</sub>
Ca <sup>2+</sup> /Na-Alg	14,3% <sub>w/w</sub>
Ac. Acetico/Ca <sup>2+</sup>	12,4 <sub>mol/mol</sub>
Velocità rotazione [rpm]	200-600

### 3.3.3 Recupero e lavaggio microsfere ibride

Sperimentalmente si è osservato che il recupero delle sfere ibride si è rivelato essere molto più veloce rispetto a quello delle microsfere di Ca-Alg. Ricordando la procedura di recupero delle microsfere di Ca-Alg vista in 2.2.1, l'agitazione della fase oleosa dopo l'aggiunta di acqua deionizzata dura 30 min invece che 60 min e il recupero non si effettua più in due cicli ma ne è sufficiente uno solo.

Riassumendo, la procedura di recupero delle microsfere ibride si effettua in questo modo:

- interruzione dell'agitazione dopo che è terminato il processo di reticolazione delle microsfere ibride e attesa di almeno 30 minuti;
- rimozione dell'elica marina e introduzione di 200 mL di acqua deionizzata;
- posizionamento dell'elica marina nella fase oleosa e agitazione del sistema a 50 rpm per 30 minuti;
- interruzione dell'agitazione ed attesa di 30 minuti prima della rimozione della fase oleosa.

Il successivo stadio di lavaggio si svolge esattamente come per le microsfere di Ca-Alg (vedere paragrafo 2.2.2). In figura 3.6 si può vedere come si presentano le microsfere ibride alla fine dei cicli di lavaggio.



Figura 3.6 – Microsfere ibride ottenute in laboratorio dopo le operazioni di recupero e lavaggio.

### **3.3.4 Invecchiamento e scambio di solvente**

Nel caso delle microsfele di Ca-Alg, dopo il loro recupero e lavaggio, si deve effettuare solamente lo scambio di solvente per poter poi procedere con l'essiccamento supercritico perché la conversione del Na-Alg in Ca-Alg avviene simultaneamente alla solubilizzazione del  $\text{CaCO}_3$  (vedere paragrafo 2.2.1). Nel caso delle microsfele ibride, invece, la frazione silicea, dopo la gelificazione, necessita di un periodo a contatto con etanolo per fortificare ulteriormente il reticolo. I processi di invecchiamento e scambio di solvente vengono effettuati simultaneamente (vedere paragrafo 1.5.3).

Sperimentalmente, in seguito a diverse prove si è deciso di eseguire l'invecchiamento lasciando il gel a contatto con l'etanolo per almeno 24 h.

Riguardo lo scambio di solvente nei gel ibridi bisogna ricordare che con i gel di Ca-Alg si è proceduto con uno scambio di solvente a diversi cicli con miscele acqua/alcol con una frazione in volume di alcol via via crescente fino ad arrivare all'immersione del gel in alcol puro (vedere paragrafo 2.2.3).

In base a queste condizioni si è scelto di eseguire anche per le microsfele ibride uno scambio di solvente a sei stadi. In figura 3.7 si può vedere come si presentano le microsfele sotto forma di alcolgel (ovvero prima dell'essiccamento supercritico).



Fig. 3.7 – Microsfere ibride a fine procedura di scambio di solvente

### 3.4 Incorporazione ketoprofene

Nel capitolo 1 è stato detto che ci sono tre modi per poter caricare le microsfeere con il ketoprofene:

- in fase di preparazione della fase acquosa;
- durante l'essiccamento supercritico;
- aggiunta di uno stadio alla procedura di scambio di solvente.

L'incorporazione di ketoprofene durante la preparazione della fase acquosa sarebbe la via più veloce e consentirebbe anche un maggior carico di principio attivo, tuttavia, a causa della elevata solubilità del ketoprofene in etanolo, durante lo stadio di scambio di solvente si avrebbe una migrazione del ketoprofene dalle microsfeere alla miscela di scambio di solvente. Per questo motivo, in questa sede, non è possibile procedere al carico di ketoprofene durante la preparazione della fase acquosa.

Per quanto riguarda il caricamento durante l'essiccamento supercritico, l'incorporazione di ketoprofene avverrebbe aggiungendo uno stadio di impregnazione di principio attivo delle microsfeere dopo aver sostituito il solvente in esse contenuto (etanolo) con della CO<sub>2</sub> ed aver portato quest'ultima allo stato supercritico. Lo stadio di impregnazione verrebbe condotto lasciando le microsfeere a contatto con CO<sub>2</sub> supercritica satura di ketoprofene nelle medesime condizioni di temperatura alle quali viene effettuato l'essiccamento (T = 40°C) e ad una pressione pari a 180 bar (Mehling et al., 2009; García-González e Smirnova, 2013). In queste condizioni di temperatura e pressione la solubilità del ketoprofene nella CO<sub>2</sub> è

bassa, pertanto, per ottenere un buon carico di principio attivo, sarebbero richiesti dei tempi eccessivamente lunghi, anche di 70 ore (Mehling et al., 2009).

Per i motivi appena esposti si è scelto di procedere con il caricamento di ketoprofene durante lo scambio di solvente.

Le microsfere sono state caricate di principio attivo aggiungendo un ulteriore stadio di scambio di solvente dove le microsfere ibride vengono immerse in soluzione alcolica contenente il 3,6%<sub>w/w</sub> di ketoprofene (Sigma Aldrich, purezza  $\geq$  98%).

Durante i lavori in laboratorio, sono state eseguite diverse prove di caricamento variando il tempo di immersione delle microsfere nella soluzione alcolica di ketoprofene tenendo il sistema in quiete oppure in agitazione con ancoretta magnetica a diverse velocità di rotazione.

Nella tabella 3.6 sono riportate le varie condizioni operative e il quantitativo di ketoprofene caricato (per una spiegazione più approfondita su come è stato valutato il quantitativo di ketoprofene caricato nelle microsfere ibride si rimanda al capitolo 6).

**Tabella 3.6** - Condizioni operative e quantitativo di ketoprofene caricato in fase di scambio di solvente con una soluzione di etanolo al 3,6%<sub>w/w</sub> di ketoprofene.

Campione	Velocità agitazione	tempo	ketoprofene/gel secco
1	quiete	5 gg	2,48%
2	quiete	19 gg	4,05%
3	300 rpm	3 h	2,13%
4	300 rpm	5 h	3,16%
5	300 rpm	18 h	7,24%

Come mostra la tabella 3.6, il risultato migliore nelle condizioni di quiete corrisponde a un tempo di immersione delle microsfere ibride nella soluzione alcolica di ketoprofene di 19 giorni. Questo tempo è stato considerato eccessivamente lungo per cui si è preferito caricare le microsfere di ketoprofene tenendo il sistema in agitazione per 3 ore. Tempi di impregnazione “in agitazione”

superiori alle 3 ore hanno portato a risultati non idonei. Nei campioni a 5 e a 18 ore, le microsfere avevano assunto l'aspetto di una soluzione colloidale e il prodotto essiccato si presentava come un agglomerato. Si è voluto comunque determinare la quantità di ketoprofene caricata ma i campioni non sono stati ritenuti idonei.

### 3.5 Conclusioni

Riassumendo, durante le prove sperimentali è stata messa a punto una nuova procedura per la produzione di microsfere ibride silice alginato seguendo il metodo della reticolazione interna (vedere paragrafo 1.5.2). Con questa nuova procedura è possibile produrre sfere di diametro molto ridotto (vedere paragrafo 1.5) e, come si vedrà nel capitolo 6, si è ricavato un notevole aumento dell'area superficiale del gel essiccato.

Questa procedura è stata sviluppata riadattando un metodo di letteratura per la formazione di microsfere non ibride di Ca-Alg tramite emulsione (capitolo 2). La principale modifica riguarda la preparazione della fase acquosa che è costituita da due diverse componenti, una organica contenente il Na-Alg e una inorganica composta dalla miscela contenente il precursore siliceo; queste vengono preparate separatamente e poi miscelate. Questa modifica ha richiesto la messa a punto di parecchi nuovi accorgimenti per evitare la prematura reticolazione di una delle due componenti delle microsfere ibride. In particolare:

- uso di Na-Alg a bassa viscosità per garantire una rapida miscelazione della fase organica con quella inorganica;
- aggiunta di una soluzione tampone a pH 6,00 onde prevenire la prematura solubilizzazione del  $\text{CaCO}_3$  con conseguente reticolazione del Na-Alg;
- scelta del TMOS come precursore della componente silicea in quanto consente di condurre la reazione di idrolisi in assenza di catalizzatori che potrebbero causare la prematura reticolazione della componente organica Na-Alg;
- rimozione del metanolo derivante dalla reazione di idrolisi del TMOS che potrebbe causare la prematura reticolazione della componente organica Na-Alg;
- miscelazione della componente organica ed inorganica a bassa velocità di rotazione (<200 rpm) onde prevenire la prematura reticolazione del TMOS;

- regolazione della velocità di reticolazione del TMOS durante la formazione delle microsfele in emulsione operando a pH costante.

I test di laboratorio hanno permesso, infine, di mettere a punto anche le modalità di recupero delle microsfele, la procedura di scambio di solvente (che è stata condotta contemporaneamente all'invecchiamento della componente silicea) e le modalità di carico del ketoprofene.





## **Capitolo 4**

# **Preparazione del rivestimento**

## 4.1 Introduzione

Nel precedente capitolo si è affrontato il problema della messa a punto di un nuovo metodo per la produzione di microsferi ibride silice/Ca-Alg. Come si vedrà nel capitolo 7 queste microsferi si sono dimostrate essere ottime candidate per formulazioni farmaceutiche a rilascio rapido; tuttavia, nel caso di formulazioni farmaceutiche a rilascio prolungato, è necessario rivestirle con un apposito strato che permetta di modulare/ritardare la modalità del rilascio del principio attivo.

Come visto nel paragrafo 1.3, i dispositivi a rilascio modificato possono essere suddivisi in due categorie:

- sistemi a matrice: il principio attivo è disperso in una matrice solida ed il rilascio è regolato dalla sua diffusione attraverso i pori della matrice oppure (o in concomitanza) dal suo degrado/rigonfiamento;
- sistemi a serbatoio: il principio attivo è disperso in una matrice solida rivestita da una membrana polimerica ed il rilascio è regolato dalla sua diffusione attraverso la membrana oppure (o in concomitanza) dal suo degrado/rigonfiamento.

In questa sede, attraverso la produzione delle microsferi rivestite, si vuole percorrere una nuova strada creando un sistema che sia una via di mezzo tra i due appena elencati. In altre parole l'obiettivo dei lavori esposti in questo capitolo è realizzare una matrice composita formata da due strati, ciascuna con diverse proprietà, in ciascuno dei quali è disperso il principio attivo. Gli strati in questione sono:

- nucleo: formato dalle microsferi ibride silice/Ca-Alg viste nel capitolo precedente, caratterizzate da un'elevata area superficiale (paragrafo 6.3.1) e il cui ruolo è permettere un elevato carico di principio attivo;
- strato esterno: il cui ruolo principale è il controllo della velocità di rilascio del principio attivo.

Durante le prove di laboratorio si sono sperimentate tre diverse alternative per lo strato esterno:

1. aerogel di Ca-Alg rinforzato con idrossipropil metil cellulosa (HPMC);
2. aerogel di silice rinforzato con HPMC;
3. aerogel idrofobo di silice.

Per quanto riguarda le soluzioni ai punti 1 e 2 si è scelto di additivare il materiale che costituisce lo strato esterno di un opportuno eccipiente. La scelta è

ricaduta sull'HPMC in quanto è uno degli eccipienti più utilizzati in letteratura per realizzare dispositivi a rilascio prolungato (Lemoine et al., 1998; Sangalli et al., 2001, 2004; Vueba et al., 2004; Lu et al., 2006; Shoaib et al., 2006; Chen, 2007; Chen e Huang, 2008; Nochos et al., 2008; Veríssimo et al., 2010; Avalor et al., 2011; Suwannateep et al., 2011; Siepmann e Peppas, 2012; Akinosho et al., 2013; Phadtare et al., 2014; Yadava et al., 2014; Rubilar et al., 2015; Sharma et al., 2015; Zabihi et al., 2015; Zhang et al., 2015; Faulhammer et al., 2016; Okeke e Boateng, 2016).

L'incorporazione del ketoprofene nelle microsfele rivestite è stata condotta con le stesse modalità descritte nel paragrafo 3.4 indipendentemente dal tipo di rivestimento.

## **4.2 Generalità HPMC**

L'idrossipropil metil cellulosa o HPMC è un polimero semisintetico derivato dalla cellulosa brevettato negli anni '60 (Avalor et al., 2011) ed è uno dei più importanti materiali idrofili impiegati nella preparazione dei supporti per dispositivi farmaceutici a rilascio prolungato per somministrazione orale in quanto non presenta tossicità, permette un elevato carico di principio attivo (Siepmann e Peppas, 2012; Vueba et al., 2004) ed è anche caratterizzato da un'elevata capacità di rigonfiamento (Sangalli et al., 2001; Shoaib et al., 2006).

Nei dispositivi farmaceutici l'HPMC permette il controllo del rilascio del principio attivo attraverso la formazione, quando si trova a contatto con acqua, di uno pseudo-gel viscoso (Shoaib et al., 2006; Avalor et al., 2011). Il principio attivo viene liberato in seguito ad un rilassamento delle catene polimeriche (Siepmann e Peppas, 2012).

I derivati della cellulosa si ottengono mediante sostituzione casuale dei gruppi idrossilici con gruppi metilici, etilici o gruppi idrossipropilici ed è la relativa idrofilia e idrofobia di questi gruppi sostituenti a modificare le proprietà dei derivati della cellulosa in soluzione (Akinosho et al., 2013). Nel caso dell'HPMC, i gruppi idrossilici vengono sostituiti da gruppi metilici e idrossipropilici mediante eterificazione (Phadtare et al., 2014). La posizione, la natura, la quantità e il peso molecolare di questi sostituenti hanno influenza sulle proprietà dell'HPMC (Siepmann e Peppas, 2012; Akinosho et al., 2013). In figura 4.1 si possono osservare la molecola della cellulosa e quella dell'HPMC.

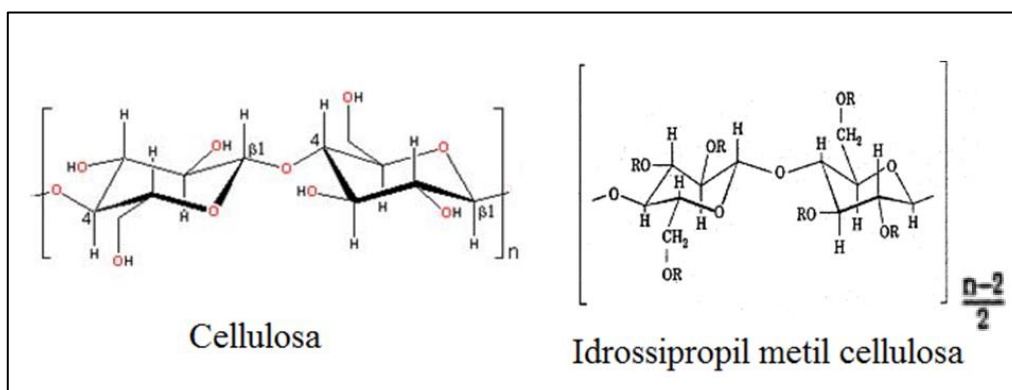


Figura 4.1 – Molecola della cellulosa e dell’HPMC.

A parità dei gruppi sostituenti e viscosità, l’eterogeneità della distribuzione dei gruppi sostituenti dell’HPMC ha influenza sulla velocità di rilascio del principio attivo. Quest’ultima, infatti, decresce all’aumentare dell’eterogeneità della distribuzione (Viriden et al., 2009).

L’USP (United States Pharmacopeia), in base al contenuto dei gruppi metilici e idrossi propilici, ha classificato l’HPMC in quattro categorie (vedere tabella 4.1): HPMC 1828, HPMC 2208, HPMC 2906 e HPMC 2910. I primi due numeri di questa nomenclatura indicano la percentuale dei gruppi metilici, gli ultimi due indicano quella dei gruppi idrossipropilici (Siepmann e Peppas, 2012; Phadtare et al., 2014).

**Tabella 4.1** – Classificazione USP dell’HPMC in base ai gruppi sostituenti.

Gruppo sostituyente	Metilico (%)		Idrossi propilico (%)	
	Minimo	Massimo	Minimo	Massimo
1828	16,5	20,0	23,0	32,0
2208	19,0	24,0	4,0	12,0
2906	27,0	30,0	4,0	7,5
2910	28,0	30,0	7,0	12,0

### 4.2.1 Solubilità e gelificazione dell'HPMC

L'HPMC è solubile in acqua fredda e insolubile in acqua calda (Chen, 2007). La sua solubilità diminuisce con il diminuire del numero di gruppi metilici delle catene polimeriche e all'aumentare della viscosità, e non è influenzata dal pH (Phadtare et al., 2014).

Quando una soluzione di HPMC viene riscaldata manifesta una riduzione della viscosità fino al raggiungimento di una certa temperatura, detta di gelificazione (50-90°C); da quel momento la viscosità cresce rapidamente fino a quando si verifica la gelificazione dell'HPMC. Questo fenomeno è causato dall'indebolimento dei legami a idrogeno tra HPMC e acqua e il rafforzamento delle interazioni tra le catene polimeriche (Chen, 2007), principalmente interazioni idrofobiche tra i gruppi metilici delle catene di HPMC (Fizman, Salvador e Sanz, 2005).

La temperatura di gelificazione varia a seconda del rapporto tra i gruppi metilici e idrossipropilici, in particolare aumenta con il diminuire dei gruppi metilici (Akinosho et al., 2013; Phadtare et al., 2014) ed è un fenomeno reversibile: abbassando la temperatura il gel si dissolve nuovamente (Veríssimo et al., 2010).

Se si riscalda una soluzione di HPMC mantenendola in agitazione, l'HPMC non gelifica ma rimane sotto forma di polvere sospesa. Si è dedotto che questo fenomeno è giustificato dal fatto che le forze dovute all'agitazione impediscono le interazioni idrofobiche dei gruppi metilici responsabili della gelificazione.

La soluzione di HPMC a temperatura ambiente è completamente trasparente. Una volta riscaldata, quando ci si avvicina alla temperatura di gelificazione, cominciano a vedersi alcune zone che subiscono un imbiancamento: questo fenomeno annuncia l'inizio della separazione dell'HPMC dall'acqua in cui è disciolta (Akinosho et al., 2013). Quando l'HPMC è gelificata si presenta come un solido gommoso bianco opaco (vedere fig. 4.2).



Figura 4.2 – Gel ottenuto da una soluzione di HPMC al 10%w riscaldata a 90°C.

Nella tabella 4.2 sono riportate la temperatura scelta per dissolvere l'HPMC in acqua ( $T_{DISS}$ ), quella di imbiancamento ( $T_{CLOUD}$ ) e quella di gelificazione ( $T_{GEL}$ ), dell'HPMC 2910 utilizzata nelle prove sperimentali di questa tesi.

**Tabella 4.2** – Valori di  $T_{DISS}$ ,  $T_{CLOUD}$  e  $T_{GEL}$  dell'HPMC utilizzata per le prove di formazione delle microsfele rivestite.

	°C
$T_{DISS}$	4
$T_{CLOUD}$	50
$T_{GEL}$	60

In figura 4.3 si possono vedere le fasi di formazione del gel di HPMC con l'aumento della temperatura ottenuto sperimentalmente con una soluzione di HPMC al 10%<sub>w/w</sub>. In A la soluzione si trova a temperatura ambiente e si presenta come un liquido trasparente altamente viscoso. In B la soluzione è stata portata a 50°C e cominciano a comparire delle zone imbiancate. Alzando la temperatura a 60°C (C) comincia la gelificazione dell'HPMC. Raggiunti 70°C (D) l'HPMC è completamente gelificata e la soluzione non è più un liquido viscoso ma un solido gommoso. Aumentando ulteriormente la temperatura (E-F) non si vedono cambiamenti significativi.

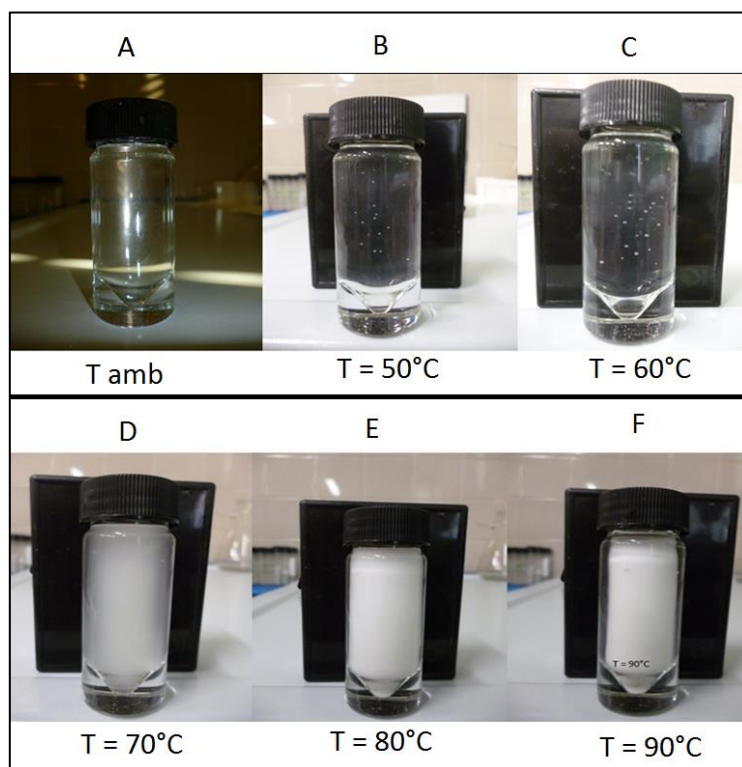


Figura 4.3 – Fasi della gelificazione di una soluzione di HPMC al 10%<sub>w/w</sub>. In A la soluzione si trova a temperatura ambiente e l'HPMC è completamente disciolta, in B cominciano ad apparire le zone imbiancate, in C l'HPMC comincia a gelificare, in D-F l'HPMC è gelificata e si presenta come un solido gommoso.

#### 4.2.2 Preparazione della soluzione di HPMC

La soluzione di HPMC può essere preparata sia sciogliendola in acqua ad una temperatura di circa 20°C che disperdendola prima in acqua ad una temperatura non inferiore ad 80°C, a cui segue prima il completo rigonfiamento e poi un opportuno raffreddamento mediante aggiunta di altra acqua (Phadtare et al., 2014). La temperatura alla quale far raffreddare la soluzione varia a seconda del tipo di HPMC (Phadtare et al., 2014); nel corso delle prove sperimentali si è deciso di raffreddare la soluzione a 4°C.

Durante le prove di laboratorio si era inizialmente optato per la preparazione della soluzione disciogliendo l'HPMC in acqua deionizzata a circa 20°C. Questo metodo si è rivelato molto scomodo a causa della formazione di grumi di HPMC la



cui dissoluzione diventa molto lenta, in alcuni casi ci sono volute alcune ore. Si è dunque deciso di preparare la soluzione in questo modo:

- agitazione e riscaldamento a 80°C di acqua deionizzata;
- dispersione di HPMC;
- aggiunta di acqua deionizzata a 4°C;
- riposo della soluzione in frigorifero a 4°C per tutta la notte.

Nel corso delle prove preliminari per la produzione del rivestimento delle microsfere si è deciso di preparare la fase acquosa con una frazione in massa di HPMC compresa nell'intervallo dell'1–5%. Si è presa questa decisione perché, durante lo svolgimento dei lavori, le soluzioni con un contenuto di HPMC >5%<sub>w/w</sub> presentavano una viscosità tale da rendere molto difficoltosa la preparazione delle microsfere rivestite.

Fra le varie proprietà dell'HPMC, va sottolineato, inoltre, che questa presenta una scarsa solubilità in etanolo il che garantisce che non ne vengano disperse quantità significative durante lo scambio di solvente (Zabihi et al., 2015).

### **4.3 Gel di Ca-Alg rinforzato con HPMC**

Nel paragrafo 4.2.1 si è detto che la gelificazione dell'HPMC avviene in seguito a delle interazioni intermolecolari tra i suoi gruppi funzionali e non per mezzo di legami chimici primari. Da ciò si è dedotto che, in seguito ad un essiccamento supercritico di un gel di sola HPMC, questo sarebbe diventato troppo debole sia dal punto di vista meccanico sia da quello chimico, comportando così l'impossibilità di ottenere un rilascio prolungato una volta immerso nel solvente di dissoluzione.

In letteratura ci sono diversi lavori di idrogel composti da Ca-Alg e HPMC (Lemoine et al., 1998; Liu et al., 2006; Nochos et al., 2008; Yadava et al., 2014; Okeke e Boateng, 2016), mentre non si sono trovate informazioni riguardo l'uso dell'HPMC come eccipiente negli aerogel. Si è, quindi, ritenuto interessante studiare il comportamento dell'HPMC negli aerogel.

