

8. Parte IV: Sviluppo di un sistema multi-cinetico e sito specifico per la terapia combinata della malaria

8.1 Patogenesi della malaria

La malaria è una tra le malattie più diffuse al mondo. Nelle aree tropicali e subtropicali rappresenta una delle prime cause di morte e la popolazione mondiale che vive in aree a rischio di malaria è circa il 42% della intera umanità.

L'OMS stima in 300-500 milioni di casi per anno l'incidenza globale della malaria, con un milione di decessi annui, a carico soprattutto dei bambini compresi fra 6 mesi e 5 anni. La situazione più grave si registra nell'Africa sub-sahariana (figura 64) in cui sono presenti oltre i due terzi dei casi totali di malaria al mondo.

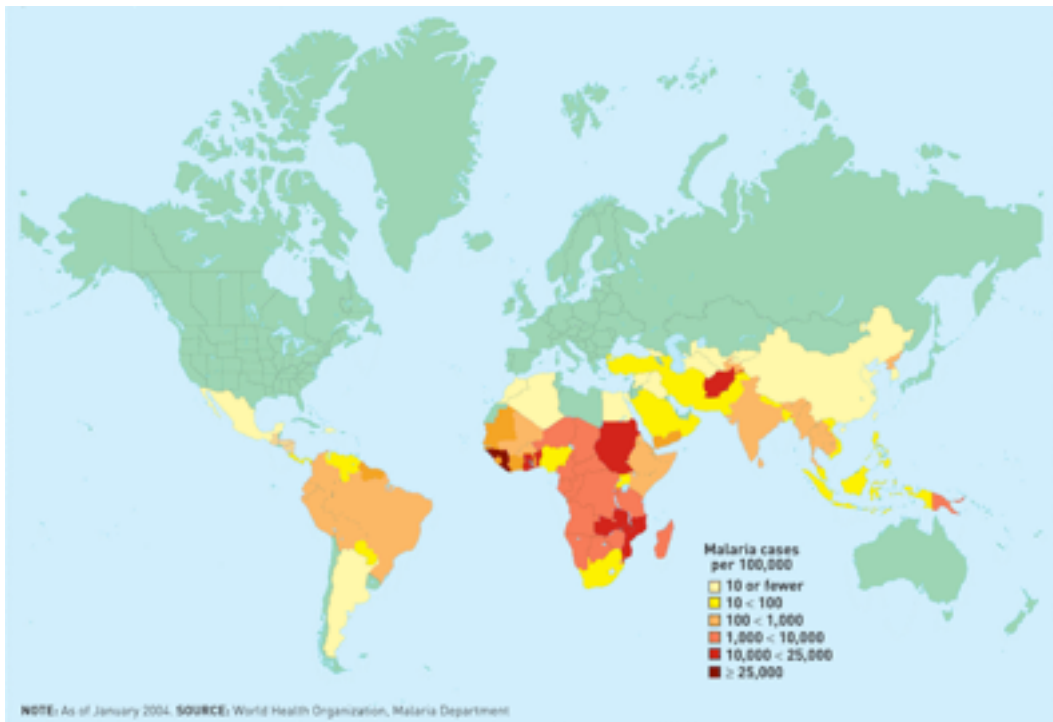


Figura 64. Diffusione della malaria nel mondo

Le specie di microrganismi patogeni per l'uomo sono essenzialmente quattro:

1. *Plasmodium falciparum*, specie più diffusa nelle zone tropicali e sub-tropicali;
2. *Plasmodium vivax*, specie prevalente in zone temperate ma presente anche in zone tropicali e sub-tropicali;
3. *Plasmodium malariae*, non uniformemente diffuso presente nelle stesse zone del *Plasmodium falciparum*;
4. *Plasmodium ovale*, presente principalmente in Africa tropicale ma anche nel pacifico;

La causa più frequente di infezione da *Plasmodium* è dovuta alla puntura di una zanzara femmina del genere *Anopheles* vettore del parassita della malaria.

a) Manifestazioni cliniche della malaria

I sintomi clinici della malaria sono diversi e non-specifici ma comunemente si possono riassumere in: febbre, stanchezza, malessere, mal di testa, mialgia, ed eccessiva sudorazione. L'anemia è una complicazione molto comune, causata dall'emolisi conseguente all'infezione e può provocare il verificarsi di casi di edema polmonare, insufficienza renale, e disfunzioni cerebrali.

b) Ciclo eso-eritrocitario

L'infezione avviene a seguito della puntura di una femmina di *Anopheles*. La zanzara inietta nel torrente circolatorio l'agente infettivo nella forma di *sporozoita*, un microrganismo lungo circa 12-15µm. Gli sporozoiti circolano nel sangue per poi raggiungere e penetrare nelle cellule del parenchima epatico (figura 65). All'interno delle cellule epatiche, la maggior parte degli sporozoiti inizia a moltiplicarsi per schizogonia dando così origine a schizonti epatici. Tale forma del microrganismo, in seguito a maturazione, che può durare da 5 a 11 giorni a seconda della specie di *Plasmodium* considerata, dà origine a migliaia di *merozoiti*. Essi dopo essersi liberati dalle cellule del parenchima epatico si riversano nel torrente circolatorio dando inizio alla fase eritrocitaria (figura 65). I *merozoiti* sono mononucleati e caratterizzati per la presenza di un complesso apicale detto conoide con il quale riescono a penetrare all'interno dell'eritrocita infettandolo.

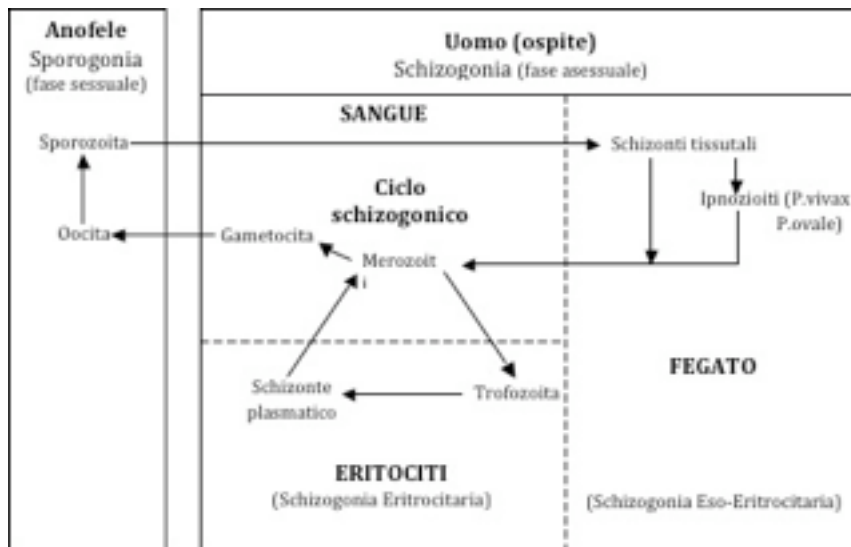


Figura 65. Ciclo vitale del Plasmodio

c) Ciclo eritrocitario

Una volta penetrati nei globuli rossi i *merozoiti* assumono le caratteristiche di *trofozoiti*, mononucleati, caratterizzati da un grosso vacuolo digestivo e attiva sintesi del DNA. I *trofozoiti* (figura 66) si accrescono metabolizzando, tramite glicolisi anaerobica, il glucosio del sangue, utilizzando ATP e fattori di crescita presenti nell'eritrocita. La loro fonte d'azoto è costituita dalla parte proteica dell'emoglobina. In seguito alla metabolizzazione di quest'ultima, un pigmento ferroporfirico, denominato emozoina, si accumula in forma granulare nel citoplasma dei parassiti. Il *trofozoita* si accresce in dimensioni occupando buona parte dell'eritrocita, riduce la dimensione del vacuolo digestivo e si trasforma in *schizonte plasmatico*.

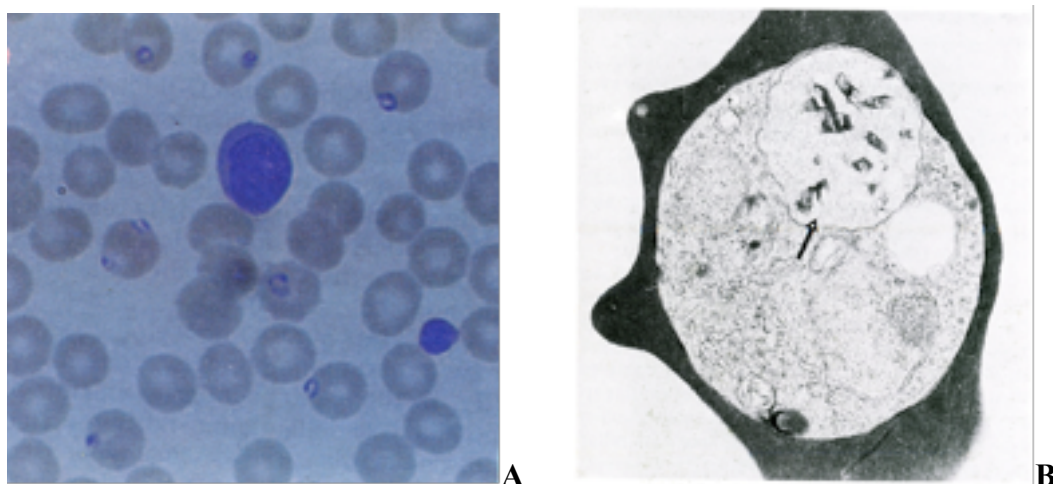


Figura 66. (A) Trofozoiti ad anello, (Da: Principi di microbiologia medica / Michele La Placa 8. ed. Bologna : Esculapio, 2000.) (B) Trofozoite maturo di *Plasmodium Falciparum* contenuto nel vacuolo del globulo rosso. L'attivo metabolismo del protozoo è testimoniato dalla presenza di emozoina indicata dalla freccia.(Da: Carosi et al, *Doctor*,4,55,1988)

Dal *trofozoita* si individualizzano numerosi *merozoiti* mononucleati (da 6 a 32 a seconda della specie) i quali si dispongono a rosetta (Figura 66A) questo punto l'eritrocita si gonfia ed esplose, liberando i nuovi *merozoiti* che sono pronti ad infettare altri eritrociti dando origine ai cicli addizionali di schizogonia (Figura 67).

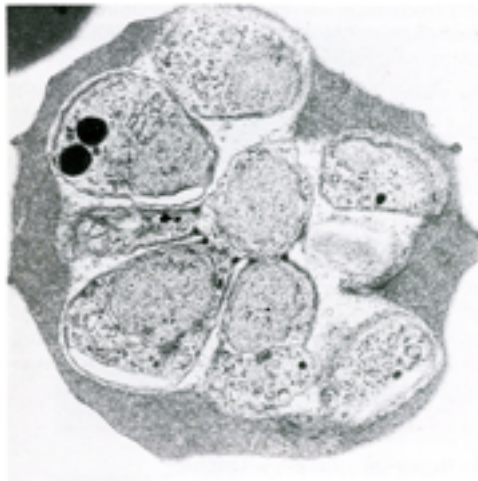


Figura 67. Microfotografia elettronica di schizonte *Plasmodium Falciparum* (15.000 X). La fase di individualizzazione dei *merozoiti* è quasi completata, precludendo alla lisi eritrocitaria. Da: Carosi et al, *Doctor*,4,55,1988.

Lo sviluppo dei parassiti è generalmente sincrono e perciò la rottura dei globuli rossi avviene simultaneamente provocando il parossismo malarico caratterizzato da: febbre, brividi, sudorazione determinate dal rilascio di tossine da parte del parassita. Tale parossismo si ripete periodicamente dopo tempi tipici della velocità del ciclo schizogonico nelle differenti specie:

- *Plasmodium falciparum* (terzana maligna) 48 ore;
- *Plasmodium vivax*, (terzana benigna) 48 ore;
- *Plasmodium malariae*,(terzana benigna) 48 ore;
- *Plasmodium ovale*,(quartana) 72 ore;

Dopo alcuni cicli schizogonici ematici i *merozoiti* danno origine a forme sessuate del parassita, i *gametociti* (Figura 68); il genoma aploide del merozoita può dare origine sia a gametociti femminili (*macrogametocita*) sia a maschili (*microgametocita*) che rimangono avvolti nella membrana dell'eritrocita. La produzione dei gametociti segue dei ritmi circadiani per poter infettare le zanzare in coincidenza del periodo di attività del vettore.

