



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA**

**DIPARTIMENTO FARMACEUTICO**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOFARMACEUTICA-FARMACOCINETICA**

---

**MIGLIORAMENTO DELLE CARATTERISTICHE  
FARMACOCINETICHE E DELLA  
TOLLERABILITÀ DIGESTIVA DELLA  
DIACEREINA ATTRAVERSO MODIFICAZIONE  
DELLO STATO SOLIDO**

**Tutore:**

**Chiar.mo Prof. RUGGERO BETTINI**

**Relatore:**

**Chiar.mo Prof. CARMELO SCARPIGNATO**

**Coordinatore**

**Chiar.mo Prof. PAOLO COLOMBO**

**Tesi di dottorato:**

**ROBERTA MENABENI**

**XIII CICLO 2008-2010**

# Indice

<b>1.</b>	<b>Introduzione</b>	<b>1</b>
1.1	Osteoartrite	4
1.2	Diacereina – Reina	08
1.2.1	Meccanismo d’azione	08
1.2.2	Diacereina	11
1.2.3	Reina	12
1.3	Alluminio idrossido	13
1.4.	Sucralfato	17
<b>2.</b>	<b>Scopo della Tesi</b>	<b>21</b>
<b>3.</b>	<b>Materiali e Metodi</b>	<b>22</b>
3.1	Materiali	22
3.2	Metodi	23
3.2.1	Analisi di solubilità	23
3.2.2	Studio di interazione tra reina e sucralfato	23
3.2.3	Studio di interazione tra reina e alluminio idrossido	25
3.2.4	Spettrofotometria -UV	27
3.2.5	Analisi HPLC	29
3.2.6	NMR in fase liquida	31

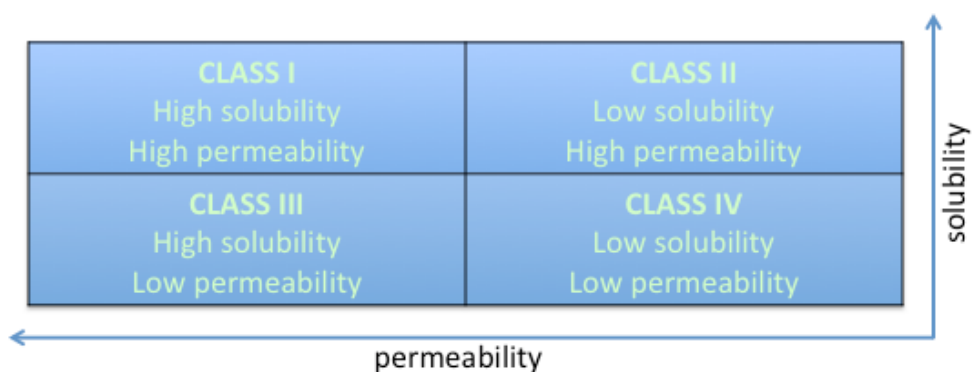
3.2.7	Diffrazione di raggi X su polvere (PXRD)	32
3.2.8	Calorimetria differenziale a scansione (DSC)	33
3.2.9	Microscopia ottica	34
<b>4.</b>	<b>Risultati e Discussione</b>	<b>35</b>
4.1	Convalida dei metodi di spettrofotometria UV	35
4.1.1	Reina in PBS	35
4.1.2	Reina in NaOH	37
4.1.3	Reina in Acqua	39
4.2	Convalida dei metodi HPLC	41
4.2.1	Sucralfato	41
4.2.2	Reina	43
4.3	$^1\text{H}$ NMR	45
4.4	Caratterizzazione dello stato solido delle materie prime	47
4.4.1	Microscopia ottica	47
4.4.2	Calorimetria differenziale a scansione (DSC)	49
4.4.3	Diffrazione di raggi X su polvere (PXRD)	50
4.5	Teoria di formazione dei complessi	51
4.5.1	Regola delle fasi	51
4.5.2	Diagrammi di solubilità di fase	53
4.5.3	Calcolo della stechiometria	58
4.5.4	Calcolo delle costanti di equilibrio	60
4.6	Solubilità di reina e di sucralfato	63

4.7	Interazione tra reina e sucralfato	65
4.7.1	Identificazione della interazione	65
4.7.2	Analisi dello spettro UV-vis	82
4.7.3	Analisi $^1\text{H}$ NMR	88
4.7.4	Interazione tra reina e alluminio idrossido	91
4.8	Caratterizzazione dello stato solido	93
4.8.1	Diffrazione di raggi X su polvere (PXRD)	93
4.8.2	Calorimetria differenziale a scansione (DSC)	94
4.8.3	Microscopia ottica	95
<b>5.</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>97</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>99</b>

# 1. Introduzione

Lo studio e il miglioramento dei parametri biofarmaceutici di una sostanza è uno dei pilastri su cui si fonda la ricerca farmaceutica. Composti con notevoli potenzialità terapeutiche mostrano, sempre più spesso, caratteristiche chimico-fisiche ma anche biologiche negative per cui il loro potenziale non è sempre completamente sfruttato in terapia. Il motivo di tale difficoltà è riconducibile principalmente a due fattori: il primo riguarda le inadeguate caratteristiche biofarmaceutiche dei farmaci (ovvero solubilità, permeabilità e velocità di dissoluzione), il secondo si riferisce invece agli effetti collaterali che essi manifestano. Questi due aspetti sono spesso collegati tra di loro; infatti nella maggior parte dei casi gli effetti collaterali di un principio attivo sono dose-dipendenti e variano col variare della dose [1]. Nel caso in cui un principio attivo sia poco solubile o presenti una scarsa permeabilità di membrana, è necessario incrementare la quantità di farmaco da somministrare al fine di raggiungerne un'adeguata concentrazione ematica efficace. L'aumento della dose di farmaco può tuttavia essere in alcuni casi devastante poiché l'entità degli effetti avversi potrebbe crescere in modo esponenziale. L'utilizzo del farmaco diventerebbe quindi problematico se non irrealizzabile. Si parla in questi casi di una ristretta finestra terapeutica in cui il farmaco è utilizzato solo per effettiva necessità oppure quando si manifestano intolleranze verso altri principi attivi della stessa specie [2]. L'obiettivo principale su cui si focalizza l'attenzione dei ricercatori è la sperimentazione di tecniche che permettano un miglioramento delle principali proprietà biofarmaceutiche dei farmaci in modo da ridurre drasticamente la dose efficace [3]. Dal 1995 il sistema di classificazione biofarmaceutica (BCS) si è mostrato essere di notevole aiuto ai ricercatori che si trovano di fronte a un numero sempre maggiore di molecole

problematiche perché insolubili o poco permeabili. Il sistema di classificazione biofarmaceutica raggruppa i farmaci in quattro classi (riportate in figura 1) secondo la loro solubilità acquosa e permeabilità gastrointestinale [4; 5].



**Figura 1.** Classi di suddivisione dei farmaci secondo BCS[6]

Questi parametri sono fondamentali per l'assorbimento e quindi l'efficacia clinica di un farmaco somministrato oralmente. Poiché i principi attivi devono essere disciolti per essere assorbiti nel tratto gastrointestinale, una bassa solubilità porta anche a una ridotta biodisponibilità. Inoltre, farmaci somministrati in forma farmaceutica solida devono disciogliersi al sito di assorbimento non solo in quantità adeguata ma anche ad una velocità adatta. Infatti, se il farmaco impiega troppo tempo per disciogliersi potrebbe non riuscire ad esplicare il suo effetto, potendo essere inattivato o liberato dalla forma farmaceutica dopo aver superato il sito ottimale di assorbimento. Inoltre, il composto deve possedere un'adeguata permeabilità di membrana che gli permetta di passare nel circolo sistemico. E' per questi motivi che si rende necessario focalizzare l'attenzione sul miglioramento del profilo farmacocinetico dei farmaci.

Diverse sono le tecniche adottate per incrementare la solubilità di principi attivi insolubili (procedimenti meccanici, chimici) [7] ma quelle più promettenti e su cui si focalizza maggiormente l'attenzione riguardano la manipolazione dello stato solido

(co-cristalli, ricerca di polimorfi, fasi solvate o amorfe) [8; 9] o le formulazioni con base polimerica o lipidica [10]. Per questa via si tende, e in molti casi si riesce, a raggiungere l'obiettivo ideale consistente in un incremento dell'assorbimento dei farmaci, attraverso il miglioramento delle caratteristiche biofarmaceutiche del principio attivo; il che risulta essere un ottimo espediente per somministrare il farmaco a dosi ridotte giacché, in tal modo, il principio attivo raggiunge il circolo sistemico in proporzioni maggiori. La diminuzione della dose somministrata si traduce anche in un proporzionale decremento degli effetti collaterali del farmaco dose-dipendente, effetti che, peraltro, possono essere annullati in molti casi con particolari interventi tecnologici. Esiste per esempio la capacità di composti specifici di mascherare gli effetti collaterali con la somministrazione di associazioni di farmaci (per esempio i farmaci anti-infiammatori non steroidei con composti protettori dello stomaco) oppure con vie di somministrazione alternative che by-passino la zona di manifestazione dell'effetto avverso (iniezione di farmaci o rilascio in situ).

Inoltre l'instaurarsi di un effetto collaterale potrebbe essere contrastato anche in modo più specifico, andando ad agire cioè sulla sostanza nel sito e nel momento in cui provoca il disturbo. A tale proposito è sfruttata nell'ambito farmaceutico la capacità di composti specifici di sequestrare principi attivi quando la loro attività non è desiderata. Questo tipo di espediente è molto utilizzato nelle intossicazioni provocate da farmaci, in cui molecole o strutture molecolari sono utilizzate per legare e quindi disattivare la sostanza causa di tossicità. I meccanismi con cui queste sostanze leganti agiscono sono diversi ma il procedimento che si osserva più frequentemente è la formazione di complessi tra la sostanza depurante e il tossico[11-13]. Diversi tipi di forme farmaceutiche sono stati allestiti per sfruttare al meglio la capacità dei composti

leganti. Liposomi, nanocapsule, formulazioni lipidiche, consentono di ottenere un effetto rapido e specifico nella zona desiderata per il sequestro.