Come nel caso delle microsfere ibride, si è deciso di seguire la procedura messa a punto nel capitolo 2 effettuando opportune modifiche nella preparazione della fase acquosa. In primo luogo, per la frazione di alginato del rivestimento, si è deciso di usare nuovamente del Na-Alg a bassa viscosità. Questa decisione è stata presa perché, durante lo svolgimento delle prove, si è notato che, per ottenere un reticolo di Ca-Alg rinforzato con HPMC con adeguata resistenza meccanica, è necessario

preparare una soluzione di Na-Alg e HPMC con una frazione di Na-Alg  $\geq 1,5\%$  w/w. Considerando che le soluzioni di HPMC sono molto viscosi, se si impiegasse il Na-Alg a media viscosità si avrebbe un ulteriore incremento della viscosità della fase acquosa rendendo difficoltosa la formazione delle microsfele rivestite. Se si volesse, invece, utilizzare il Na-Alg a media viscosità, si dovrebbe ridurre la quantità di HPMC durante la preparazione della fase acquosa. Nella tabella 4.3 è riportata la composizione della soluzione di Na-Alg/HPMC.

**Tabella 4.3** – Composizione della soluzione Na-Alg/HPMC.

	% w/w
Na-Alg	1,5
HPMC	1-5

Per preparare questa soluzione inizialmente si era deciso di procedere come per la preparazione della soluzione di sola HPMC descritta nel paragrafo 4.2.2, con l'unica differenza di versare nell'acqua a 80°C una miscela solida di HPMC e Na-Alg invece che la sola HPMC. Questa procedura, però, portava alla formazione di grumi di Na-Alg e HPMC molto difficoltosi da sciogliere. Si è quindi deciso di preparare prima una soluzione di Na-Alg al cui interno è stata successivamente dispersa l'HPMC seguendo la procedura vista nel paragrafo 4.2.2.

In sintesi, si è deciso di preparare la soluzione in questo modo:

- preparazione di una soluzione di Na-Alg;
- agitazione e riscaldamento a 80°C della soluzione;
- dispersione di HPMC;
- aggiunta di acqua deionizzata a 4°C;
- riposo della soluzione in frigorifero.

### 4.3.1 Materiali

Per la fase acquosa sono stati usati: HPMC (categoria 2910, Sigma Aldrich); Na-Alg a bassa viscosità (Sigma-Aldrich; viscosità in soluzione acquosa al 1% w/w a 25°C: = 4-12 cP), CaCO<sub>3</sub> (Sigma Aldrich; purezza  $\geq 99,0\%$ ).

Per la fase oleosa sono stati usati: olio di paraffina (Sigma Aldrich; densità 0,827-0,890 g/mL a 20 °C; viscosità dinamica 110 – 230 mPa·s), Span 80 (sorbitano

monooleato; Sigma Aldrich), Acido acetico glaciale (Sigma Aldrich, purezza  $\geq 99,7\%$ ).

Per il recupero, lavaggio delle microsfere e lo scambio di solvente sono stati usati rispettivamente: etil acetato (Sigma-Aldrich; purezza  $\geq 99,7\%$ ), Tween 80 (polietilenglicole sorbitano monooleato; Sigma Aldrich), etanolo (Sigma Aldrich; purezza  $\geq 99,8\%$ ).

### 4.3.2 Dispersione del $\text{CaCO}_3$

La modalità di dispersione del  $\text{CaCO}_3$  nella soluzione acquosa Na-Alg/HPMC utilizzata per realizzare lo strato esterno delle microsfere rivestite secondo il metodo della reticolazione interna è stata messa a punto mediante prove preliminari. Tali prove sono consistite nella realizzazione di semplici microsfere di Ca-Alg/HPMC.

Inizialmente il  $\text{CaCO}_3$  veniva disperso nella soluzione di Na-Alg/HPMC esattamente come nel caso delle microsfere ibride. Procedendo in questo modo e lavorando con soluzioni contenenti il  $5\%_{w/w}$  di HPMC, le microsfere recuperate si presentavano come un unico agglomerato privo di struttura, come si può vedere in figura 4.4.



Figura 4.4 – Esito di una prova di formazione di microsfere di Ca-Alg/HPMC. La dispersione non uniforme del  $\text{CaCO}_3$  ha portato ad una reticolazione parziale del Na-Alg: le microsfere, dopo il loro recupero, sono diventate un agglomerato. Nell'immagine di destra il sistema è stato portato a  $70^\circ\text{C}$  per far diventare bianca l'HPMC rendendo visibile l'agglomerato.

Si è ipotizzato che ciò succeda a causa di una dispersione non omogenea del  $\text{CaCO}_3$  nella soluzione di Na-Alg/HPMC, il che comporta una reticolazione parziale del Na-Alg con la conseguente formazione di microsfere con una struttura molto labile.

Ricordando le proprietà dell'HPMC esposte nel paragrafo 4.2.1, se si prende la soluzione di Na-Alg/HPMC, la si mette in agitazione e successivamente si riscalda, l'HPMC, quando diventa insolubile, non gelifica ma rimane sotto forma di una polvere sospesa. In questo modo si ottiene una dispersione di HPMC in una soluzione di Na-Alg; poiché tale sistema presenta una bassa viscosità vi si può disperdere facilmente ed in breve tempo il  $\text{CaCO}_3$ . In seguito, raffreddando la dispersione senza interrompere l'agitazione, l'HPMC si solubilizza ed il  $\text{CaCO}_3$  resta disperso in maniera uniforme.

In seguito a questa osservazione, per disperdere il  $\text{CaCO}_3$ , si è deciso di preparare la fase acquosa in questo modo:

- preparazione di una soluzione acquosa di Na-Alg/HPMC;
- aggiunta di  $\text{CaCO}_3$  alla soluzione (il  $\text{CaCO}_3$  rimane sulla superficie);
- agitazione del sistema e riscaldamento a  $80^\circ\text{C}$ ;
- agitazione a caldo della dispersione per 15 minuti;
- raffreddamento a  $T_{\text{amb}}$  senza interrompere l'agitazione.

La dispersione formata presenta molte bollicine d'aria che è opportuno rimuovere. Si è stabilito per via sperimentale che è sufficiente riporre la dispersione in frigorifero per 1 ora. Prove di laboratorio hanno dimostrato che, lasciando la dispersione a riposo per tutta la notte, il  $\text{CaCO}_3$  precipita sul fondo, pertanto è bene non prolungare eccessivamente il tempo di riposo.

Sulla base delle considerazioni sopra esposte è stato possibile mettere a punto le modalità di preparazione della fase acquosa necessaria per la produzione dello strato esterno delle microsfere rivestite. La composizione di tale fase è riportata nella tabella 4.4.

**Tabella 4.4** – Composizione della fase acquosa per la formazione dello strato esterno delle microsfere rivestite.

	% w/w
Na-Alg	1,4
HPMC	1-5
CaCO <sub>3</sub>	0,5

### 4.3.3 Formazione rivestimento

Dopo aver preparato la fase acquosa come descritto nel paragrafo precedente, bisogna disperdere le microsfere ibride. Anche in questo caso, come per la dispersione del CaCO<sub>3</sub> descritta nel paragrafo precedente, a causa dell'elevata viscosità della fase acquosa, riuscire ad ottenere una dispersione uniforme delle microsfere è difficoltoso.

Tenendo presente le osservazioni fatte nel paragrafo 4.3.2 e dopo molte prove sperimentali finalizzate a trovare la temperatura che dia una viscosità della fase acquosa contenente le microsfere ibride ottimale per la formazione del rivestimento, si è deciso di disperdere le microsfere ibride nella fase acquosa in questo modo:

- aggiunta delle microsfere ibride nella fase acquosa;
- agitazione e riscaldamento a T=80°C;
- agitazione a caldo per 15 minuti;
- raffreddamento a 55°C.

Dalle prove in laboratorio si è notato che occorre stabilire un certo rapporto in massa tra microsfere e fase acquosa per poter ottenere delle microsfere rivestite altrimenti, in seguito alla dispersione delle microsfere ibride, la fase acquosa raggiunge una viscosità tale che in fase di emulsione non è in grado di disperdersi in maniera uniforme e si possono formare delle matrici di Ca-Alg/HPMC che inglobano più microsfere ibride. Questo rapporto diminuisce aumentando la concentrazione di HPMC nella soluzione. Durante lo svolgimento delle prove, per poter ottenere dei dati confrontabili, si è deciso di utilizzare, per qualsiasi concentrazione di HPMC, un rapporto in massa tra microsfere ibride e fase acquosa del 55%<sub>w/w</sub>.

Anche per la formazione del strato esterno delle microsfere rivestite si ricorre alla tecnica dell'emulsione disperdendo la fase acquosa addizionata delle microsfere ibride in una fase oleosa. Questa procedura operativa è stata adottata in

quanto ci si aspettava una forte interazione secondaria fra i nuclei ibridi e la soluzione acquosa contenente Na-Alg e HPMC. Infatti, sia in tale fase sia nei nuclei sono presenti forti legami a idrogeno. Ciò garantisce che i nuclei di microsfere ibride si disperdano nella fase oleosa ragionevolmente circondati da uno strato della soluzione acquosa di Na-Alg e HPMC.

Come nel caso delle microsfere ibride e di Ca-Alg, la fase oleosa è composta da olio di paraffina contenente Span 80 e acido acetico. Le tabelle 4.5 e 4.6 riportano la composizione della fase oleosa e i parametri di processo per la formazione delle microsfere rivestite.

**Tabella 4.5** – Composizione della fase oleosa.

Componente	% <sub>w/w</sub>
Span80	1,1
Ac. acetico	1,3

**Tabella 4.6** – Parametri di processo per la formazione delle microsfere rivestite.

Variabile	Valore
Rapporto di fase	30% <sub>v/v</sub>
Ca <sup>2+</sup> /Na-Alg	14,3% <sub>w/w</sub>
Ac. Acetico/Ca <sup>2+</sup>	12,4 <sub>mol/mol</sub>
Velocità rotazione	400 rpm

Inizialmente, per realizzare la formazione del rivestimento e il successivo recupero delle microsfere rivestite, si era deciso di procedere come per le microsfere di Ca-Alg (vedere paragrafo 2.2.1).

Si era deciso di procedere in questa maniera perché, anche se l'HPMC è solubile in acqua a temperatura ambiente, la sua diffusione dall'interno del rivestimento delle microsfere verso l'acqua nella quale sono immerse è comunque lenta, per cui si era supposto che le sue perdite nei successivi stadi di recupero e di

lavaggio fossero trascurabili. Questa supposizione era suffragata da varie fonti bibliografiche (Lemoine et al., 1998; Liu et al., 2006; Nochos et al., 2008; Yadava et al., 2014; Okeke e Boateng, 2016) in cui alcune microsfere di Ca-Alg e HPMC, venivano prodotte con il metodo diffusivo in una soluzione acquosa di  $\text{CaCl}_2$ . Tuttavia, procedendo secondo il metodo descritto nel paragrafo 2.2.1 le filtrazioni eseguite alla fine del recupero e dopo ogni ciclo di lavaggio erano sempre lunghe e difficoltose. Si è ipotizzato che la causa di ciò fosse la perdita di HPMC dalle microsfere rivestite dovuta all'eccessiva dissoluzione dell'eccipiente nella soluzione acquosa di lavaggio. Si può notare, infatti, dalla figura 4.5 come il trasferimento dell'HPMC dal rivestimento delle microsfere all'acqua di lavaggio produca una schiuma in superficie.

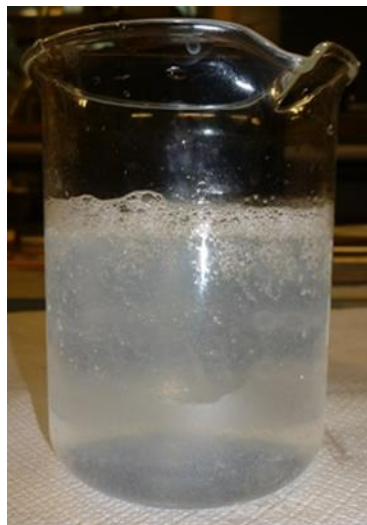


Figura 4.5 - Acqua di lavaggio usata per le microsfere rivestite, la schiuma in superficie è data dall'HPMC rilasciata dalle microsfere.

Onde evitare le eccessive perdite di HPMC durante gli stadi di recupero e lavaggio delle microsfere si è deciso di aggiungere un ulteriore stadio nella procedura di formazione del rivestimento. Questo consiste nel riscaldare a  $80^\circ\text{C}$  l'emulsione per ottenere la gelificazione dell'HPMC (vedere paragrafo 4.2).

Riassumendo il rivestimento delle microsfere rivestite è stato prodotto in questo modo:

- preparazione di una soluzione acquosa contenente Na-Alg e HPMC;

- dispersione del CaCO<sub>3</sub>;
- dispersione delle microsfere;
- preparazione e agitazione della fase oleosa
- caricamento di 15 mL della dispersione preparata e mantenuta a 55°C in una siringa;
- introduzione della fase acquosa in un volume di 50 mL della fase oleosa (mantenuta in agitazione);
- riscaldamento a 80°C dopo un'attesa di 30 minuti;
- attesa di 30 minuti prima di procedere con il recupero delle microsfere.

#### **4.3.4 Recupero microsfere**

Ricordando quanto detto nel paragrafo 4.2, alla temperatura di 80°C l'HPMC è idrofoba. In questo modo non è più possibile recuperare le microsfere rivestite con l'inversione di fase in quanto queste rimarrebbero nella fase oleosa. Dopo alcune prove preliminari si è deciso di diluire la fase oleosa con un solvente organico poco viscoso miscibile con olio di paraffina ed immiscibile con H<sub>2</sub>O; in questo modo la fase oleosa diventa una miscela liquida poco viscosa e filtrabile tale da permettere un facile recupero delle microsfere, il solvente scelto è l'etil-acetato.

Se la fase oleosa, subito dopo la formazione del rivestimento delle microsfere, venisse raffreddata a temperatura ambiente, sarebbe necessario un volume di etil-acetato eccessivo per ottenere una miscela con una viscosità tale da renderla filtrabile, per questo motivo si è deciso di procedere con il recupero delle microsfere mantenendo in temperatura sia la fase oleosa che l'etil acetato da aggiungere.

La filtrazione è stata eseguita mediante un filtro ad imbuto in quanto il filtro Buchner impiegato in precedenza non è più utilizzabile. Infatti, l'esecuzione "a caldo" della filtrazione provoca il distacco della carta filtrante dal filtro Buchner, comportando ingenti perdite di microsfere. Operando con un filtro ad imbuto, invece, la carta filtrante rimane aderente all'imbuto grazie al peso della fase oleosa stessa.

Riassumendo, si è scelto di procedere con il recupero delle microsfere rivestite in questo modo:

- interruzione del riscaldamento della fase oleosa contenente le microsfere rivestite;
- aggiunta di 50 mL di etil-acetato nella fase oleosa ancora calda mantenuta in agitazione;



- interruzione dell'agitazione dopo 1 minuto di attesa;
- filtrazione "a caldo" della fase oleosa diluita e raccolta delle microsfele.

### **4.3.5 Lavaggio e scambio di solvente**

Anche durante gli stadi di lavaggio e scambio di solvente bisogna prendere degli accorgimenti per non avere perdite di HPMC. Per il lavaggio si è deciso di procedere come per le microsfele di Ca-Alg (vedere paragrafo 2.2.2) con l'unica differenza che, anche in questo caso, è necessario lavorare ad alta temperatura per rendere l'HPMC insolubile in acqua (vedere paragrafo 4.2).

Entrando più nel dettaglio, lo scambio di solvente è stato eseguito come descritto nel paragrafo 2.2.3 ma lavorando in temperatura. In questo caso la temperatura non è uguale in tutti gli stadi: per soluzioni con contenuto di etanolo  $\leq 50\%_{v/v}$  si mantiene una temperatura di  $80^{\circ}\text{C}$ , mentre, per soluzioni con contenuto alcolico  $\geq 70\%_{v/v}$  si lavora a  $70^{\circ}\text{C}$  per evitare l'eccessiva evaporazione dell'alcol. Per evitare bruschi sbalzi di temperatura alle microsfele, anche il secondo stadio in etanolo puro si effettua a  $70^{\circ}\text{C}$ . Lavorando in queste condizioni le perdite di HPMC sono trascurabili.

## **4.4 Rivestimento silicato rinforzato con HPMC**

In alternativa a quanto esposto nel paragrafo 4.3 viene qui descritta la procedura per la formazione di un rivestimento esterno di silice e HPMC. L'obiettivo è sempre quello di realizzare formulazioni farmaceutiche a rilascio prolungato.

### **4.4.1 Materiali usati**

Per la soluzione acquosa inorganica sono stati usati: HPMC (categoria 2910, Sigma Aldrich), TMOS (Sigma Aldrich, purezza  $\geq 98\%$ ), MTMS (Sigma Aldrich, purezza  $\geq 98\%$ ), acido acetico glaciale (Sigma Aldrich; purezza  $\geq 99,7\%$ ),  $\text{NH}_4\text{OH}$  (soluzione acquosa al  $30\%_{v/v}$ ), acqua deionizzata.

Per la fase oleosa sono stati usati: olio di paraffina (Sigma Aldrich; densità  $0,827\text{-}0,890\text{ g/mL}$  a  $20^{\circ}\text{C}$ ; viscosità dinamica  $110 - 230\text{ mPa}\cdot\text{s}$ ), Etanolo (Sigma Aldrich, purezza  $\geq 99,8\%$ ).

Il recupero, lavaggio delle microsfele e lo scambio di solvente sono stati effettuati con etanolo.

#### 4.4.2 Preparazione soluzione acquosa inorganica

Per la preparazione della soluzione acquosa inorganica, si è scelta una strada diversa rispetto a quella per la preparazione della componente inorganica vista nel paragrafo 3.2.1.

Nel capitolo 1 è stato detto che, per la produzione di gel di silice usando alcossidi silicati come precursori, si devono miscelare, insieme al precursore,  $H_2O$ , un alcol e un catalizzatore che può essere acido o basico (oppure entrambi). Tuttavia, nel caso delle microsfele ibride descritte nel capitolo 3, si è sviluppata una procedura che permettesse la gelificazione del precursore siliceo senza utilizzare né alcol né un catalizzatore onde evitare la reticolazione prematura del Na-Alg (vedere paragrafo 3.2). Nel caso della preparazione dello strato di rivestimento delle microsfele ibride, è possibile utilizzare sia un alcol sia il catalizzatore dal momento che, in questo caso, non è presente alcuna componente organica contenente Na-Alg.

A tal scopo è stato scelto l'etanolo come alcol da impiegare nel processo. Per quanto riguarda la scelta del catalizzatore, invece, si è optato per una catalisi a due stadi, uno con catalizzatore acido ed uno con catalizzatore basico in modo da promuovere sia la reazione di idrolisi che quella di condensazione (vedere paragrafo 1.5.1)

Nel paragrafo 1.7.2 è stato detto che il catalizzatore acido utilizzato nel metodo di letteratura per la produzione delle microsfele di silice (Alnaief e Smirnova, 2011) è l' $HCl$ ; tuttavia, la scheda di sicurezza del Na-Alg fornita dal produttore indica che esso è incompatibile con gli acidi forti. Poiché i nuclei ibridi andranno dispersi nella soluzione silicea per formare il rivestimento, si è ritenuto di evitarne il contatto con l' $HCl$  e si è, quindi, optato per l'uso di acido acetico glaciale. Questa scelta è comunque supportata da precedenti lavori di letteratura dove si riporta la sintesi di gel silicati catalizzata dall'acido acetico (Soleimani Dorcheh e Abbasi, 2008).

Il quantitativo di acido acetico è stato stimato per via empirica. Ricordando quanto detto nel paragrafo 3.2.1, la reazione di idrolisi è esotermica. In base a questa osservazione, una volta stabilita la proporzione dei reagenti, sono state effettuate delle prove aumentando sistematicamente la quantità di acido acetico fino a quando non si è avvertito, al tatto, il riscaldamento della soluzione acquosa inorganica contenuta nel becher. Per il secondo stadio di catalisi, con catalizzatore basico, si è scelto di usare una soluzione acquosa di  $NH_4OH$  al 30%<sub>v/v</sub>.

Un altro accorgimento riguarda la scelta del precursore siliceo. Invece di usare solamente il TMOS si è preferito optare per una sua miscela con il MTMS con un

contenuto di MTMS pari al 30%<sub>w/w</sub>. Il TMOS, infatti, formerebbe dei gel idrofili quindi, in seguito al contatto delle microsfere rivestite con i fluidi gastrici lo strato esterno collasserebbe molto velocemente con il rischio che l'HPMC si distacchi prima di idratarsi e non si potrebbe più ottenere un rilascio prolungato. Per questo motivo si è deciso di dare un certo grado di idrofobia al rivestimento esterno aggiungendo un quantitativo di MTMS, che è il precursore usato per la formazione dei gel silicati idrofobi.

Come sopra spiegato, il rivestimento siliceo esterno è stato rinforzato mediante l'aggiunta di HPMC. Durante la preparazione della soluzione acquosa inorganica si devono prendere degli accorgimenti per poter miscelare l'HPMC con gli altri reagenti.

Nel primo tentativo si è provato a preparare una soluzione acquosa di HPMC al 10%<sub>w/w</sub> ed in seguito la si è unita con una miscela contenente etanolo, acido acetico ed i due precursori silicei, (la composizione della miscela ottenuta dall'unione della soluzione di HPMC con gli altri composti è riportata nella tabella 4.7). A causa dell'elevata viscosità della soluzione di HPMC, la miscelazione con gli altri precursori richiede tempi lunghi ed in questo modo si ha una gelificazione dei precursori silicei prima che queste due componenti si siano perfettamente miscelate.

**Tabella 4.7** – Composizione della miscela per la preparazione del rivestimento di silice e HPMC ottenuta dall'unione della soluzione di HPMC con gli altri precursori.

Componente	% <sub>w/w</sub>
HPMC	10
TMOS	30
MTMS	14
Ac Acetico	1
Etanolo	55

Per risolvere questo problema si è deciso di preparare una soluzione idroalcolica di HPMC (Gazzaniga et al, 1994); in questo modo è possibile solubilizzare l'HPMC in tempi brevi in quanto non sono presenti i precursori silicei. Inoltre, la soluzione idroalcolica (la cui composizione è riportata nella tabella 4.8) ha una viscosità inferiore rispetto alla soluzione acquosa di HPMC, pertanto la successiva miscelazione con i precursori e l'acido acetico avviene in tempi relativamente brevi, evitando così il problema della gelificazione prematura.

**Tabella 4.8** – Composizione della soluzione idroalcolica di HPMC.

Componente	% <sub>w/w</sub>
HPMC	4
H <sub>2</sub> O	34
Etanolo	62

La composizione della miscela di TMOS/MTMS e acido acetico è riportata nella tabella 4.9.

**Tabella 4.9** – Composizione della miscela dei precursori.

Componente	% <sub>w/w</sub>
TMOS	67
MTMS	29
Ac. acetico	4

Dopo aver miscelato la soluzione idroalcolica con la miscela dei precursori silicei si aggiungono le microsfere ibride mantenendo un rapporto in peso tra microsfere e la miscela silicea con HPMC del 55%. Successivamente occorre aggiungere dell' $\text{NH}_4\text{OH}$  per portare a termine la gelificazione. La quantità di  $\text{NH}_4\text{OH}$  aggiunta è stata scelta in modo tale da avere una gelificazione della miscela

dopo 30 minuti. Questo tempo consente di ottenere la formazione dello strato esterno delle microsfere rivestite con il metodo dell'emulsione (capitolo 2). Nella tabella 4.10 è riportata la composizione della soluzione acquosa inorganica.

**Tabella 4.10** - Composizione della soluzione acquosa inorganica.

Componente	% <sub>w/w</sub>
TMOS	16
MTMS	7
HPMC	2
H <sub>2</sub> O	16
Etanolo	29
Ac. acetico	1
NH <sub>4</sub> OH al 30% <sub>v/v</sub>	30

#### 4.4.3 Formazione del rivestimento

Dal momento che la soluzione acquosa inorganica utilizzata per la formazione dello strato esterno contiene etanolo, le microsfere ibride che costituiscono il nucleo devono essere convertite in alcolgel prima di essere sottoposte alla procedura di rivestimento. Questo accorgimento è necessario altrimenti, utilizzando le microsfere ibride in forma di idrogel, l'etanolo contenuto nella soluzione acquosa inorganica potrebbe diffondere nelle microsfere danneggiando il loro reticolo (2.2.3). La presenza dell'etanolo nella soluzione acquosa inorganica rende necessario un altro accorgimento. Dal momento che tale alcol è parzialmente solubile in olio di paraffina, la fase oleosa utilizzata nella fase di emulsione è composta da olio di paraffina saturato di etanolo (Alnaief e Smirnova, 2011). Sperimentalmente si è proceduto versando in un imbuto separatore 50 mL di olio di paraffina e 10 mL di etanolo e, in seguito, agitando energicamente il sistema, successivamente è stato recuperato l'olio di paraffina saturo di etanolo.

Il rapporto tra la soluzione acquosa inorganica e la fase oleosa è del 30%<sub>v/v</sub> e il sistema di reazione è lo stesso che si è usato per le microsfere di alginato (2.1.1). Anche in questo caso la velocità di rotazione dell'elica marina è stata mantenuta pari a 400 rpm.