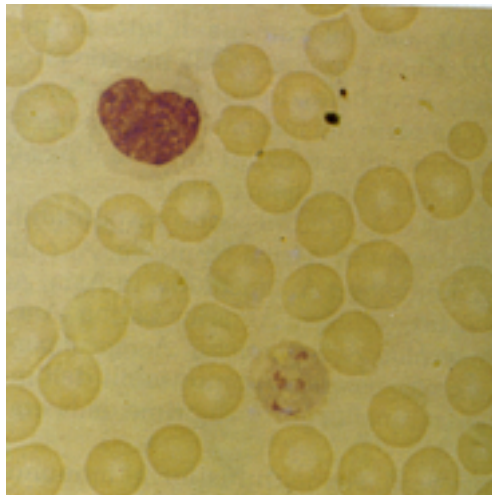


Figura 68. Gametocita falcirforme di *Plasmodium falciparum* in striscio sottile di sangue periferico. (Da: Principi di microbiologia medica / Michele La Placa 8. ed. Bologna : Esculapio, 2000.)

d) Ciclo sessuato e sporogenico nell'anofele

In seguito alla puntura di una persona infetta da parte di un anofele, le forme sessuate del plasmodio, i *gametociti*, presenti nel sangue fuoriescono dai globuli rossi nello stomaco della zanzara. Il *microgametocita* (Figura 69) va incontro ad un processo di

exflagellazione che porta alla formazione di 4-8 *microgameti* mononucleati ed il *macrogametocita* matura ad *macrogamete*. La fecondazione del *macrogamete*, ad opera del *microgamete*, nello stomaco del vettore (sporogonia), porta alla formazione di uno zigote che si sviluppa fino a formare una struttura mobile allungata denominata *oocinete*. L'*oocinete* perfora la parete intestinale, alla cui superficie esterna aderisce sotto forma di *oocisti* (Figura 69) rotondeggiante e incapsulata dalla reazione dell'ospite. All'interno della parete intestinale per successive divisioni meiotiche possiamo trovare fino 10.000 *sporozoiti* mobili che, rotta la parete dell'*oocita* e della lamina basale intestinale, sono rilasciati nell'emocele da dove raggiungono le ghiandole salivari e da qui sono iniettati nell'soggetto.

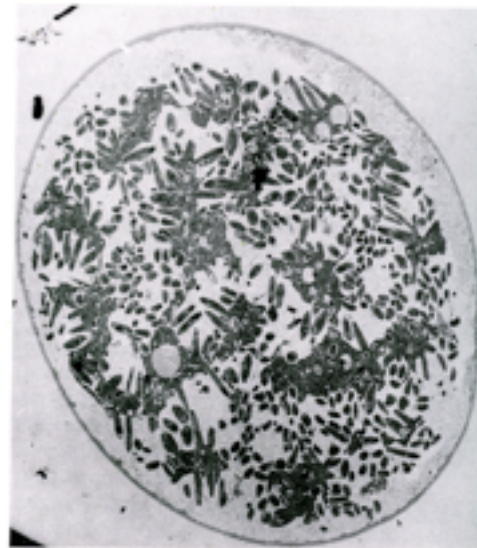


Figura 69. Microfotografia elettronica di oocisti, ottenuta tramite dissezione dell'emocele di *Anopheles*, stipata di sporozoiti fusiformi (10.000 X). (Da: Principi di microbiologia medica / Michele La Placa 8. ed. Bologna : Esculapio, 2000.)

e) *Recrudescenze e recidive.*

Una volta completato il ciclo di infezione, il *Plasmodium falciparum* può provocare recrudescenze: cioè la ripresa delle manifestazioni cliniche dopo attacco primario. Esse sono causate da parassiti persistenti al livello plasmatico che si liberano dagli eritrociti che si manifesta entro tempi brevi.

Fenomeni di recidive (nuova manifestazione della malattia anche dopo anni), si possono osservare nei casi di infezioni da *Plasmodium ovale* e da *Plasmodium vivax*; questo a causa di alcuni sporozoiti presenti negli epatociti. Essi si trasformano in una forma quiescente, detta *ipnozoita*, che dopo un periodo di latenza riprende a svilupparsi in schizonti epatici, diventando così fonte di un nuovo ciclo malarico.

8.2 Terapia antimalarica

La terapia antimalarica di solito viene condotta principalmente con farmaci attivi sulla fase schizogonica plasmatica del plasmodio. I principi attivi utilizzati sono selezionati in base alle resistenze registrate nell' area in cui viene curata la infezione. Nel caso del *Plasmodium vivax* e del *Plasmodium ovale* è necessario un trattamento contro la forma schizogonica tissutale in modo da scongiurare eventuali recidive. Generalmente i farmaci antimalarici vengono assunti per via orale, sebbene in alcuni casi si preferisca inizialmente una somministrazione di tipo parenterale in modo da avere una risposta immediata nei pazienti che hanno contratto una forma severa o complicata di malaria. In seguito, la terapia parenterale viene sostituita con una orale, molto più facile da rispettare per il paziente e molto più flessibile.

a) Farmaci utilizzati nella terapia antimalarica

Nella Tabella 21 sono catalogati tutti i farmaci che attualmente sono usati soli o in associazione per la cura della malaria. Tale tipo di catalogazione vuole mettere in evidenza le caratteristiche farmacocinetiche dei principi attivi in uso.

Tabella 21. Principali farmaci abitualmente usati nella terapia antimalarica e loro caratteristiche farmacocinetiche

PRINCIPALI FARMACI	ATTIVITA'	DOSAGGI	EMIVITA	PICCO PLASMATICO
Chinina	Rapida azione schizonticida plasmatica e gametocida	600 mg	11 ore	1-3
Chinidina	Rapida azione schizonticida plasmatica e gametocida	600 mg	11 ore	1-3
Meflochina	Azione schizonticida plasmatica	20-25 mg/kg dose singola o divisa in 2 o 3 somministrazioni.	21 giorni	Altamente variabile
Cloroquina	Rapida azione schizonticida plasmatica e gametocida	25 mg/kg per 3 giorni	2 mesi	3-5
Amodiachina	Rapida azione schizonticida plasmatica e gametocida	35 mg/kg per 3 giorni.	1/10 giorni	
Primachina	Schizonticida tissutale. Attività gametocida e su altri stage del ciclo vitale del plasmodio	15 mg per 14/21 giorni. Una dose singola di 30/45 mg ha azione gametocida.	3/6 ore	1-2
Proguanil	Schizonticida tissutale, lenta azione schizonticida plasmatica, attività sporontocida. Inibitore della diidrofolato reductasi	400 mg	20 ore	4
Primetamina	Schizonticida tissutale, lenta azione schizonticida plasmatica, attività sporontocida. Inibitore della diidrofolato reductasi. Usato in associazione con altri antimalarici che inibiscono altre fasi della diidrofolato reductasi	75mg in associazione con Sulfadoxina in rapporto 1:20	4 giorni	2-6
Alofantrina	Schizonticida plasmatico	500 mg in 3 dosi ogni 6 ore.	1/2 giorni	3-6
Artemisinina	Schizonticida plasmatico	Artemisinin 5 mg/kg 1 ^o giorno 2.5 mg/kg 2 ^o e 3 ^o giorno	4-11 ore	3
Artesunato	Schizonticida plasmatici	5 mg/kg 1 ^o giorno 2.5 mg/kg 2 ^o e 3 ^o giorno	4-11 ore	3
Artemetere	Schizonticida plasmatico	i.m. 3.2 mg/kg 1 ^o giorno 1.6 mg/kg nei seguenti giorni	4-11 ore	3
Arteether	Schizonticida plasmatico	i.m. 3.2 mg/kg 1 ^o giorno 1.6 mg/kg nei seguenti giorni	25-72 ore	3
Sulfametopirazina	Usato in associazione con Primetamina			
Doxiciclina	Schizonticida plasmatico e tissutale	100mg 2 volte al giorno per 7gg		
Clindamicina	Schizonticida plasmatico e tissutale	600mg 2 volte a giorno per 7gg		

c) Terapia combinata nel trattamento di malaria indotta da Plasmodium falciparum

Il continuo incremento di ceppi di *Plasmodium falciparum* resistenti alla cloroquina e ad altri antimalarici, assieme alla tossicità di alcuni farmaci, fa sì che la terapia antimalarica presenti casi di insuccesso.

La ricerca, quindi, ha spostato la propria attenzione su l'utilizzo di farmaci più efficaci utilizzati in associazione. Questo permette di incidere sul ciclo vitale del plasmodio su più fasi riducendo la possibilità dell'insorgenza di resistenze ai farmaci anti malarici. Il vantaggio terapeutico però non si traduce automaticamente in un vantaggio per il paziente; costui, dovendo assumere più farmaci contemporaneamente, ha difficoltà nel rispettare la posologia. La diminuzione della compliance del paziente provoca la sua mancata guarigione e l'aumento della possibilità di sviluppo di resistenze da parte del *Plasmodium falciparum*; tale risultato è dovuto livelli plasmatici di farmaco nel sangue inferiori a quelli terapeutici. Quindi, al fine di aumentare la compliance del paziente e di rendere più efficace la cura anti-malarica, è necessario associare più farmaci cercando di ridurre il più possibile le somministrazioni sino a giungere ad una sola dose al giorno.

La WHO (34) ha raccomandato l'utilizzo dell'*Artemisinina*, e di composti ad essa correlati, riservato alle aree in cui è presente una resistenza diffusa a più farmaci utilizzati nella terapia antimalarica. Al fine di dare una risposta a questo problema, alcune multinazionali hanno messo in commercio associazioni fra *Artemisinina* e farmaci già da tempo utilizzati in terapia. Ad esempio la Sanofi-Aventis ad inizio 2006 ha messo in commercio un'associazione Artesunato-amodiquina per la cura della forma complicata della malaria come unica dose giornaliera, lo stesso è stato fatto da Novartis

nel 2004 con una associazione Artemather-lumefantrina; entrambi i prodotti in associazione sono formulati come compresse a rilascio immediato.

Altre associazioni di farmaci raccomandate dal WHO sono state le seguenti:

- Artemather-lumefantrina
- Artesunato-amodiquina
- Artesunato-mefloquina
- Artesunato-sulfadoxina/pyrimethamina
- Artesunato-Clindamicina

Tutte e cinque le associazioni WHO sono efficaci ma solo le prime due sono prodotte come forma di dosaggio multi-farmaco per una unica somministrazione giornaliera. In questa maniera tali prodotti assicurano una migliore aderenza al trattamento da parte del paziente.

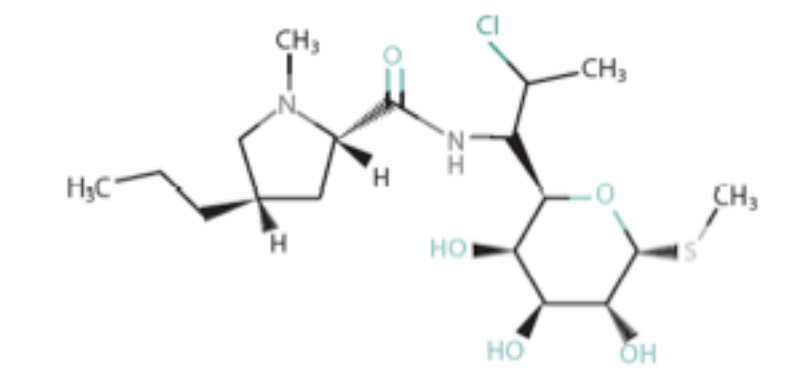
Altre associazioni di farmaci usati per la cura di questo tipo di infezione sono:

- Pyrimethamina-Sulfadoxina (Fanisar[®])
- Doxiciclina o Clindamicina in associazione con Pyrimethamina-Sulfadoxina
- Atovaquone-Proguanil (Malarone[®])

I farmaci con cui condurre la terapia antimalarica sono molteplici e ancora maggiori sono le possibilità di cura se pensiamo alle possibili combinazioni. Inoltre la possibilità di utilizzare sistemi a rilascio modificato di farmaci ancora non usati nella terapia anti malarica potrebbe di fatto aumentare le possibilità di cura.