Normalmente questi accorgimenti sono utilizzati nel caso di malattie croniche nelle quali l'assunzione di farmaci deve essere costante e duratura (per esempio per malattie autoimmuni, infiammazioni croniche, terapie ormonali). La continua somministrazione di composti farmaceutici può infatti a lungo andare inasprire effetti collaterali tipici o addirittura provocarne la manifestazione di nuovi, con conseguente peggioramento della qualità di vita del paziente.

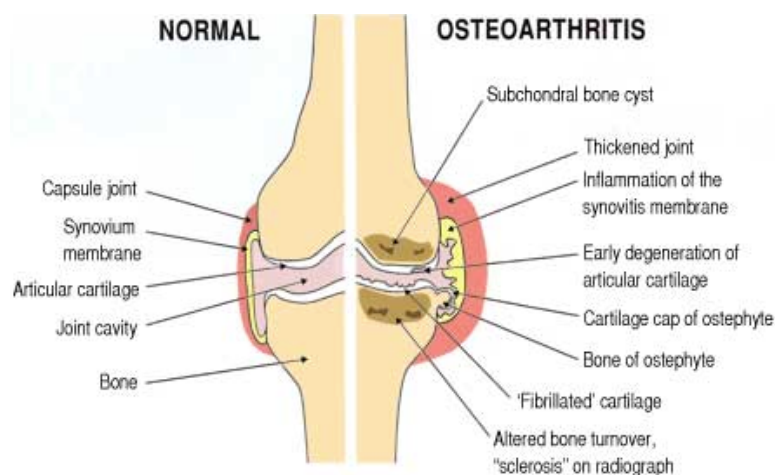
## **1.1 Osteoartrite**

L'osteoartrite è una malattia cronica caratterizzata da una degenerazione progressiva della cartilagine articolare accompagnata da infiammazione della membrana sinoviale e deformazione ossea [14]. L'incidenza dell'osteoartrite in alcuni paesi europei è stata stimata essere di circa il 18-25% negli uomini e 24-40% nelle donne in un'età compresa tra i 55 e i 74 anni [15].

La cartilagine articolare grazie alla sua elasticità e resistenza esercita una funzione di sostegno che permette i movimenti articolari. Essa è costituita da cellule, chiamate condrociti, che producono una sostanza costituita prevalentemente da acqua, fibre collagene, proteoglicani, acido ialuronico e glicoproteine. Normalmente l'articolazione è formata da due estremità ossee separate da uno spazio, chiamato cavità articolare. Le due estremità terminano con un "cuscinetto" di cartilagine. Tutta l'articolazione è rivestita dalla membrana sinoviale che prende il nome dal liquido che contiene, la sinovia, che ha funzione di lubrificante.

La degradazione della cartilagine è causata principalmente da un'alterazione del metabolismo dei condrociti articolari[16]. Molti studi evidenziano l'influenza di particolari molecole infiammatorie, le quali sono responsabili dell'aumento dei processi cellulari di decomposizione della matrice cartilaginea rispetto a quelli biosintetici [17].

In figura 2 è rappresentata schematicamente un'articolazione divisa in due parti, una che la rappresenta sana, l'altra in cui sono evidenziati i punti colpiti dall'osteoartrite.



**Figura 2.** Rappresentazione schematica dell'articolazione del ginocchio in condizioni normali (sinistra) e colpito da osteoartrite (destra)

Le principali molecole infiammatorie responsabili della complicazione della malattia sono risultate essere l'interleuchina 6 (IL-6), il tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), il monossido di azoto (NO), le prostaglandine (PG), le specie reattive dell'ossigeno (ROS) ma soprattutto l'interleuchina 1 (IL-1). [18-22]. Questa citochina ricopre un ruolo essenziale nell'osteoartrite poiché attiva diversi processi che portano alla degradazione della cartilagine articolare.

L'IL-1 agisce a livello nucleare promuovendo la trascrizione di un oligonucleotide che contiene la sequenza per la sintesi di un particolare fattore nucleare, il *fattore nucleare kappa (NF-kB)*. Questo fattore nucleare promuove la trascrizione di RNA che codifica per la produzione di composti proteici dell'infiammazione (citochine, fattori di crescita, molecole di adesione). La promozione della trascrizione di NF-kB avviene indirettamente attraverso l'inibizione di un enzima chiamato I $\kappa$ B- $\alpha$  che normalmente ha il compito di inibire la sintesi di NF-kB.

Un'ulteriore azione, esercitata dall'IL-1 in cellule quali condrociti o sinoviociti, è quella dell'induzione dell'espressione del gene per la sintesi dell'isoforma inducibile dell'enzima ossido nitrico-sintasi (iNOS). Questo processo porta all'aumento della produzione di NO che esercita diversi effetti catabolici per inibizione della sintesi di collagene e proteoglicani e induzione di apoptosi. L'IL-1 induce inoltre la sintesi di pro-matrice metallo-proteasi (pro-MMPs), i precursori dell'enzima matrice metallo-proteasi (MMPs) che contribuisce significativamente alla distruzione della cartilagine articolare stimolando la degradazione dei proteoglicani. Il numero di questi enzimi degradanti aumenta ulteriormente quando le citochine infiammatorie diminuiscono l'espressione degli inibitori tissutali delle metallo proteasi (TIMPs) che normalmente esplicano una funzione di controllo sulla produzione di MMPs.

Un'azione importante nel processo infiammatorio dell'articolazione è svolta altresì dai radicali attivi dell'ossigeno (ROS) la cui formazione da parte della cellula è pure promossa dalle citochine dell'infiammazione. Essi sono responsabili sia dell'induzione all'apoptosi nei condrociti che dell'induzione delle collagenasi articolari.

Il trattamento farmacologico dell'osteoartrite impiegato fino ad oggi consiste nella somministrazione di farmaci analgesici ed anti-infiammatori i cui obiettivi riguardano la diminuzione dei sintomi della malattia (dolore, instabilità articolare e gonfiori localizzati). I composti ad oggi utilizzati con maggior successo appartengono alla famiglia dei farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS). Tuttavia il loro utilizzo nella terapia a lungo termine è difficilmente tollerato a causa degli effetti collaterali gravi di questa classe di farmaci come intolleranza gastro-intestinale, tossicità epatica e renale e disturbi sulla coagulazione del sangue. La causa della loro dannosità deriva dal fatto che agiscono come inibitori degli enzimi ciclo-ossigenasi (COX) che catalizzano la sintesi di prostaglandine.

In alcuni casi di alta intolleranza o inefficacia dei FANS essi possono essere sostituiti in terapia con altri farmaci analgesici come il tramadolo o gli oppiacei, utilizzati solo per periodi limitati poiché causano tolleranza e dipendenza. Una cura alternativa riguarda la somministrazione sia intraarticolare sia orale di glucocorticoidi, che però è attuata solamente per il trattamento di episodi di dolore acuti a causa dei gravi effetti collaterali di questa classe di farmaci. Tutti questi principi attivi hanno lo scopo di alleviare il dolore provocato dall'infiammazione artritica ma non hanno effetto sui meccanismi di degradazione della matrice cartilaginea.

Una categoria più nuova e ampia di principi attivi utilizzati per il trattamento dell'osteoartrite riguarda i farmaci DMARDs (disease-modifying anti-arthritic drugs) che comprendono diverse classi di composti con differenti meccanismi d'azione. Queste sostanze sembrano essere molto vantaggiose perché agiscono modificando i processi promotori della malattia. All'interno dei DMARDs sono compresi gli inibitori di enzimi metallo-proteasi, fattori di crescita e citochine modificate, sostanze per

terapia genica, anticorpi monoclonali ma anche molecole più semplici come zuccheri, polisaccaridi e derivati antrachinonici [15; 23]. Quest'ultimo gruppo di sostanze ha mostrato interessanti aspetti per quanto riguarda la cura dell'osteoartirte.

La diacereina e il suo metabolita attivo reina sono utilizzati per la cura sintomatica dell'osteoartrite ma anche per il recupero funzionale dell'articolazione grazie alla loro capacità di ridurre e ritardare la degradazione dei condrociti della cartilagine [22; 24; 25]. La diacereina possiede un meccanismo anti-infiammatorio che agisce su diversi parametri dell'infiammazione. Questo meccanismo d'azione è differente rispetto ai farmaci anti-infiammatori tradizionali e quindi consente di evitarne anche tutti gli effetti collaterali.

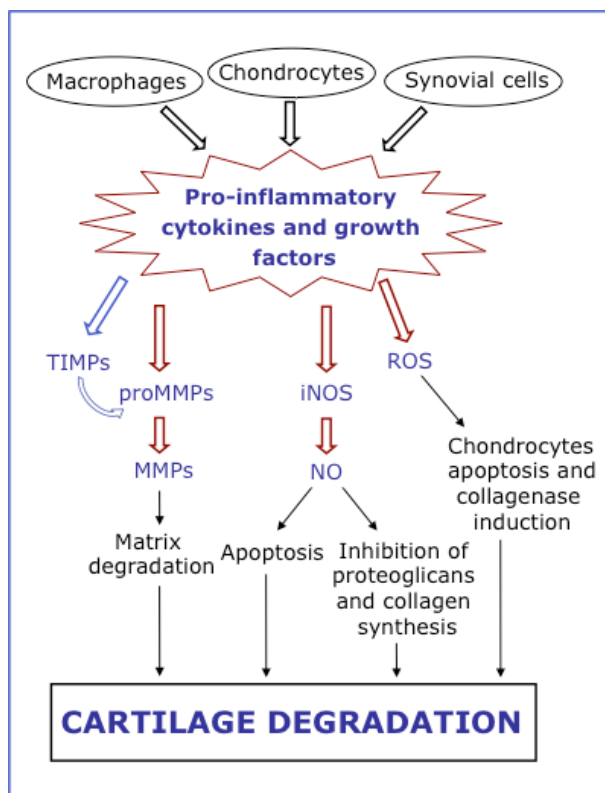
## **1.2 Diacereina – Reina**

### **1.2.1 Meccanismo d'azione**

La diacereina e la reina si sono mostrate in grado di diminuire i principali processi che portano alla degenerazione della cartilagine articolare. Il loro meccanismo d'azione si basa sull'inibizione della produzione di IL-1 mentre non mostra alcun effetto di inibizione sulle fosfolipasi-A<sub>2</sub>, sulle ciclo-ossigenasi e sulla 5-lipossigenasi e quindi sulla produzione di prostaglandine e leucotrieni[26]. Il meccanismo d'azione della reina a livello cellulare non è ancora ben chiaro, comunque esse sopprimono

l'attivazione di NF- $\kappa$ B indotta dalla degradazione di I $\kappa$ B- $\alpha$  e inibiscono l'espressione della iNOS a livello della trascrizione [18] [21].