Per stabilire una tecnica di formazione del rivestimento si è scelto di seguire una procedura di letteratura per la produzione di microsfere di silice (Alnaief e Smirnova, 2011) applicando delle modifiche. Il rivestimento viene creato nel modo seguente:

- preparazione della soluzione alcolica di HPMC;
- preparazione della miscela contenente i precursori silicei;
- miscelazione delle due miscele con agitatore magnetico a 200 rpm per 5 minuti;
- dispersione delle microsfere senza interrompere l'agitazione;
- agitazione per 30 minuti;
- aggiunta di NH<sub>4</sub>OH;
- agitazione per 3 minuti;
- inserimento della dispersione nella fase oleosa (mantenuta in agitazione);
- interruzione dell'agitazione e recupero delle microsfere rivestite dopo un'attesa di 30 minuti.

Anche in questo caso si presume che in fase di emulsione il rivestimento rimanga saldo al nucleo tramite i ponti di idrogeno che si formano all'interfaccia.

#### **4.4.4 Recupero e lavaggio microsfere**

In questo caso il recupero delle microsfere viene effettuato sempre con la tecnica dell'inversione di fase, usando, però, una miscela di acqua/etanolo al 70%<sub>v/v</sub> di etanolo. Si è scelto di non usare etanolo puro altrimenti la fase oleosa andrebbe nel fondo del becher rendendo difficoltosa la sua rimozione per il recupero delle microsfere. Aggiungendo il 30%<sub>v/v</sub> di acqua deionizzata la fase oleosa migra verso l'alto facilitando la sua rimozione.

Il recupero delle microsfere rivestite avviene, dunque, in questo modo:

- riduzione della velocità di rotazione dell'elica marina a 50 rpm (operazione condotta dopo aver completato la procedura di reticolazione delle microsfere descritta nel paragrafo 4.4.3);
- aggiunta di 200 mL di etanolo contenente il 30%<sub>v/v</sub> di acqua deionizzata;
- interruzione dell'agitazione dopo una attesa pari a 1 h;
- rimozione della fase oleosa;
- filtrazione della fase alcolica e recupero delle microsfere.

Dopo alcuni test preliminari, la successiva fase di lavaggio è stata eseguita in questo modo:

- immersione delle microsfere in 100 mL di etanolo al 70%<sub>v/v</sub>;
- raccolta delle microsfere tramite filtrazione ed immersione in 100 mL di etanolo al 70%<sub>v/v</sub>;
- recupero delle microsfere tramite filtrazione;
- ripetizione degli ultimi due punti di cui sopra per altre tre volte.

Lo scambio di solvente viene effettuato in due stadi, immergendo prima le microsfere in etanolo puro per 15 minuti in presenza di agitazione (500 rpm con agitazione magnetica); successivamente le microsfere vengono immerse nuovamente in etanolo puro per almeno 24 ore tenendo il sistema in quiete.

## **4.5 Rivestimento idrofobo di silice**

Come ultima tecnica di rivestimento si è proceduto con la formazione di uno strato esterno silicato idrofobo. Come precursore siliceo si è usato il MTMS. Questa operazione è stata eseguita in assenza di HPMC.

### **4.5.1 Materiali**

Per la soluzione acquosa inorganica sono stati usati: MTMS (Sigma Aldrich, purezza  $\geq 98\%$ ), acqua deionizzata.

Per la fase oleosa sono stati usati: etil acetato (Sigma Aldrich, purezza  $\geq 99,7\%$ ), Span 80 (sorbitano monooleato, Sigma Aldrich), acido acetico glaciale (Sigma Aldrich, purezza  $\geq 99,7\%$ ).

Per il recupero, lavaggio delle microsfere e lo scambio di solvente sono stati usati rispettivamente: Tween 80 (polietilenglicole sorbitano monooleato; Sigma Aldrich), etanolo (Sigma Aldrich, purezza  $\geq 99,8\%$ ).

#### 4.5.2 Preparazione della soluzione acquosa inorganica

Per la soluzione acquosa inorganica (la cui composizione è riportata nella tabella 4.11) si è usata una miscela di MTMS e acqua deionizzata senza l'uso di catalizzatore ed etanolo. Si è scelto di procedere in questo modo in quanto dopo alcune prove preliminari si è osservato che, analogamente al TMOS, è possibile ottenere l'idrolisi del MTMS senza l'uso del catalizzatore.

**Tabella 4.11** – Composizione soluzione acquosa inorganica usata per la formazione dello strato esterno idrofobo.

Componente	% <sub>w/w</sub>
MTMS	50
H <sub>2</sub> O	50

La soluzione acquosa inorganica è stata preparata nel seguente modo:

- miscelazione di acqua deionizzata e MTMS con agitatore magnetico a 700 rpm per 15 minuti;
- riscaldamento della miscela a 65°C in agitazione con agitatore magnetico a 200 rpm per 5 minuti (operazione necessaria per la rimozione del metanolo formato in seguito alla reazione di idrolisi descritta nel paragrafo 3.2.1);
- raffreddamento della miscela (per evitare sbalzi di temperatura alle microsfere che verranno aggiunte).

In seguito al raffreddamento della miscela è possibile aggiungere le microsfere ibride e procedere con la formazione dello strato esterno.

Per quanto riguarda la fase oleosa, se si usasse dell'olio di paraffina, non sarebbe possibile procedere con il recupero delle microsfere tramite l'inversione di fase in seguito all'aggiunta di un volume di H<sub>2</sub>O nel sistema di emulsione in quanto le microsfere rivestite, essendo rivestite di uno strato idrofobo, rimarrebbero nella



fase oleosa. Per questo motivo si è scelto di sostituire l'olio di paraffina con un solvente immiscibile con l'acqua e con una viscosità inferiore rispetto l'olio di paraffina in modo da poter recuperare le microsfere rivestite tramite filtrazione invece che mediante l'inversione di fase: il solvente scelto è l'etil-acetato.

Nella tabella 4.12 è riportata la composizione della fase oleosa.

**Tabella 4.12** – Composizione della fase oleosa.

Componente	% <sub>v/v</sub>
Etil-acetato	98
Span80	1
Ac. acetico	1

### 4.5.3 Formazione del rivestimento

Il rapporto tra la soluzione acquosa inorganica e la fase oleosa è del 30%<sub>v/v</sub> e il sistema di reazione è lo stesso che si è usato per le microsfere di alginato (2.1.2), mantenendo la velocità di rotazione dell'elica marina a 400 rpm.

Il rivestimento viene creato nel modo seguente:

- preparazione della miscela MTMS/H<sub>2</sub>O;
- agitazione con ancoretta magnetica a 200 rpm;
- dispersione delle microsfere senza interrompere l'agitazione;
- agitazione per 10 minuti;
- inserimento della dispersione nella fase oleosa (mantenuta in agitazione);
- interruzione dell'agitazione e recupero delle microsfere rivestite dopo un'attesa di 30 minuti.

### 4.5.4 Recupero, lavaggio e scambio di solvente

Come detto nel paragrafo 4.5.2, le microsfere vengono recuperate tramite filtrazione della fase oleosa alla fine del processo di formazione dello strato esterno.

I successivi stadi di lavaggio e scambio solvente vengono effettuati come visto nel capitolo 2.

## 4.6 Conclusioni

In questo capitolo sono state illustrate tre nuove procedure per la produzione di tre diversi rivestimenti per un possibile impiego nei dispositivi a rilascio modificato di farmaco.

Il primo rivestimento è composto da Ca-Alg e HPMC, è completamente biodegradabile e bio-adesivo. Poiché il reticolo di questo rivestimento contiene Ca-Alg, non è adatto per il rilascio nei fluidi intestinali, in quanto a quei valori di pH il reticolo si disgrega molto velocemente (Silva et al., 2006; Veronovski et al., 2012). La procedura di rivestimento è alquanto complessa e ha richiesto la soluzione di varie problematiche. Si può tuttavia concludere che gli aspetti più rilevanti per la produzione di questo rivestimento sono:

- utilizzo di Na-Alg a bassa viscosità e concentrazioni di HPMC inferiori al 5%<sub>w/w</sub> onde evitare che l'eccessiva viscosità della fase acquosa impedisca la formazione del rivestimento delle microsferi;
- messa a punto di nuove modalità di produzione delle microsferi rivestite, del loro recupero e lavaggio che consentissero di operare "a caldo" onde evitare perdite di HPMC in quanto questo eccipiente è altamente solubile in acqua a temperatura ambiente.

Il secondo rivestimento ideato è composto da silice e HPMC. Anche in questo caso il rivestimento è bio-adesivo per la presenza dell'HPMC ma non biodegradabile a causa della componente silicea. Il reticolo di silice permette l'utilizzo di questi rivestimenti anche nei fluidi intestinali. Gli aspetti più rilevanti nella produzione di questo rivestimento sono:

- al fine di ottenere un dispositivo a rilascio ritardato è necessario miscelare il TMOS con il MTMS per avere un reticolo esterno di silice con un certo grado di idrofobia;
- importanza del corretto dosaggio di catalizzatore onde evitare la gelificazione del rivestimento esterno prima che la miscelazione con i nuclei sia completa;
- dal momento che la soluzione inorganica che costituisce il rivestimento è a base alcolica, le microsferi ibride che costituiscono i nuclei devono essere convertite in alcolgel prima di essere rivestite;

- il recupero delle microsfele è stato eseguito mediante la tecnica di inversione di fase opportunamente modificata per tener conto del contenuto alcolico menzionato nel punto precedente.

Il terzo rivestimento è stato realizzato usando solamente MTMS. Questo rivestimento è l'unico dei tre a non essere bio-adesivo, tuttavia, essendo formato a partire da un precursore idrofobo si conserva più a lungo nel tempo e permette l'utilizzo anche per i fluidi intestinali. Gli aspetti più rilevanti nella produzione di questo rivestimento sono:

- la reazione di idrolisi del MTMS non necessita l'uso di alcol e catalizzatore;
- data la natura idrofoba delle microsfele rivestite che ne renderebbe impossibile il recupero con la consueta tecnica dell'inversione di fase, la tecnica di rivestimento è stata modificata sostituendo l'olio di paraffina della fase oleosa con etil acetato, in modo da consentire il recupero delle microsfele tramite filtrazione.

# **Capitolo 5**

## **Essiccamento supercritico**

## 5.1 Introduzione

Nei precedenti capitoli sono state illustrate le modalità di preparazione di vari tipi di microsferi e della sostituzione del solvente acquoso contenuto nelle loro porosità con dell'etanolo in modo tale da ottenere degli alcolgel. Al fine di ottenere degli aerogel questi devono essere essiccati in condizioni supercritiche (vedere paragrafo 1.4).

Come già spiegato nei capitoli precedenti, la trasformazione degli idrogel in alcolgel è necessaria in quanto l'acqua è poco solubile nella CO<sub>2</sub> supercritica; inoltre, l'acqua reagisce con la CO<sub>2</sub> formando acido carbonico che potrebbe causare una graduale corrosione delle varie parti dell'apparecchiatura usata per l'essiccamento supercritico.

Questo capitolo è dedicato all'illustrazione della procedura di essiccamento supercritico.

## 5.2 Condizioni di essiccamento

Come già detto nel paragrafo 1.4.1, l'essiccamento in condizioni supercritiche può essere condotto sia a bassa temperatura (in questo caso il fluido portato in condizioni supercritiche è la CO<sub>2</sub>) che ad alta temperatura (quando si lavora in queste condizioni è lo stesso alcol contenuto nei pori dell'alcolgel ad essere portato allo stato supercritico).

Nel caso dei gel di Ca-Alg non è possibile effettuare un essiccamento supercritico ad alta temperatura in quanto, alle temperature richieste per questa modalità si avrebbe il degrado termico del materiale (vedere paragrafo 1.5.2). Per questo motivo si è deciso di essiccare anche le microsferi ibride rivestite e non rivestite con un processo supercritico a bassa temperatura.

Solitamente le condizioni temperatura scelte per questo tipo di essiccamento sono comprese tra 35°C (Veronovski et al., 2012) e 60°C (Raman et al., 2015). In questa sede si è deciso di optare per una temperatura pari a 40°C in modo da essere sufficientemente al di sopra della temperatura critica della CO<sub>2</sub>, evitando così fluttuazioni delle proprietà fisiche del solvente in seguito a piccole oscillazioni di temperatura, ed allo stesso tempo mettere a punto una procedura idonea anche per un eventuale essiccamento di microsferi impregnate con sostanze termolabili. Per quanto riguarda la pressione, considerando che in questa sede vengono prodotti diverse specie di aerogel, si è deciso di operare con una pressione pari a 105 bar in

quanto è un valore utilizzato per aerogel di diversa natura (Biesmans et al., 1998; Ismail et al., 2004; Sanz-Moral et al., 2013).

Il processo di essiccamento supercritico dell'alcolgel può essere diviso in tre fasi:

1. sostituzione dell'etanolo con CO<sub>2</sub>;
2. raggiungimento delle condizioni di pressione e temperatura (in questa sede 105 bar e 40°C);
3. depressurizzazione.

Per quanto riguarda la fase di sostituzione dell'etanolo occorre distinguere fra l'etanolo contenuto nelle porosità interne dell'alcolgel e quello esterno alle microsferiche contenuto nella porosità del letto particellare. Quest'ultimo è la conseguenza del fatto che, terminata la fase di scambio di solvente (ed eventuale caricamento del farmaco), le microsferiche di alcolgel non vengono asciugate prima di essere alloggiare nell'autoclave utilizzata per l'essiccamento supercritico e, in alcuni casi (paragrafo 5.4.1), l'autoclave viene riempita con etanolo.

Ai fini dell'ottenimento dell'aerogel tutto l'etanolo deve essere eliminato. È tuttavia molto importante assicurarsi di aver completamente rimosso l'etanolo contenuto nei pori dell'alcolgel perché, se non dovesse venire totalmente sostituito con CO<sub>2</sub> supercritica, le microsferiche essiccate potrebbero presentare dei cedimenti strutturali dovuti alla presenza dell'etanolo residuo, il quale, al di sotto del punto critico della CO<sub>2</sub>, forma con essa un sistema bifasico. L'etanolo allo stato liquido, in equilibrio con la CO<sub>2</sub> gassosa, porta a delle forti pressioni capillari che possono danneggiare o addirittura distruggere il reticolo del gel; per questo motivo è necessario stimare un giusto tempo di sostituzione dell'etanolo tale da garantire la sua completa rimozione.

Mentre il tempo rimozione dell'etanolo esterno all'alcolgel è facilmente stimabile conoscendo il volume da rimuovere e la portata di fluido supercritico, la rimozione dell'alcol contenuto nelle porosità interne può essere più difficoltosa e tale da richiedere un tempo addizionale di flussaggio della CO<sub>2</sub>. Nel caso di gel monolitici il tempo necessario per la rimozione dell'etanolo contenuto nelle porosità interne può essere determinato mediante opportune correlazioni matematiche in funzione delle dimensioni del gel (Cranck, 1994; Novak e Knez, 1997; Masmoudi et al., 2006). Nel caso delle microsferiche calcoli preliminari con le correlazioni prima citate dimostrano che il tempo necessario per la sostituzione dell'etanolo contenuto nelle porosità interne con la CO<sub>2</sub> può essere ritenuto

trascurabile. Le dimensioni delle microsfele, infatti, sono estremamente ridotte ( $<500\mu\text{m}$ ) rispetto a quelle dei gel monolitici (i cui spessori generalmente non sono mai inferiori alla scala millimetrica). Per questo motivo è ragionevole supporre che, una volta terminata la fase di sostituzione dell'etanolo esterno alle microsfele, quello contenuto nelle porosità interne venga completamente rimosso durante il tempo di attesa per raggiungere le condizioni di pressione e temperatura di 105 bar e 40 °C. Alla luce delle considerazioni sopra esposte, quando, d'ora in avanti, verrà menzionata la fase di sostituzione dell'etanolo si intenderà la rimozione dell'etanolo esterno alle microsfele, ovvero quello contenuto nella porosità del letto particellare.

Per quanto riguarda la depressurizzazione (che può essere vista come la fase di essiccamento vera e propria), invece, questa è la fase più critica di tutto il processo e, se non viene eseguita con una velocità sufficientemente bassa, si ottengono dei gel essiccati con il reticolo completamente o parzialmente collassato.

In laboratorio sono state eseguite diverse prove per stabilire le giuste condizioni operative per la fase di sostituzione dell'etanolo e quella di depressurizzazione. Per quanto riguarda i dettagli relativi alla sostituzione dell'etanolo si rimanda al paragrafo 5.5. Relativamente alle condizioni di depressurizzazione, invece, è stata scelta una velocità pari a 1 bar/min. In figura 5.1, in cui si confrontano i risultati di un essiccamento condotto a 5 bar/min con uno eseguito a 1 bar/min, si può vedere come la scelta errata della velocità di depressurizzazione (in questo caso 5 bar/min) possa portare ad un collasso del reticolo delle microsfele.



Figura 5.1 – Due campioni di aerogel ibridi Si/Ca-Alg ottenuti essiccando lo stesso volume di alcogel ed eseguendo la depressurizzazione a 5 bar/min (sinistra) e 1 bar/min (destra).

### **5.3 Descrizione dell'apparecchiatura di essiccamento supercritico**

In figura 5.2 è riportato uno schema dell'apparecchiatura utilizzata. L'apparecchiatura opera in continuo ed è costituita dalle seguenti unità:

- bombola della CO<sub>2</sub> liquida (B) dotata di un tubo pescante;
- pompa volumetrica a due tempi per fluidi supercritici SFT-10 (P1) dotata di sistema refrigerante ad aria, operante in controllo di portata con portate comprese nell'intervallo 0,00 – 24,0 mL/min con accuratezza pari a  $\pm 5\%$  (nel caso venga pompata CO<sub>2</sub>); la pressione operativa varia da 0,6895 a 689,5 bar con accuratezza pari a  $\pm 2\%$ ;
- pompa a siringa TELEDYNE ISCO 100DM (P2); essa può lavorare in controllo sia di portata (0,01  $\mu$ L/min – 25 mL/min; accuratezza  $\pm 0,3\%$ ) che di pressione (0,6895 – 689,5 bar; accuratezza  $\pm 0,5\%$ );
- miscelatore statico (M);
- misuratore di portata a effetto CORIOLIS SIEMENS SITRANS FC MASS 6000 (FI1);
- serpentino riscaldante (S) che consente al flusso di raggiungere l'autoclave (R) alla temperatura operativa;
- autoclave (R) del volume di 10 mL oppure 50 mL;
- stufa MEMMERT (F) al suo interno si trovano S ed R;
- misuratore di portata a effetto Coriolis MICROMOTION FISHER-ROSEMONT (FI2) per misurare il flusso a monte di R e a valle di S; oltre alla portata del flusso rileva anche densità e temperatura;
- regolatore di contropressione automatico provvisto di sistema di riscaldamento THAR BPR (BPR) dotato di valvola automatica con controllore PID funzionante con indicatore di posizione, pressione massima 680 bar.



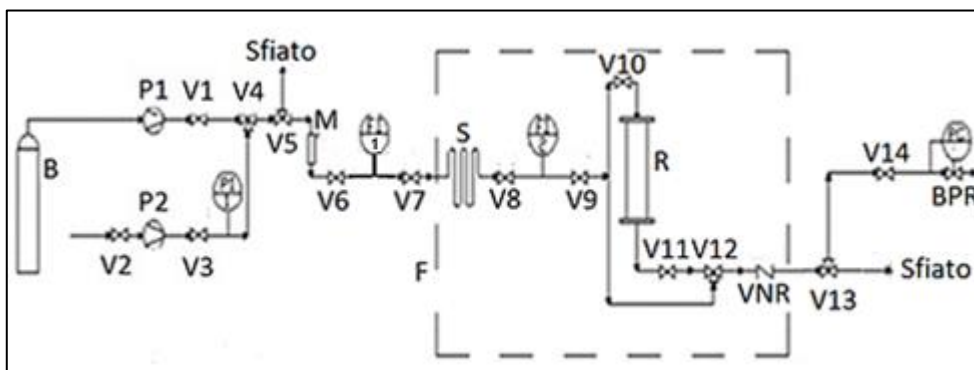


Figura 5.2 - Apparecchiatura utilizzata per l'essiccamento supercritico.

La procedura generale di essiccamento delle microsferi è la seguente:

- raffreddamento della pompa P1 per almeno 20 min per evitare la cavitazione durante il pompaggio di CO<sub>2</sub> allo stato liquido;
- inserimento dell'autoclave R contenente i campioni da essiccare all'interno della stufa F;
- sostituzione dell'etanolo e riempimento di R con CO<sub>2</sub> liquida prelevata dalla bombola B tramite P1;
- raggiungimento delle condizioni di pressione (105 bar) e temperatura (40°C);
- scarico della CO<sub>2</sub> dal regolatore di contropressione BPR ad 1 bar/min;
- raffreddamento di R a T<sub>amb</sub>;
- scollegamento di R e prelievo dei campioni.

La modalità di alloggiamento dei campioni nell'autoclave R ed il suo riempimento con CO<sub>2</sub> variano in base alla modalità di sostituzione dell'etanolo che, a sua volta, cambia a seconda del tipo di microsferi da essiccare che possono essere "bianche" (ovvero prive di farmaco) oppure caricate di ketoprofene. I dettagli verranno forniti nel paragrafo 5.4.

Durante lo svolgimento delle prove sperimentali si è notato che, per essiccare le microsferi, è opportuno scegliere delle basse portate per le pompe per non rischiare di trovare delle microsferi essiccate agglomerate. Per questo motivo, durante la sostituzione dell'etanolo e il riempimento dell'autoclave R con CO<sub>2</sub>, si è scelto di lavorare con una portata massima delle pompe pari a 1,5 mL/min.

## 5.4 Sostituzione dell'etanolo

Si è deciso di procedere con la sostituzione dell'etanolo in due modalità differenti, a seconda che si vogliano essiccare delle microsfere bianche oppure caricate con del ketoprofene.

### 5.4.1 Sostituzione dell'etanolo per le sfere bianche

Le microsfere di alcolgel, prima di essere inserite in autoclave, vengono caricate all'interno di cilindretti in vetro le cui estremità sono chiuse con una retina in materiale polimerico in modo da impedirne la fuoriuscita.

Nel corso delle prove si è osservato che, per evitare l'agglomerazione delle microsfere, oltre a lavorare con basse portate, è necessario inserirle nei cilindretti senza compattarle, come si può vedere in figura 5.3.



Figura 5.3 – Cilindretto di vetro riempito di microsfere di alcolgel pronte per essere inserite nell'autoclave.

I cilindretti di vetro riempiti con le microsfere devono essere inseriti all'interno di un'autoclave. A seconda dei quantitativi di microsfere che si vogliono essiccare possono essere utilizzate due differenti autoclavi, rispettivamente di volume pari a 50 mL e 10 mL. L'autoclave da 50 mL, ad esempio, consente di alloggiare fino a quattro cilindretti di vetro, ciascuno contenete un campione di microsfere da essiccare.

Per poter assorbire eventuali colpi di pressione i cilindretti di vetro posti all'interno dell'autoclave vengono alternati con dei distanziatori in alluminio internamente cavi.

- L'autoclave viene riempita secondo la seguente modalità (fig. 5.4):
- introduzione di uno strato di circa 2 cm di lana di vetro in entrambe le estremità;
  - inserimento dei cilindretti di vetro alternati con i distanziatori in alluminio.

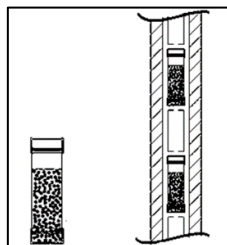


Figura 5.4 – Rappresentazione schematica delle microsferine inserite in R.

Fra i vari problemi riscontrati vi è stato quello delle forti oscillazioni di pressione in uscita al regolatore di contropressione BPR dovute alla simultanea presenza di etanolo e CO<sub>2</sub> durante la fase di sostituzione del solvente. Tali oscillazioni di pressione vanno evitate in quanto potrebbero danneggiare il reticolo delle microsferine. Nei lavori svolti in laboratorio si è osservato che questo problema deriva da una scarsa miscelazione tra etanolo e CO<sub>2</sub> il che impedisce al BPR di regolare la pressione correttamente. Si è deciso di risolvere questo problema riempiendo la prima metà dell'autoclave con i campioni da essiccare e la seconda metà con delle sferette di vetro a diversi diametri (150 - 500 µm). In questo modo la seconda metà dell'autoclave agisce come un miscelatore statico per l'etanolo residuo e il flusso di CO<sub>2</sub> riducendo così le oscillazioni di pressione al BPR che provocano il danneggiamento del reticolo delle microsferine.

Per la sostituzione dell'etanolo si procede in questo modo:

- caricamento dell'autoclave con i campioni da essiccare (in alto) e delle sfere di vetro (al fondo);
- riempimento dell'autoclave con etanolo tramite la pompa a siringa P2 impostata in controllo di portata a 1,5 mL/min;
- pressurizzazione (2 bar/min) dell'etanolo contenuto in autoclave mediante la pompa a siringa P2 fino ad un valore di pressione che coincide con quello della bombola della CO<sub>2</sub> (~ 60 bar);
- isolamento della linea di alimentazione dell'etanolo una volta raggiunta la pressione della bombola della CO<sub>2</sub>;

- apertura della linea di CO<sub>2</sub> e pompaggio a 1,5 mL/min fino alla completa rimozione dell'etanolo mantenendo la pressione nell'intorno dei 60 bar.