Sfruttando la modularità e flessibilità della tecnologia Dome Matrix[®] si è deciso di preparare un sistema antimalarico multi cinetico e sito specifico di due farmaci in associazione per la cura della malaria. I farmaci impiegati per la realizzazione di tale sistema furono Clindamicina – Artesunato.

8.2.1. Clindamicina Fosfato



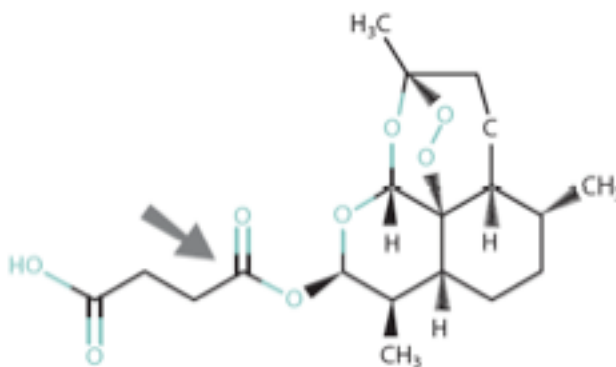
La Clindamicina è un antibiotico derivato dalla Lincomicina; esso si può trovare sotto forma di cloridrato, di palmitato cloridrato o di fosfato. La Clindamicina è somministrata per via orale e parenterale come fosfato ed è usata nel trattamento di infezioni batteriche da Gram-positivi anaerobi, toxoplasmosi, *Pneumocisti carinii pneumonia* e Babesiosi. La Clindamicina è molto solubile in acqua; la sua azione antibiotica è dovuta all'inibizione della sintesi proteica del plasmodio. Le formulazioni usate in terapia sono per lo più capsule contenenti Clindamicina base o cloridrato in una quantità pari a 75 mg, 150 mg o 300 mg.

In seguito a somministrazione orale circa il 90% della dose di Clindamicina è assorbita dal tratto gastrointestinale, in particolar modo nello stomaco; concentrazioni di 2 o 3 µg per ml si osservano dopo 1h dalla somministrazione di 150 mg di clindamicina, con una

concentrazione media plasmatica di circa 0.7 µg per ml dopo 6 h. L'emivita della clindamicina è di circa 2 o 3h, inoltre essa può essere aumentata in neonati e pazienti con attività renale compromessa. La clindamicina fosfato viene metabolizzata dal fegato nei seguenti metaboliti attivi: clindamicina base, metabolita N-demetilato e in un metabolita sulfossido. La quantità assorbita non è significativamente influenzata dal cibo nello stomaco mentre lo è la sua velocità.

Effetti collaterali collegati all'uso di clindamicina sono formazioni di tipo ulceroso nel colon e riduzione della flora batterica intestinale con conseguente diarrea da *Clostridium difficile*.

8.2.3 Artesunato



L'Artesunato è di solito presentato come sale di sodio dell'estere emisuccinato dell'Artemisinina. E' solubile in acqua ma è instabile in soluzioni neutre o acide. L'Artesunato viene somministrato per via orale, rettale e intravenosa. A tutt'oggi non esistono in commercio prodotti in associazione con l'Artesunato.

L'Artesunato è rapidamente ma non del tutto assorbito nel tratto gastrointestinale, con un picco plasmatico a 1h e 30 min dopo somministrazione orale. E' interamente convertito in diidroartemisinina, un metabolita attivo. L'eliminazione dell'Artesunato è rapida e l'azione antimalarica dipende dal tempo di eliminazione della Diidroartemisinina che ha una emivita breve di circa 45min.

Recenti studi hanno dimostrato come un pasto ricco di grassi possa favorire l'aumento di quota di farmaco assorbita, favorendo un aumento delle concentrazioni plasmatiche benefico per l'efficacia della terapia (34,35).

L'artesunato ha inoltre mostrato una notevole instabilità in soluzione acquosa; tale instabilità è molto pronunciata a pH acidi come quello dello stomaco (36, 37, 38). L'anello perossidico e i gruppi lattonici infatti in ambiente acido sono suscettibili di apertura (39) con conseguente perdita di attività farmacologica.

8.3 Scopo

Lo scopo della ultima parte del mio lavoro di tesi è stato quello di sfruttare la tecnologia DOME MATRIX[®] per progettare una forma farmaceutica a rilascio modificato contenente Clindamicina e Artesunato per la cura dell'infezione malarica.

L'obiettivo è stato perseguito fabbricando un assemblato costituito da:

- un modulo di clindamicina fosfato a rilascio immediato che liberasse rapidamente il farmaco;
- due moduli (maschio e femmina) di clindamicina fosfato in grado di controllare il rilascio di farmaco nel tempo, assemblati in configurazione a camera vuota in modo da ottenere un sistema in grado di galleggiare nei fluidi gastrici.
- un modulo di artesunato a rilascio immediato che liberasse rapidamente il farmaco

Il vantaggio del sistema in configurazione a camera vuota consiste nell'aumento del tempo di permanenza della forma farmaceutica nello stomaco, consentendo così alla clindamicina fosfato di essere assorbita per la maggior parte in questa sede anatomica e riducendo la frazione di clindamicina fosfato che raggiunge l'intestino, dove essa manifesta i suoi effetti indesiderati più gravi. L'obiettivo ultimo consiste nel ridurre le somministrazioni giornaliere di farmaco, di fatto aumentando così la compliance del paziente e riducendo il rischio di comparsa di ceppi resistenti.

I moduli a rilascio modificato devono favorire il mantenimento della concentrazione plasmatica di clindamicina il più possibile al di sopra della MIC.

8.4 Risultati e Discussione

8.4.1 Sistema multi cinetico e sito specifico per la terapia combinata anti malarica.

La clindamicina fosfato è un antibiotico a largo spettro utilizzato per la sua bassa tossicità mentre l'artesunato è un anti malarico della famiglia dell'artemisina con una potente azione anti protozoaria.

Utilizzando la tecnologia Dome Matrix[®] è stato il sistema terapeutico composto da:

un modulo a rilascio immediato di artesunato in modo da ottenere una veloce comparsa del farmaco nel sangue con una conseguente rapida riduzione della parassitemia,;

tre moduli contenenti clindamicina fosfato, di cui uno a rilascio immediato per assicurare un terzo della dose subito;

due moduli a rilascio controllato sono assemblati in configurazione a camera vuota. Con tale sistema, in grado di galleggiare, si vuole assicurare un rilascio del farmaco all'interno dello stomaco per tempi lunghi (Figura 70) riducendo la quota di farmaco che raggiunge il colon in modo da diminuire gli effetti collaterali.

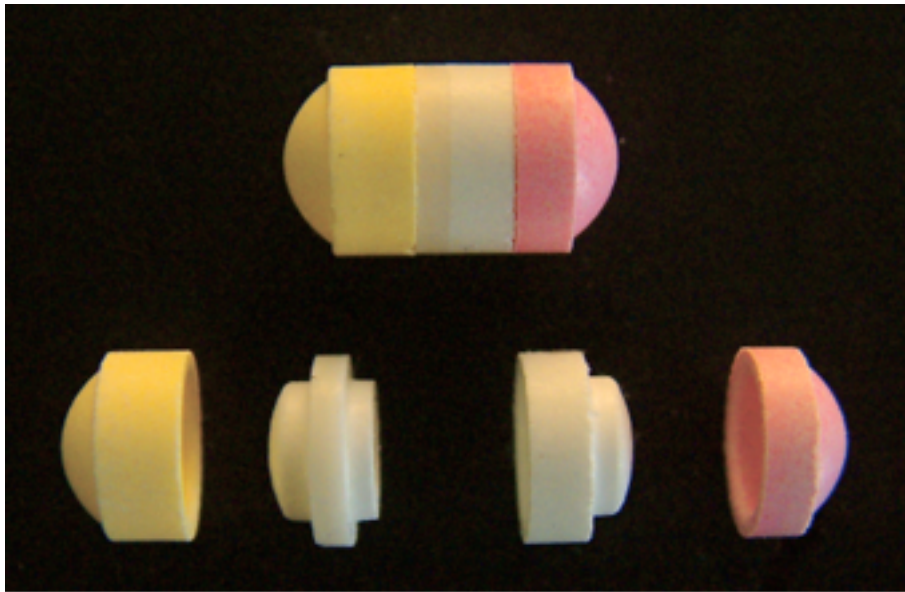


Figure 70: Sistema multi cinetico e sito specifico anti-malarico costituito da due moduli a rilascio modificato di clindamicina fosfato assemblati in configurazione a camera vuota (colore bianco), un modulo a rilascio immediato di clindamicina fosfato (colore giallo) e un modulo a rilascio immediato di artesunato (colore rosa)

8.4.2 Rilascio di clindamicina fosfato da moduli a rilascio controllato.

Sui moduli a rilascio controllato contenenti clindamicina fosfato sono stati condotti studi di rilascio per caratterizzare la cinetica di rilascio da tali matrici.

Poiché i moduli a rilascio controllato sono presenti in due tipologie aventi diversa forma, si è deciso di condurre preliminarmente uno studio di dissoluzione in modo da capire se la differente forma dei due moduli influenzava la cinetica di rilascio.

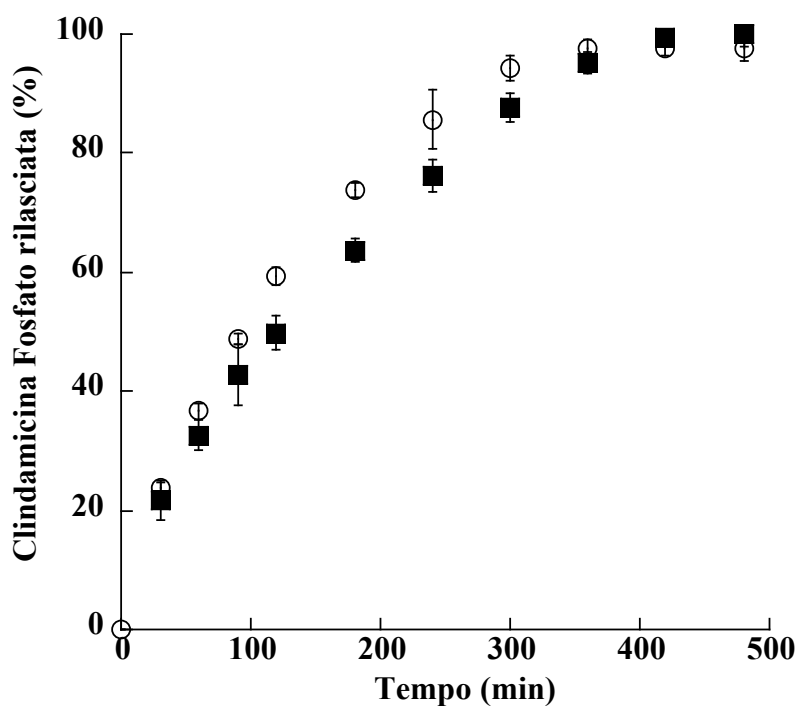


Figura 71: Profilo di rilascio dei moduli a rilascio prolungato maschio (■) e femmina (○) in fluido gastrico simulato senza enzimi USP 31. Le barre rappresentano l'errore standard della media n=6.

Dalla Figura 71 si può notare come i profili di rilascio non siano molto differenti; il calcolo del fattore f_2 , che è pari a 79.37, conferma che i due moduli non sono significativamente differenti. Si può però individuare una differenza nei tempi in cui i due tipi di moduli rilasciano l'80% di farmaco che per i moduli femmina era di 240 minuti e per i moduli maschio era di 300 minuti.