In figura 3 è riportato uno schema che rappresenta le principali vie responsabili della degradazione articolare sulle quali agiscono la diacereina e la reina, attivate da citochine infiammatorie e da fattori di crescita.



**Figura 3.** Principali processi responsabili della degradazione della cartilagine articolare. Le frecce in rosso indicano un'azione di induzione nella produzione di enzimi e sostanze promotrici dell'infiammazione mentre le frecce in blu indicano un'azione di inibizione degli enzimi che diminuiscono la sintesi di metallo proteasi.

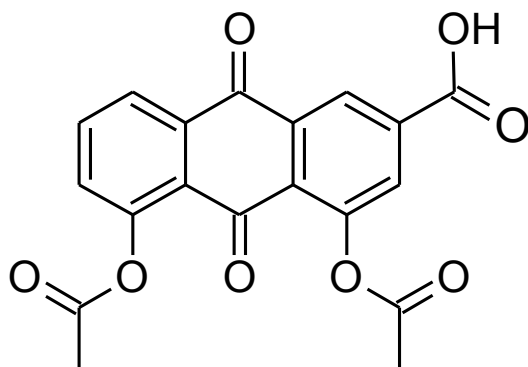
E' stato dimostrato che la diacereina inibisce la sintesi di proteoglicani indotta da IL-1 e inoltre ne limita la degradazione da parte delle MMPs[27].

La sintesi dei precursori di queste proteasi (proMMPs) infatti è ridotta dalla diacereina e dalla reina che, oltretutto, aumentano la produzione degli inibitori tissutali delle MMPs (TIMPs). Interessanti analisi sulla diacereina hanno inoltre mostrato che essa è in grado, assieme al suo metabolita, di inibire la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che si formano a seguito dell'infiammazione articolare e che sono responsabili dell'induzione all'apoptosi nei condrociti e dell'induzione delle collagenasi articolari. Inoltre è stato studiato un'effetto di rigidità nella fluidità della membrana dei linfociti dovuta alla perossidazione dei lipidi da parte dei radicali superossido nei pazienti con osteoartrite. Questa particolarità può causare oltre ad alterazione nella permeabilità di membrana dei linfociti, anche un peggioramento nelle attività delle proteine di membrana[28]. Si può quindi affermare che la diacereina possiede un'azione antiartritica e condroprotettiva prevenendo la distruzione della cartilagine e diminuendo i livelli di citochine pro-infiammatorie[19-22; 27; 29].

Per quanto riguarda l'attività analgesica del farmaco, studi *in vivo* su topi hanno provato che essa è in grado di inibire l'allodinia sia meccanica che indotta da somministrazione di carragenina nell'articolazione [30]. L'effetto analgesico prodotto dal trattamento con diacereina è risultato essere paragonabile a quello generato dai FANS [31].

Come già accennato la diacereina non manifesta l'effetto collaterale gastro-lesivo tipico dei FANS, al contrario le è stata attribuita una modesta funzione protettiva dello stomaco dimostratasi efficace nelle ulcerazioni indotte da indometacina [29].

### 1.2.2 Diacereina



**Figura 4.** Formula di struttura della diacereina

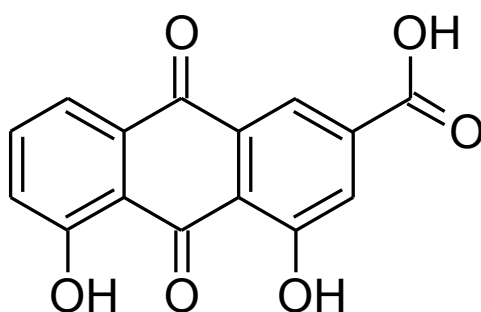
La diacereina (4,5-diacetilossi-9,10-diossiantracene-2-carbossi acido) possiede la formula di struttura indicata in figura 4 ed è un composto di semisintesi che deriva dalla diacetilazione degli OH della reina in posizione 1 e 8. Essa appare come una polvere giallognola e cristallina e possiede un punto di fusione di circa 218 °C. La diacereina è poco solubile in acqua, in metanolo cloroformio e negli acidi mentre è solubile negli alcali e in dimetilsolfossido (DMSO) [32].

La diacereina è classificata come un farmaco anti-artritico ad azione lenta in molti paesi del mondo. Normalmente è somministrata per via orale a una dose giornaliera di 50-100 mg al giorno a stomaco pieno poiché la presenza di cibo ne aumenta l'assorbimento. La diacereina viene assorbita principalmente nella prima parte dell'apparato gastrointestinale (stomaco ed intestino tenue) ed è interamente metabolizzata a reina da parte di enterociti ed epatociti prima che raggiunga il circolo sistemico. Il raggiungimento della concentrazione di picco è abbastanza lento, infatti dopo una somministrazione di 50 mg, la concentrazione massima di circa 3 mg/L è

raggiunta approssimativamente in 2 ore e mezza [33]. Somministrazioni consecutive permettono di mantenere la concentrazione di farmaco nel sangue a livelli più alti di steady state.

Studi clinici su pazienti hanno mostrato che la diacereina possiede un effetto di analgesia sul dolore osteoarticolare significativo e paragonabile a quello esercitato dai FANS. Inoltre questo effetto benefico è prolungato anche dopo sospensione della somministrazione grazie a un effetto di carry-over [34]. La diacereina si è mostrata anche in grado di favorire il recupero funzionale dell'articolazione ed è stata giudicata positivamente anche dai pazienti per quanto riguarda la sua efficacia[35].

### 1.2.3 Reina



**Figura 5.** Formula di struttura della reina

La reina (4,5-diidrossiantrachinone-2-carbossi acido) possiede la formula di struttura indicata in figure 5 ed è un alcaloide antrachinonico presente in diverse piante come l'aloè, il rabarbaro, la senna. Essa appare come una polvere fine giallo scuro e cristallina e possiede un punto di fusione di circa 322 °C. La reina è poco solubile in acqua, in alcol e negli acidi mentre è solubile negli alcali e in dimetilsolfossido (DMSO) [36].

La reina manifesta la sua funzione anti-artritica dopo assorbimento nel circolo sistemico. La reina penetra molto bene nel liquido sinoviale, dove raggiunge una concentrazione paragonabile a quella plasmatica. La reina nel sangue si lega per circa il 99% alle proteine plasmatiche come albumina e anche  $\gamma$ -immunoglobuline. Tuttavia non si sono mai osservati fenomeni di saturazione o spiazzamento da parte della reina, al contrario dei FANS che spiazzano facilmente altri farmaci legati alle proteine plasmatiche. Per questo motivo la reina non presenta interazioni con altri farmaci.

Essa è eliminata principalmente per via renale sia come reina libera che come coniugato solfato e coniugato glucuronide in percentuali di 19.5 %, 18.5 % e 62 % rispettivamente. Concentrazioni di reina e suoi coniugati sono stati determinati nelle feci ma a una concentrazione molto bassa dello 0.4 %. La via di eliminazione renale impartisce alle urine una tipica colorazione giallastra del tutto innocua. La diacereina che rimane nel lume intestinale (circa il 60 %) viene metabolizzata a livello del colon in reina che è a sua volta convertita dalla flora batterica per ossidazione.

L'efficacia della diacereina nella terapia dell'osteoartrite è ormai consolidata ma il suo utilizzo in terapia resta comunque limitato. Le cause principali che non permettono un utilizzo sicuro di questo farmaco sono principalmente due: la sua scarsa solubilità in acqua e l'attività lassativa che la reina svolge a livello del colon. La limitata solubilità della diacereina ne limita l'assorbimento nel tratto gastro-intestinale, infatti la sua biodisponibilità è compresa tra il 35-56 % [33]. Questa particolarità rende necessaria la somministrazione di una dose consistente di farmaco per ottenerne un livello efficace nel fluido sinoviale dell'articolazione. La quantità consistente di diacereina che rimane nel lume intestinale (circa il 60 %) è metabolizzata a reina la quale viene

trasformata in composti sennosidici molto irritanti che ne provocano il suo principale effetto collaterale lassativo. Poiché la responsabile di questa trasformazione è la flora batterica, la quantità di derivati sennosidici prodotta dipende fortemente dalla composizione della flora microbica di ciascun individuo, caratteristica che conferisce una fortissima variabilità individuale.

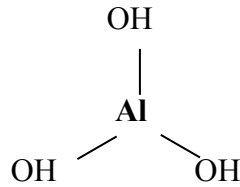
Un miglioramento della tollerabilità digestiva e delle caratteristiche biofarmaceutiche della diacereina sono quindi necessari per renderla utilizzabile in terapia. Come accennato nella prima parte dell'introduzione esiste la possibilità di sfruttare operazioni tecnologiche per ridurre o addirittura eliminare le caratteristiche negative di un principio attivo. Nel caso della diacereina la necessità di sopprimere il suo principale effetto avverso è uno dei primi obiettivi da raggiungere per rendere il prodotto utilizzabile in tempi brevi. Poiché anche una scarsa quantità di metabolita può provocare irritazione a livello del colon, è necessario che la reina non raggiunga quella parte di intestino nemmeno in piccole dosi. Uno dei potenziali approcci utili per realizzare questo scopo può essere sicuramente la modificazione dello stato solido al fine di promuovere un assorbimento completo della diacereina che quindi è totalmente eliminata dal lume gastrointestinale e non arriva a livello del colon.