#### 5.4.2 Sostituzione dell'etanolo per le sfere caricate con ketoprofene

Quando si vogliono essiccare dei campioni caricati con ketoprofene bisogna tenere presente che questo principio attivo è solubile in sc-CO<sub>2</sub>. Nella tabella 5.1 è riportata la solubilità del ketoprofene in sc-CO<sub>2</sub> a diverse condizioni di pressione e temperatura.

**Tabella 5.1** – Solubilità del ketoprofene in sc-CO<sub>2</sub>. Fonte: Ahmadi Sabegh et al., 2012, Solubility of ketoprofen in supercritical carbon dioxide, J. of Supercritical Fluids 72 (2012) 191– 197.

T	P	Solubilità
°C	bar	Frazione molare
40	90	0,39x10 <sup>-5</sup>
	100	1,39 x10 <sup>-5</sup>
	110	2,12 x10 <sup>-5</sup>
	130	5,52 x10 <sup>-5</sup>
	150	6,32 x10 <sup>-5</sup>
	200	8,78 x10 <sup>-5</sup>
	250	9,15 x10 <sup>-5</sup>
55	110	0,33 x10 <sup>-5</sup>
	130	1,66 x10 <sup>-5</sup>
	150	4,66 x10 <sup>-5</sup>
	170	7,03 x10 <sup>-5</sup>
	190	10,3 x10 <sup>-5</sup>
	210	13,3 x10 <sup>-5</sup>
	230	16,1 x10 <sup>-5</sup>
	250	18,8 x10 <sup>-5</sup>

Come si può osservare la solubilità del farmaco in CO<sub>2</sub> supercritica alle condizioni di pressione e temperatura a cui viene svolto l'essiccamento supercritico (105 bar e 40 °C) è piuttosto bassa. Tuttavia si è deciso, comunque, di ridurre il più possibile il volume dell'autoclave a disposizione della CO<sub>2</sub> in modo da ridurre la quantità di ketoprofene che si solubilizza.

Tenendo presente, poi, che il ketoprofene è molto solubile in etanolo, la sostituzione dell'alcol con la CO<sub>2</sub> non può essere eseguita con la stessa modalità descritta nel paragrafo precedente per le microsfele bianche in quanto il principio attivo verrebbe rimosso completamente.

Nel caso di microsfele cariche di ketoprofene, la sostituzione dell'etanolo, viene dunque eseguita in questa modalità:

- caricamento dell'autoclave con i campioni da essiccare senza aggiunta di etanolo;
- riempimento dell'autoclave con CO<sub>2</sub> fino alla pressione della bombola (il riempimento viene effettuato manovrando opportunamente le valvole V6 – V11 in modo da assicurare un graduale raggiungimento della pressione finale evitando così che le microsfele subiscano dei colpi d'ariete che potrebbero danneggiare il loro reticolo).

Nel caso precedente (dove l'autoclave viene prima riempita di etanolo e mandata alla pressione della bombola della CO<sub>2</sub>), quando si fa fluire la CO<sub>2</sub>, l'intera linea dell'apparecchiatura si trova già alla pressione della CO<sub>2</sub> in uscita dalla bombola, per cui, una volta rimosso tutto l'etanolo dalla linea, si può agevolmente pressurizzare il sistema alle condizioni supercritiche e, successivamente, depressurizzare senza imbattersi in problemi di oscillazione di pressione. In questo caso invece, quando si fluisce la CO<sub>2</sub>, la linea è vuota e questo comporta l'instaurarsi di un profilo di pressione lungo la linea. Questa non uniformità della pressione può provocare, in fase di depressurizzazione, delle oscillazioni di pressione che possono portare ad un parziale danneggiamento del reticolo delle microsfele con conseguente riduzione dell'area superficiale. Per questo motivo è molto importante scegliere accuratamente un criterio su come impostare la portata alla pompa P1 (flusso di CO<sub>2</sub>) durante il raggiungimento delle condizioni supercritiche onde evitare che durante la successiva fase di depressurizzazione (ovvero essiccamento delle microsfele) ci siano delle oscillazioni di pressione.

Si è inoltre deciso di portare l'apparecchiatura in temperatura simultaneamente alla mandata in pressione in modo da diminuire il tempo per raggiungere la

condizioni supercritiche della CO<sub>2</sub> diminuendo ulteriormente le perdite di ketoprofene.

Dopo alcune prove preliminari si è scelto di variare la portata di CO<sub>2</sub> in modo graduale operando in questo modo:

- portata iniziale di P1 pari a 1,5 mL/min fino al raggiungimento di una pressione di 80 bar;
- riduzione della portata di P1 a 1 mL/min fino al raggiungimento di una pressione di 90 bar;
- riduzione della portata di P1 a 0,5 mL/min fino al raggiungimento di una pressione di 100 bar;
- riduzione della portata di P1 a 0,2 mL/min fino al raggiungimento di una pressione di 105 bar;
- riduzione della portata di P1 a 0,1 mL/min fino al raggiungimento di una pressione di 107 bar;
- interruzione del flusso di CO<sub>2</sub> e attesa della riduzione della pressione a 105 bar.

## 5.5 Conclusioni

La procedura di essiccamento supercritico riportata nel presente capitolo mostra come sia stato necessario adottare parecchi accorgimenti per consentire di ottenere microsfele integre e non agglomerate. Tali accorgimenti, in particolare, riguardano la modalità di alloggiamento delle microsfele in autoclave, la scelta della massima portata delle pompe e la velocità di depressurizzazione finale.

Particolare attenzione è stata dedicata alla fase di caricamento della CO<sub>2</sub> e sostituzione dell'etanolo. Sono state adottate, infatti, due diverse procedure a seconda che l'essiccamento riguardi le microsfele "bianche" (ovvero prive di farmaco) oppure quelle caricate di ketoprofene. Mentre nel primo caso il caricamento della CO<sub>2</sub> è preceduto da una fase preliminare di riempimento e pressurizzazione con etanolo, nel secondo caso tale operazione non è possibile in quanto il farmaco è altamente solubile nel solvente alcolico e verrebbe allontanato dal sistema. L'assenza di tale fase preliminare rende più difficoltoso il successivo riempimento e la pressurizzazione con la CO<sub>2</sub> rendendo necessaria la messa a punto di accorgimenti volti ad evitare colpi d'ariete alle microsfele.



# **Capitolo 6**

## **Caratterizzazione microsferi**



## 6.1 Introduzione

Questo capitolo è dedicato alla caratterizzazione delle microsfere ibride prodotte seguendo la procedura messa a punto nel capitolo 3. Seguendo i metodi analitici di letteratura usati per le microsfere di Ca-Alg, si è deciso di procedere con l'analisi granulometrica mediante diffrazione laser sulle microsfere in forma di idrogel (Poncelet et al., 1999; Tian et al., 2008; Alnaief et al., 2011) e della stima di area superficiale e porosità tramite tecnica BET sulle microsfere essiccate (Mehling et al., 2009; Alnaief et al., 2011; Veronovski et al., 2012, 2013). Inoltre sono state monitorate le variazioni dell'area superficiale per unità di massa in un arco di tempo pari a due mesi, per osservare se il materiale si deteriora nel tempo, per mezzo delle analisi SAXS (Dieudonne' et al., 1998; Berthon et al., 2001).

## 6.2 Analisi granulometrica

Le tecniche di analisi granulometrica basate sul principio della diffrazione laser sono molto usate in diversi campi della ricerca e applicazioni industriali come, per esempio, la combustione del carbone in polvere, il monitoraggio delle polveri inquinanti o la produzione di dispositivi farmaceutici (Black et al, 1996). Questa tecnica analitica è, inoltre, in grado di fornire misurazioni accurate e applicabili su particelle con un diametro fino a 3000  $\mu\text{m}$  (Setekleiv e Svendsen, 2014). Il campione da analizzare, che deve essere in forma particolata e sospeso in un liquido, viene colpito da un fascio di luce laser ad una data lunghezza d'onda ( $\lambda$ ). In questo modo si viene a creare un modello di diffrazione come quello riportato in figura 6.1, dove l'angolo della luce diffratta ( $\theta$ ) varia al variare del diametro della particella colpita (Annapragada e Adjei, 1996; Setekleiv e Svendsen, 2014). Il campione da analizzare deve essere sufficientemente concentrato per dare un segnale stabile ma sufficientemente diluito per evitare il problema dello scattering multiplo. La concentrazione del particolato solitamente viene espressa attraverso un parametro detto oscuramento (Brusa, 2013).

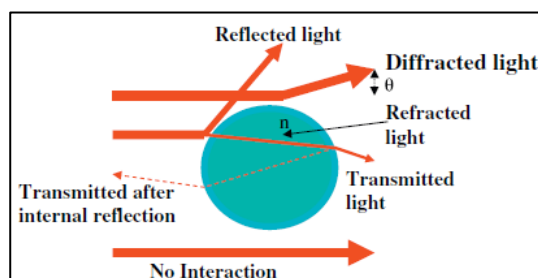


Figura 6.1 – Modello di diffrazione di un raggio laser che colpisce una particella in sospensione. Fonte: A. Eddie Setekleiv, H.F. Svendsen / Measurement 55 (2014) 133–141.

L'intensità della luce dispersa è una funzione di  $\lambda$ ,  $\theta$ , la dimensione del particolato  $D$  e l'indice di rifrazione relativo tra le particelle del campione e il liquido di sospensione (Setekleiv e Svendsen, 2014).

### 6.2.1 Scelta del modello ottico

Per determinare le dimensioni del particolato si può seguire una di queste due teorie:

- teoria di Lorentz - Mie;
- teoria di Fraunhofer.

Entrambi questi modelli teorici si basano sull'ipotesi che le particelle sospese sono perfettamente sferiche. La teoria di Lorentz-Mie trova fondamento dalla risoluzione delle equazioni di Maxwell che descrivono le radiazioni elettromagnetiche dovute alla luce che si disperde in seguito all'interazione con ogni singola sfera. Il modello di Fraunhofer, invece, considera il modello di dispersione della luce come una serie di bande concentriche chiare e scure prodotte da ogni singola microsfera. Mentre il modello di Lorentz-Mie richiede calcoli più complessi per la soluzione rigorosa delle equazioni, il modello di Fraunhofer è più semplice ma induce delle approssimazioni accettabili solo su particelle di grandi dimensioni (Black et al., 1996).

Nel caso del granulometro utilizzato in questo lavoro di tesi, il Coulter LS232, per particolati con diametro  $>100 \mu\text{m}$  non si hanno differenze significative nei risultati ottenuti con i due differenti modelli (Beckam Coulter Ink, 2011). Dal momento che le microsfele ibride prodotte in laboratorio hanno un diametro medio  $>100 \mu\text{m}$ , in questa sede è stato scelto il modello ottico di Fraunhofer.

## 6.2.2 Curva di distribuzione granulometrica

Dal momento in cui i modelli teorici sui quali si basa questa tecnica analitica assumono l'ipotesi che le particelle siano sferiche, la curva di distribuzione granulometrica ottenuta (fig. 6.2) viene costruita di conseguenza.

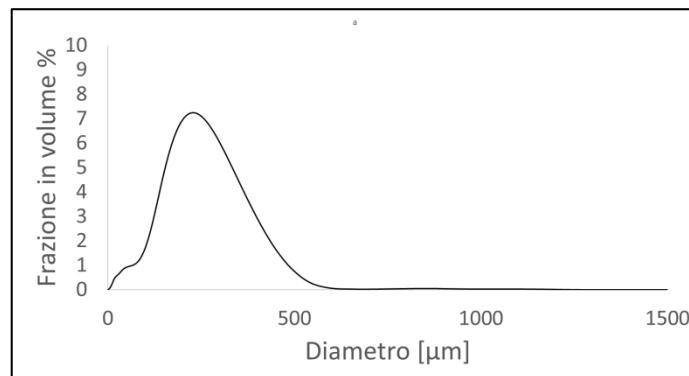


Figura 6.2 – Curva di distribuzione granulometrica ottenuta da un campione di microsferi ibride prodotte con una velocità di rotazione dell'elica marina pari a 400 rpm.

Per determinare le dimensioni del particolato e ricavare informazioni sulla forma delle particelle che lo compongono sono stati presi in considerazione i seguenti parametri:

- $d_M$ , il diametro medio aritmetico;
- $d_{10}$ , il 10% delle particelle analizzate hanno un diametro inferiore a questo valore;
- $d_{50}$ , il 50% delle particelle analizzate hanno un diametro inferiore a questo valore;
- $d_{90}$ , il 90% delle particelle analizzate hanno un diametro inferiore a questo valore;
- $d_{32}$  o diametro medio di Sauter, rappresenta il diametro di una sfera equivalente avente un rapporto tra volume e area pari a quello dell'intero insieme di particelle.

Gli scostamenti dei valori di  $d_{10}$ ,  $d_{50}$ ,  $d_{90}$  e  $d_{32}$  rispetto a quello del diametro medio aritmetico,  $d_M$ , forniscono informazioni sulla forma delle particelle in

quanto, in caso di perfetta sfericità, tutti i valori dei parametri sopra elencati dovrebbero coincidere (Black et al., 1996).

Per caratterizzare la forma di una curva di distribuzione granulometrica si può ricorrere alle variabili della statistica fra cui, in particolare:

- l'indice di asimmetria (o skewness), parametro che fornisce una misura della mancanza di simmetria della curva;
- la curtosi, parametro che rappresenta l'allontanamento dalla normalità distributiva in termini di appiattimento o allungamento della curva.

### **6.2.3 Risultati**

Per le prove è stato utilizzato un granulometro Coulter LS232, adatto per particolati di diametro compreso tra 0,045 e 2000  $\mu\text{m}$  con lunghezza d'onda a 750 nm. In questo strumento una lente di Fourier invia la luce diffratta su tre detector impostati rispettivamente per fasci di luce con un valore di angolo di diffrazione basso, medio e alto. Ogni detector è composto da 126 elettro-diodi. Le microsfere sono state sospese in acqua Milli-Q con una concentrazione tale da dare un valore di oscurazione compreso nell'intervallo 8-12%. Come detto in precedenza, per l'analisi dei dati è stato usato il modello ottico di Fraunhofer usando i parametri di default del software fornito del produttore del granulometro.

Le microsfere ibride sono state prodotte seguendo la procedura messa a punto nel capitolo 3; la composizione delle fasi utilizzate per produrle è riportata nella tabella 6.1. I campioni sono stati prodotti mantenendo costanti tutte le variabili di processo (tab. 6.2) ad eccezione del numero di giri dell'elica marina (vedere paragrafo 3.3.1).

**Tabella 6.1** – Composizione delle fasi usate per la produzione delle microsfere ibride sottoposte ad analisi granulometrica.

	Variabile	Valore
		% <sub>w/w</sub>
Fase acquosa, dispersa	C <sub>Na-Alg</sub>	1,4
	C <sub>CaCO<sub>3</sub></sub>	0,5
	C <sub>Sol tamp pH 6,00</sub>	0,8
	Na-Alg/TMOS	6,3
Fase oleosa, continua	C <sub>Span80</sub>	1,1
	C <sub>Ac. acetico</sub>	1,3

**Tabella 6.2** – Variabili di processo mantenute costanti nei processi di formazione delle microsfere ibride sottoposte ad analisi granulometrica.

Variabile	Valore
Rapporto di fase	30% <sub>v/v</sub>
Ca <sup>2+</sup> /Na-Alg	14,3% <sub>w/w</sub>
Ac. Acetico/Ca <sup>2+</sup>	12,4 <sub>mol/mol</sub>

In base al numero di giri dell'elica marina, rispettivamente pari a 200, 400 e 600 rpm, i campioni sono stati chiamati IB200, IB400 e IB600. Nelle tabelle 6.3 e 6.4 sono riportati i diametri medi e le variabili statistiche ottenuti dalle curve di distribuzione granulometrica.

**Tabella 6.3** – Confronto dei diametri medi delle microsfele ibride prodotte a differenti velocità di rotazione della girante.

Campione	Diametro medio [ $\mu\text{m}$ ]				
	$d_M$	$d_{32}$	$d_{10}$	$d_{50}$	$d_{90}$
IB200	484	211	217	481	758
IB400	282	96	69	269	496
IB600	311	134	76	263	603

**Tabella 6.4** – Confronto delle variabili statistiche delle curve di distribuzione delle microsfele ibride prodotte a differenti velocità di rotazione della girante.

Campione	Variabile	
	skewness	curtosi
IB200	0,11	0,34
IB400	0,59	0,38
IB600	1,48	2,83

Come si può vedere dai valori riportati nelle tabelle precedenti, aumentando la velocità di rotazione dell'elica marina da 200 rpm (IB200) a 400 rpm (IB400) diminuiscono sensibilmente tutti i diametri medi. Portando, invece, la velocità di rotazione dell'elica marina da 400 rpm (IB400) a 600 rpm (IB600), si osserva una riduzione del valore di  $d_{50}$ , che presenta il valore minore (263  $\mu\text{m}$ ) tra tutti e tre i campioni. Tuttavia si osserva un allargamento della curva di distribuzione granulometrica rispetto ai casi precedenti, come si può notare dall'andamento dei valori dei diametri  $d_{10}$  (76  $\mu\text{m}$ ) e  $d_{90}$  (603  $\mu\text{m}$ ) che tornano ad aumentare. A conferma di ciò, passando da 400 rpm a 600 rpm, si osserva un piccolo aumento del diametro medio (da 282 a 311  $\mu\text{m}$ ) e del diametro di Sauter  $d_{32}$  (da 96 a 134  $\mu\text{m}$ ).

Dalle variabili statistiche (tabella 6.4) si può vedere come, aumentando le velocità di rotazione della girante, aumentino sia l'asimmetria che l'appiattimento o allungamento delle curve di distribuzione dei diametri (raffigurate in figura 6.3). Entrambe le variabili statistiche hanno un andamento crescente con l'aumentare

della velocità di rotazione della girante; infatti, passando da 200 a 600 rpm i valori di skewness e curtosi aumentano rispettivamente da 0,11 a 1,48 e da 0,34 a 2,83. In particolare la crescita è più marcata quando la velocità di rotazione aumenta da 400 a 600 rpm quando la curva di distribuzione diventa più asimmetrica e, soprattutto, più piatta e allungata come si può notare dal significativo incremento del valore della curtosi.

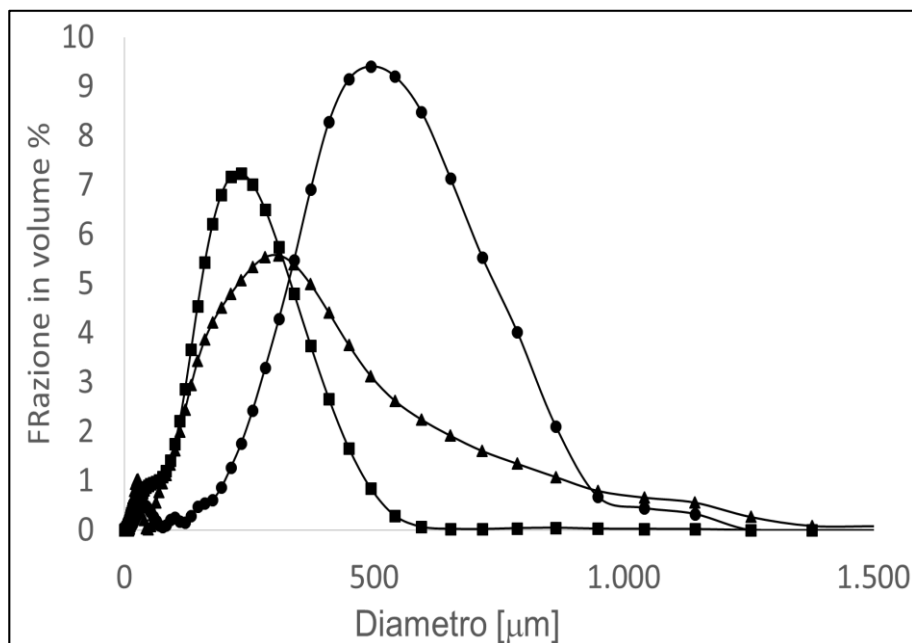


Figura 6.3 – Confronto curve di distribuzione granulometrica ● IB200; ■ IB400; ▲ IB600.

Le curve di distribuzione delle microsfele ibride ottenute in questa tesi sono state paragonate con analoghe curve di distribuzione di microsfele non ibride di Ca-Alg prodotte in un precedente lavoro di letteratura (Silva et al., 2006). Tali microsfele non contengono alcuna componente silicea ma sono state prodotte partendo da Na-Alg a media viscosità con il metodo della reticolazione interna usando olio di paraffina con lo stesso contenuto di Span 80 e lo stesso rapporto di fase che sono stati impostati per le prove sperimentali di questa tesi. Anche la velocità di rotazione dell'emulsione varia nello stesso intervallo (200-600 rpm). In tabella 6.5 e in figura 6.4 sono rispettivamente riportati i valori dei diametri medi e

delle curve di distribuzione granulometrica ottenuti in letteratura (Silva et al., 2006).

**Tabella 6.5** – Valori dei diametri medi ricavati curve di distribuzione granulometrica ottenute da microsfele di Ca-Alg prodotte con le stesse condizioni di emulsione delle prove sperimentali. Fonte: \*C.M. Silva et al. / International Journal of Pharmaceutics 311 (2006) 1–10.

Velocità rotazione rpm	Diametro medio [ $\mu\text{m}$ ]	
	Ca-Alg (letteratura*)	Ibride (sperimentale)
200	288	484
400	74	282
600	53	311

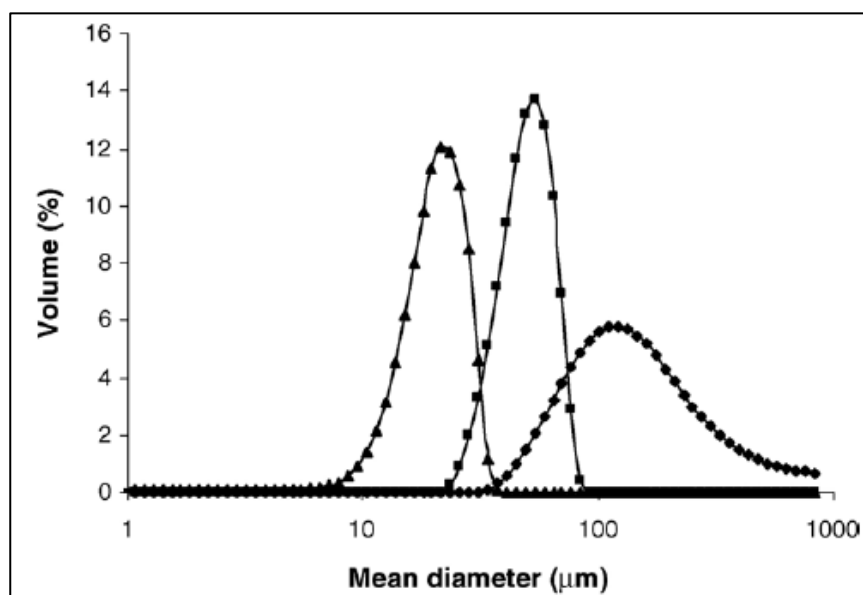


Figura 6.4 – Curve di distribuzione granulometrica ottenute da microsfele di Ca-Alg prodotte con le stesse condizioni di emulsione delle prove sperimentali ♦ 200 rpm; ■ 400 rpm; ▲; 600 rpm. Fonte: C.M. Silva et al. / International Journal of Pharmaceutics 311 (2006) 1–10.



Come si può vedere dal confronto delle figure 6.3 e 6.4, le curve di distribuzione granulometrica hanno comportamenti diversi. In particolare per le microsfere di solo Ca-Alg prodotte in letteratura la curva con un intervallo di distribuzione più ampio dei diametri è stata ottenuta a 200 rpm e non a 600 rpm come per le microsfere ibride prodotte in questa tesi. Confrontando i dati delle tabelle 6.4 e 6.5 si nota come le microsfere ibride siano sempre più grosse di quelle di Ca-Alg; infine, contrariamente alle microsfere ibride, quelle di Ca-Alg prodotte a 600 rpm sono sensibilmente più piccole di quelle prodotte a 400 rpm.

Le differenze di comportamento fra i due sistemi possono essere giustificate dal diverso meccanismo di reticolazione dei due tipi di microsfere. Mentre la reticolazione dell'alginato è una reazione molto veloce, la reticolazione del TMOS avviene in maniera prolungata nel tempo e comporta un aumento progressivo della viscosità; inoltre, l'aumento della velocità di agitazione accelera la gelificazione del TMOS (vedere capitolo 3). In base a queste osservazioni si può ritenere che, mentre nel caso delle microsfere di solo Ca-Alg la turbolenza provocata dall'agitazione ha effetto solo sulla riduzione delle dimensioni delle microsfere, nel caso delle microsfere ibride questo fenomeno è accompagnato dalla accelerazione della gelificazione della frazione silicea. Quest'ultimo effetto comporta un aumento della viscosità della fase acquosa che favorisce la formazione di microsfere più grosse. Nel caso delle microsfere ibride, quindi, l'effetto dell'incremento dell'agitazione agisce su due meccanismi contrastanti: se da un lato la turbolenza favorisce la diminuzione del diametro medio come nelle microsfere di solo Ca-Alg, dall'altro l'incremento della viscosità legato all'accelerazione della gelificazione della componente silicea favorisce il fenomeno opposto. È ragionevole pensare che variando la velocità della girante da 200 a 400 rpm prevalga il primo effetto mentre quando la rotazione è ulteriormente incrementata a 600 rpm prevalga il secondo.