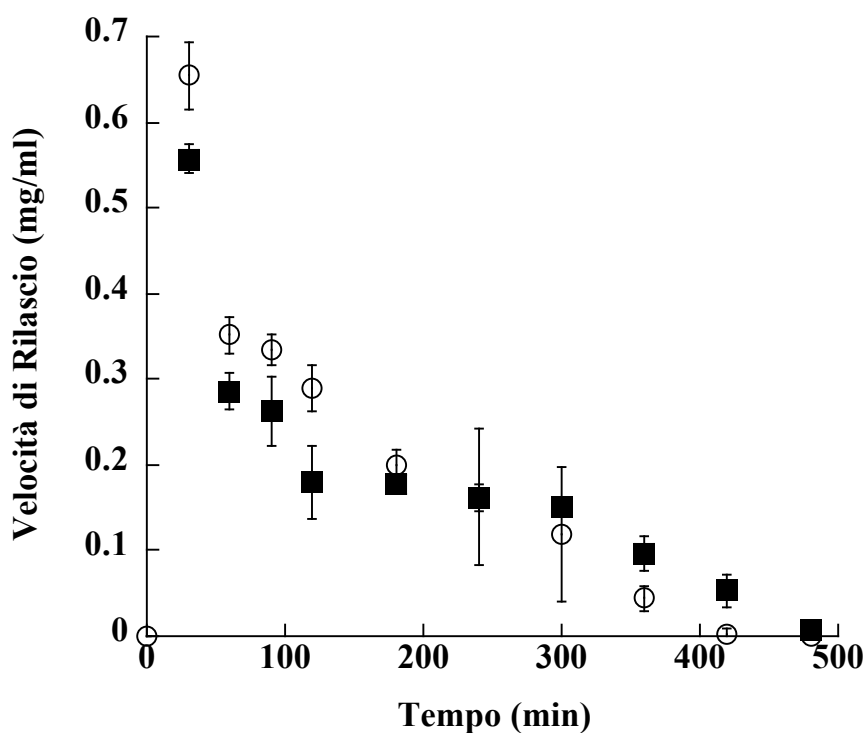


Figure 72: Velocità di rilascio clindamicina fosfato dai moduli maschio (■) e femmina (○) a rilascio controllato. Le barre rappresentano l'errore standard della media n=6.

Dal grafico della velocità di rilascio di farmaco contro il tempo (Figura 72) si può osservare che nei primi 100 minuti il rilascio di farmaco dal modulo femmina era più veloce rispetto al modulo maschio. La ragione di questo risultato è da attribuirsi alla

maggiore area superficiale esposta dal modulo femmina al mezzo di dissoluzione (modulo maschio=171.5 mm² modulo femmina=197.5 mm²).

Dallo studio della cinetica di rilascio condotto sui moduli maschio e femmina utilizzando l'equazione esponenziale di Kosmeyer-Peppas e imponendo $m=0.45$ (23) emerge che il meccanismo di rilascio del farmaco indicato dal valore di n (Tabella 22) era per entrambi i moduli di tipo pseudo-fickiano, indicando sostanzialmente che la diversa forma dei due moduli non influenzava in modo significativo la cinetica di rilascio.

Tabella 22. Analisi della cinetica di rilascio dei moduli maschio e femmina a rilascio controllato.

Modulo	n	R²	Kd	Kr	R²
Maschio	0.605±0.016	0.999	3.7	0.24	0.999
Femmina	0.659±0.036	0.999	3.07	0.44	0.999

Applicando l'equazione binomiale di Peppas e Sahlin (24) è stato possibile valutare il contributo dovuto alla diffusione (Kd) e al rilassamento delle catene polimeriche (Kr), sul trasporto di clindamicina dai moduli maschio e femmina. Per il modulo maschio, il valore della costante collegata alla diffusione di farmaco dal sistema era simile a quello del modulo femmina. Per quanto riguarda il valore della costante di rilassamento, come

si può vedere in tabella 22, nel caso del modulo maschio era circa la metà rispetto al valore calcolato per la femmina.

Confrontando il rigonfiamento dei moduli maschio e femmina nel tempo (Figura 73), si nota che nei primi 120 minuti sviluppano un gel che mima la forma iniziale dei moduli dei moduli a secco.

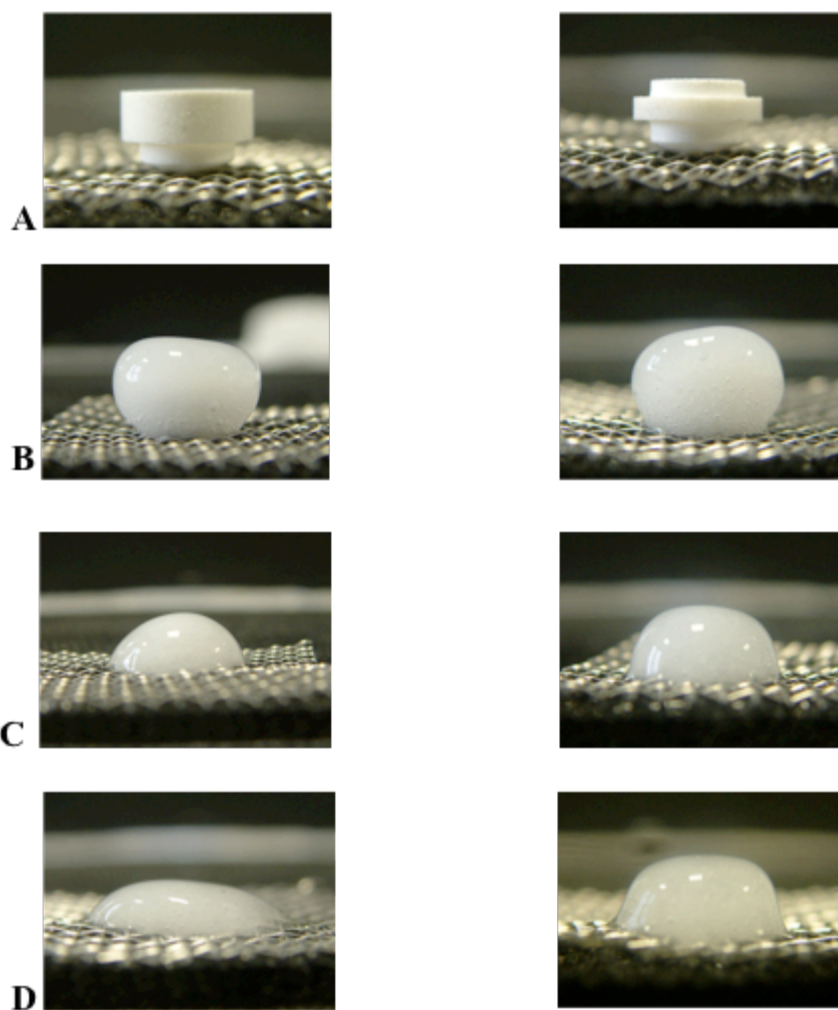


Figura 73. Rigonfiamento dei moduli maschio e femmina conteneti clindamicina fosfato (A=0', B=120', C=300', D=380')

Essendo tale comportamento non imputabile alla formulazione, che è la medesima per entrambi i moduli, si è ipotizzato che la diversa forma dei due moduli si ripercuotesse sulla cinetica di rigonfiamento del modulo. Nel caso del modulo maschio, il maggiore spessore delle pareti laterali congiuntamente al minor diametro della concavità e alla presenza della protrusione porta ad un rallentamento del rigonfiamento/dissoluzione del modulo. Il risultato è uno “swelling” del sistema la cui cinetica è influenzata dalla forma del modulo, nel senso che esso subisce l’effetto di fenomeni di tipo “impedimento sterico” in dipendenza di come le superfici che rigonfiano sono collocate. La diversa cinetica di rigonfiamento/dissoluzione si riflette su un lento rilascio del farmaco.

8.4.3 Rilascio di clindamicina fosfato da un assemblato in configurazione a camera vuota

Due moduli, maschio e femmina a rilascio controllato, precedentemente caratterizzati circa la cinetica di rilascio furono assemblati in configurazione a camera vuota. Tale configurazione fu ottenuta incastrando i due moduli faccia concava contro faccia concava come da Figura 74, grazie alla protusione anulare presente sulla base concava del modulo maschio (A).

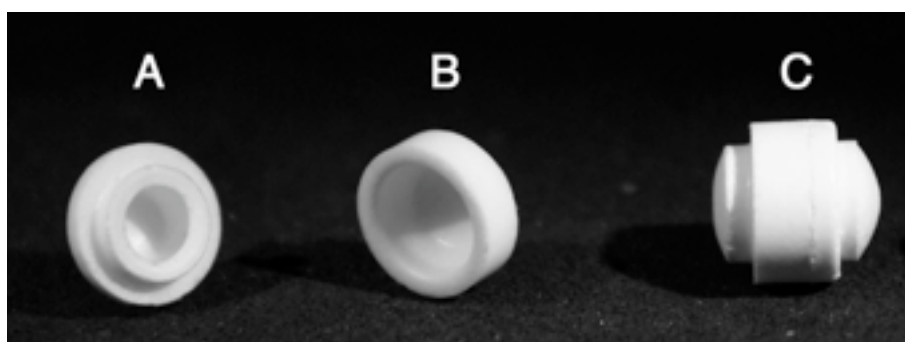


Figure 74: Moduli Dome Matrix[®] per l'assemblaggio a camera vuota (C). Il modulo maschio (A) viene assemblato al modulo femmina (B) faccia concava contro faccia concava grazie alla protusione anulare presente sulla faccia concava del modulo maschio.

Assemblando i due moduli in configurazione a camera vuota si ha riduzione della superficie esposta al mezzo di dissoluzione rispetto a quella che si avrebbe con i due moduli non assemblati. Inoltre contestualmente si ha un raddoppiamento della massa

costituente il sistema. Questo porta ad un rallentamento della frazione di farmaco rilasciata se confrontata con quella dei singoli moduli maschio e femmina in ragione della riduzione del rapporto S/V (40). (Figura 75).

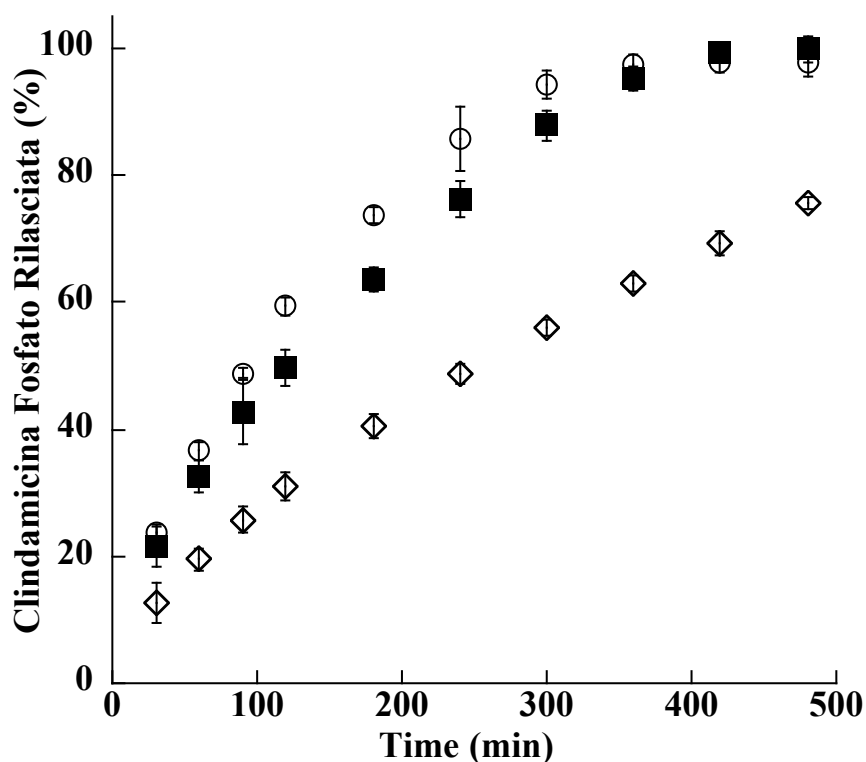


Figura 75: Profilo di rilascio in fluido gastrico simulato senza enzimi USP 31. dei moduli a rilascio prolungato maschio (■), femmina (○) e assemblati in configurazione a camera vuota (◇) Le barre rappresentano l'errore standard della media, n=6.