Esiste l'opportunità di preparare forme farmaceutiche che permettano di mantenere il farmaco più a lungo nella parte superiore dell'apparato gastro-intestinale. Questa proprietà può essere ottenuta attraverso l'allestimento di strutture che permettano alla forma farmaceutica di galleggiare sopra al contenuto gastrico. Un metodo molto promettente consiste nell'assemblaggio di moduli a forma di "cupola" (dome) [37] che creano al loro interno una cavità vuota che permette alla forma farmaceutica finale

(della grandezza di una capsula 00) di galleggiare sul contenuto gastrico[38]. I moduli che compongono la forma farmaceutica possono essere preparati con eccipienti che influenzino il rilascio del principio attivo. Questa caratteristica unita alla maggiore permanenza della formulazione in situ consente di generare un profilo di rilascio ottimale del farmaco nel lume gastrico. Questo approccio porterebbe al raggiungimento di un consistente assorbimento del farmaco.

Un approccio promettente è quello attuato nelle pratiche detossificanti in caso di avvelenamento da farmaci. Questo metodo molecola-specifico potrebbe essere un'ottima soluzione per l'eliminazione dell'effetto collaterale della reina nel colon. La formazione in situ di un composto di interazione tra la reina e una sostanza legante con formazione di un addotto molecolare non solubile e non assorbibile permetterebbe di evitarne l'effetto lassativo. In questo caso sarebbe di notevole aiuto l'allestimento di una forma farmaceutica che consenta il rilascio della sostanza legante nel sito specifico ovvero nel colon. Questo artificio è già notevolmente sfruttato nella pratica farmaceutica per migliorare l'efficacia di quei farmaci che agiscono a livello intestinale. Esistono numerosi carrier che permettono di condizionare il rilascio di farmaci sia per quanto riguarda la velocità ma anche il sito di azione[39; 40]. Le sostanze più comunemente utilizzate a tale scopo sono polimeri polisaccaridici [41; 42]. Questo tipo di sostanze protegge la forma farmaceutica ai pH acidi dello stomaco e del primo intestino, mentre dissolvono o disgregano al pH più neutro del colon provocando il rilascio del principio attivo.

### 1.3 Alluminio Idrossido

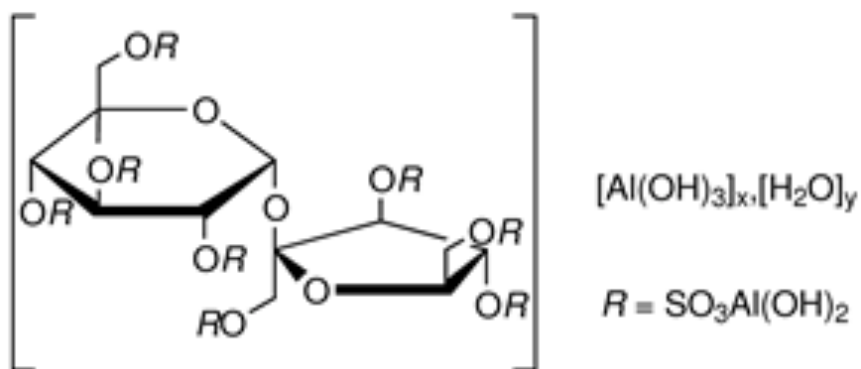


**Figura 6.** Formula di struttura dell'alluminio idrossido

L'alluminio idrossido possiede la formula di struttura indicata in figura 6. Esso appare come una polvere bianca più o meno fine e quasi amorfa, con punto di fusione intorno ai 300 °C. L'alluminio idrossido è praticamente insolubile in acqua e in alcool ma solubile in acidi minerali diluiti e in idrossidi alcalini. Anch'esso, come il sucralfato, viene utilizzato in terapia nel trattamento dell'ulcera ma soprattutto come antiacido. L'idrossido di alluminio ad alte dosi possiede effetto costipante poiché rallenta la velocità dello svuotamento gastrico e inibisce la peristalsi intestinale (per questo è solitamente associato ad altri antiacidi come magnesio solfato o carbonato). L'alluminio idrossido è inoltre indicato per neutralizzare l'ipercloridria poiché nello stomaco forma alluminio cloruro a contatto con acido cloridrico. Poiché esso è anche in grado di assorbire i fosfati, viene utilizzato in quei casi in cui è necessario ridurre la loro concentrazione ematica. I fosfati di alluminio sono insolubili in acqua e vengono eliminati con le feci. L'idrossido di alluminio può interferire con l'assorbimento di alcuni farmaci sia attraverso il cambiamento del pH e della velocità di svuotamento gastrici che per diretto adsorbimento dei principi attivi, i quali non raggiungono così la circolazione sistemica[43]. Anche l'alluminio idrossido come il sucralfato ha mostrato la capacità di sequestrare principi attivi attraverso la loro complessazione. In

particolare antibiotici come i fluorochinoloni sono tipicamente sensibili alla presenza dell'alluminio idrossido che interagisce con il principio attivo formando un chelato. In questo modo l'attività del farmaco è bloccata infatti si sconsiglia l'utilizzo di antiacidi a pazienti in cura con i fluorochinoloni [44]. La capacità dell'alluminio idrossido di formare complessi è sfruttata con successo anche per la purificazione delle acque. Esso interagisce infatti anche con gli ioni di metalli pesanti presenti nelle acque inquinate formando complessi per adsorbimento [45].

#### 1.4 Sucralfato



**Figura 7.** Formula di struttura del sucralfato

Il sucralfato (Esadeca- $\mu$ -idrossitetraosaidrossi [ $\mu$ 8-[1,3,4,6-tetra-O-solfo- $\beta$ -D-fruttofuranosil- $\alpha$ -D-glucopiranoside tetrakis (idrogeno solfato)8-] esadecaalluminio [46]) possiede la formula di struttura indicata in figura 7 ed è un sale alluminico del saccarosio ottachis idrogeno solfato. Esso appare come una polvere fine bianca e amorfa e quindi non possiede un punto di fusione. Il peso molecolare del sucralfato è variabile poiché dipende dalla quantità di molecole di alluminio idrossido e acqua legate al suo interno. Normalmente si utilizza come peso molecolare standard 2086,74

g/mol. Il numero di molecole d'acqua che solitamente entrano a far parte della struttura del sucralfato (indicato con  $y$  in figura 6) può essere compreso tra 22 e 31 mentre il numero delle molecole di alluminio idrossido (indicato con  $x$  in figura 6) tra 8 e 10.

In terapia è principalmente utilizzato nella prevenzione e nel trattamento dell'ulcera gastrica e duodenale e come protettivo della mucosa gastrointestinale. Studi più recenti hanno proposto il sucralfato anche nel trattamento della colite ulcerante per somministrazione diretta nel colon ma anche in sospensione orale per la prevenzione di mucositi e infiammazioni rettali dovute a una radioterapia oncologica[47; 48]. Il sucralfato è somministrato sia da solo che in associazione con altri farmaci per prevenirne gli effetti collaterali (come protezione gastrica durante il trattamento coi FANS o coi farmaci rilassanti la muscolatura liscia che possono causare reflusso gastro-esofageo) oppure come coadiuvante (insieme ad antibiotici per contrastare la gastrite indotta dall'infezione) [49]. La sua dose giornaliera massima è di 4 grammi suddivisi in due o tre somministrazioni prima dei pasti poiché il cibo interferisce con la sua azione, oppure la sera prima di coricarsi. La presenza del sucralfato sul mercato è forte sia per quanto riguarda le formulazioni in polvere (Antepsin<sup>®</sup>, Sucralfin<sup>®</sup>, Sucramal<sup>®</sup>, Sucralfato Teva<sup>®</sup>, Sucralfato Pliva<sup>®</sup>) che per la forma in gel (Gastrogel<sup>®</sup>, Citogel<sup>®</sup>): quest'ultima possiede caratteristiche di prolungata bioadesività e quindi assicura un effetto clinico di protezione protratto[50]. La sua efficacia terapeutica è dovuta al fatto che in ambiente acido l'alluminio idrossido si dissocia dalla porzione della molecola di saccarosio octasolfato il quale polimerizza dando origine a un gel viscoso. Questo gel si lega attivamente alla mucosa gastro-intestinale ma anche alle proteine e ai leucociti presenti alla base dell'ulcera formando così una barriera contro

l'acidità gastrica, la pepsina e i sali biliari. Oltre all'effetto protettivo di barriera il sucralfato a pH 2 inibisce l'attività della pepsina sia per effetto tampone che per assorbimento di ioni idrogeno [51].

Il sucralfato si è mostrato utile anche nella cura di patologie gastrointestinali non correlate ad acidità come coliti ulcerative o danni alla mucosa del colon [52]. Esso svolge la sua azione localmente: infatti non viene assorbito nel tratto gastrointestinale, sia per le sue dimensioni ma anche per le numerose cariche positive che caratterizzano gli idrossidi di alluminio che lo compongono. Sebbene il sucralfato sia in genere ben tollerato, esso può determinare stipsi, disturbi gastrointestinali (nausea, pesantezza), secchezza della bocca o leggeri disturbi della pelle. Nonostante si presenti come una polvere amorfa, il sucralfato è praticamente insolubile in acqua, mentre si scioglie invece abbastanza facilmente in acidi o basi forti. Quando viene messo a contatto con acido cloridrico, il sucralfato dapprima forma una dispersione che con aggiunta di ulteriore acido dà origine ad aggregati e granuli più o meno grandi. L'aumento della concentrazione di acido cloridrico rende le particelle aggregate soffici fino a formare un gel. Continuando l'aggiunta di acido concentrato esse scompaiono e il sucralfato passa completamente in soluzione con dissociazione della porzione alluminica dal saccarosio octasolfato. Un leggero incremento della solubilità del sucralfato si osserva anche in soluzioni di sali inorganici poiché in presenza di anioni o cationi esso può essere ionizzato a causa della natura anfotera dell'alluminio idrossido che lo costituisce[53].