Può essere interessante confrontare i risultati di questa tesi con un altro precedente lavoro di letteratura che riguarda, nuovamente, delle microsfere di solo Ca-Alg (Poncelet et al., 1992). È noto, infatti, che cambiando la natura della fase oleosa varia il diametro delle microsfere ottenute. Ad esempio, impiegando un olio vegetale si ottengono microsfere di diametro più piccolo rispetto agli oli minerali; aumentando la quantità di tensioattivo nella fase oleosa e aumentando il rapporto di fase dell'emulsione (vedere paragrafo 1.7.1) si può ridurre il diametro delle microsfere. Questo è il caso delle microsfere di solo Ca-Alg prodotte da Poncelet e collaboratori a 400 rpm (Poncelet et al., 1992), che hanno utilizzato una soluzione di Na-Alg all'1,8%<sub>w/w</sub> dispersa in olio di colza contenente il 2%<sub>w/w</sub> di Span 80 con un rapporto di fase del 16%<sub>v/v</sub> intervenendo così sui sopra citati parametri: il

risultato è stato quello di ottenere delle microsfele con una distribuzione bimodale (figura 6.5). Si è preferito, quindi, non alterare le condizioni della fase oleosa onde scongiurare il pericolo di ottenere microsfele ibride con distribuzione bimodale.

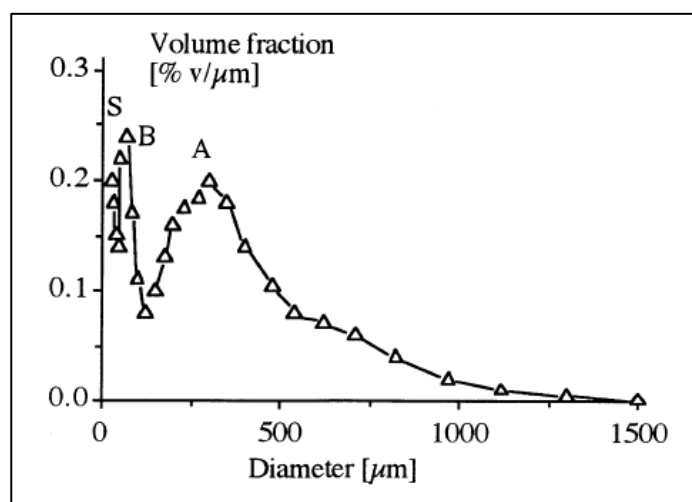


Figura 6.5 – Curva di distribuzione granulometrica bimodale che si potrebbe ottenere cambiando le condizioni di emulsione. Fonte: Poncelet et al., 1992 / Appl Microbiol Biotechnol (1992) 38, 39-45.

Alla luce dei risultati riportati in figura 6.3 e nelle tabelle 6.3 e 6.4 nonché dalle considerazioni emerse dal confronto con precedenti lavori di letteratura (Silva et al., 2006; Poncelet et al., 1992) si può concludere che i risultati migliori ottenuti in questa tesi sono quelli a 400 rpm. In tali condizioni, infatti, si ottengono microsfele ibride con diametro piccolo e una buona distribuzione granulometrica. La necessità di ottenere microsfele di piccolo diametro è legata al fatto che nei dispositivi a rilascio modificato particolati ciò consente, a parità di principio attivo caricato, di avere un maggior numero di elementi discreti e quindi una maggior biodisponibilità dovuta a una maggior superficie di scambio. In tale ottica un aumento della velocità di rotazione dell'elica marina a 600 rpm, purtroppo, comporta un netto peggioramento della curva di distribuzione dei diametri senza risultare in una ulteriore diminuzione del diametro. Dal momento che la scelta di modificare altre variabili di processo, come la quantità di tensioattivo nella fase oleosa e/o il rapporto di fase, oltre che risultare molto onerosa dal punto di vista sperimentale,

potrebbe comportare una distribuzione bimodale dei diametri si è preferito non procedere in questa direzione.

## 6.3 Area superficiale

Uno dei metodi maggiormente usati per la caratterizzazione dei solidi porosi è il modello BET. Questo modello, che prende il nome dai suoi ideatori (Brunauer, Emmett e Teller) e fu sviluppato nel 1938, è una tecnica basata sull'adsorbimento di un gas (solitamente  $N_2$ ) ed è attualmente considerato un metodo convenzionale per la determinazione dell'area superficiale.

Per svolgere un'analisi BET non esiste una procedura standard e per questo motivo, ogni qual volta si deve analizzare un nuovo materiale, è necessario stabilire i corretti parametri per poter ottenere dei risultati attendibili (Mel'gunov e Ayupov, 2017). L'area superficiale è intesa come l'interfaccia tra il materiale poroso e l'ambiente circostante considerando anche le pareti dei pori, in questo caso la tecnica di adsorbimento di gas è più idonea rispetto ad altri metodi che potrebbero fornire risultati affetti da errore (Naderi, 2015). La quantità di gas adsorbito all'interfaccia solido-vapore viene descritta mediante una curva detta isoterma di adsorbimento. Questa curva rappresenta l'ammontare di gas adsorbito in funzione della pressione parziale a temperatura costante. In base alle condizioni chimico-fisiche e alle interazioni tra gas e solido solitamente si ottengono i cinque differenti modelli di isoterme di adsorbimento raffigurate in figura 6.6 (Naderi, 2015).

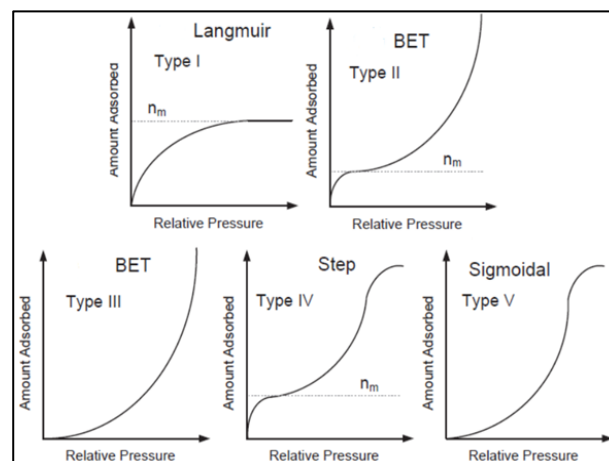


Figura 6.6 – Modelli delle isoterme di adsorbimento. Fonte: Majid Naderi, Surface Measurement Systems, Ltd., Alperton, London, UK, 2015.

L'adsorbimento fisico è un fenomeno reversibile e l'isoterma presenta un ciclo di isteresi dovuto alla condensazione capillare nei pori (fig. 6.7). Il processo di adsorbimento avviene in questo modo: inizialmente, si ha il riempimento dei micropori, che è dominato quasi interamente dalle interazioni tra adsorbato e pareti del poro, segue la copertura della superficie esterna, consistente nella formazione del monostrato o adsorbimento multistrato delle pareti dei mesopori e dei macropori, con condensazione capillare nel caso di mesopori. Ciò vuol dire che, la zona a bassi valori di  $P/P_0$ , corrispondente al riempimento dei micropori, è utile per ricavare il volume microporoso; la zona corrispondente alla formazione del monostrato, permette di calcolare l'area superficiale e la zona di condensazione capillare (presenza di isteresi sull'isoterma) viene utilizzata per caratterizzare i mesopori (Silvestri et al., 2013).

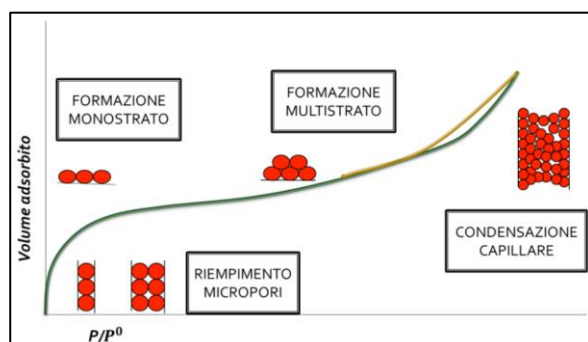


Figura 6.7 – Esempio di isoterma di adsorbimento di tipo II. Fonte: <http://openarchive.enea.it/bitstream/handle/10840/4483/RT-2013-7-ENEA.pdf?sequence=2>.

Sfruttando la reversibilità dell'adsorbimento fisico è stata messa a punto un'equazione che consente di stimare l'area superficiale mettendola in relazione con la quantità di gas/vapore che è servito per coprire la superficie esterna con uno strato molecolare (Naderi, 2015).

L'equazione è la seguente:

$$\frac{\frac{P}{P_0}}{V \times \left(1 - \frac{P}{P_0}\right)} = \frac{1}{V_m \times C} + \frac{\frac{P}{P_0} \times (C - 1)}{V_m \times C} \quad (6.1)$$

dove:

- V è il volume delle molecole adsorbite;
- $V_m$  è il volume dello strato molecolare;
- C è una costante;
- $P/P_0$  è la pressione relativa.

Se si costruisce un grafico mettendo il termine di sinistra dell'equazione (6.1) sull'asse delle ascisse e il rapporto  $P/P_0$  sull'asse ordinate, si ottiene una retta dalle quale è possibile ricavare il valore dell'area superficiale tramite la valutazione del coefficiente angolare e dell'intercetta.

### 6.3.1 Risultati

L'area superficiale è stata misurata sui campioni IB200, IB400 e IB600, dopo l'essiccamento supercritico, con apparecchiatura BET ASAP 2020. I campioni subito dopo il trattamento supercritico sono stati conservati in un essiccatore e sono stati analizzati il giorno successivo. Prima delle analisi i campioni sono stati degassati a 60°C (Mehling et al., 2009) per 4 ore. Le misure sono state effettuate utilizzando  $N_2$  ad una temperatura pari a -196°C, la curva di isteresi ottenuta è del tipo II (fig. 6.8). Nella tabella 6.6 sono riportati i valori di area superficiale ( $A_S$ ), volume poroso totale ( $V_p$ ), volume microporoso ( $V_{mp}$ ) e diametro medio dei pori ( $d_p$ )

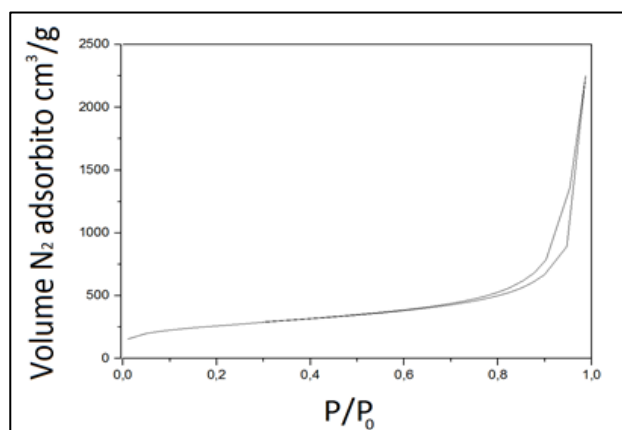


Figura 6.8 - Isotherma di adsorbimento ottenuta da analisi BET delle microsfere ibride delle microsfere ibride prodotte in laboratorio mentendo una velocità di rotazione dell'elica marina peri a 400 rpm.

**Tabella 6.6** - Risultati delle analisi BET sulle microsfere ibride essiccate.

Campione	Dati BET			
	$A_S$ m <sup>2</sup> /g	$V_p$ cm <sup>3</sup> /g	$V_{mp}$ cm <sup>3</sup> /g	$d_p$ nm
IB200	915	3,66	0,03	16
IB400	928	3,49	0,12	17
IB600	1042	3,59	0,15	16

Come mostra la tabella 6.5 aumentando la velocità di rotazione dell'elica marina aumenta l'area superficiale, il volume poroso totale non subisce variazioni significative mentre il volume dei micropori aumenta sensibilmente quando si passa da 200 rpm a 400 rpm per poi aumentare leggermente quando la velocità di rotazione sale a 600 rpm. Questo andamento è in qualche modo analogo a quello delle del diametro  $d_{50}$  riportato in tabella 6.3 anche se quest'ultimo diminuisce al crescere della velocità di rotazione. Le dimensioni del 50% delle microsfere analizzate, infatti, diminuisce nettamente da 481 a 269  $\mu\text{m}$  passando da 200 a 400 rpm per poi avere una piccola diminuzione da 269 a 263  $\mu\text{m}$  passando da 400 a 600 rpm. Sotto queste osservazioni si può affermare che il volume microporoso aumenta

al diminuire del diametro delle microsfeere. Il diametro medio dei pori (stimato sull'ipotesi dei pori sferici), invece, rimane circa costante a valori pari a 16 nm (tabella 6.6), portando quindi a classificare queste microsfeere come mesoporose.

Nella tabella 6.7 è riportato il confronto tra i valori di area superficiale e volume poroso totale tre le microsfeere ibride prodotte in laboratorio e quelli presi da due lavori di letteratura dove, nel primo, sono state prodotte delle microsfeere ibride silice/alginato con il metodo della diffusività usando il TMOS come precursore siliceo (Lu et al., 2006), mentre, nel secondo, sono stati prodotti degli aerogel ibridi silice/Ca-Alg monolitici usando il silicato di sodio al posto del TMOS (Raman et al., 2015). Come si può vedere le microsfeere prodotte in questa tesi con il metodo della reticolazione interna presentano maggiori porosità e area superficiale rispetto a quelle prodotte con il metodo della diffusività. Anche in confronto con gli aerogel di silice prodotti con il  $\text{Na}_2\text{SiO}_4$  in sostituzione del TMOS, le microsfeere ibride prodotte in questa tesi hanno valori maggiori.

**Tabella 6.7** – Confronto dell'area superficiale e volume poroso totale delle microsfeere ibride prodotte in laboratorio con i risultati trovati in letteratura.

	Campione		
	IB400	Lu et al., 2006	Raman et al., 2015
Forma	microsfere	microsfere	monolitico
Tecnica formazione	reticolazione interna	metodo diffusivo	colatura su stampo
Precursori	Na-Alg, TMOS	Na-Alg, TMOS	Na-Alg, $\text{Na}_2\text{SiO}_4$
<u><i>Na – Alg</i></u> <u><i>precursorse silceo</i></u>	0,06 <sub>w/w</sub>	0,07 <sub>w/w</sub>	5 <sub>w/w</sub>
$A_s$ [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]	928	549	623
$V_p$ [ $\text{cm}^3/\text{g}$ ]	3,49	1,27	3,25

## 6.4 Invecchiamento

Gli aerogel sono soggetti ad una diminuzione progressiva della loro area superficiale nel tempo; questo fenomeno probabilmente è dovuto alla crescita dei grani per effetto della maturazione di Ostwald. Gli aerogel idrofili sono anche soggetti a delle lesioni del reticolo dovute all'assorbimento dell'umidità atmosferica. A tal proposito il rapporto tra l'area superficiale e il volume è stato monitorato per mezzo di analisi SAXS eseguite sui campioni freschi e dopo un periodo di conservazione di 70 giorni. I campioni sono stati conservati in un essiccatore per preservarli dall'umidità atmosferica.

### 6.4.1 Analisi SAXS

SAXS (small angle X-ray scattering) è una tecnica analitica in grado di caratterizzare i materiali che presentano caratteristiche strutturali che rientrano nelle dimensioni nanometriche (1-100 nm) attraverso delle misurazioni delle intensità (I) dei raggi X diffusi da un campione in funzione dell'angolo di diffusione. Tale analisi è condotta ad angoli di incidenza ( $\theta$ ) molto bassi, tipicamente in un intervallo compreso tra  $0.1^\circ$  e  $5^\circ$ , utilizzando una geometria in trasmissione e un fascio monocromatico di raggi X con lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) compresa nell'intervallo 0.1-0.2 nm. In figura 6.9 è riportato lo schema di un sistema di analisi SAXS.

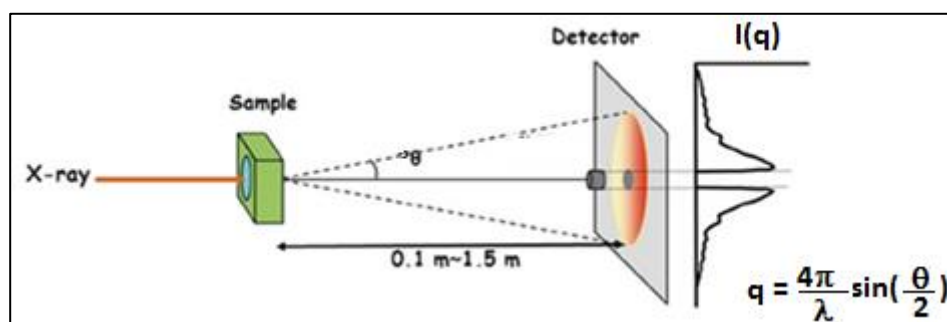


Figura 6.9 – Schema di un sistema di analisi SAXS. Fonte: [http://coms-nano.jp/coms-nano3/?page\\_id=622](http://coms-nano.jp/coms-nano3/?page_id=622).

Come si può vedere dalla figura l'intensità dei raggi X è espressa in funzione di un parametro,  $q$ , detto momento di trasferimento ed è descritto dalla seguente equazione (Pollanen et al., 2008):



$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (6.2)$$

Per alti valori di  $q$  si può ritenere valida la seguente relazione (Dieudonné et al., 1998):

$$I(q) = Kq^{-4} \quad (6.3)$$

dove:

$$K = \lim_{q \rightarrow \infty} q^4 I(q) \quad (6.4)$$

L'area specifica ( $S/V$ ) può essere calcolata mediante la relazione (Dieudonné et al., 1998):

$$\frac{K}{Q} = \frac{1}{\pi\varphi_s\varphi_p} \times \frac{S}{V} \quad (6.5)$$

dove:

- $\varphi_s$  è la frazione in volume del solido;
- $\varphi_p$  è la frazione in volume della porosità (aria);
- $Q$ , detto invariante di Porod è definito dalla seguente equazione:

$$Q = \int_0^{\infty} q^2 I(q) dq \quad (6.6)$$

## 6.4.2 Risultati

Le analisi SAXS sono state condotte con un diffrattometro X'Pert Pro, con sorgente Cu K $\alpha$ , configurato per misure SAXS. Il campione è stato alloggiato sul porta-campione per misure in trasmissione, ponendolo tra due fogli di Mylar. Per ogni campione è stata condotta una prima misura sul porta-campione vuoto, per valutare il fattore di assorbimento del campione, calcolabile dal rapporto tra le intensità del fascio diretto misurate in assenza e in presenza del campione stesso. Le misure sono state condotte secondo il seguente programma: scansione tra  $-0.115^\circ$  e  $5.005^\circ$  e step size di  $0.01^\circ$ . Il tempo totale di misura è stato di 42 minuti. Le ottiche utilizzate sono sul fascio primario, un Gutman X-ray mirror che converte il fascio divergente in un fascio parallelo di alta intensità e una slitta divergente di  $1/32^\circ$  per limitare la dimensione del fascio incidente. Sul fascio secondario è stata montata una prima slitta antiscatter per ridurre lo scattering dell'aria ed una seconda per allineare ulteriormente il fascio. Il detector allo stato solido è un PIXcel, composto da più di 65.000 PIXcel ciascuno di dimensioni pari a  $55 \times 55$  microns. Questo sistema permette un rapidissimo tempo di risposta e tempi di raccolta notevolmente ridotti. I dati ottenuti sono stati analizzati con il software EasySaxs 2.0 Panalytical.

Dalle analisi del campione IB400 eseguite il giorno successivo all'essiccamento supercritico, dopo 28 giorni e dopo 70 giorni dal giorno dell'essiccamento si osserva che il rapporto S/V non subisce grosse variazioni; i risultati ottenuti sono riportati nella tabella 6.8.

**Tabella 6.8** – Variazioni nel tempo del rapporto S/V ottenuto per mezzo di analisi SAXS del campione IB400.

Tempo trascorso dall'essiccamento	S/V
giorni	nm <sup>-1</sup>
1	1,71
28	1,47
70	1,40

Come si può vedere la diminuzione di S/V è marcata nel primo mese dove si ha un decremento pari al 14% mentre nel secondo mese si è avuta una riduzione molto inferiore (5%). Si può ipotizzare che l'accrescimento dei grani responsabile della riduzione del rapporto S/V, sia un fenomeno che coinvolge la frazione silicea e la frazione di alginato separatamente. La natura ibrida del materiale, però, fa sì che le due frazioni siano intersecate tra loro. Se inizialmente ciascuna delle due frazioni è soggetta all'accrescimento dei grani, in seguito, le intersezioni con l'altra frazione limitano questo fenomeno.

## 6.5 Conclusioni

I risultati dimostrano che il metodo di formazione delle microsfele ibride messo a punto in questa tesi (capitolo 3) permette di ottenere valori di area superficiale paragonabili a quelli degli aerogel di sola silice. Rispetto agli aerogel di solo alginato le microsfele ibride presentano valori maggiori di area superficiale e quindi possiedono una più elevata capacità di incorporazione del principio attivo. Rispetto agli aerogel di sola silice, invece, le microsfele ibride hanno acquisito proprietà bioadesive e questo significa che, essendo in grado di aderire alla mucosa gastrointestinale, permettono una migliore assimilazione del principio attivo migliorando ulteriormente la sua biodisponibilità.

Le condizioni di processo adottate in questo lavoro hanno permesso di ottenere microsfele con una curva di distribuzione granulometrica unimodale. In particolare, operando con una velocità di rotazione dell'elica marina nella fase di emulsione pari a 400 rpm, si possono ottenere delle microsfele con una buona distribuzione granulometrica e dimensioni ridotte ( $d_{50}$  pari a 269  $\mu\text{m}$ ). Occorre tener presente, però, che la scelta delle condizioni di agitazione dell'emulsione richiede particolare attenzione al fine di coniugare l'esigenza di ottenere microsfele di piccole dimensioni con una buona distribuzione granulometrica. Infatti, rispetto alle microsfele non ibride di solo alginato, la fluidodinamica dell'emulsione influenza in modo più complesso la morfologia del particolato in quanto agisce anche sulla velocità di gelificazione della componente silicea.

Infine, il monitoraggio dell'area superficiale per unità di massa ha dimostrato come le microsfele sembrino conservarsi bene nel tempo. Infatti esse sono soggette ad una riduzione dell'area superficiale solamente nel primo mese, in seguito questo fenomeno si riduce considerevolmente.

# **Capitolo 7**

## **Test di dissoluzione**

## **7.1 Introduzione**

In questo capitolo verrà illustrato il modo in cui il principio attivo incorporato nelle microsfere (sia ibride che rivestite), ottenute con i metodi descritti nei precedenti capitoli, viene rilasciato. Come si è già detto, l'obiettivo di questa attività di ricerca è stato realizzare dei nuovi aerogel da candidare come supporti per dispositivi farmaceutici a rilascio modificato. Nel capitolo 3 è stato illustrato come si è messa a punto una nuova procedura per la produzione di microsfere ibride silice/Ca-Alg che possono essere utilizzate per il rilascio rapido di farmaco. Nel capitolo 4, invece, sono state proposte varie alternative per produrre uno strato esterno sulle microsfere ibride tale da renderle idonee ad un rilascio prolungato in ambienti gastrici. Al fine di valutare la capacità di rilascio delle microsfere, in tutti i dispositivi è stato incorporato il ketoprofene.

## **7.2 Valutazione della quantità totale di ketoprofene caricato nelle microsfere**

Per poter stabilire la quantità di ketoprofene inizialmente incorporata nelle microsfere, è necessario dissolverle in un opportuno solvente che viene poi analizzato tramite analisi spettrofotometrica. Per tutte le tipologie di microsfere esaminate in questa tesi, rivestite e non rivestite, l'incorporazione di ketoprofene è avvenuta tenendo immersi i campioni in una soluzione di etanolo al 3,6% w/w per 3 ore in agitazione con ancorotta magnetica a 300 rpm come riportato nel paragrafo 3.4.

Poiché la frazione inorganica (silicata) delle microsfere è idrofila, è sufficiente immergerla in H<sub>2</sub>O per avere una sua dissoluzione. Per quanto riguarda la frazione organica (Ca-Alg), invece, è necessario immergere le microsfere in una soluzione acquosa di Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Del Gaudio et al., 2012). In questo modo si instaura una reazione di scambio ionico tra gli ioni Ca<sup>2+</sup> dell'alginato con gli ioni Na<sup>+</sup> del sale (Silva et al., 2006). In seguito a questa reazione il Ca-Alg si converte in Na-Alg con la conseguente dissoluzione delle microsfere.

Per la dissoluzione delle microsfere si è, dunque, proceduto in questo modo:

- preparazione di una soluzione acquosa di Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a pH = 12,00;
- agitazione di 50 mL della soluzione di Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> con agitatore magnetico a 500 rpm e aggiunta di 50 mg di microsfere;

- attesa di 1 ora e interruzione dell'agitazione.

La soluzione viene in seguito riscaldata a 37°C e analizzata allo spettrofotometro usando come bianco di riferimento la soluzione di Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a pH =12,00.

Per maggior chiarezza espositiva i dati delle quantità totali di ketoprofene caricato nelle microsfere verranno forniti insieme ai risultati dei test di rilascio nel paragrafo 7.5. Nella tabella 7.1 è riportata la nomenclatura, accompagnata da una breve descrizione, dei campioni sottoposti ai test di dissoluzione.