Dall'assemblaggio dei due moduli si otteneva un sistema che galleggiava sin dai primi istanti in cui veniva immerso nel mezzo di dissoluzione grazie alla camera vuota presente all'interno. Il rilascio dell'80% di farmaco si realizzava in otto ore, rendendo, tale sistema utile per tentare una somministrazione due volte al giorno.

Il valore dell'esponente n di questa assemblato ($n=0.645$) calcolato con l'equazione esponenziale di Kosmayer-Peppas indicava che l'assemblato a camera vuota presentato presentava un meccanismo di trasporto di farmaco di tipo pseudo-Fickiano (Figura 76). In particolare, il valore di n trovato era simile al valore trovato in precedenza per il modulo femmina ($n=0.659$ Tabella 22).

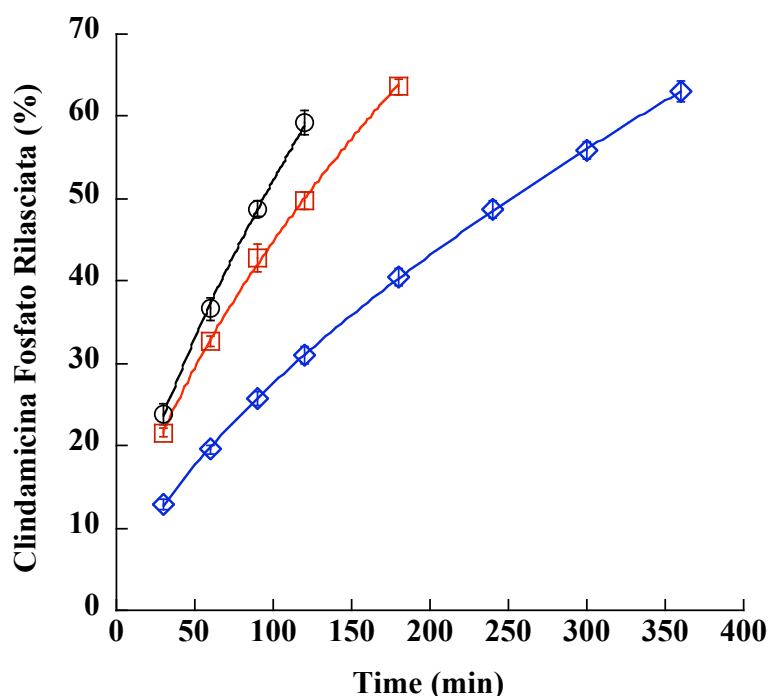


Figure 76: Analisi della Frazione di rilascio da moduli maschio (□), femmina (○) e assemblati in configurazione a camera vuota (◇) con l'equazione di Kosmayer-Peppas. Le barre rappresentano l'errore standard della media, $n=6$.

Il grafico della velocità di rilascio del farmaco in funzione del tempo (Figura 77) mostra che a tempi maggiori di 180 minuti si ha una certa costanza nella velocità di cessione

del farmaco, andamento caratteristico delle matrici a rilascio controllato fabbricati con polimeri idrofilici.

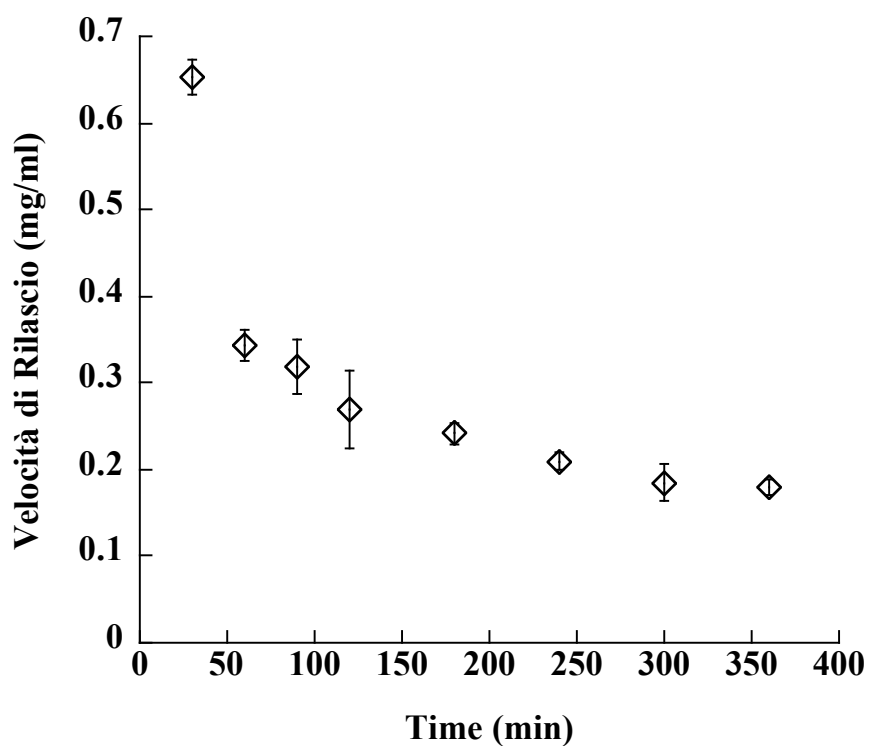


Figure 77: Velocità di rilascio clindamicina fosfato da assemblati a camera vuota (◇) costituiti dai moduli maschio e femmina. Le barre rappresentano l'errore standard della media n=6.

Al fine di valutare se le condizioni idrodinamiche potessero influenzare il profilo di dissoluzione dell'assemblato a camera vuota, è stato condotto un esperimento comparativo fra assemblati galleggianti e assemblati a camera vuota non galleggianti

riempiti nelle cavità con sfere di vetro in modo da renderli pesanti e poterli mantenere al fondo del vessel. Le condizioni idro-dinamiche fra il fondo del vessel e la parte sono marcatamente diverse e questo poteva essere un elemento che poteva influenzare il profilo di rilascio dalle matrici.

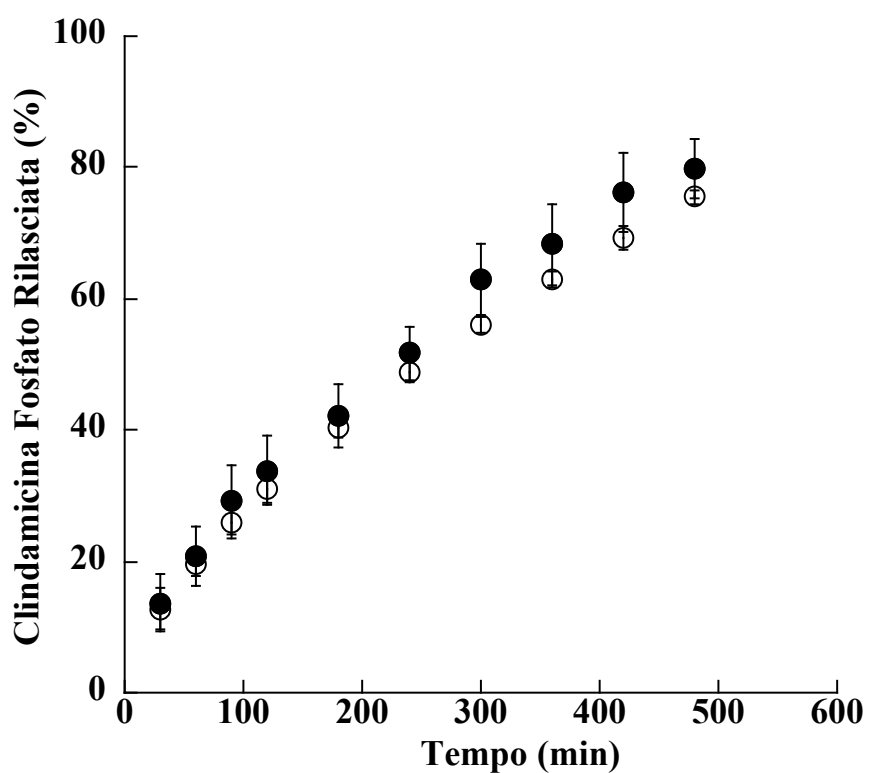


Figure 78: Profilo di rilascio di clindamicina fosfato da assemblati a camera vuota galleggianti (○) e non galleggianti (●) a rilascio controllato. Le barre rappresentano l'errore standard della media, n=6.

I risultati ottenuti (Figura 78) mostrano che non vi è significativa differenza nei profili di rilascio. Questo esperimento ha dimostrato che il rilascio del farmaco dipende dal polimero usato e dal gel da esso formato e non dalle condizioni idrodinamiche in cui il sistema si trova.

8.4.4 Resistenza all'apertura e Forza di distacco dei moduli assemblati

Al fine di valutare qualitativamente e quantitativamente la resistenza opposta dai due moduli assemblati in configurazione a camera vuota all'apertura, sono stati condotti due test.

a) Percentuale di moduli aperti nel friabilometro

Il primo test è stato condotto utilizzando un friabilometro abitualmente impiegato per misurare la resistenza agli urti delle compresse. L'esperimento è stato adattato per misurare la solidità degli assemblati in configurazione a camera vuota ottenuti incastrando tra di loro le due facce concave di un modulo maschio e un modulo femmina. Venti assemblati sono stati posti nel friabilometro impostato ad una velocità di rotazione di 25 rpm/min; l'esperimento aveva durata di 4 minuti. Al termine del test nessuno degli assemblati si era aperto indicando un'ottima tenuta dell'assemblato.

b) Forza di trazione usando un dinamometro

A seguito dell'esperimento condotto con il friabilometro si è deciso di quantificare a tenuta dell'assemblato attraverso una misura della forza necessaria per separare i moduli costituenti l'assemblato in configurazione a camera vuota. Dopo aver determinato il peso e lo spessore dei moduli maschio e femmina, questi furono assemblati incastrando la protrusione anulare del modulo maschio nella cavità complementare del modulo femmina. Il sistema assemblato a camera vuota è stato fissato ai morsetti del dinamometro e sottoposto a trazione.

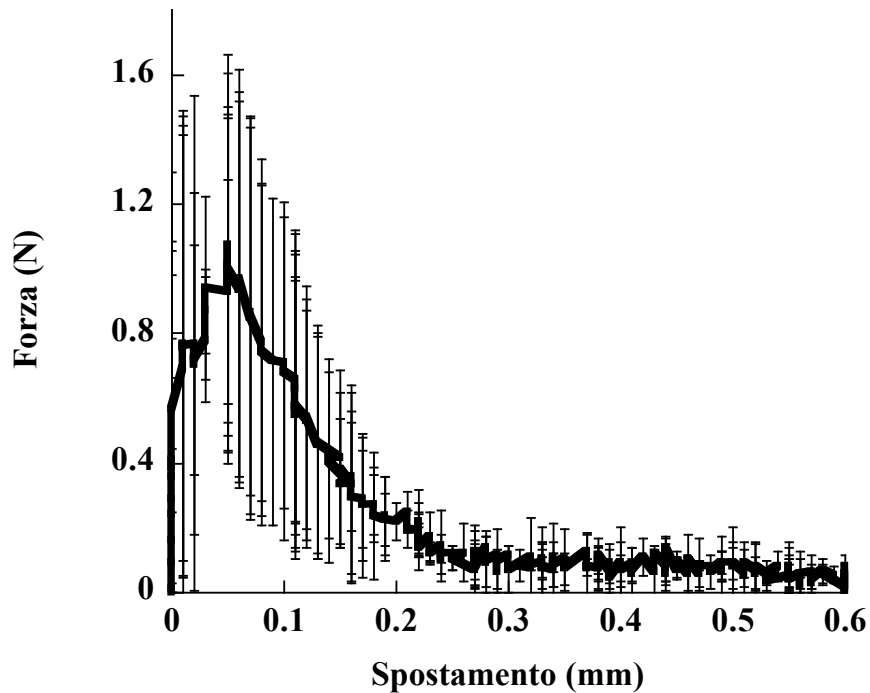


Figura 79: Forza di trazione su assemblati a camera vuota costituiti da moduli a rilascio controllato contenenti clindamicina fosfato. Le barre rappresentano l'errore standard della media $n=3$.