Oltre agli effetti per cui è noto in terapia, il sucralfato ha mostrato interessanti capacità di sequestro di farmaci per complessazione. Il caso più comune in terapia è l'interazione di complessazione che avviene tra il sucralfato e una particolare classe di

antibiotici, le tetracicline[54; 55]. Questo tipo di farmaci sono conosciuti per il loro effetto antibatterico contro l'*helicobacter pylori*. Tuttavia alla dose necessaria all'eradicazione del batterio manifestano significativi effetti collaterali. Formulazioni mucoadesive ricavate dall'interazione tra sucralfato e tetracicline permettono una prolungata persistenza del farmaco sulla parete gastrica che quindi mostra il suo effetto per un periodo esteso. Grazie a questo espediente la dose di farmaco necessaria all'eradicazione dell'*helicobacter pylori* è diminuita, così come il numero delle somministrazioni giornaliere e quindi degli effetti collaterali. La porzione di sucralfato responsabile della complessazione che avviene con le tetracicline è l'alluminio idrossido. Quando il pH acido dello stomaco porta in soluzione una parte di sucralfato, l'alluminio idrossido si separa dal saccarosio octasolfato portando con sé la tetraciclina che è così rilasciata dal complesso[56].

Per quanto riguarda invece la parte di molecola di saccarosio octasolfato, anch'essa ha mostrato la capacità di formare complessi con molecole come fattori di crescita[57] ed enzimi proteolitici[58]. In questi casi il sucralfato complessa le sostanze proteiche in un modo analogo all'eparina. Effettivamente le strutture dei due composti non sono molto differenti poiché l'eparina è costituita da unità ripetitive di disaccaridi con gruppi solfato. Il legame tra sucralfato e il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) è sfruttato per indurre una dimerizzazione all'interno del FGF che è responsabile della sua attività. Questo meccanismo normalmente è indotto dall'eparina[59].

## **2. Scopo della tesi**

Lo scopo di questa tesi è stato principalmente quello di studiare l'interazione tra la reina e il sucralfato. Questo obiettivo è stato perseguito attraverso diversi studi di caratterizzazione al fine di valutare la fattibilità di un approccio formulativo che preveda il sequestro della reina da parte del sucralfato a livello del colon.

Il sucralfato è stato scelto come farmaco modello per il miglioramento della tollerabilità della diacereina. Le sue caratteristiche lo rendono molto promettente per contrastare l'effetto indesiderato della diacereina, sia per quanto riguarda la sua capacità di proteggere la mucosa gastrointestinale che per la sua tendenza a formare composti di interazione con diversi tipi di molecole.

Nella prima parte del lavoro sono state eseguite analisi sulle sostanze pure ed è stato allestito un metodo per studiare l'interazione tra reina e sucralfato. Gli studi in soluzione hanno prodotto campioni i quali sono stati esaminati mediante spettrofotometria UV-vis. In seguito sono state condotte analisi al fine di ottenere informazioni sulle attrazioni intermolecolari del complesso. Questo tipo di studi hanno riguardato dapprima una parte sperimentale in cui le soluzioni di interazione sono state analizzate mediante spettrofotometria UV, HPLC ed NMR in soluzione. Inoltre, sono stati condotti esperimenti d'interazione tra reina e alluminio idrossido per valutare il ruolo di quest'ultimo nell'interazione con la reina.

Infine, l'ultima parte del lavoro ha previsto la caratterizzazione dello stato solido del composto d'interazione tra le due sostanze attraverso microscopia ottica, calorimetria differenziale a scansione (DSC), diffrazione di raggi X su polvere (PXRD).

### **3. Materiali e metodi**

#### ***3.1 Materiali***

La reina con un grado di purezza del 90 % è stata acquistata da Acros Organics, Geel, (Belgium) lotto A0243805, mentre il sucralfato in polvere extrafine è stato fornito da Euticals (Lodi), lotto 1/93. L'alluminio idrossido superbatico è stato fornito da Lisapharma (Erba, Como).

Le analisi di interazione sono state svolte dapprima in soluzione di NaOH 0,1 N preparata disciogliendo 4 g di pellets di sodio idrossido (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Milano) in 1 litro di acqua bidistillata. Successivamente è stata utilizzata una soluzione di tampone fosfato (PBS) a pH 7,4 preparata secondo il metodo descritto in F.U. XII che consiste nella dissoluzione di circa 1,18 g di potassio fosfato monobasico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany) e 4,30 g di sodio fosfato bibasico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany) in un litro di acqua bidistillata [60]. L'ammonio solfato utilizzato per la preparazione della fase mobile per l'HPLC del sucralfato è stato acquistato da Carlo Erba Reagenti, Milano. L'acqua deuterata (100 Atom % D) per la preparazione di PBS per analisi NMR è stata acquistata da ARMAR Chemicals, Döttingen, Switzerland.

Etanolo, metanolo, dimetilsolfossido, acetone, acido cloridrico, acido fosforico erano di grado analitico.

## **3.2 Metodi**

### *3.2.1 Analisi di solubilità*

La solubilità della reina è stata testata in acqua e PBS a due diverse temperature (25 °C e 37 °C), mentre in etanolo, metanolo, dimetilsolfossido e acetone a temperatura ambiente. La solubilità del sucralfato è stata testata in acqua e in PBS a 25 °C e 37 °C. Quantità pesate in eccesso di sostanza sono state fatte disciogliere in 1 ml di solvente fino all'ottenimento di una soluzione satura. I campioni così preparati sono stati fatti equilibrare per un periodo di tre giorni, dopo di che le soluzioni surnatanti sono state filtrate e analizzate con metodo appropriato. Le soluzioni sature di reina sono state diluite con PBS e analizzate mediante spettrofotometria UV ad una lunghezza d'onda di 254 nm. Le soluzioni sature di sucralfato invece sono state essiccate in corrente di azoto, riprese con un solvente appropriato e analizzate mediante un opportuno metodo HPLC.

### *3.2.2 Studio di interazione tra reina e sucralfato*

Un primo approccio utilizzato per studiare l'interazione tra reina e sucralfato ha previsto la dissoluzione di una quantità pesata di reina in un solvente appropriato. Alla soluzione ottenuta sono state poi aggiunte quantità crescenti di sucralfato extrafine. La miscela così preparata è stata fatta equilibrare secondo tempi definiti e sottoposta di tanto in tanto ad agitazione. Questo tipo di analisi sono state condotte variando le condizioni operative sia per quel che riguarda la temperatura (25 °C e 37 °C) che per le quantità di reina o sucralfato aggiunta.

Nelle tabelle 1 e 2 sono riportate le composizioni dei campioni preparati in questo studio di interazione.

**Tabella 1.** Composizione dei campioni preparati per investigare l'interazione tra reina e sucralfato in diversi solventi a 25 °C

SOLVENTE	NaOH 0,1 M	PBS pH 7.4
REINA (mol 10 <sup>-5</sup> )	1,06	1,06
SUCRALFATO (mol 10 <sup>-5</sup> )	2,40	2,40
	4,79	4,79
	7,19	7,19
	9,58	9,58
	10,78	10,78
	11,98	11,98
	13,18	13,18
	14,38	14,38
	19,17	19,17
28,75	28,75	
VOLUME (ml)	5	5
TEMPERATURA (°C)	25°C	25°C
TEMPO	3 giorni	3 giorni

**Tabella 2.** Composizione dei campioni preparati per investigare l'interazione tra reina e sucralfato in diversi solventi a 37 °C

SOLVENTE	PBS pH 7.4	PBS pH 7.4	PBS pH 7.4	PBS pH 7.4	PBS pH 7.4
REINA (mol 10 <sup>-5</sup> )	1,06	1,06	1,06	1,06	1,06
	2,11				
	4,22				
	8,44				
SUCRALFATO (mol 10 <sup>-5</sup> )	2,46	2,58	2,46	2,46	9,58
	4,82		4,82	4,82	
	7,20		7,20	7,20	
	9,67		9,67	9,67	
	10,78		10,78	10,78	
	11,97		11,97	11,97	
	13,22		13,22	13,22	
	14,42		14,42	14,42	
	19,23		19,23	19,23	
	28,82		28,82	28,82	
				39,20	
VOLUME (ml)	5	2,5	10	20	5
TEMPERATURA (°C)	37	37	37	37	37
TEMPO	3 giorni	3 giorni	3 giorni	3 giorni	30 min, 1 ora, 2 ore, 3 ore, 6 ore

L'interazione tra reina e sucralfato è stata inoltre studiata mettendo a contatto soluzioni sature delle due molecole ottenute disciogliendo le due sostanze in acqua, acqua e acido cloridrico, acqua e sodio idrossido, PBS, PBS e acido cloridrico, PBS e sodio idrossido. La preparazione delle soluzioni è stata eseguita facendo dissolvere la reina e il sucralfato nei diversi solventi fino a saturazione del sistema con permanenza di precipitato. I campioni così ottenuti sono stati fatti equilibrare per 3 giorni a 37 °C e sottoposti di tanto in tanto ad agitazione. Le soluzioni di reina e sucralfato sono in seguito state filtrate (0.45µm) e fatte interagire per 24 ore sempre a 37 °C. In alcuni casi si è osservata la formazione di precipitato per cui tutti i campioni sono stati filtrati per recuperare sia la fase solida (asciugata in essiccatore) che la fase liquida surnatante. La fase liquida è stata analizzata mediante spettrofotometria UV-vis per la misurazione della concentrazione di reina e per l'indagine del suo spettro di assorbanza. La fase solida è invece stata analizzata mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC) e microscopia ottica.

### *3.2.3 Studio di interazione tra reina e alluminio idrossido*

L'analisi di interazione tra reina e alluminio idrossido è stata condotta in modo analogo a quelle allestite per l'interazione con il sucralfato. Alle soluzioni di reina sono state aggiunte quantità di alluminio idrossido proporzionali alle moli di tale composto presenti nelle quantità di sucralfato impiegate nell'analisi descritta in precedenza. Anche in questo caso la miscela è stata fatta equilibrare secondo tempi definiti e sottoposta ad agitazione.

Il calcolo delle moli di alluminio idrossido necessarie è stato svolto considerando un peso molecolare del sucralfato di 2481,68 (che comprende 8 moli di alluminio

idrossido e 22 moli di acqua). Il peso molecolare del sucralfato può variare secondo le moli di alluminio idrossido e delle moli di acqua presenti all'interno della molecola. Si è deciso comunque di eseguire il calcolo delle moli di alluminio idrossido a partire da un peso molecolare del sucralfato in cui le molecole di acqua e alluminio idrossido sono presenti in quantità esigua. In tabella 3 sono riportate le composizioni dei campioni preparati in questo studio di interazione.