**Tabella 7.1** – Nomenclatura e descrizione dei campioni sottoposti ai test di dissoluzione.

Campione	Descrizione
IB	Microsfere ibride non rivestite, di composizione analoga al campione IB400 (capitolo 6)
HPMC1; HPMC2.5; HPMC5	microsfere ibride (IB) rivestite con un aerogel di Ca-Alg e HPMC (C <sub>HPMC</sub> nella soluzione di preparazione del gel rispettivamente pari al 1, 2,5 e 5% <sub>w/w</sub> )
HPMC2.5_a	microsfere ibride (IB) rivestite con aerogel di Ca-Alg e HPMC (C <sub>HPMC</sub> nella soluzione di preparazione del gel pari al 2,5% <sub>w/w</sub> e maggior quantità di CaCO <sub>3</sub> ) vedi paragrafo 7.5.2.2
HPMC2.5_b	microsfere ibride (IB) rivestite con un aerogel di Ca-Alg e HPMC (C <sub>HPMC</sub> nella soluzione di preparazione del gel pari al 2,5% <sub>w/w</sub> e maggior quantità di Na-Alg) vedi paragrafo 7.5.2.3
SiHPMC	microsfere ibride (IB) rivestite con un aerogel di silice e HPMC (C <sub>HPMC</sub> nella soluzione di preparazione del gel pari al 2,5% <sub>w/w</sub> )
SiID	microsfere ibride (IB) rivestite con un aerogel di silice idrofobo

## **7.3 Test di rilascio in vitro**

In questo paragrafo verranno esposti gli esiti dei test di dissoluzione effettuati sulle microsfere ibride non rivestite e sulle microsfere ibride rivestite seguendo le diverse tecniche messe a punto nel capitolo 4.

In questi test, eseguiti in un mezzo di dissoluzione acido con un valore di pH pari a 1,20, le microsfere non si dissolvono ma rimangono sospese. Per quanto riguarda la frazione alginato delle microsfere accade che, a valori di pH acidi, gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  vengono ceduti in soluzione formando l'acido alginico (insolubile in acqua) e distruggendo così la struttura reticolare; tuttavia, le interazioni intermolecolari tra le catene dell'acido alginico ne impediscono la loro dispersione in acqua e queste mantengono così la forma di microsfere (paragrafo 1.5.2, Silva et al., 2006). La frazione silicea invece, essendo idrofila, dovrebbe essere erosa e disperdersi; anche in questo caso, si instaurano delle interazioni intermolecolari tra i gruppi ossidrilici della frazione silicea e quelli delle catene di alginato che impediscono la dispersione dei residui della frazione di silice (paragrafo 1.5.3, Coradin et al., 2003; Chernev et al., 2005; Chen e Lin, 2007).

### **7.3.1 Le prove di dissoluzione secondo lo standard USP**

Le prove di dissoluzione, dette anche test di rilascio in vitro, sono largamente impiegate in ambito farmaceutico per studiare l'evoluzione di un prodotto, fornire un criterio di scelta per nuovi dispositivi farmaceutici, ottenere informazioni sull'utilità di eventuali eccipienti o rivestimenti e ricavare dati confrontabili tra diversi dispositivi.

In questo lavoro di tesi le prove di dissoluzione fanno riferimento allo standard USP (United States Pharmacopeia) (Khoo et al., 2000; Vueba et al., 2004; Ribeiro et al., 2005; Del Gaudio et al., 2012). Secondo questo standard, un apparato idoneo per questi test deve comprendere:

- un recipiente con fondo emisferico coperto, in vetro o altro materiale inerte trasparente;
- una girante a lame oppure a cestello in acciaio inossidabile 316 o altro materiale inerte.

Il recipiente in vetro (le cui dimensioni sono riportate nella tabella 7.2) deve stare immerso in un bagno termostatico ad una temperatura pari a  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Il

motore che movimentata la girante deve essere posizionato in modo che l'asse centrale della girante non sia spostato dall'asse centrale del vessel per più di 2 mm.

**Tabella 7.2** – Dimensioni standard USP per il recipiente da usare per i test di dissoluzione.

Capacità	altezza	diametro
	mm	mm
1 L	160 - 210	98 - 106
2 L	280 - 300	98 - 106
4 L	280 - 300	145 - 155

La distanza tra la fine della girante e la superficie interna del fondo del recipiente deve essere pari a  $25 \pm 2$  mm. A seconda del tipo di girante scelta il sistema può essere distinto in:

- USP apparatus 1 (girante a cestello);
- USP apparatus 2 (girante a lame).

In figura 7.1 sono riportate le dimensioni della girante a lame imposte dallo standard USP.

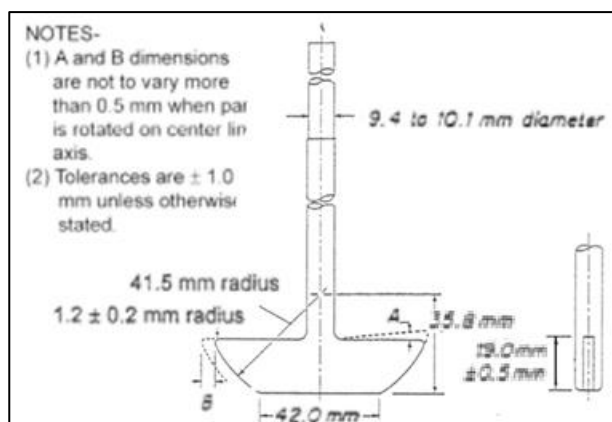


Figura 7.1 – Dimensione della girante a lame utilizzata per i test di dissoluzione imposte dagli standard USP. Fonte: The United States Pharmacopeial Convention ©, 2011.



Secondo gli standard USP, come solvente di dissoluzione acido, si deve usare una soluzione acquosa di HCl che abbia il pH tipico dei fluidi gastrici. Nella tabella 7.3 sono riportate le condizioni operative stabilite dallo standard USP per i test di dissoluzione in ambienti gastrici.

**Tabella 7.3** – Condizioni operative dei test di rilascio condotti con un mezzo di dissoluzione acido nel rispetto degli standard USP.

parametro	valore
pH	1,20 ± 0,05
T	37 ± 0,5°C
agitazione	50 - 100 rpm

### 7.3.2 Descrizione sistema di rilascio

Il sistema utilizzato in laboratorio consiste in un recipiente agitato posto in linea con uno spettrofotometro in modo da rilevare in tempo reale la quantità di ketoprofene rilasciato ed è composto dalle seguenti unità:

- USP ERWEKA DT (fig. 7.2) composto da un recipiente da 1 L in vetro, coperto ed immerso in un bagno di acqua riscaldata da un termostato;
- pompa peristaltica;
- spettrofotometro PERKIN-ELMER LAMBDA 25 UV-Vis in grado di lavorare con lunghezze d'onda di 190 – 1100 nm, accuratezza: ±0,003 (visibile), ±0,015 (UV);
- sistema peltier PTP-1+1 PERKIN ELMER.



Figura 7.2 – Apparato utilizzato per le prove di rilascio.

Durante le prove si deciso di utilizzare la girante a lame dal momento che le microsfere hanno dimensioni troppo piccole per poter essere contenute nel cestello. La temperatura viene misurata con un termometro posto all'interno del recipiente. La soluzione viene mandata allo spettrofotometro tramite una pompa peristaltica impostata a 30 rpm. La cuvette utilizzata per l'analisi con lo spettrofotometro è di vetro al quarzo con cammino ottico di 10 mm. In figura 7.3 è riportato lo schema del sistema utilizzato per i test di dissoluzione.

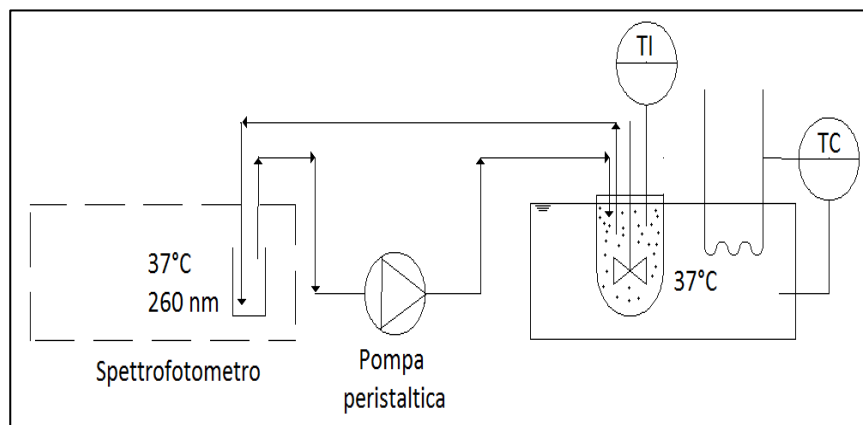


Figura 7.3 – Rappresentazione schematica del sistema utilizzato per i test di dissoluzione.

## 7.4 Retta di taratura per le misure spettrofotometriche

I risultati esposti in questo capitolo richiedono misure spettrofotometriche per valutare la concentrazione del ketoprofene in soluzioni acquose. Per poter ricavare le quantità di ketoprofene dalle curve di assorbanza molecolare occorre costruire una retta di taratura. Come già anticipato nei paragrafi 7.2 e 7.3, le soluzioni acquose da esaminare contengono HCl o  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ . In laboratorio è stato verificato che la presenza di HCl o di  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  non ha influenza sul picco di assorbanza molecolare del farmaco, pertanto si è deciso di costruire una sola retta di taratura usando come solvente acqua deionizzata. In figura 7.4 è riportato l'esempio di una curva di assorbanza del ketoprofene nella soluzione acida di rilascio, come si può vedere, il valore della lunghezza d'onda del picco è pari a 260 nm.

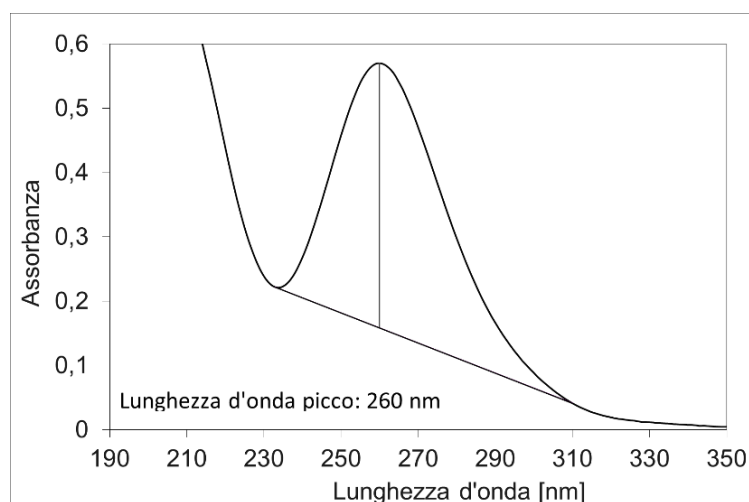


Figura 7.4 – Curva di assorbanza molecolare ottenuta da una soluzione acquosa di ketoprofene.

La retta di taratura (fig. 7.5) è stata ottenuta da diverse diluizioni di una soluzione acquosa di ketoprofene di concentrazione pari a 50 ppm. Nella tabella 7.4 sono riportate la concentrazione di ketoprofene dei campioni di soluzione diluita e l'altezza del corrispondente picco di assorbanza molecolare (A) dalla linea di base. Le misure, per ogni campione, sono state effettuate in triplo.

**Tabella 7.4** – Concentrazione delle soluzioni di ketoprofene utilizzate per la retta di taratura e il corrispettivo valore di assorbanza molecolare.

Campione	C ket [ppm]		A	
	valore	EA	media	SD
1	4,50	± 0,02	0,2187	0,0003
2	8,90	± 0,04	0,4118	0,0002
3	14,92	± 0,06	0,7016	0,0005
4	19,27	± 0,08	0,9091	0,0005
5	22,17	± 0,09	1,0555	0,0005

Da questi valori è stata ricavata una retta con coefficiente di correlazione lineare  $R^2 = 0,99996$  di equazione:

$$A = 0,047 \times C \quad (7.1)$$

dove:

- A è l'altezza del picco di assorbanza molecolare;
- C è la concentrazione di ketoprofene in ppm.

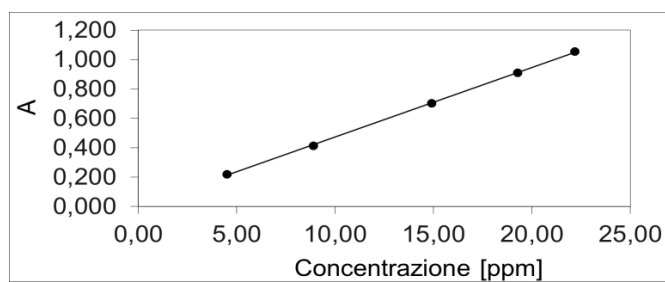


Figura 7.5 - Retta di taratura del ketoprofene.

## 7.5 Risultati

In questa sezione verranno esposti e commentati i profili di rilascio ottenuti dai test di rilascio in vitro e effettuati su tutti i tipi di microsfere prodotte in questa attività di ricerca, rivestite e non rivestite.

### 7.5.1 Microsfere ibride non rivestite

Il primo test è stato effettuato sul campione IB. Nella tabella 7.5 è riportata la composizione della fase acquosa utilizzata per la formazione di queste microsfere.

**Tabella 7.5** – Composizione della fase acquosa utilizzata per la formazione delle microsfere ibride (IB).

Variabile	Valore
	% <sub>w/w</sub>
C <sub>Na-Alg</sub>	1,4
Na-Alg/TMOS	6,3
Ca <sup>2+</sup> /Na-Alg	14,3

Nella tabella 7.6 sono riportati valori di quantità di ketoprofene incorporata, efficienza di rilascio, i tempi  $t_{10}$ ,  $t_{50}$  e  $t_{90}$ , che rappresentano il tempo necessario per un rilascio di ketoprofene rispettivamente pari al 10, 50, 90% di quello disperso nelle microsfere, e il tempo  $t_{RIL}$ , che corrisponde al tempo necessario per ottenere la massima quantità di ketoprofene rilasciabile dalle microsfere. In figura 7.6 è raffigurato il profilo di rilascio del campione IB confrontato con quello del ketoprofene allo stato cristallino.

**Tabella 7.6** – Valori quantità di ketoprofene incorporata, di efficienza di rilascio, e tempi  $t_{RIL}$ ,  $t_{10}$ ,  $t_{50}$  e  $t_{90}$  ottenuti dal campione IB in confronto con il ketoprofene allo stato cristallino.

	Campione	
	IB	Ketoprofene
Ketoprofene incorporato [mg/g <sub>AEROGEL</sub> ]	24	-
Efficienza di rilascio	95%	100%
$t_{RIL}$ [min]	10	210
$t_{10}$ [min]	0	1,5
$t_{50}$ [min]	0,5	47
$t_{90}$ [min]	3	140

Come si può vedere, il 90% del ketoprofene contenuto in IB viene rilasciato nei primi tre minuti del test con una efficienza complessiva pari al 95% del farmaco incorporato. Alla luce di questo risultato si può concludere che le microsferi ibride possono essere considerate delle ottime candidate come supporti per le formulazioni farmaceutiche a rilascio rapido adatte, in particolare, ai principi attivi scarsamente solubili in acqua come il ketoprofene.

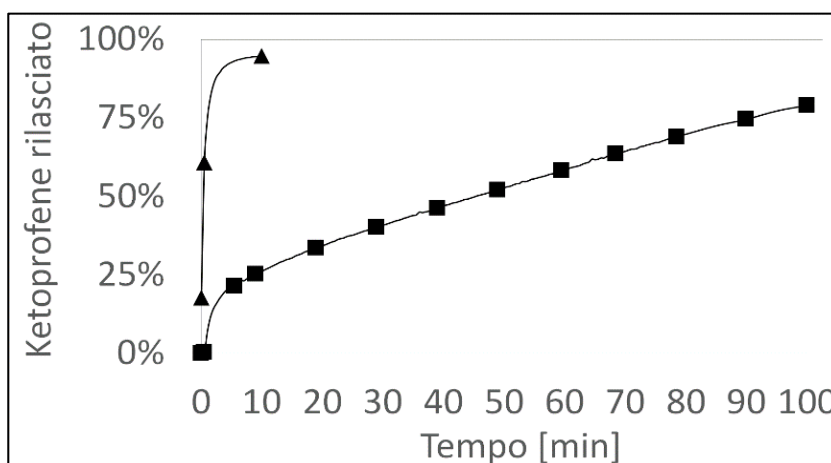


Figura 7.6 – Profili di rilascio del campione IB (▲) e del ketoprofene allo stato cristallino (■).

## 7.5.2 Microsfere con rivestimento Ca-Alg/HPMC

Questa sezione è dedicata alle proprietà di rilascio delle microsfere ibride rivestite da uno strato di aerogel di Ca-Alg rinforzato con HPMC.

### 7.5.2.1 Effetto del contenuto di HPMC

I campioni su cui sono stati effettuati i test di dissoluzione sono HPMC1, HPMC2.5 e HPMC5. Nella tabella 7.7 è riportata la composizione della fase acquosa usata per produrre il rivestimento di queste microsfere.

**Tabella 7.7** – Composizione della fase acquosa usata per produrre il rivestimento dei campioni HPMC1, HPMC2.5 e HPMC5.

Campione	variabile		
	$C_{\text{Na-Alg}}$	$C_{\text{HPMC}}$	$\text{Ca}^{2+}/\text{Na-Alg}$
	% w/w	% w/w	% w/w
HPMC1	1,4	1,0	14,3
HPMC2.5	1,4	2,5	14,3
HPMC5	1,4	5,0	14,3

Nella tabella 7.8 sono riportati i valori della quantità di ketoprofene incorporato, le efficienze di rilascio e i tempi caratteristici di questi campioni in confronto con le microsfere non rivestite (IB). Dal momento che l'efficienza di rilascio del campione HPMC2.5 è pari all'86%, il tempo  $t_{90}$  è stato sostituito con il tempo  $t_{80}$ , che corrisponde al tempo in cui viene rilasciato l'80% del farmaco incorporato. In figura 7.7 sono riportati i profili di rilascio delle microsfere rivestite contenenti HPMC in confronto con le microsfere ibride non rivestite.

**Tabella 7.8** – Valori quantità di ketoprofene incorporato, efficienza di rilascio e tempi  $t_{RIL}$ ,  $t_{10}$ ,  $t_{50}$  e  $t_{80}$  dei campioni HPMC1, HPMC2.5 e HPMC5 in confronto con le microsfere non rivestite (IB).

	Campione			
	IB	HPMC1	HPMC2.5	HPMC5
Ketoprofene incorporato [mg/g <sub>AEROGEL</sub> ]	24	47	104	100
Efficienza di rilascio	95%	92%	86%	93%
$t_{RIL}$ [min]	10	10	30	10
$t_{10}$ [min]	0	< 0,5	< 0,5	0
$t_{50}$ [min]	0,5	0,5	2,0	< 0,5
$t_{80}$ [min]	1,5	1,5	15	0,5

Un primo aspetto interessante riguarda la quantità complessiva di ketoprofene incorporato, Come si può vedere dai dati riportati in tabella 7.8, i campioni che contengono HPMC possiedono una capacità di carico di principio attivo maggiore del nucleo non rivestito. In particolare, questa aumenta con l'aumentare del contenuto di HPMC nella soluzione acquosa del rivestimento fino a raggiungere un valore asintotico di circa 100 mg/g<sub>AEROGEL</sub> per concentrazioni di HPMC superiori al 2,5%. Per spiegare questo fenomeno occorre tener presente che l'HPMC in forma gelificata rigonfia formando una struttura altamente porosa in grado di caricare elevate quantità di principio attivo. Si può dunque affermare che la presenza dell'HPMC ha un effetto positivo sull'incremento della quantità di principio attivo incorporata.



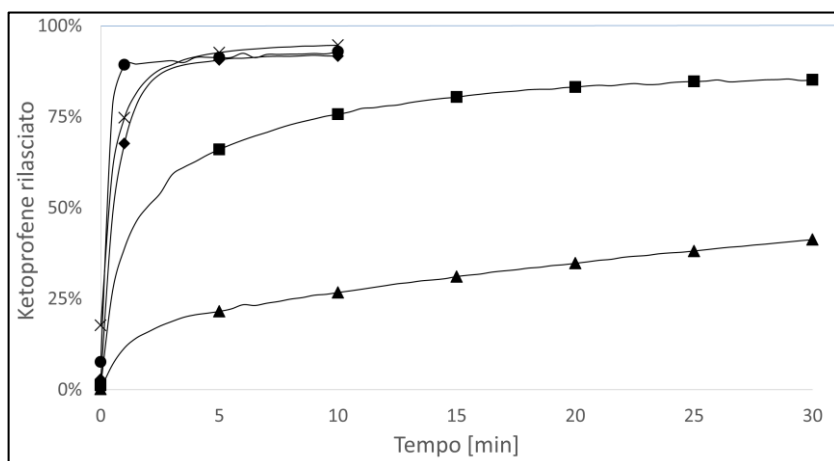


Figura 7.7 – Confronto profili di rilascio dei campioni IB (X); HPMC1 (◆); HPMC2.5 (■); HPMC5 (●); ketoprofene cristallino (▲).

Per quanto riguarda i profili di rilascio, quello del campione HPMC1 è praticamente identico a quello del campione IB, l'unica differenza che si può notare è nei primi secondi del test, dove il tempo  $t_{10}$  è leggermente superiore a zero, in figura 7.8, nella quale è riportato il tratto iniziale del profilo di rilascio dei campioni IB e HPMC1, si può vedere come IB liberi all'incirca il 20% del ketoprofene quasi istantaneamente all'inizio del test mentre, nel caso del campione HPMC1, il rilascio all'inizio del test è quasi nullo. Questo segnale, insieme ad un leggero abbassamento dell'efficienza di rilascio, può dimostrare che l'HPMC ha un potenziale effetto sulla velocità di rilascio di principio attivo ma è necessario aumentarne la quantità.

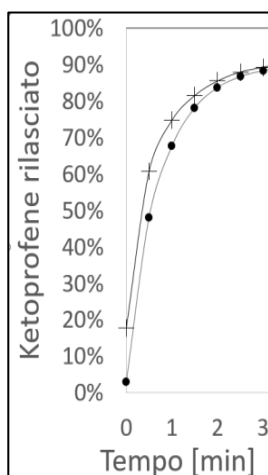


Figura 7.8 – Confronto del profilo di rilascio nel tratto iniziale tra il nucleo (+) e il campione HPMC1 (●).

Nel caso del campione HPMC2.5, in effetti, l'effetto dell'HPMC (che questa volta si trova in maggiori quantità) è molto più marcato rispetto al caso precedente ed il tempo di rilascio completo di principio attivo aumenta di un ordine di grandezza passando da ~3 a 30 minuti. L'efficienza di rilascio questa volta si è abbassata passando dal 95% all'86%. Nonostante il decremento di nove punti percentuali rimane sempre un buon valore di efficienza di rilascio.

Aumentando ulteriormente la quantità di HPMC nel rivestimento (campione HPMC5), si ha un profilo di rilascio rapido analogo a quello del campione IB, anche il valore di efficienza di rilascio (93%) è molto prossimo a quello del nucleo (95%). Questo può essere spiegato dal fatto che, incrementando ulteriormente la quantità di HPMC, il reticolo di Ca-Alg non è più in grado di trattenere l'eccipiente quando viene a contatto con il solvente di dissoluzione; di conseguenza il rivestimento si disgrega e si ottiene un profilo di rilascio analogo a quello delle microsfele non rivestite.

Nella tabella 7.9 sono riportati i rapporti tra HPMC e Na-Alg dei campioni sottoposti a test di dissoluzione. Si può concludere che esiste un rapporto massico ottimale fra l'HPMC e il Na-Alg. Il rallentamento del rilascio del principio attivo è stato ottenuto con un rapporto HPMC/Na-Alg pari a 1,6; mentre a valori inferiori il contenuto di HPMC è troppo basso da indurre un effetto significativo sul rallentamento del rilascio, a valori superiori il contenuto di Na-Alg è troppo basso e non impedisce la disgregazione del rivestimento.

**Tabella 7.9** – Rapporto HPMC/Na-Alg nella fase acquosa usata per la preparazione del rivestimento delle microsfele ibride.

Campione	$\frac{HPMC}{Na - Alg}$
HPMC1	0,7
HPMC2.5	1,6
HPMC5	3,5

#### 7.5.2.2 Effetto del rapporto CaCO<sub>3</sub>/Na-Alg

Avendo stabilito che producendo un rivestimento con un rapporto HPMC/Na-Alg pari a 1,6 si ha avuto un rallentamento del rilascio del ketoprofene mentre un suo aumento non ha avuto nessun effetto sulla velocità del rilascio, si è provato a modificare le caratteristiche del reticolo di alginato.

La prima opzione è stata quella di aumentare il rapporto CaCO<sub>3</sub>/Na-Alg al fine di incrementare il grado di reticolazione dell'alginato. Pertanto lo scopo di questa prova è stato quello di osservare se una fortificazione del reticolo di Ca-Alg portasse ad una variazione del profilo di rilascio delle microsfele mantenendo un rapporto HPMC/Na-Alg pari a 1,6.