In figura 79 si può vedere che l'assemblato oppone una certa resistenza iniziale alla separazione, quantificata da una forza di trazione di 0.8 N. Il meccanismo di incastro tende a cedere superato questo valore per dare seguito alla apertura dell'assemblato quando la forza di trazione raggiunge 1.07 ± 0.59 . Dopo aver raggiunto il massimo della forza applicata in grado di separare i due moduli, la forza di trazione non crollava a zero ma diminuiva progressivamente a causa della riduzione graduale dell'attrito tra le superfici d'incastro dei due moduli che si separavano.

Poiché i moduli contengono HPMC che rigonfia a contatto con l'acqua formando un gel che svolge da adesivo, per valutare se la bagnatura dei moduli potesse influenzare la solidità dell'incastro. Volendo simulare ciò che accade una volta ingerito l'assemblato, è stata condotta una misura sugli assemblati idratati.

Dopo aver pesato e misurato gli spessori dei moduli maschi e dei moduli femmina, essi sono stati assemblati in configurazione a camera vuota e assicurati ai morsetti del dinamometro. Dopo avere spruzzato circa 2 ml di acqua deionizzata su tutti i lati dell'assemblato, la misura di trazione è stata misurata dopo 60 secondi.

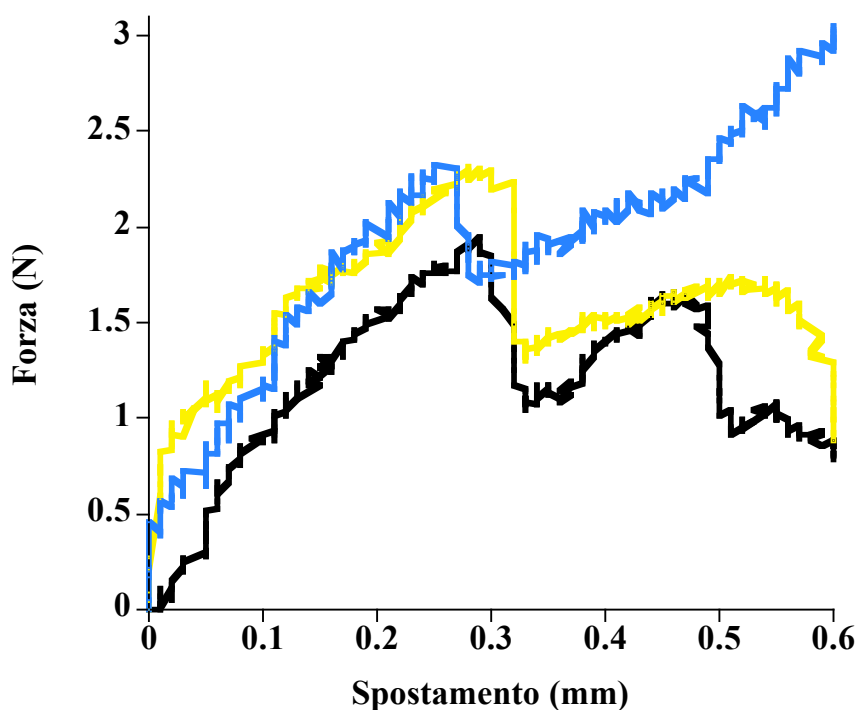


Figura 80: Forza di trazione su assemblati bagnati a camera vuota costituiti da moduli a rilascio controllato contenenti clindamicina fosfato.

Il risultato ottenuto è stato che nessuno degli assemblati si è aperto, sebbene e la forza massima applicata fosse stata di $2.18 \pm 0.20\text{N}$. L'andamento della curva di forza (Figura 80) contro lo spostamento ha un andamento tale per cui nella prima parte si osserva un aumento della forza di trazione meno rapido che nell'assemblato secco, in seguito la forza tende a diminuire a causa dei morsetti che scivolano per effetto del gel formatosi sulle superfici dell'assemblato. Questo gel, infatti, ha determinato una diminuzione nella presa dei morsetti utilizzati per bloccare il sistema Dome Matrix[®] alla cella di carico del dinamometro.

8.4.5 Studio di galleggiamento

8.4.5.1 Resultant weight di un sistema in configurazione a camera vuota

L'andamento della Resultant Weight nel tempo, per un sistema costituito da due moduli in configurazione a camera vuota, è illustrato in Figura 81. Nella prima parte della curva vi era un rapido incremento della spinta di galleggiamento (tra 0 e 100 minuti); inoltre un plateau in corrispondenza del massimo di 31.58 ± 2.74 mg che si protrae fino alla conclusione dell'esperimento a 350 minuti, è chiaramente visibile.

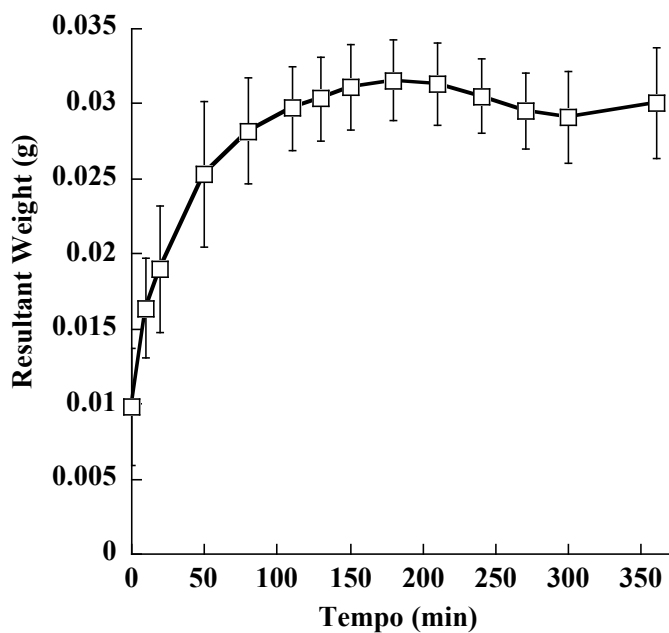


Figura 81: Andamento della Resultant Weight nel tempo per un sistema costituito da due moduli in configurazione a camera vuota. Le barre rappresentano l'errore standard della media, $n=3$.

8.4.6 Calcolo dei volumi dei sistemi Dome Matrix[®] durante gli esperimenti di Resultant weight

Per comprendere le cause dell'andamento della Resultant Weight nel tempo si è deciso di studiare le variazioni di densità che il sistema subisce durante l'immersione nel liquido che ne causa il rigonfiamento. Rifacendosi all'Equazione 6 la densità è stata calcolata tramite alla misura dei volumi.

$$d_s = d_f - \frac{F_{rw}}{V}$$

Come si può vedere dalle fotografie scattate durante la misurazione della spinta di galleggiamento (Figura 82), per tutta la durata dell'esperimento, si assiste ad un incremento di volume dovuto al rigonfiamento dell'HPMC contenuto all'interno del sistema. Dalle fotografie è stato calcolato l'aumento di volume assumendo che esso fosse isotropico.



Figura 82. Swelling degli assemblati Dome Matrix[®] in configurazione "a camera vuota"

Nella Figura 83 si può osservare l'incremento di volume in relazione alle variazioni di Resultant Weight. Il volume del sistema a 360 minuti è stato di $0.77 \text{ cm}^3 \pm 0.036$.

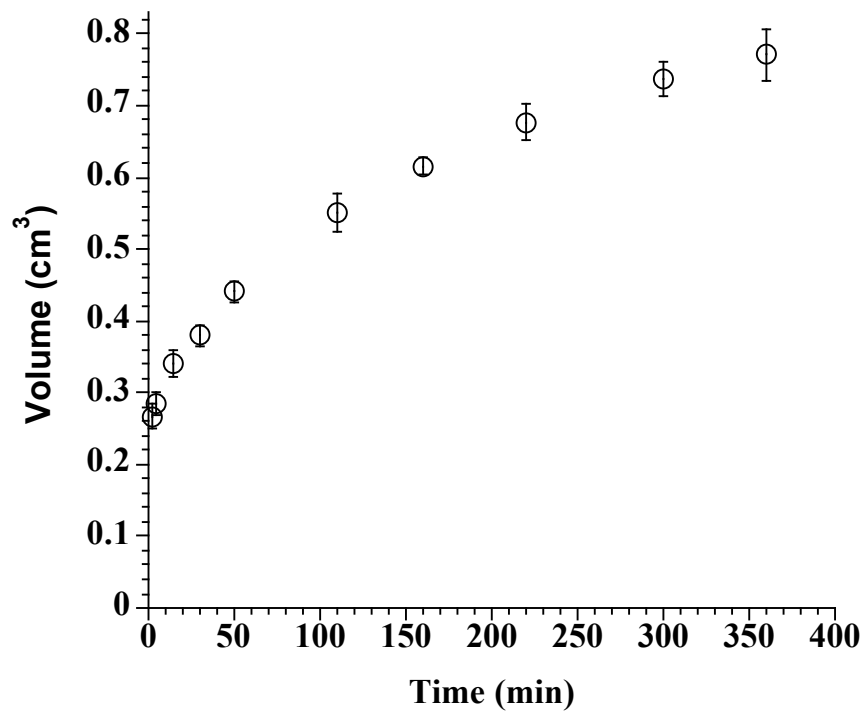


Figure 83:Variazione di volume del sistema costituito da due moduli in configurazione “a camera vuota”. Le barre rappresentano l’errore standard della media $n=3$.

Al termine dell’esperimento, una delle dome è stata sezionata per verificare se al suo interno fosse ancora presente una camera d’aria. Come si può osservare nell’ingrandimento presente in Figura 84, la camera interna è ancora presente dopo 360 min.

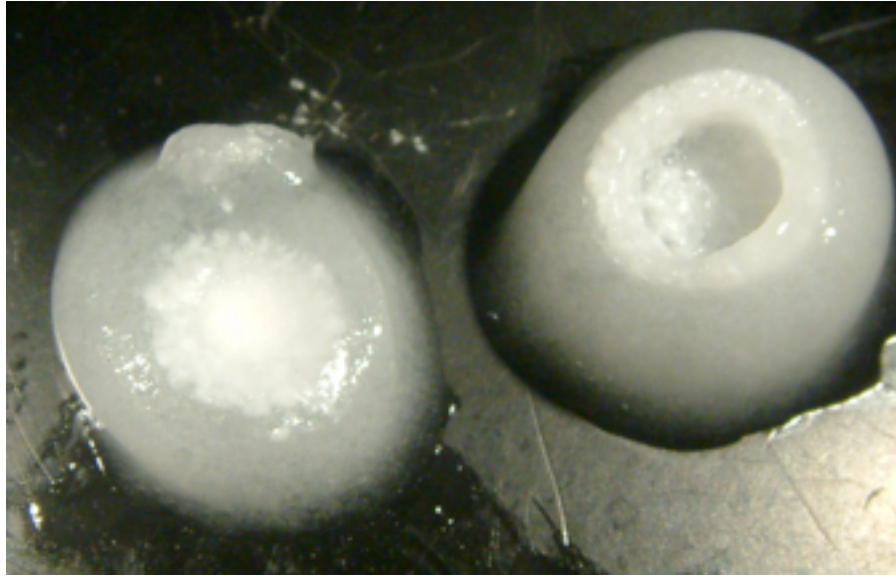


Figura 84. Sezione longitudinale di un assemblato Dome Matrix[®] in configurazione a camera vuota dopo 560 min in fluido gastrico simulato.