**Tabella 3.** Composizione dei campioni preparati per investigare l'interazione tra reina e alluminio idrossido

SOLVENTE	PBS pH 7.4
REINA (mol $10^{-5}$ )	1,06
ALLUMINIO IDROSSIDO (mol $10^{-5}$ )	8,06
	16,12
	32,24
	48,35
	64,47
	72,53
	80,59
	88,65
	96,71
	129,0
193,4	
VOLUME (ml)	5
TEMPERATURA (°C)	37
TEMPO	3 giorni

### 3.2.4 Spettrofotometria UV

La spettrofotometria è un'analisi che si basa sui fenomeni di assorbimento di radiazioni nella regione del visibile (350 – 700 nm) e del vicino ultravioletto (200 – 350 nm). Le porzioni di una molecola che assorbono più facilmente sono quelle in cui sono presenti molti elettroni di tipo  $\pi$  poichè essi partecipano meno al legame tra gli atomi e quindi sono più eccitabili. I raggruppamenti chimici responsabili di un assorbimento situato nella regione delle lunghezze d'onda comprese tra 180 e 1000 nm sono detti “cromofori”.

Questo metodo permette di condurre sia analisi quantitative (misurando la variazione dell'assorbanza di un campione ad una determinata lunghezza d'onda della radiazione) ma anche qualitative (misurando l'andamento dello spettro di assorbimento a più lunghezze d'onda, tipico di ogni sostanza) [61].

Le soluzioni surnatanti ottenute dalle interazioni tra reina e sucralfato e reina e alluminio idrossido sono state analizzate mediante uno spettrofotometro UV-Vis Jasco V570 (Tokyo, Japan). La cuvetta utilizzata per contenere i campioni è una cuvetta di forma prismatica a base quadrata aperta sul lato superiore e realizzata in quarzo con cammino ottico di 1 cm.

L'identificazione della reina in soluzione è stata realizzata mediante la registrazione degli spettri UV-vis, in un range di lunghezza d'onda compreso tra 200 nm e 500 nm ad un intervallo di registrazione delle diverse assorbanze di 0,2 nm. Lo spettro è stato tracciato sulla base di 1551 punti totali registrati a lunghezze d'onda diverse. L'ampiezza della banda passante (band width) è di 2 nm per l'UV e 0,4 nm per il NIR. La velocità di scansione impiegata è stata di 100 nm/min.

La misura della concentrazione della reina in soluzione è stata eseguita invece in assorbanza ad una singola lunghezza d'onda di 254 nm sia per i campioni ottenuti in sodio idrossido 0,1 N che per quelli in PBS. Questa lunghezza d'onda è stata determinata dopo analisi dello spettro Uv della sostanza pura nei diversi solventi. L'assorbanza del campione è stata registrata con una band width di 2 nm per l'Uv e di 8 nm per il NIR dopo 10 cicli di indagine da parte dello strumento.

L'analisi spettrofotometrica a lunghezza d'onda singola è stata convalidata per linearità e precisione. La linearità è la capacità di un metodo di ottenere risultati che sono proporzionali alla concentrazione di analita in un preciso intervallo. La linearità è determinata calcolando la retta di regressione in un grafico in cui sono riportati i risultati (la media delle assorbanze ottenute) contro la concentrazione di analita. La precisione di un metodo analitico è una misura della riproducibilità di tutto il metodo analitico in condizioni di operazioni standard. La precisione è espressa come deviazione standard relativa (RSD):

$$\%RSD = \frac{dev. std * 100}{media} \quad [1]$$

dove %RSD è la deviazione standard relativa definita come percentuale del rapporto tra la deviazione standard e il valore medio dei risultati[62].

Dalla pendenza della retta di taratura è stato ricavato il valore del coefficiente di estinzione molare che permette di calcolare la concentrazione della soluzione partendo dalla sua assorbanza secondo la legge di Lambert – Beer:

$$A = \varepsilon * c * l \quad [2]$$

in cui  $A$  è l'assorbanza del campione analizzato,  $\epsilon$  è il coefficiente di estinzione molare,  $c$  è la concentrazione del campione analizzato e  $l$  è la lunghezza del cammino ottico tipico della cella contenente il campione.

### *3.2.5 Analisi HPLC*

Lo strumento impiegato per l'analisi HPLC comprende due pompe Shimadzu LC-10ATvp, un forno per colonne Shimadzu CTO-10ASvp, un diode array detector Shimadzu SPD-M10Avp, un refractive index detector Shimadzu RID-10A e un autocampionatore Waters 717plus.

#### Sucralfato

Il metodo HPLC allestito per determinare la concentrazione di sucralfato è descritto nella farmacopea degli Stati Uniti (USP).

Il metodo HPLC impiegato ha previsto l'utilizzo come fase mobile di una soluzione acquosa di ammonio solfato (132 mg/ml) aggiustata a pH 3,5 con acido fosforico. Il flusso di eluente è stato mantenuto a 0,5 ml/min. La colonna cromatografica usata è una Macherey-Nagel Nucleodur NH<sub>2</sub>-RP, 250 x 4,0 mm, 5  $\mu$ m mantenuta a una temperatura di 30 °C mentre il volume di iniezione del campione è stato di 30  $\mu$ l. Il sucralfato è stato monitorato per mezzo di un refractive index detector (RID) anch'esso mantenuto a una temperatura costante di 30 °C[63].

## Reina

L'analisi HPLC impiegata per determinare la concentrazione della reina ha previsto l'utilizzo di acido fosforico (0,1 M) e metanolo in proporzioni di 40:60 come fase mobile. L'eluente è stato mantenuto a un flusso costante di 1 ml/min. La colonna cromatografica usata è una Waters Nova-Pak C18-RP, 150 x 3,9 mm, 4 µm a una temperatura di 40 °C mentre il volume di iniezione del campione è stato di 20 µl. La reina è stata rilevata per mezzo di un diode array detector (DAD) a una lunghezza d'onda di 254 nm[64].

I metodi HPLC utilizzati sono stati convalidati per linearità, precisione, limite di rilevazione e limite di quantificazione.

La linearità è determinata anche in questo caso calcolando la retta di regressione in un grafico in cui sono riportati i risultati (la media delle aree ottenute) contro la concentrazione di analita

La precisione in questo caso è determinata mediante un metodo che determina il numero sufficiente di iniezioni per ottenere dei risultati statisticamente validi. La precisione è comunque espressa come %RSD cioè la deviazione standard relativa definita come percentuale del rapporto tra la deviazione standard e il valore medio dei risultati. Se la %RSD è inferiore a 2 allora sono sufficienti cinque iniezioni per avere un risultato affidabile. Nel caso in cui essa sia maggiore di 2 sono necessarie sei iniezioni[62].

Il limite di rilevazione di un metodo è la concentrazione più bassa in un campione che può essere rilevata ma non necessariamente quantificata. Il limite di rilevazione è

generalmente considerato come la concentrazione che dà un rapporto di segnale – rumore di fondo tra 3 e 2.

Il limite di quantificazione è la concentrazione più bassa di analita in un campione che può essere determinata con una precisione accettabile. Esso è generalmente individuato come la concentrazione che dà un rapporto di segnale – rumore di fondo di 10[65].

### *3.2.6 NMR in fase liquida*

L'analisi NMR in soluzione ha previsto la registrazione degli spettri delle soluzioni sature in PBS di sucralfato e reina e dei campioni di interazione tra le due molecole.

Una delle soluzioni analizzate è stata allestita facendo interagire  $1,06 \times 10^{-5}$  mol di reina con  $23,96 \times 10^{-5}$  mol di sucralfato in 20 ml di PBS preparato con acqua deuterata.

La soluzione surnatante è stata filtrata e posta in un tubo per analisi NMR.

Gli spettri NMR sono stati registrati a una temperatura di 37 °C con uno spettrometro Varian-NMR-inova600.

#### NMR $^1\text{H}$

La misurazione NMR è stata svolta sull'idrogeno  $^1\text{H}$  a 600 MHz in un intervallo compreso tra 0 e 12 ppm con una sequenza di impulso PRESAT per la soppressione del picco dell'acqua. Ai campioni sono state aggiunte piccole quantità di DSS (4,4-dimetil-4-silapentano-1-acido sulfonico) il quale è utilizzato come standard interno nelle analisi NMR al fine di determinare eventuali shift dei picchi. Il DSS è stato utilizzato in queste analisi poiché possiede una solubilità in acqua maggior del TMS (tetrametilsilano) usato più frequentemente [66].

### 3.2.7 Diffrazione di raggi X su polvere (PXRD)

La diffrazione di raggi X su polvere è una tecnica che sfrutta le radiazioni elettromagnetiche per la caratterizzazione dello stato solido dei materiali. I raggi X hanno una lunghezza d'onda compresa in un intervallo di 0.01-10 nm. Essi sono generati in un tubo sigillato e sotto vuoto che utilizza un alto voltaggio di corrente per scaldare un filamento interno (catodo) da cui sono emessi gli elettroni che all'aumentare del caldo aumentano anche il loro moto. Gli elettroni sono quindi rilasciati dal catodo caldo ad alta velocità e collidono contro un metallo "target", in genere composto da tungsteno o rame, rilasciando energia sotto forma di radiazioni ad alta frequenza, i raggi X. Il fascio di raggi X che si crea viene quindi "collimato", ovvero selezionato solamente per i raggi che corrono paralleli ad una certa direzione. I raggi selezionati sono direzionati verso la superficie piatta del campione dove vengono diffratti secondo un angolo  $\theta$  che soddisfa la legge di Bragg:

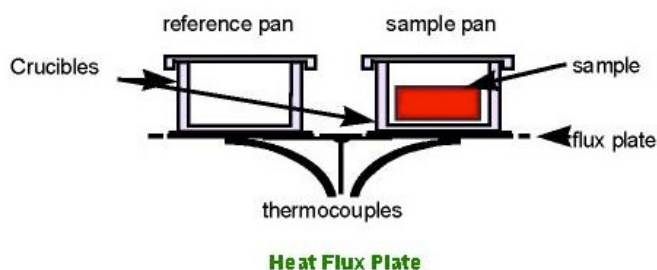
$$n\lambda = 2d * \sin\theta \quad [2]$$

dove  $n$  è l'ordine di diffrazione,  $d$  è la distanza interplanare dei cristalli nel campione,  $\theta$  è l'angolo incidente del raggio X (angolo di Bragg) e  $\lambda$  è la lunghezza d'onda caratteristica dei raggi X (dovuta al tipo di tubo generatore di raggi X). La preparazione del campione per analisi di raggi X su polvere avviene stratificando la sostanza nell'incavo di una lastrina piana di alluminio la quale è in seguito posta nel portacampione del diffrattometro. Il risultato della diffrazione di raggi X è rappresentato da un diffrattogramma in cui l'intensità diffratta del raggio è riportata in funzione dell'angolo di scattering di  $2\theta$ . I raggi X su polvere riportati in questo lavoro sono stati registrati con un diffrattometro Rigaku Miniflex (Japan) che utilizza una radiazione  $\text{CuK}\alpha$  di 30 kV, 15mA a una velocità di scansione di 0,5 °/min e con

un'intervallo di scansione ( $2\theta$ ) da  $2^\circ$  a  $35^\circ$ . I raggi X sono stati utilizzati per la caratterizzazione delle materie prime e per l'indagine della formazione di un composto di interazione tra di esse.