Nella tabella 7.10 è riportata la composizione della fase acquosa usate per la formazione di questo rivestimento.

**Tabella 7.10** - Composizione della fase acquosa utilizzata per la formazione del rivestimento del campione HPMC2.5\_a.

Variabile	Valore % w/w
C <sub>Na-Alg</sub>	1,4
C <sub>HPMC</sub>	2,5
Ca <sup>2+</sup> /Na-Alg	43,2

Nella tabella 7.11 è riportata la quantità di ketoprofene incorporato, l'efficienza di rilascio e i tempi  $t_{10}$ ,  $t_{50}$ ,  $t_{80}$  e  $t_{RIL}$  dei campioni IB, HPMC2.5 e HPMC2.5\_a, in figura 7.9 sono riportati i loro profili di rilascio.

**Tabella 7.11** – Valori quantità di ketoprofene incorporata e di efficienza di rilascio, e tempi  $t_{RIL}$ ,  $t_{10}$ ,  $t_{50}$  e  $t_{80}$  dei campioni IB, HPMC2.5 e HPMC2.5\_a.

	Campione		
	IB	HPMC2.5	HPMC2.5_a
Ketoprofene incorporato [mg/g <sub>AEROGEL</sub> ]	24	104	62
Efficienza di rilascio	95%	86%	92%
$t_{RIL}$ [min]	10	30	10
$t_{10}$ [min]	0	< 0,5	< 0,5
$t_{50}$ [min]	0,5	2,0	0,8
$t_{80}$ [min]	1,5	15	1

Un primo effetto dell'aumento del grado di reticolazione dell'alginato consiste nel notevole abbassamento del carico di ketoprofene che scende a 62 mg/g<sub>Aerogel</sub>. Quando il rapporto CaCO<sub>3</sub>/Na-Alg sale dal 14,3 al 43,2% inducendo un maggior grado di reticolazione della componente Ca-Alg il rigonfiamento dell'HPMC risulta più contenuto e, di conseguenza, anche la capacità di carico. Questa interpretazione dei risultati è suffragata dal fatto che, secondo la procedura sperimentale la reticolazione del Na-Alg avviene prima della gelificazione a caldo dell'HPMC (vedere paragrafo 4.3.3).

Dalla curva di rilascio raffigurata in figura 7.9 e dai tempi caratteristici di rilascio riportati in tabella 7.11 si può vedere come l'aumento della reticolazione dell'alginato non dia risultati positivi ai fini del rilascio prolungato. Le microsfere così rivestite tornano, infatti, ad avere un comportamento analogo a quelle non rivestite (IB). Probabilmente, come per la diminuzione della quantità di ketoprofene incorporato, anche per il profilo di rilascio la maggiore reticolazione dell'alginato impedisce all'HPMC di rigonfiarsi e di conseguenza il rilascio del farmaco non viene rallentato.

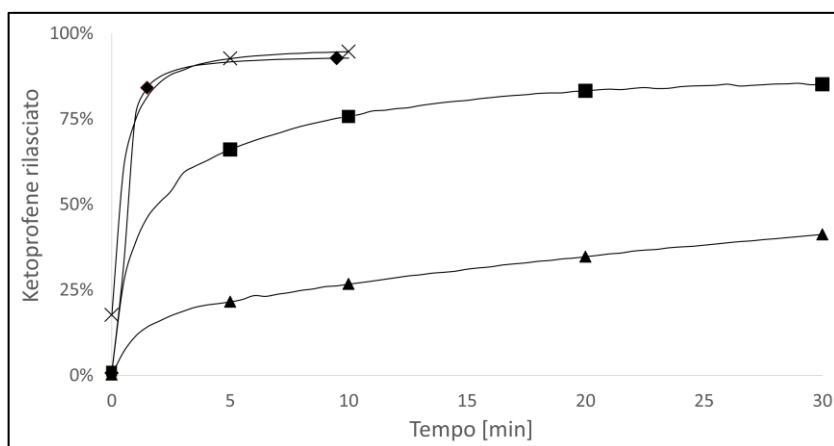


Figura 7.9 – Profili di rilascio dei campioni IB (X); HPMC2.5 (■); HPMC2.5\_a (◆); ketoprofene cristallino (▲).

### 7.5.2.3 Influenza della concentrazione di alginato

Come ultima opzione si è provato a variare il rapporto HPMC/Na-Alg nel rivestimento aumentando il contenuto di Na-Alg invece di diminuire la quantità di HPMC. Si è pensato, infatti, che se la capacità di rallentamento del rilascio fosse legata al quantitativo “assoluto” di HPMC, sarebbe importante non variarne la concentrazione nella soluzione di preparazione del rivestimento. Si è pensato così di aumentare la concentrazione di Na-Alg cercando di produrre un gel con un reticolo più compatto che dovrebbe favorire il prolungamento del rilascio evitando la prematura disgregazione. In questa prova il rapporto HPMC/Na-Alg è pari a 0,8. Nella tabella 7.12 è riportata la composizione della fase acquosa impiegata per la formazione del rivestimento.

**Tabella 7.12** - Composizione della fase acquosa utilizzata per la formazione del rivestimento del campione HPMC2.5\_b.

Variabile	Valore
	% w/w
$C_{Na-Alg}$	3,0
$C_{HPMC}$	2,5
$Ca^{2+}/Na-Alg$	14,3

Nella tabella 7.13 è riportata la quantità di ketoprofene incorporato, l'efficienza di rilascio e i tempi  $t_{RIL}$ ,  $t_{10}$ ,  $t_{50}$  e  $t_{80}$  dei campioni IB, HPMC1, HPMC2.5 e HPMC2.5\_b, in figura 7.10 sono raffigurati i loro profili di rilascio.

**Tabella 7.13** – Valori quantità di ketoprofene incorporata e di efficienza di rilascio, e tempi  $t_{10}$ ,  $t_{50}$ ,  $t_{80}$  e  $t_{RIL}$  dei campioni IB, HPMC1, HPMC2.5 e HPMC2.5\_b.

	Campione			
	IB	HPMC1	HPMC2.5	HPMC2.5_b
HPMC/Na-Alg	-	0,7	1,6	0,8
Ketoprofene incorporato [mg/g <sub>AEROGEL</sub> ]	24	47	104	44
Efficienza di rilascio	95%	92%	86%	94%
$t_{RIL}$ [min]	10	10	30	10
$t_{10}$ [min]	0	< 0,5	< 0,5	0
$t_{50}$ [min]	0,5	0,5	2,0	0
$t_{80}$ [min]	1,5	1,5	15	< 0,5

Nel caso di una maggiore quantità di alginato la quantità di ketoprofene incorporato nelle microsfere è pari a 44mg/g<sub>Aerogel</sub>. Tale valore è di gran lunga inferiore ai 104 mg/g<sub>Aerogel</sub> del campione HPMC2.5 ma è confrontabile a quello del campione HPMC1 (47 mg/g<sub>Aerogel</sub>). Evidentemente, la capacità di carico è funzione del rapporto HPMC/Na-Alg che è, rispettivamente pari a 0,8 per il campione HPMC2.5\_b e pari a 0,7 per il campione HPMC1.

Come si può vedere dai dati in tabella 7.13 e dalla figura 7.10, in cui è riportato il profilo di rilascio di queste microsfere, il rilascio è del tutto analogo alle microsfere non rivestite con una efficienza di rilascio pari al 94%.

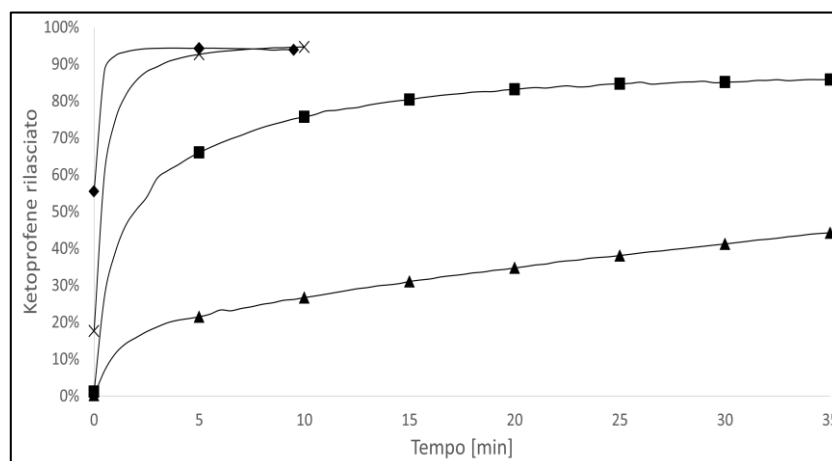


Figura 7.10 – Profili di rilascio dei campioni IB (X); HPMC2.5 (■); HPMC2.5\_b (◆); ketopropene cristallino.

Da questi risultati si può dedurre che per formare un rivestimento di Ca-Alg/HPMC che favorisca sia la capacità di carico di principio attivo sia un certo rallentamento del suo rilascio è necessario mantenere una concentrazione di Na-Alg nella soluzione acquosa dell'1,4%<sub>w/w</sub> e un rapporto  $Ca^{2+}/Na-Alg$  pari al 14,3%; tali condizioni corrispondono ad un rapporto HPMC/Na-Alg pari a circa 1,6.

### 7.5.3 Microsfere con rivestimento silice/HPMC

In questo paragrafo si vuole osservare l'effetto dell'aggiunta di HPMC ad un rivestimento esterno a base di silice. Ai fini del rilascio del ketopropene è stato necessario formare un reticolo siliceo parzialmente idrofilo altrimenti, se si fosse prodotto un reticolo totalmente idrofilo, questo sarebbe stato eroso non appena a contatto con l'acqua, facendo disperdere l'HPMC (paragrafo 4.4.2). Nella tabella 7.14 è riportata la composizione della soluzione acquosa inorganica usata per la formazione del rivestimento.

**Tabella 7.14** – Composizione della soluzione acquosa inorganica usata per la formazione del rivestimento del campione SiHPMC.

Variabile	Valore
	% w/w
C <sub>TMOS</sub>	16,0
C <sub>MTMS</sub>	8,0
C <sub>HPMC</sub>	2,5
Ac acetico/TMOS	5,5
Ac acetico/NH <sub>4</sub> OH	3,0

Nella tabella 7.15 sono riportati i valori della quantità di ketoprofene incorporato, le efficienze di rilascio e i tempi  $t_{10}$ ,  $t_{25}$ ,  $t_{50}$  e  $t_{RIL}$  del campione SiHPMC in confronto con le microsfere non rivestite (IB) e i migliori risultati ottenuti con il rivestimento HPMC/Na-Alg (HPMC2.5) descritto nel paragrafo precedente. In figura 7.10 è riportato il profilo di rilascio del campione SiHPMC in confronto con quello delle microsfere non rivestite (IB).

**Tabella 7.15** – Valori quantità di ketoprofene incorporata e di efficienza di rilascio, e tempi  $t_{10}$ ,  $t_{25}$ ,  $t_{50}$  e  $t_{RIL}$  del campione SiHPMC e del campione IB.

	Campione		
	IB	HPMC2.5	SiHPMC
Ketoprofene incorporato [mg/g <sub>AEROGEL</sub> ]	24	104	76
Efficienza di rilascio	95%	86%	51%
$t_{RIL}$ [min]	10	30	25
$t_{10}$ [min]	0	< 0,5	0,5
$t_{25}$ [min]	< 0,5	0,5	0,7
$t_{50}$ [min]	0,5	2	20



Come si può vedere la quantità di ketoprofene incorporata nel campione SiHPMC è notevolmente superiore a quella delle microsfere non rivestite (IB) ma è minore rispetto al campione HPMC2.5. L'efficienza di rilascio è scesa notevolmente mentre il tempo del rilascio è di 25 minuti. Nel campione HPMC2.5 il rilascio completo del principio attivo è durato circa 30 minuti.

Una spiegazione a questi risultati può essere il fatto che il reticolo di silice non permette all'HPMC di rigonfiare come nel campione HPMC2.5 e, di conseguenza, non permette di ottenere capacità di carico più elevate. Pur avendo un effetto di rallentamento del rilascio del principio attivo confrontabile al campione HPMC2,5, l'efficienza di rilascio si riduce significativamente, non permettendo di liberare all'incirca la metà del principio attivo disperso.

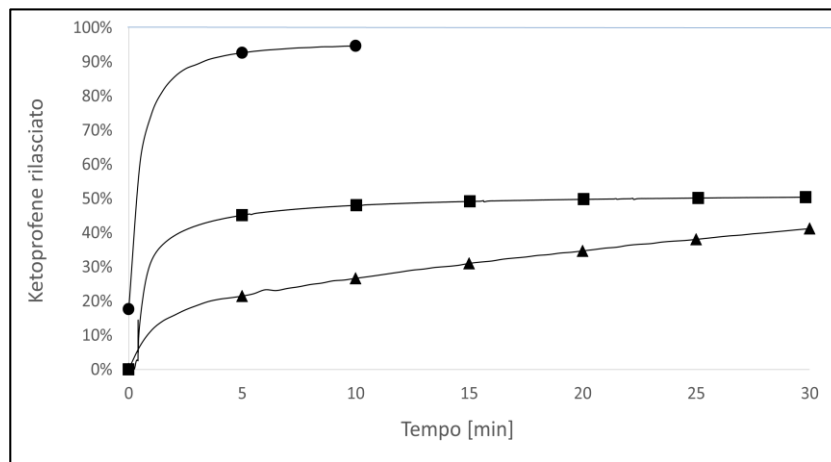


Figura 7.11 - Curve di rilascio delle microsfere con rivestimento silicato contenente HPMC: (●) IB; (■) SiHPMC; ketoprofene cristallino (▲).

#### 7.5.4 Microsfere con rivestimento di silice idrofobo

I campioni SiID presentano un rivestimento formato a partire dal MTMS e quindi idrofobo (paragrafo 4.5). La composizione della miscela usata per la formazione del rivestimento è riportata nella tabella 7.16. In questo caso il rilascio del ketoprofene è regolato dalla diffusione attraverso lo strato idrofobo, la curva del profilo di rilascio ottenuta sperimentalmente è riportata in figura 7.12.

**Tabella 7.16** – Composizione della fase acquosa usate per produrre lo strato esterno di silice idrofobo delle microsfere.

Campione	Variabile	Valore
		% w/w
SiID	C <sub>MTMS</sub>	48,5
	C <sub>H<sub>2</sub>O</sub>	51,5

Nella tabella 7.17 sono riportati i valori della quantità di ketoprofene incorporato, le efficienze di rilascio e i tempi  $t_{RIL}$ ,  $t_{10}$ ,  $t_{25}$  e  $t_{50}$  del campione SiID in confronto con le microsfere non rivestite (IB).

**Tabella 7.17** – Valori quantità di ketoprofene incorporata e di efficienza di rilascio, e tempi  $t_{10}$ ,  $t_{25}$ ,  $t_{50}$  e  $t_{RIL}$  del campione SiID e del campione IB.

	Campione	
	IB	SiID
Ketoprofene incorporato [mg/g <sub>AEROGEL</sub> ]	24	45
Efficienza di rilascio	95%	64%
$t_{RIL}$ [min]	10	60
$t_{10}$ [min]	0	0,7
$t_{25}$ [min]	< 0,5	1
$t_{50}$ [min]	0,5	8,5

Come si può vedere dalla tabella 7.16, la quantità di ketoprofene incorporata è superiore a quella delle microsfere ibride (IB) però il valore dell'efficienza di rilascio (64%) è inferiore. Quest'ultimo valore, però, è in linea con quello degli aerogel di silice idrofobi, la cui efficienza di rilascio si aggira intorno al 60% (Smirnova et al., 2004). Il tempo necessario per ottenere il massimo rilascio di farmaco, in questo caso, è pari a circa un'ora. Da questo si può affermare che l'utilizzo di un rivestimento silicato idrofobo, è una strategia efficace ai fini del rilascio prolungato. Infatti, considerando sia la quantità di ketoprofene incorporato

sia l'efficienza di rilascio le microsfere con rivestimento SiID consentono di ottenere dopo un'ora nella soluzione di rilascio un quantitativo di farmaco confrontabile a quello rilasciato in 3 min dalle microsfere non rivestite (IB).

La figura 7.12, infine, pone a confronto il rilascio delle microsfere con rivestimento SiID con quello del farmaco cristallino non supportato. La figura mostra come con le microsfere SiID sia possibile ottenere un profilo di rilascio combinato bimodale (vedere paragrafo 1.2.4). In questo modo si ottiene un rilascio rapido nei primi minuti accelerando l'insorgenza degli effetti terapeutici per poi passare ad un rilascio graduale mantenendo la concentrazione plasmatica di principio attivo all'interno degli indici terapeutici.

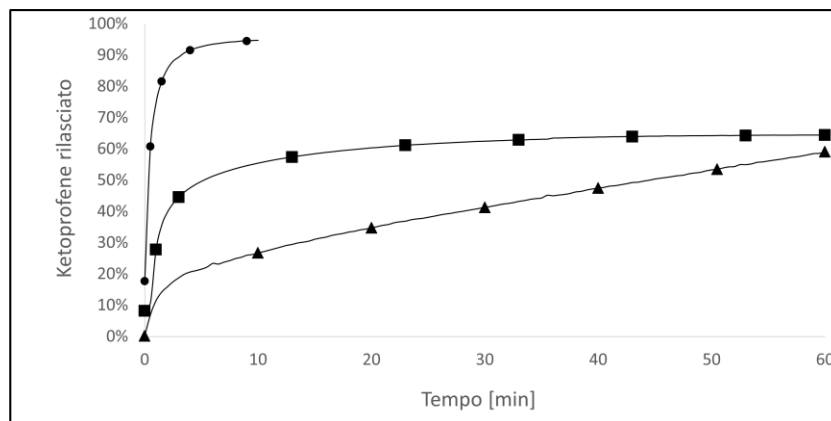


Figura 7.12 – Curva di rilascio ottenuta dalle microsfere con rivestimento idrofobo: (●) IB; (■) SiID; ketopropene cristallino (▲).

## 7.6 Considerazioni finali

Nella tabella 7.18 sono riportati i valori del ketoprofene incorporato, dell'efficienza di rilascio e il tempo  $t_{RIL}$  dei campioni IB, HPMC2.5, SiHPMC e SiID; in figura 7.13 si può vedere il confronto delle curve di rilascio ottenute dai rivestimenti che hanno provocato un rallentamento del rilascio del ketoprofene.

**Tabella 7.18** – Valori quantità di ketoprofene incorporata, efficienza di rilascio e  $t_{RIL}$  dei campioni IB, HPMC2.5, SiHPMC e SiID.

Campione	Ketoprofene incorporato [mg/g <sub>AEROGEL</sub> ]	Efficienza di rilascio	$t_{RIL}$ [min]
IB	24	95%	10
HPMC2.5	104	86%	30
SiHPMC	76	51%	25
SiID	45	64%	60

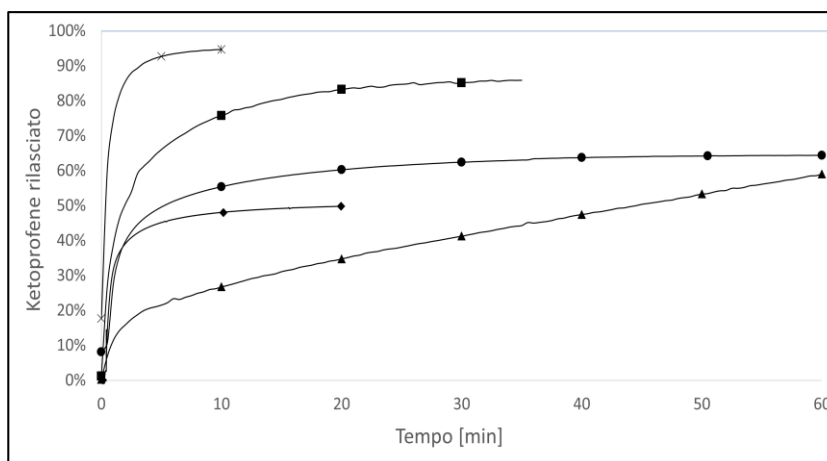


Fig. 7.13 – Confronto curve di rilascio microsfere ibride rivestite e non rivestite. (×) IB; (■) HPMC2.5; (●) SiID; (◆) SiHPMC; ketoprofene cristallino (▲).

Le microsfere non rivestite (IB) possiedono un'alta efficienza di rilascio (95%) e rilasciano il 90% del ketoprofene incorporato in 3 minuti per cui sono ottime candidate per le formulazioni a rilascio rapido.

Il campione HPMC2.5 mostra come la presenza di HPMC in un reticolo di Ca-Alg riesca a rallentare la velocità di cessione del principio attivo fino a circa 30 min; l'efficienza di rilascio, anche se minore rispetto alle microsfere non rivestite, ha comunque un buon valore (86%). Come si è visto nel paragrafo 7.5.2 tale rallentamento si ottiene soltanto in corrispondenza di un valore ottimale del rapporto HPMC/Na-Alg. Inoltre è stato osservato che la presenza dell'HPMC nei reticoli di Ca-Alg è in grado di aumentare considerevolmente la quantità di carico di principio attivo. Questo è un risultato interessante in quanto anche se queste microsfere non sempre riescono a garantire un significativo rallentamento del rilascio del farmaco potrebbero, però, essere utilizzate nelle formulazioni a rilascio rapido con maggior contenuto di principio attivo (la quantità di ketoprofene incorporata è più del quadruplo di quella contenuta nelle microsfere non rivestite).

Per quanto riguarda i rivestimenti di silice, ai fini del rilascio prolungato, è più conveniente agire sull'idrofobia del reticolo piuttosto che ricorrere all'aggiunta di HPMC in quanto, in questi reticoli, quest'ultima non è in grado di rigonfiare e come unico effetto porta ad un abbassamento dell'efficienza di rilascio, parzialmente compensato dall'aumento della quantità di carico di principio attivo.

I risultati migliori, in termini di rilascio prolungato, sono stati ottenuti con le microsfere con rivestimento di silice idrofobo in quanto queste consentono di ottenere dopo un'ora un quantitativo di farmaco rilasciato confrontabile con quello rilasciato in 3 min dalle microsfere non rivestite. Questo profilo di rilascio, paragonato a quello del ketoprofene cristallino puro, è di tipo bimodale in quanto ha il vantaggio di avere un più rapido rilascio iniziale, portando ad un più rapido effetto terapeutico, per poi passare ad un rilascio graduale mantenendo la concentrazione plasmatica di principio attivo all'interno degli indici terapeutici.

# Conclusioni

L'attività svolta durante questa tesi di dottorato ha permesso di raggiungere l'obiettivo di messa a punto di una nuova procedura per produrre delle microsfere ibride silice/Ca-Alg. L'attività è stata alquanto complessa in quanto è stato necessario riadattare una tecnica, quella della reticolazione interna nata per la preparazione di microsfere di solo alginato, al caso delle microsfere ibride. In particolare, ne è risultata una procedura con parecchi accorgimenti per evitare la prematura reticolazione di una delle due componenti, per consentire la produzione di microsfere di adeguate dimensioni e con una distribuzione unimodale e realizzarne, infine, l'essiccamento supercritico. Dagli studi fatti sulla loro morfologia, queste microsfere si presentano con una buona distribuzione granulometrica per particolati con un diametro medio, misurato sul gel bagnato, fino a 270  $\mu\text{m}$ .

I valori dell'area superficiale sono stati molto soddisfacenti, queste microsfere infatti, dopo l'essiccamento supercritico, si presentano con area superficiale (915 – 1042  $\text{m}^2/\text{g}$ ) paragonabile a quella degli aerogel di silice e, dunque, oltre ad essere bio-adesive possiedono anche elevate capacità di carico. Si vuole inoltre evidenziare che i valori dell'area superficiale di queste microsfere sono maggiori rispetto a quelle degli aerogel ibridi prodotti in letteratura con il metodo diffusivo (529 – 623  $\text{m}^2/\text{g}$ , Lu et al., 2006; Raman et al., 2015).

Le microsfere ibride ottenute sono state caricate di un farmaco poco solubile in acqua, il ketoprofene, con l'obiettivo di investigare la possibilità del loro impiego come supporti per farmaci a rilascio rapido. I test di rilascio in vitro ne hanno dimostrato l'idoneità in quanto si è osservato un rilascio del 95% del ketoprofene incorporato in soli 10 minuti; inoltre, rispetto alle microsfere non ibride di Ca-Alg che in ambienti gastrici rilasciano fino all'80% del principio attivo (Silva et al., 2006), esse presentano un incremento dell'efficienza di rilascio di 15 punti percentuali.

Un altro obiettivo della tesi è stato quello di rivestire le microsfere ibride precedentemente realizzate onde investigarne la possibilità di impiego come supporti per farmaci a rilascio prolungato. In particolare si è confrontata la prestazione dell'idrossipropil metil cellulosa (HPMC) come eccipiente del rivestimento rispetto a quelle di un rivestimento di silice idrofobo. Sono state così

messe a punto nuove procedure per produrre microsfele ibride silice/Ca-Alg con tre tipi di rivestimento: il primo costituito da Ca-Alg e HPMC, il secondo costituito da silice e HPMC, il terzo costituito da silice idrofoba.