Dato il costante incremento di volume dovuto al rigonfiamento del polimero la variazione della Resultant Weight fu correlata con la variazione di densità. Nella figura 85 si osserva che il veloce incremento della Resultant Weight iniziale coincide con una veloce diminuzione di densità del sistema. La spinta di galleggiamento massima registrata viene spiegata dal minimo raggiunto dalla densità del sistema ($0.94 \text{ g/cm}^3 \pm 0.048$).

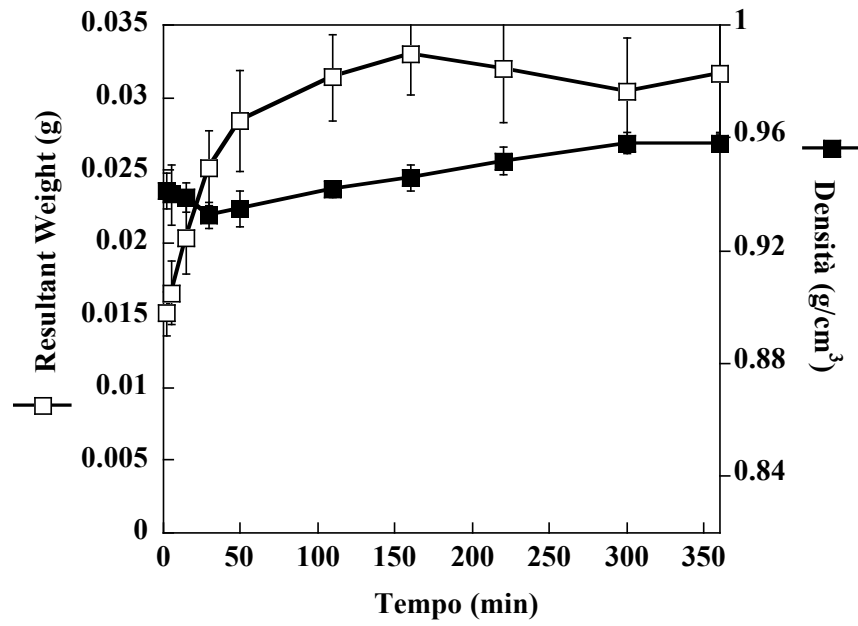


Figure 85. Variazione della densità del sistema costituito da due moduli in configurazione “a camera vuota” in relazione all’andamento della Resultant weight. Le barre rappresentano l’errore standard della media, n=3.

8.4.7 Formulazione di moduli a rilascio immediato di clindamicina fosfato e artesunato.

I moduli a rilascio immediato sono importanti per il corretto funzionamento del sistema antimalarico in quanto devono disgregare velocemente in modo da assicurare un pronto rilascio della dose dei farmaci. Nel caso del sistema terapeutico progettato, la velocità di disgregazione acquista maggiore importanza in quanto da essa dipende la rapidità con cui l'assemblato a camera vuota galleggia. I due moduli a rilascio immediato contenenti clindamicina fosfato e artesunato rispettivamente furono incastrati su entrambe le facce dell'assemblato void, in questa maniera una volta immerso nel medium di dissoluzione esso tendeva ad affondare; una rapida disgregazione era necessaria in modo da ridurre il tempo di affioramento dell'assemblato. Questo aspetto assume maggior importanza se pensiamo agli effetti in vivo: è noto infatti che la riduzione dei tempi di affioramento riduce la possibilità che la forma farmaceutica gastroflottante abbandoni lo stomaco prematuramente attraverso il piloro (41).

Tabella 23. Composizione delle formule a rilascio immediato di clindamicina fosfato e artesunato

Formula	Quantita (mg)						
	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7
Clindamicina fosfato	80	80	80	80	80	80	
Artesunato							50
Avicel PH102	31.75	31.75	31.75	12.5	31.75	14.8	53.4
Explotab	7.5					8.9	4.5
Kollidon CL		7.5		7.5	8		
Ludipress			7.5	19.25			
Pharmatose DCL11					32.89		
Encompress						35	
Amido						35	
Talco	5	5	5	5	4	7.4	3.4
Sodio dodici solfato							0.1
Magnesio Stearato	0.75	0.75	0.75	0.75	0.6	1	0.79
Totale	125	125	125	125	160	182.2	110

Al fine di valutare la formulazione in grado di disgregare più velocemente, è stato condotto il test di disgregazione su sei moduli per formulazione in 800 ml di fluido gastrico simulato senza enzimi (USP 30) per ognuna delle formulazioni.

Tutte le formulazioni disgregavano nei tempi imposti dalla F.U.I. XI Ed. e cioè 15 minuti. Nella Tabella 24 sono riportati i tempi medi di disgregazione per ogni formulazione (Tabella 23):

Table 24. Tempi di disgregazione dei moduli a rilascio immediato di clindamicina fosfato e artesunato n=6.

Formula	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	# 7
Tempo di disgregazione	6	4'40"	8'30"	5'	4'10"	2'	1'

La formulazione contenente clindamicina fosfato in grado si assicurare una pronta disgregazione era la formulazione 6 ottenuta granulando il principio attivo e l'amido con una soluzione di acqua deionizzata. Nel caso del modulo contenente artesunato la completa disgregazione avveniva in 1 minuto circa, questo a causa della presenza nella formulazione dei moduli di molti eccipienti insolubili in acqua. Nessun altro studio formulativo su i moduli contenenti artesunato fu condotto in quanto si ritenne sufficientemente rapido il tempo di disgregazione della formulazione n°7.

8.4.7.1 Dissoluzione dei moduli a rilascio immediato contenenti Artesunato

E' noto in letteratura come l'artesunato e più in generale i derivati dell'artemisinina siano particolarmente instabili di pH fortemente acidi (37). Al fine di verificare quanto rapido fosse la degradazione a pH 1.2 per l'artesunato una soluzione a concentrazione nota del principio attivo (0.04 mg/ml) in fluido gastrico simulato fu preparata e una quota di 100µl fu analizzata ogni 15 minuti.

Si osservò come già dopo 15 minuti si avesse una degradazione del principio attivo pari al 19.20% della concentrazione iniziale, mentre a 75 minuti la concentrazione di principio attivo si dimezzava (Figura 86).

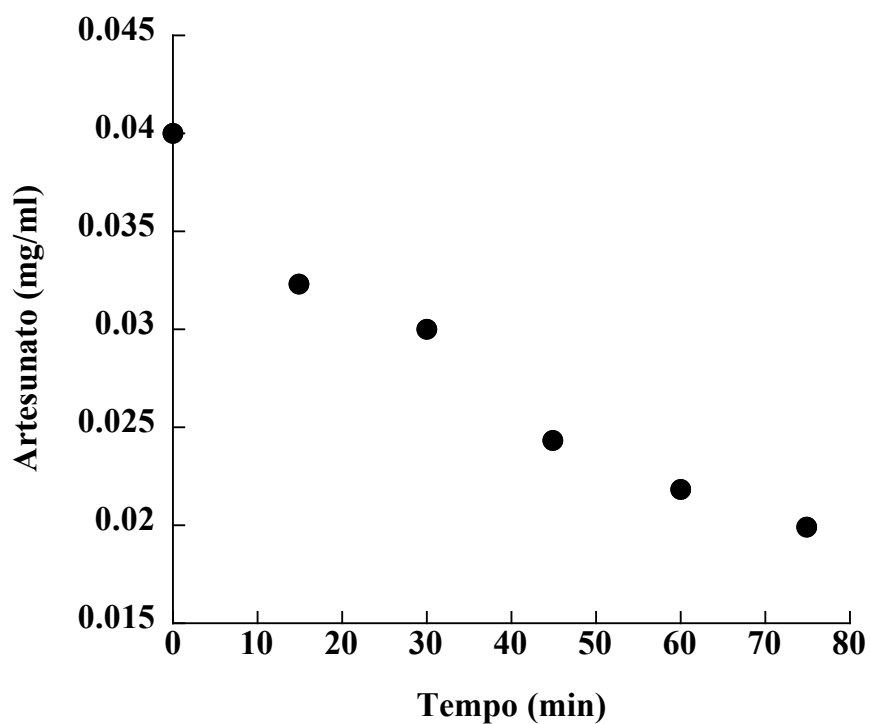


Figura 86. Profilo di degradazione di Artesunato in fluido gastrico simulato privo di enzimi.

A tale pH le condizioni per seguire il rilascio di farmaco dalla matrice risultavano non ottimali e per questo si decise condurre la dissoluzione a pH 3 dove il farmaco era più stabile. A causa della sua estrema insolubilità il test di dissoluzione fu condotto in flusso continuo aperto ad una velocità di flusso di 20 ml/min. I risultati mostrarono come l'80% percento del farmaco venisse liberato nei primi 30 minuti.

8.4.8 Sistema multi-cinetico e sito specifico per la terapia combinata antimalarica rilascio di Clindamicina fosfato e Artesunato

Dopo aver studiato i profili di dissoluzione dei diversi moduli a rilascio controllato ed immediato, il sistema multi cinetico fu assemblato e testato in vitro. Il sistema fu assemblato nel seguente modo: due moduli a rilascio controllato di clindamicina fosfato sono assemblati in configurazione a camera vuota mentre un modulo a rilascio immediato di artesunato e uno a rilascio immediato di clindamicina fosfato sono incastrati sulle facce convesse dell'assemblato in configurazione a camera vuota.

Lo studio di dissoluzione è stato condotto in flusso continuo in tampone a pH 3 ad un flusso di 20 ml/min.

Tutti e due i moduli a rilascio immediato disgregavano rapidamente liberando l'assemblato a rilascio modificato in configurazione a camera vuota. Nei primi 30 minuti veniva liberata un terzo della dose di clindamicina fosfato, mentre dopo appena 15 minuti la dose di artesunato era completamente disciolta; i due terzi della dose di clindamicina fosfato venivano in seguito rilasciati in maniera controllata nel tempo dall'assemblato in configurazione a camera vuota. (Figura 87)

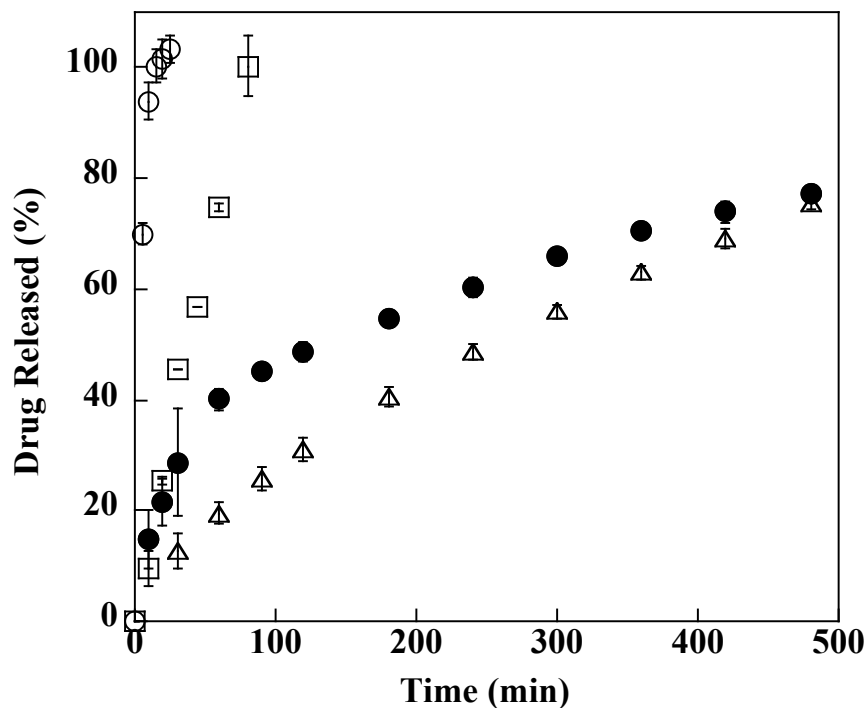


Figura 87: Profilo di dissoluzione del sistema terapeutico anti malarico, costituito da un modulo a rilascio immediato di clindamicina fosfato (○), un modulo a rilascio immediato di artesunato (□) e due moduli a rilascio controllato di clindamicina fosfato assemblati in configurazione a camera vuota (△). In grafico è rappresentata anche la curva cumulativa del rilascio di clindamicina fosfato dall'assemblato costituito dall'assemblato a configurazione a camera vuota e dal modulo a rilascio immediato di clindamicina fosfato (●).