### 3.2.8 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

La DSC è una tecnica di termoanalisi che misura la quantità di energia come flusso di calore, assorbita o rilasciata da un campione solido che è riscaldato, raffreddato o mantenuto a temperatura costante. In un esperimento tipico sia il campione pesato che il riferimento sono posizionati all'interno di un unico forno in cui subiscono lo stesso programma di variazione di temperatura. In figura 8 è rappresentato schematicamente il forno di una DSC con due crogioli di cui uno è riempito col campione, l'altro è vuoto e funge da riferimento. La termocoppia in collegamento sia con il campione che col riferimento rileva la differenza della quantità di flusso di calore che assorbe o rilascia il campione rispetto al riferimento. Questa variazione è dovuta a processi esotermici o endotermici che avvengono all'interno del campione durante la scansione della temperatura.



**Figura 8.** Rappresentazione schematica di un forno per analisi DSC

Gli esperimenti di calorimetria differenziale a scansione sono eseguiti particolarmente per la determinazione del punto di fusione o del calore di fusione ma anche per individuare la temperatura di transizione, per lo studio di cristalli e per l'identificazione di trasformazioni di fase. Lo strumento DSC utilizzato in questo lavoro per caratterizzare le materie prime e il composto di interazione è stato un Mettler Toledo DSC 821e (Mettler Toledo, USA). Il campione è stato pesato e posto in un crogiolo di alluminio della capacità di 40  $\mu$ l. Le scansioni delle sostanze sono state realizzate in flusso di idrogeno secco (100 ml/min) con un programma di temperatura da 30 a 350 °C a 10 K al minuto. La calibrazione della temperatura e dei valori di entalpia è stata effettuata con Indio.

### *3.2.9 Microscopia ottica*

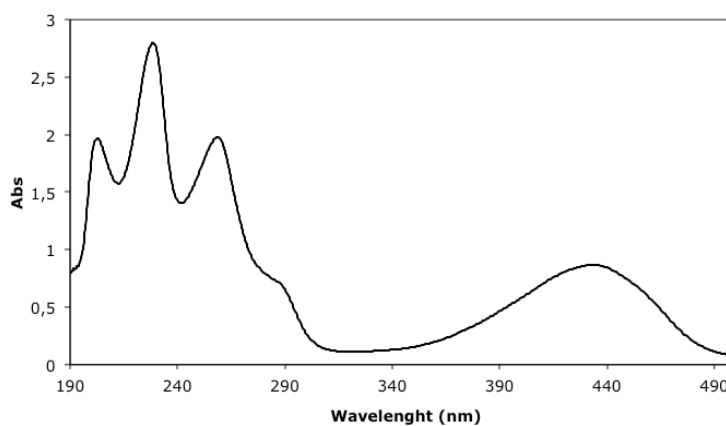
L'analisi morfologica delle materie prime e del composto di interazione in differenti solventi è stata realizzata per mezzo di microscopia ottica. Lo strumento utilizzato per questo tipo di analisi è un microscopio a luce polarizzata (Labophot II Nikon, Tokio, Japan), con un ingrandimento 10x, o 20x.

## 4. Risultati e discussione

### 4.1 Convalida dei metodi di spettrofotometria UV

#### 4.1.1. Reina in PBS

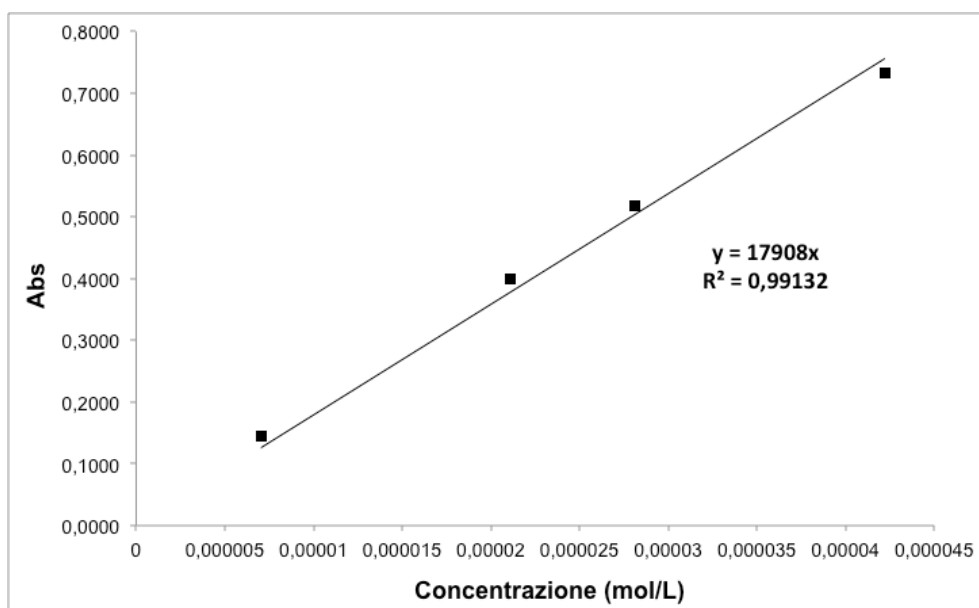
La quantificazione della reina in soluzione di PBS è stata eseguita per mezzo di analisi spettrofotometrica Uv-vis. La lunghezza d'onda di 254 nm a cui misurare i campioni è stata scelta dopo registrazione e studio dello spettro Uv-vis completo del farmaco in PBS (figura 9).



**Figura 9.** Spettro Uv-vis di reina in PBS a pH 7,4

La scelta della lunghezza d'onda è stata realizzata sulla base di alcuni accorgimenti che hanno previsto il mantenimento di una certa distanza dalla zona di interferenza di molti solventi comuni (190-210 nm) ma anche una posizione in cui l'assorbimento della sostanza sia rilevante.

Una retta di regressione è stata tracciata mediante l'analisi di quattro soluzioni di reina in PBS a concentrazioni differenti (figura 10).



**Figura 10.** Retta di taratura per analisi UV-vis di rena in PBS 7,4

Ogni campione è stato sottoposto a dieci cicli di analisi per tre volte e dai risultati ottenuti si sono calcolate la linearità e la precisione espressa come deviazione standard relativa (RSD %) del procedimento. Il coefficiente di correlazione  $R^2$  della retta di regressione è risultato essere di 0,99132 in un range di concentrazioni compreso tra  $7,037 \cdot 10^{-6}$  mol e  $4,222 \cdot 10^{-5}$  mol che indica un'ottima linearità. Dalla pendenza della retta di regressione si è ricavato il coefficiente di assorbimento molare  $\epsilon$  necessario per il calcolo della concentrazione dei campioni mediante la legge di Lambert-Beer. Il coefficiente di assorbimento molare coincide con il coefficiente angolare della retta disegnata ed è quindi 17908.

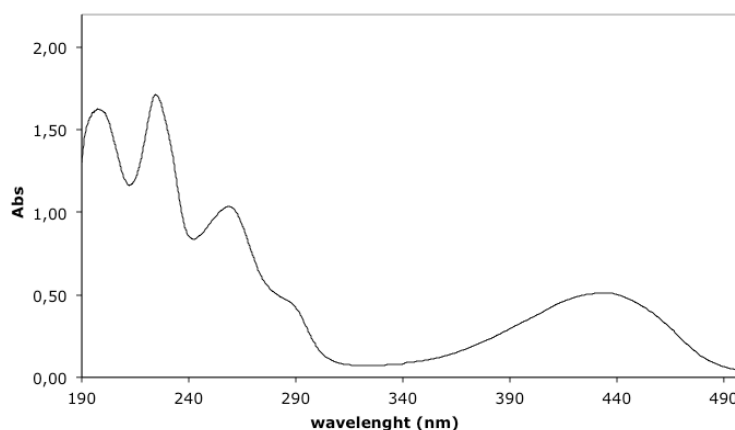
La riproducibilità del sistema è considerata accettabile se i valori di RSD % ottenuti per ogni campione è inferiore al 2 %, limite definito dalle linee guida ICH Q2 (R1). I risultati sono mostrati in tabella 4.