I test di rilascio hanno dimostrato che le microsfele ibride non rivestite si sono rivelate degli ottimi candidati come supporti per farmaci a rilascio rapido. Si è osservato che la presenza dell'idrossipropil metil cellulosa nello strato esterno consente di aumentare notevolmente la capacità di carico di principio attivo delle microsfele (soprattutto se abbinata alla presenza di alginato, in quanto il contenuto di farmaco incorporato è più del quadruplo di quella contenuta nelle microsfele non rivestite); essa ha, inoltre, un moderato effetto ritardante sul rilascio del ketoprofene. Fra i tre rivestimenti esaminati, quello costituito da silice idrofoba si è rivelato essere il miglior candidato per il rilascio prolungato del principio attivo. Quest'ultimo, infatti, consente di ottenere dopo un'ora un quantitativo di farmaco rilasciato confrontabile con quello rilasciato in 3 min dalle microsfele non rivestite. Esso, inoltre, consente di ottenere un rilascio di tipo bimodale combinato in cui si ha un rapido rilascio iniziale, che porta ad un rapido effetto terapeutico, seguito da un rilascio graduale che mantiene la concentrazione plasmatica di principio attivo all'interno degli indici terapeutici.

# Bibliografia

- Akinosho H., Hawkins S., Wicker L. (2013). Hydroxypropyl methylcellulose substituent analysis and rheological properties. *Carbohydrate Polymers* 98, 276–281.
- Alnaief M., Alzaitoun M. A., García-González C. A., Smirnova I. (2011). Preparation of biodegradable nanoporous microspherical aerogel based on alginate. *Carbohydrate Polymers* 84, 1011–1018.
- Alnaief M., Smirnova I. (2010). Effect of surface functionalization of silica aerogel on their adsorptive and release properties. *Journal of Non-Crystalline Solids* 356, 1644–1649.
- Alnaief M., Smirnova I. (2011). In situ production of spherical aerogel microparticles. *J. of Supercritical Fluids* 55, 1118–1123.
- Annapragada A., Adjei A. (1996). An analysis of the Fraunhofer Diffraction method for particle size distribution analysis and its application to aerosolized sprays. *International Journal of Pharmaceutics* 127, 219–227.
- Avalle P., Pygall S. R., Gower N., Midwinter A. (2011). The use of in situ near infrared spectroscopy to provide mechanistic insights into gel layer development in HPMC hydrophilic matrices. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 43, 400–408.
- Bera H., Ippagunta S. R., Kumar S., Vangala P. (2017). Core-shell alginate-ghatti gum modified montmorillonite composite matrices for stomach-specific flurbiprofen delivery. *Materials Science and Engineering C* 76, 715–726.
- Berthon S., Barbieri O., Ehrburger-Dolle F., Geissler E., Achard P., Bley F., Hecht A. M., Livet F., Pajonk G. M., Pinto N., Rigacci A., Rochas C. (2001). DLS and SAXS investigations of organic gels and aerogels. *Journal of Non-Crystalline Solids* 285, 154–161.



- Biesmans G., Randall D., Francais E., Perrut M. (1998). Polyurethane-based organic aerogels' thermal performance. *Journal of Non-Crystalline Solids* 225, 36–40.
- Black D. L., McQuay M. Q., Bonin M. P. (1996). Laser-based techniques for particle-size measurement: a review of sizing methods and their industrial applications. *Prog. Energy Combust. Sci.* 22, 267-306.
- Brusa R. (2013). Caratteristiche granulometriche degli API: difficoltà e limiti dell'analisi laser. IMS srl Micronizzazioni.  
<http://aschimfarma.federchimica.it/docs/default-source/giornata-con-afi-23.4.2013/rita-brusa.pdf?sfvrsn=2>
- Buisson P., Hernandez C., Pierre M., Pierre A. C. (2001). Encapsulation of lipases in aerogels. *Journal of Non-Crystalline Solids* 285, 295 - 302.
- Chen H. H. (2007). Rheological properties of HPMC enhanced Surimi analyzed by small- and large-strain tests: I. The effect of concentration and temperature on HPMC flow properties. *Food Hydrocolloids* 21, 1201–1208.
- Chen H. H., Huang Y. C. (2008). Rheological properties of HPMC enhanced surimi analyzed by small- and large-strain tests-II: Effect of water content and ingredients. *Food Hydrocolloids* 22, 313-322.
- Chen J. P., Lin Y. S. (2007). Decolorization of azo dye by immobilized *Pseudomonas luteola* entrapped in alginate–silicate sol–gel beads. *Process Biochemistry* 42, 934–942.
- Chernev G. E., Samuneva B., Djambaski P. R., Salvado I. M. M., Fernandes H. V. (2006). Silica hybrid nanocomposites. *Central European Journal of Chemistry* 4(1), 81–91.
- Chickering D., Jacob P., Mathiowitz E. (1992). A tensile technique to evaluate the interaction of bioadhesive microspheres with intestinal mucosa, *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.* 19, 88–89.
- Chickering D., Mathiowitz E. (1995). Bioadhesive microspheres: I. A novel electrobalance based method to study adhesive interactions between individual microspheres and intestinal mucosa. *J. Control. Release* 34, 251–261.

- Ch'ng H., Park H., Kelly P., Robinson J. (1985). Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery. Synthesis and evaluation of some swelling, water-insoluble bioadhesive polymers. *J. Pharm. Sci.* 74, 399–405.
- Ciriminna R., Fidalgo A., Pandarus V., Béland F., Ilharco L. M., Pagliaro M. (2013). The Sol–Gel Route to Advanced Silica-Based Materials and Recent Applications. *Chem. Rev.* 113, 6592–6620.
- Conte U., Colombo P., La Manna A., Gazzaniga A., Sangalli M. E., Giunchedi P. (1989). A New Ibuprofen Pulsed Release Oral Dosage Form. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 15, 14-16.
- Coradin T., Livage J. (2003). Mesoporous alginate/silica biocomposites for enzyme immobilisation. *C. R. Chimie* 6, 147–152.
- Coradin T., Nassif N., Livage J. (2003). Silica–alginate composites for microencapsulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 61, 429–434.
- Crank J. (ed). (1975). *The mathematics of diffusion*. Oxford university press.
- Debele T. A., Mekuria S. L., Tsai H.C. (2016). Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents. *Materials Science and Engineering C* 68, 964–981.
- Del Gaudio P., Auriemma G., Mencherini T., Della Porta G., Reverchon E., Aquino R. P. (2012). Design of Alginate-Based Aerogel for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Controlled Delivery Systems Using Prilling and Supercritical-Assisted Drying. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 102, 185–194.
- Dieudonné P., Delord P., Phalippou J. (1998). Small angle X-ray scattering of aerogel densification. *Journal of Non-Crystalline Solids* 225, 220–225.
- Dokoumetzidis A., Macheras P. (2006). A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *International Journal of Pharmaceutics* 321, 1–11.
- Faulhammer E., Kovalcik A., Wahl V., Markl D., Stelzer F., Lawrence S., J.G. Khinast J. G., Paudel A. (2016). Multi-methodological investigation of the

- variability of the microstructure of HPMC hard capsules. *International Journal of Pharmaceutics* 511, 840–854.
- Fiszman S. M., Salvador A., Sanz T. (2005). Why, when and how hydrocolloids are employed in batter-coated food: A review. *Progress in Food Biopolymer Research* 1, 55–68.
- Fricke J., Tillotson T. (1997). Aerogels: production, characterization, and applications. *Thin Solid Films* 297, 212–223.
- Gandhi S., Gosse M. D., Nishii Y., Nuxoll E. (2015). Barrier-Mediated Pulsatile Release. *Journal of Membrane Science* 495, 351–360.
- García-González C. A., Alnaief M., Smirnova I. (2011). Polysaccharide-base aerogels—Promising biodegradable carriers for drug delivery systems. *Carbohydrate Polymers* 86, 1425–1438.
- García-González C. A., Smirnova I. (2013). Use of supercritical fluid technology for the production of tailor-made aerogel particles for delivery systems. *J. of Supercritical Fluids* 79, 152–158.
- Gazzaniga A., Sangalli M. E., Giordano F., (1994b). Oral Chronotopic® drug delivery systems: achievement of time and/or site specificity. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 40(4), 246–250.
- Gombotz W. R., Wee S. F. (2012). Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, 194–205.
- Gonçalves V. S. S., Gurikov P., Poejo J., Matias A. A., Heinrich S., Duarte C. M. M., Smirnova I. (2016). Alginate-based hybrid aerogel microparticles for mucosal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 107, 160–170.
- Gray V. A. (2013). Method Development and Setting Clinically Relevant Dissolution Specifications, including Quality by Design. USP Expert Committee Dissolution Workshop.
- Hacene Y. C., Singh A., Van den Mooter G. (2016). Drug loaded and ethylcellulose coated mesoporous silica for controlled drug release prepared using a pilot

- scale fluid bed system. *International Journal of Pharmaceutics* 506, 138–147.
- Ismail A. A., Ibrahim I. A., Ahmed M. S., Mohamed R. M., El-Shall H. (2004). Sol–gel synthesis of titania–silica photocatalyst for cyanide photodegradation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 163, 445–451.
- Khoo S. M., Porter C. J. H., Charman W. N. (2000). The formulation of Halofantrine as either non-solubilising PEG 6000 or solubilising lipid based solid dispersions: Physical stability and absolute bioavailability assessment. *International Journal of Pharmaceutics* 205, 65–78.
- Knez Z., Markocic E., Leitgeb M., Primožic M., Knez Hrnčić M., Skerget M. (2014). Industrial applications of supercritical fluids: A review. *Energy* 77, 235–243.
- Kondratenko M. S., Elmanovich I. V., Gallyamov M. O. (2017). Polymer materials for electrochemical applications: Processing in supercritical fluids. *J. of Supercritical Fluids* 127, 229–246.
- Ladavos A. K., Katsoulidis A. P., Iosifidis A., Triantafyllidis K. S., Pinnavaia T. J., Pomonis P. J. (2012). The BET equation, the inflection points of N<sub>2</sub> adsorption isotherms and the estimation of specific surface area of porous solids. *Microporous and Mesoporous Materials* 151, 126–133.
- Lee J. H., Yeo Y. (2014). Controlled drug release from pharmaceutical nanocarriers. *Chem.Eng.Sci.* [http://dx. doi.org/10.1016/j.ces.2014.08.046](http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2014.08.046)
- Lemoine D., Wauters F., Bouchend'homme S., Préat V. (1998). Preparation and characterization of alginate microspheres containing a model antigen. *International Journal of Pharmaceutics* 176, 9–19.
- Li J., Wang H., Yang B., Xu L., Zheng N., Chen H., Li S. (2016). Control-release microcapsule of famotidine loaded biomimetic synthesized mesoporous silica nanoparticles: Controlled release effect and enhanced stomach adhesion in vitro. *Materials Science and Engineering C* 58, 273–277.

- Lim S. Y., Kim K. O., Kim D. M., Park C. B. (2009). Silica-coated alginate beads for in vitro protein synthesis via transcription/translation machinery encapsulation. *Journal of Biotechnology* 143, 183–189.
- Liu Q., Rauth A. M., Wu X. Y. (2007). Immobilization and bioactivity of glucose oxidase in hydrogel microspheres formulated by an emulsification–internal gelation–adsorption–polyelectrolyte coating method. *International Journal of Pharmaceutics* 339, 148–156.
- Liu W., Selomulya C., Wu W. D., Gengenbach T. R., Williams T., Chen X. D. (2013). On the formation of uniform alginate-silica microcomposites with ordered hierarchical structures. *Journal of Food Engineering* 119, 299–307.
- Lovskaya D. D., Lebedev A. E., Menshutina N. V. (2015). Aerogels as drug delivery systems: In vitro and in vivo evaluations, *J. Supercrit. Fluids*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2015.07.011>
- Lu Y., Jiang Z., Xu S., Wu H. (2006). Efficient conversion of CO<sub>2</sub> to formic acid by formate dehydrogenase immobilized in a novel alginate–silica hybrid gel. *Catalysis Today* 115, 263–268.
- Luo X., Zhang H., Chen M., Wei J., Zhang Y., Li X. (2014). Antimetastasis and antitumor efficacy promoted by sequential release of vascular disrupting and chemotherapeutic agents from electrospun fibers. *International Journal of Pharmaceutics* 475, 438–449.
- Lupo B., Maestro A., Porras A., Gutiérrez J. M., González C. (2014). Preparation of alginate microspheres by emulsification/internal gelation to encapsulate cocoa polyphenols. *Food Hydrocolloids* 38, 56-65.
- Mallepally R. R., Bernard I., Marin M. A., Ward K. R., McHugh M. A. (2013). Superabsorbent alginate aerogels. *J. of Supercritical Fluids* 79, 202–208.
- Masmoudi J., Rigacci A., Ilbizian P., Cauneau F., Achard P. (2006). Diffusion during the supercritical drying of silica gels. *Drying technology: An International Journal* 24, 1121-1125.
- Masuelli M. A., Illanes C. O. (2014). Review of the characterization of sodium alginate by intrinsic viscosity measurements. Comparative analysis between

- conventional and single point methods. *International Journal of BioMaterials Science and Engineering*; 1(1): 1-11.
- Mehling T., Smirnova I., Guenther U., Neubert R. H. H. (2009). Polysaccharide-based aerogels as drug carriers. *Journal of Non-Crystalline Solids* 355, 2472–2479.
- Mel'gunov M. S., Ayupov A. B. (2017). Direct method for evaluation of BET adsorbed monolayer capacity. *Microporous and Mesoporous Materials* 243, 147-153.
- Naderi M. (ed). (2015). *Surface Measurement Systems, Ltd., Alperton, London, UK.*
- Nochos A., Douroumis D, Bouropoulos N. (2008). In vitro release of bovine serum albumin from alginate/HPMC hydrogel beads. *Carbohydrate Polymers* 74, 451–457.
- Novak Z., Knez Z. (1997). Diffusion of methanol–liquid CO<sub>2</sub> and methanol–supercritical CO<sub>2</sub> in silica aerogels. *Journal of Non-Crystalline Solids* 221, 163–169.
- Okeke O. C., Boateng J. S. (2016). Composite HPMC and sodium alginate based buccal formulations for nicotine replacement therapy. *International Journal of Biological Macromolecules* 91, 31–44.
- Ouwerx C., Velings N., Mestdagh M. M., Axelos M. A. V. (1998). Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polymer Gels and Networks* 6, 393-408.
- Paques J. P., Van der Linden E., Van Rijn C. J. M., Sagis L. M. C. (2014). Preparation methods of alginate nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science* 209, 163–171.
- Park K., Robinson J. R. (1984). Bioadhesive polymers as platforms for oral-controlled drug delivery: Method to study bioadhesion. *Int. J. Pharm.* 19, 107–127.
- Pawar S. N., Edgar K. J. (2012). Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials* 33, 3279-3305.

- Phadtare D., Phadtare G., Nilesh B., Asawat M. (2014). Hypromellose – a choice of polymer in extended release tablet formulation. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 3(9), 551-566.
- Pinto J. F. (2010). Site-specific drug delivery systems within the gastro intestinal tract: From the mouth to the colon. *International Journal of Pharmaceutics* 395, 44–52.
- Pollanen J., Shirer K. R., Blinsein S., Davis J. P., Choi H., Lippman T. M., Halperin W. P., Lurio L. B. (2008). Globally anisotropic high porosity silica aerogels. *Journal of Non-Crystalline Solids* 354, 4668–4674.
- Polo L., Gómez-Cerezo N., Aznar E., Vivancos J. L., Sancenón F., Arcos D., Vallet-Regí M., Martínez-Máñez R. (2017). Molecular gates in mesoporous bioactive glasses for the treatment of bone tumors and infection. *Acta Biomaterialia* 50, 114–126.
- Poncelet D., Lencki R., Beaulieu C., Halle J. P., Neufeid R. J., Fournier A. (1992). Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology. *Appl Microbiol Biotechnol* 38, 39-45.
- Poncelet D., Babak V., Dulieu C., Picot A. (1999). A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 155, 171–176.
- Raman S. P., Gurikov P., Smirnova I. (2015). Hybrid alginate based aerogels by carbon dioxide induced gelation: Novel technique for multiple applications. *J. Supercrit. Fluids*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2015.05.003>.
- Ramsey E., Sun Q., Zhang Z., Zhang C., Gou W. (2009). Mini-Review: Green sustainable processes using supercritical fluid carbon dioxide. *Journal of Environmental Sciences* 21, 720–726.
- Rastello De Boisseson M., Leonard M., Hubert P., Marchal P., Stequert A., Castel C., Favre E., Dellacherie E. (2004). Physical alginate hydrogels based on hydrophobic or dual hydrophobic/ionic interactions: Bead formation, structure, and stability. *Journal of Colloid and Interface Science* 273, 131–139.

- Rayment P., Wright P., Hoad C., Ciampi E., Haydock D., Gowland P., Butler M. F. (2009). Investigation of alginate beads for gastro-intestinal functionality, Part 1: In vitro characterisation. *Food Hydrocolloids* 23, 816–822.
- Ribeiro A. J., Silva C., Ferreira D., Veiga F. (2005). Chitosan-reinforced alginate microspheres obtained through the emulsification/internal gelation technique. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 25, 31–40.
- Rubilar J. F., Zúniga R. N., Osorio F., Pedreschi F. (2015). Physical properties of emulsion-based hydroxypropyl methylcellulose/whey protein isolate (HPMC/WPI) edible films. *Carbohydrate Polymers* 123, 27–38.
- Sabegh M. A., Rajaei H., Esmailzadeh F., Lashkarbolooki M. (2012). Solubility of ketoprofen in supercritical carbon dioxide. *J. of Supercritical Fluids* 72, 191–197.
- Samuneva B., Djambaski P., Kashchieva E., Chernev G., Kabaivanova L., Emanuilova E., Salvado I. M. M., Fernandes M.H.V., Wu A. (2008). Sol-gel synthesis and structure of silica hybrid biomaterials. *Journal of Non-Crystalline Solids* 354, 733–740.
- Sangalli M. E., Maroni A., Zema L., Busetti C., Giordano F., Gazzaniga A. (2001). In vitro and in vivo evaluation of an oral system for time and/or site-specific drug delivery. *Journal of Controlled Release* 73, 103–110.
- Sangalli M. E., Maroni A., Foppoli A., Zema L., Giordano F., Gazzaniga A. (2004). Different HPMC viscosity grades as coating agents for an oral time and/or site-controlled delivery system: a study on process parameters and in vitro performances. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 22, 469–476.
- Sanz-Moral L. M., Rueda M., Nieto A., Novak Z., Knez Z., Martín A. (2013). Gradual hydrophobic surface functionalization of drysilica aerogels by reaction with silane precursors dissolved in supercritical carbon dioxide. *J. of Supercritical Fluids* 84, 74–79.
- Setekleiv A. E., Svendsen H. F. (2014). Comparison of piezo electric particle monitor with laser diffraction technique. *Measurement* 55, 133–141.



- Sharma M., Kohli S., Dinda A. (2015). In-vitro and in-vivo evaluation of repaglinide loaded floating microspheres prepared from different viscosity grades of HPMC polymer. *Saudi Pharmaceutical Journal* 23, 675–682.
- Shchipunov Y. A., Karpenko T. Y., Bakunina I. Y., Burtseva Y. V., Zvyagintseva T. N. (2004). A new precursor for the immobilization of enzymes inside sol–gel-derived hybrid silica nanocomposites containing polysaccharides. *J. Biochem. Biophys. Methods* 58, 25–38.
- Shoaib M. H., Tazeen J., Merchant H. A., Yousuf R. I. (2006). Evaluation of drug release kinetics from ibuprofen matrix tablets using HPMC. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19 (2), 119-124.
- Shyong Y. J., Wang M. H., Kuo L. W., Su C. F., Kuo W. T., Chang K. C., Lin F. H. (2017). Mesoporous hydroxyapatite as a carrier of olanzapine for long-acting antidepressant treatment in rats with induced depression. *Journal of Controlled Release* 255, 62–72.
- Siepmann J., Peppas N. A. (2012). Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, 163–174.
- Siepmann J., Siegel R. A., Rathbone M. J. (eds). (2012). *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*, *Advances in Delivery Science and Technology*.
- Siepmann J., Siepmann F. (2013). Mathematical modeling of drug dissolution. *International Journal of Pharmaceutics* 453, 12– 24.
- Silva C. M., Ribeiro A. J., Figueiredo I. V., Goncalves A. R., Veiga F. (2006). Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. *International Journal of Pharmaceutics* 311, 1–10.
- Smirnova I., Suttiruengwong S., Arlt W. (2004). Feasibility study of hydrophilic and hydrophobic silica aerogels as drug delivery systems. *Journal of Non-Crystalline Solids* 350, 54–60.
- Soleimani Dorcheh A., Abbasi M. J. (2008). Silica aerogel; synthesis, properties and characterization. *Journal of materials processing technology* 199, 10–26.

- Song J., Fan X., Shen Q. (2016). Daidzein-loaded nanostructured lipid carriers-PLGA nanofibers for transdermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 501, 245–252.
- Streubel A., Siepmann J., Peppas N. A., Bodmeier R. (2000). Bimodal drug release achieved with multi-layer matrix tablets: transport mechanisms and device design. *Journal of Controlled Release* 69, 455–468.
- Sundararaj S. C., Thomas M. V., Peyyala R., Dziubla T. D., Puleo D. A. (2013). Design of a multiple drug delivery system directed at periodontitis. *Biomaterials* 34, 8835-8842.
- Sundararaj S. C., Thomas M. V., Dziubla T. D., Puleo D. A. (2014). Bioerodible system for sequential release of multiple drugs. *Acta Biomaterialia* 10, 115–125.
- Suwannateep N., Banlunara W., Wanichwecharungruang S. P., Chiablaem K., Lirdprapamongkol K., Svasti J. (2011). Mucoadhesive curcumin nanospheres: Biological activity, adhesion to stomach mucosa and release of curcumin into the circulation. *Journal of Controlled Release* 151, 176–182.
- The United States Pharmacopeial Convention ©. (2011).
- Ulker Z., Erkey C. (2014). An emerging platform for drug delivery: Aerogel based systems. *Journal of Controlled Release* 177, 51–63.
- Veres P., López-Periago A. M., Lázár I., Saurina J., Domingo C. (2015). Hybrid aerogel preparations as drug delivery matrices for low water-solubility drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 496, 360–370.
- Veríssimo M. I. S., Pais A. A. C. C., Gomes M. T. S. R. (2010). Following HPMC gelation with a piezoelectric quartz crystal. *Carbohydrate Polymers* 82, 363–369.
- Veronovski A., Novak Z., Knez Z. (2012). Synthesis and Use of Organic Biodegradable Aerogels as Drug Carriers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 23:7, 873-886.

- Veronovski A., Knez Z., Novak Z. (2013). Preparation of multi-membrane alginate aerogels used for drug delivery. *J. of Supercritical Fluids* 79, 209–215.
- Viridén A., Wittgren B., Andersson T., Larsson A. (2009). The effect of chemical heterogeneity of HPMC on polymer release from matrix tablets. *European journal of pharmaceutical sciences* 36, 392–400.
- Vueba M. L., Batista de Carvalho L. A. E., Veiga F., Sousa J. J., Pina M. E. (2004). Influence of cellulose ether polymers on ketoprofen release from hydrophilic matrix tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58, 51–59.
- Wang R., Shou D., Lv O., Kongc Y., Deng L., Shen J. (2017). pH-Controlled drug delivery with hybrid aerogel of chitosan, carboxymethyl cellulose and graphene oxide as the carrier. *International Journal of Biological Macromolecules* 103, 248–253.
- Wilding I. R., Savis S. S., Sparrow R. A., Ziemniak J. A., Heald D. L. (1995). Pharmacoscintigraphic evaluation of a modified release (Geomatrix®) diltiazem formulation. *Journal of Controlled Release* 33, 89-97.
- Willson R. J., Sokoloski T. D. (2004). Ranking of polymorph stability for a pharmaceutical drug using the Noyes–Whitney titration template method. *Thermochimica Acta* 417. 239–243.
- Xia Y., Pack D. W. (2014). Uniform biodegradable microparticle systems for controlled release. *Chem.Eng.Sci.*  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2014.06.049i>
- Yadava S. K., Patil J. S., Mokale V. J., Naik J. B. (2014). Sodium alginate/HPMC/liquid paraffin emulsified (o/w) gel beads, by factorial design approach; and in vitro analysis. *J Sol-Gel Sci Technol* 71, 60–68.
- Zabihi F., Yang M., Leng Y., Zhao Y. (2015). PLGA–HPMC nanoparticles prepared by a modified supercritical anti-solvent technique for the controlled release of insulin. *J. of Supercritical Fluids* 99, 15–22.
- Zhang Y., Hu X., Liu X., Dandan Y., Di D., Yin T., Zhang S., Tang X. (2015). Dry state microcrystals stabilized by an HPMC film to improve the

bioavailability of andrographolide. *International Journal of Pharmaceutics* 493, 214–223.

Zhao Y., Hu F., Evans J. J., Harris M. T. (2011). Study of sol–gel transition in calcium alginate system by population balance model. *Chemical Engineering Science* 66, 848–858.

Zhao Q., Wang X., Yan Y., Wang D., Zhang Y., Jiang T., Wang S. (2017). The advantage of hollow mesoporous carbon as a near-infrared absorbing drug carrier in chemo-photothermal therapy compared with IR-820. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 99, 66–74.