Lo stesso sistema fu testato anche in fluido gastrico simulato nelle stesse condizioni utilizzate per lo studio dei moduli contenenti clindamicina fosfato e descritte in precedenza. Questo tipo di esperimento fu condotto per studiare il comportamento del

sistema multi cinetico anti malarico nelle condizioni in cui avrebbe dovuto trovarsi in vivo. Una volta immerso nel mezzo il modulo a rilascio controllato di Artesunato si libera immediatamente disgregandosi, mentre il modulo a rilascio immediato di clindamicina tendeva a rimanere attaccato al modulo a camera vuota per circa 3 minuti per poi disgregare e permettere ad esso di galleggiare. Dal grafico in figura 88 si può osservare come il differente pH e le differenti condizioni in cui il test di dissoluzione fu condotto non alteravano il profilo di rilascio del farmaco rendendo le curve sovrapponibili.

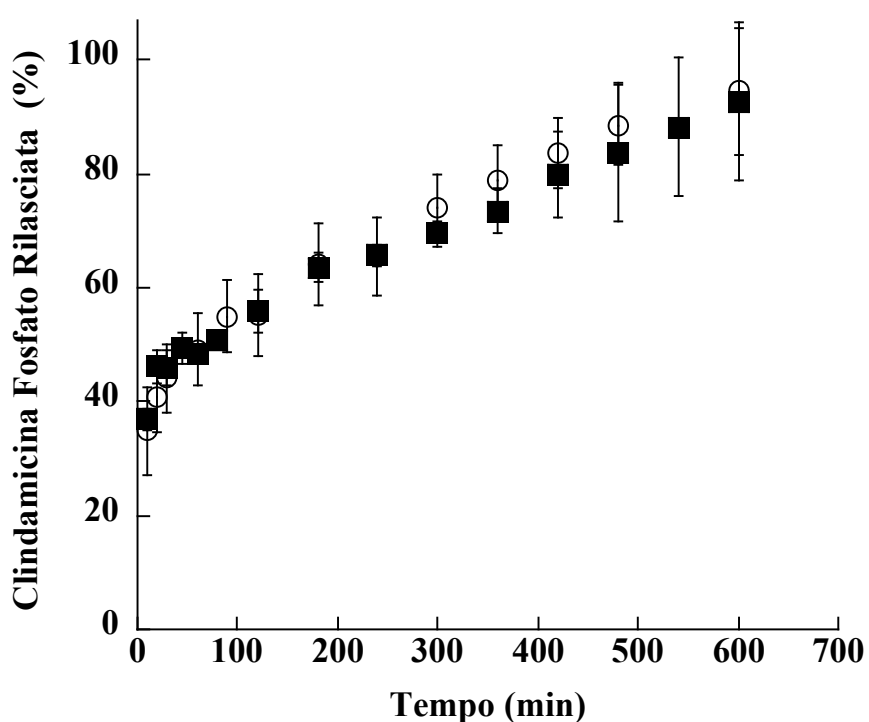


Figura 88: Curva cumulativa del rilascio di clindamicina fosfato dall'assemblato costituito dall'assemblato a configurazione a camera vuota e dal modulo a rilascio

immediato di clindamicina fosfato a pH 1.2 (○) nell' apparato II e a pH 3
(■)nell'apparato IV.

8.4.9 Profili plasmatici di Clindamicina fosfato in cani di razza beagle

Al fine di misurare i profili plasmatici di clindamicina fosfato liberata dal sistema terapeutico anti malarico fu condotto uno studio pilota in vivo su tre cani di razza beagle. La plasmatica di clindamicina fosfato liberata dall'assemblato costituito dal modulo a rilascio immediato e il moduli a rilascio controllato furono confrontati con la curva ottenuta somministrando capsule di clindamicina fosfato aventi pari dosaggio.

a) Disegno sperimentale

Tre cani del peso medio di 20kg furono usati nello studio. Prima della somministrazione, ai cani venne fornita una razione controllata di cibo di tipo commerciale, mentre fu assicurato libero accesso all'acqua. Lo studio fu diviso in due periodi, nel primo vennero somministrati i sistemi multi cinetici antimalarici, mentre nel secondo le capsule contenenti clindamicina fosfato; i due periodi furono intervallati da una settimana di wash out.

c) Test di dissoluzione delle capsule contenenti Clindamicina Fosfato

Le capsule contenenti di clindamicina fosfato furono testate in fluido gastrico simulato a pH 1.2. L'80% del farmaco veniva rilasciato entro i primi 15 minuti

d) Test in vivo

La concentrazione serica media di clindamicina fosfato per le capsule e i sistemi multi cinetici antimalarici sono presentati in Tabella 26. La concentrazione massima (C_{max}) misurata nel caso delle capsule fu registrata dopo 60' ed era pari a $5.06 \pm 0.97 \mu\text{g/ml}$,

mentre nel caso dei sistemi multi cinetici antimalarici la concentrazione rimaneva su $3\mu\text{g/ml}$ per circa 8 ore. (Figura 89)

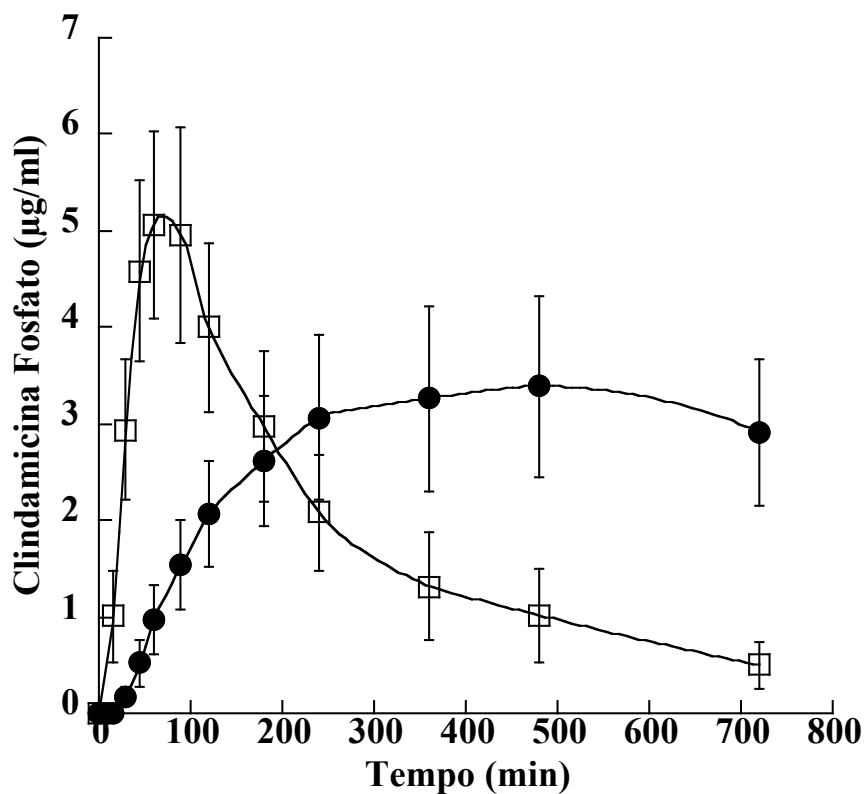


Figura 89: Curve plasmatiche di clindamicina fosfato dei sistemi anti malarici e di capsule somministrati a cani di razza beagle delle capsule e dei sistemi antimalarici. Le barre rappresentano l'errore standard della media, $n=3$.

Tabella 25. Valori di AUC_{0-700} in cani di razza beagle delle capsule e dei sistemi antimalarici.

	AUC_{0-700}	AUC_{rel}
Capsule	1336.235	
Sistemi multicinetici anti malarici	1957.075	1.46

Nel caso dei sistemi antimalarici fu registrata un aumento di AUC rispetto a quella ottenuta con le capsule; la biodisponibilità relativa mostrava un incremento a favore dei sistemi multi cinetici anti malarici di circa il 46% (Tabella 25).

Tabella 26. Tabella riassuntiva dei valori di concentrazione plasmatica in cani di razza beagle delle capsule e dei sistemi antimalarici.

Tempo dopo la somministrazione (min)	Concentrazione media serica (\pm SD) μ g/ml	Concentrazione media serica (\pm SD) μ g/ml
	Capsule	Sistema antimalarico
15	1.033 \pm 0.48	0 \pm 0
30	2.94 \pm 0.73	0.17 \pm 0.95
45	4.58 \pm 0.94	0.52 \pm 0.24
60	5.06 \pm 0.97	0.96 \pm 0.36
90	4.96 \pm 1.12	1.54 \pm 0.47
120	3.99 \pm 0.87	2.07 \pm 0.55
180	2.96 \pm 0.78	2.62 \pm 0.68
240	2.08 \pm 0.60	3.07 \pm 0.85
360	1.31 \pm 0.56	3.27 \pm 0.96
480	1.02 \pm 0.48	3.39 \pm 0.94
720	0.5 \pm 0.23	2.92 \pm 0.76

8.5 Conclusioni

La tecnologia Dome Matrix[®] grazie alla sua modularità e flessibilità consente la costruzione di assemblati multi-farmaco che comportano l'associazione di due o più farmaci, dimostrandosi utile alla semplificazione delle terapie complesse.

I moduli maschio di clindamicina per la loro particolare forma rilasciano il farmaco più lentamente rispetto ai moduli femmina in quanto la formazione dello strato di gel capace di controllare il rilascio di Clindamicina fosfato è diverso. L'assemblaggio dei due moduli in configurazione a camera vuota porta ad una riduzione della velocità di rilascio del farmaco a causa della riduzione delle superfici a contatto con il mezzo di dissoluzione, rispetto ai due moduli separati.

I moduli assemblati in configurazione a camera vuota sottoposti a trazione si separano dopo l'applicazione di una forza superiore a 1N; bagnando il sistema è possibile ottenere una maggiore resistenza alla separazione dei moduli che non si aprono a causa della formazione di uno strato di gel sulla superficie esterna dell'assemblato.

Il sistema anti malarico costituito da due moduli a rilascio controllato di Clindamicina uniti in configurazione a camera vuota, uniti ad un modulo a rilascio immediato di Clindamicina e ad un modulo a rilascio immediato di Artesunato, una volta immerso nel mezzo di dissoluzione, si comporta nella seguente maniera:

il sistema affonda rapidamente e il modulo a rilascio immediato di artesunato disgrega in meno di un minuto rilasciando in 30 minuti circa 80% della dose. Il modulo di clindamicina, anch'esso a rilascio immediato, disgrega in 3 minuti liberando così i due

moduli assemblati in configurazione a camera vuota e rilasciando in 10 minuti un terzo della dose totale somministrata. A seguito della disgregazione dei moduli esterni l'assemblato in configurazione a camera vuota viene distaccato dal sistema a quattro moduli raggiungendo una densità che gli consente di riemergere e galleggiare. Il resto della dose di clindamicina viene quindi rilasciata in maniera graduale per più di 10 ore.

I test preliminari in vivo condotti su tre cani di razza beagle ha mostrato che il sistema terapeutico Dome Matrix[®] anti malarico è in grado di aumentare la biodisponibilità (frazione assorbita) di circa il 46% rispetto a delle capsule a rilascio immediato; inoltre le concentrazioni plasmatiche di farmaco vengono mantenute più alte rispetto alla M.I.C per circa 10 ore rendendo tale sistema utilizzabile per una somministrazione due volte al giorno.