**Tabella 4** Deviazione standard e RSD % di campioni di reina in PBS a differenti concentrazioni

Concentrazione (mol/L)	Assorbanza (U.A.)	Deviazione standard	RSD %
$7,04 \cdot 10^{-6}$	0,1438	0,0001	0,091
$2,11 \cdot 10^{-5}$	0,4003	0,0001	0,027
$2,81 \cdot 10^{-5}$	0,5183	0,0000	0,009
$4,22 \cdot 10^{-5}$	0,7325	0,0001	0,007

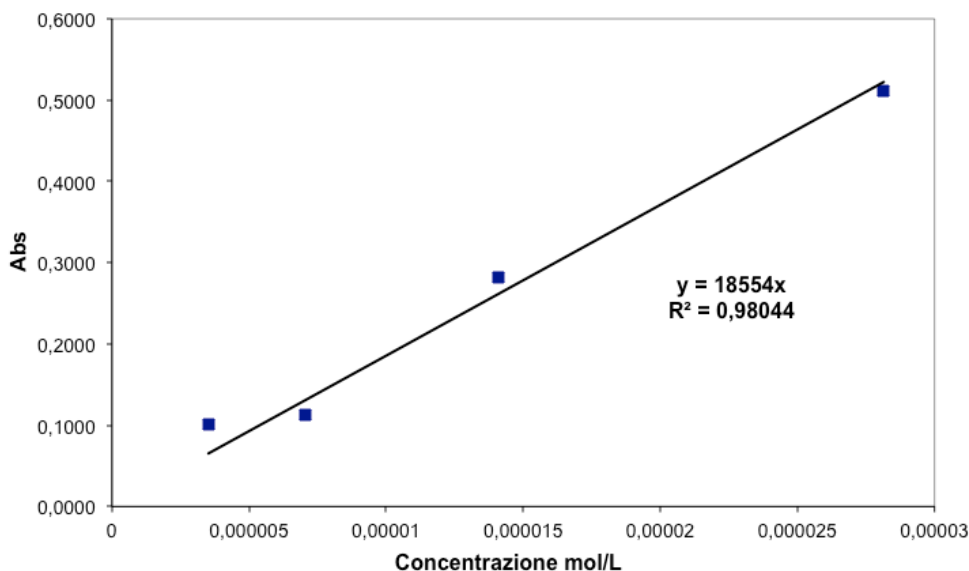
#### 4.1.2 Reina in NaOH

La costruzione di una retta di calibrazione si è resa necessaria anche per quanto riguarda l'analisi di quantificazione della reina con spettrofotometria Uv-vis svolta in soluzione di NaOH 0,1 M. Anche in questo caso è stato prima registrato uno spettro Uv-vis della sostanza in soluzione (fig. 11) da cui è stata ricavata a lunghezza d'onda a cui sono state svolte le analisi di quantificazione.



**Fig. 11.** Spettro Uv-vis di reina in NaOH 0,1 M

La retta di regressione è stata tracciata dopo l'analisi di quattro soluzioni di reina in NaOH a concentrazioni differenti (figura 12).



**Figura 12.** Retta di taratura per analisi Uv-vis di reina in NaOH 0,1 M

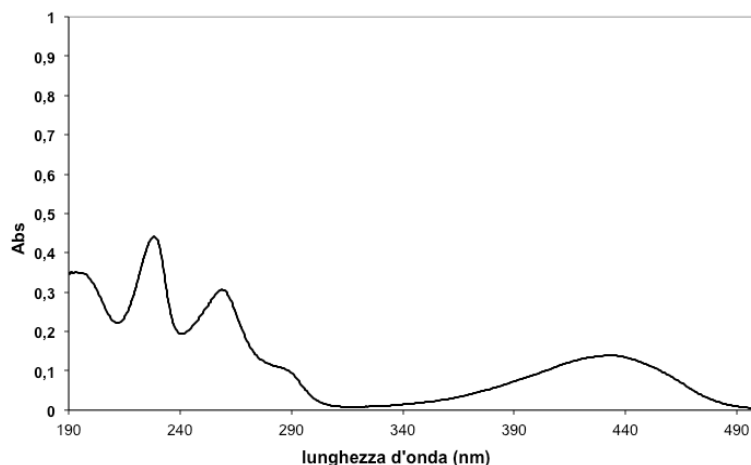
Anche in questo caso ogni campione è stato sottoposto a dieci cicli di analisi per tre volte e dai risultati ottenuti si sono calcolate la linearità e la precisione espressa come deviazione standard relativa (RSD %) del procedimento. Il coefficiente di correlazione  $R^2$  della retta di regressione è risultato essere di 0,98044 in un range di concentrazioni compreso tra  $3,52 \cdot 10^{-6}$  mol e  $2,81 \cdot 10^{-5}$  mol che indica una buona linearità. Il coefficiente di assorbimento molare ricavato dalla pendenza della retta è di 18554. In tabella 5 sono riportati i risultati ottenuti dalla misura spettrofotometrica delle soluzioni, la deviazione standard e la RSD %.

**Tab. 5** Deviazione standard e RSD % di campioni di reina in NaOH 0,1 M a differenti concentrazioni

Concentrazione (mol/L)	Assorbanza (U.A.)	Deviazione standard	RSD %
$3,52 \cdot 10^{-6}$	0,1018	0,0001	0,428
$7,04 \cdot 10^{-5}$	0,1130	0,0001	0,640
$1,41 \cdot 10^{-5}$	0,2814	0,0001	0,196
$2,81 \cdot 10^{-5}$	0,5119	0,0001	0,133

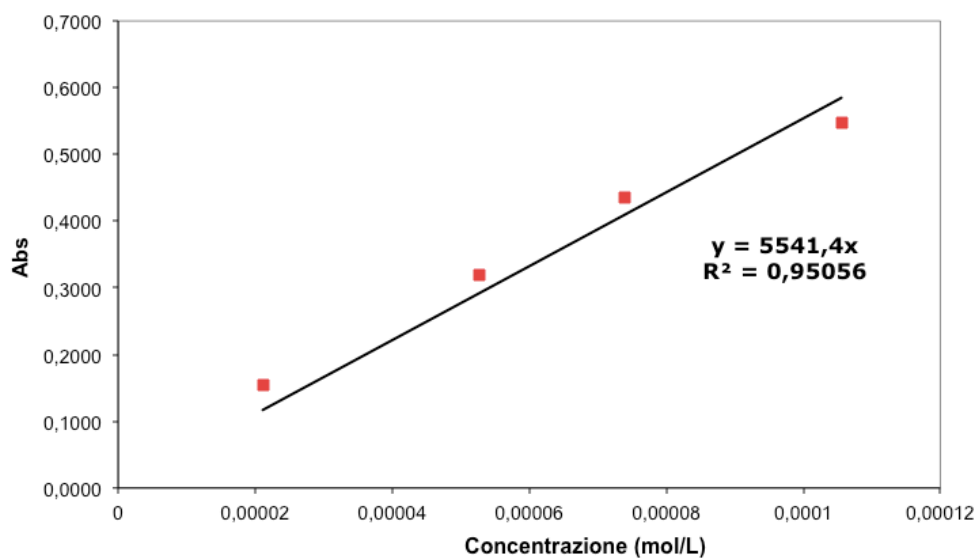
#### 4.1.3 Reina in acqua

La costruzione di una retta di calibrazione è stata effettuata anche per quanto riguarda l'analisi di quantificazione della reina con spettrofotometria Uv-vis svolta in acqua. Anche in questo caso è stato prima registrato uno spettro Uv-vis della sostanza in soluzione (figura 12) da cui è stata ricavata la lunghezza d'onda a cui sono state svolte le analisi di quantificazione.



**Figura 12.** Spettro Uv-vis di reina in NaOH 0,1 M

La retta di regressione è stata tracciata dopo l'analisi di quattro soluzioni di reina in acqua a concentrazioni differenti (figura 13).



**Figura 13.** Retta di taratura per analisi Uv-vis di reina in acqua

Anche in questo caso ogni campione è stato sottoposto a dieci cicli di analisi per tre volte e dai risultati ottenuti si sono calcolate la linearità e la precisione espressa come deviazione standard relativa (RSD %) del procedimento. Il coefficiente di correlazione  $R^2$  della retta di regressione è risultato essere di 0,95056 in un range di concentrazioni compreso tra  $2,11 \cdot 10^{-5}$  mol e  $1,06 \cdot 10^{-4}$  mol che indica una discreta linearità. Il coefficiente di assorbimento molare ricavato dalla pendenza della retta è di 5541,4. In tabella 6 sono riportati i risultati ottenuti dalla misura spettrofotometrica delle soluzioni, la deviazione standard e la RSD %.

**Tabella 6** Deviazione standard e RSD % di campioni di reina in acqua a differenti concentrazioni

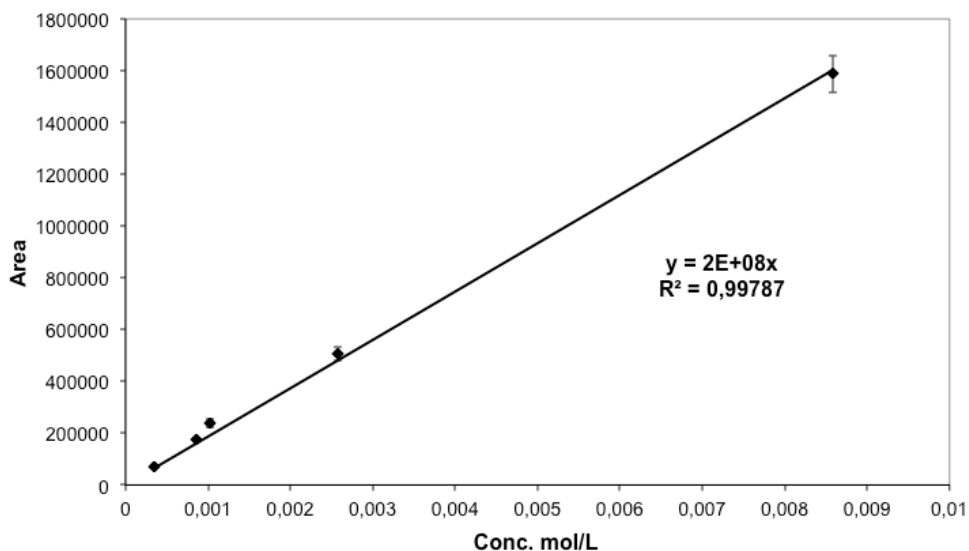
Concentrazione (mol/L)	Assorbanza (U.A.)	Deviazione standard	RSD %
$7,04 \cdot 10^{-6}$	0,1130	0,0001	0,640
$1,41 \cdot 10^{-5}$	0,2814	0,0001	0,196
$2,81 \cdot 10^{-5}$	0,5119	0,0001	0,133
$3,87 \cdot 10^{-5}$	0,6218	0,0001	0,221

## ***4.2 Convalida dei metodi HPLC***

### **4.2.1 Sucralfato**

Il sucralfato è stato quantificato secondo il metodo descritto nel capitolo 3. La realizzazione di una retta di calibrazione (figura 14) ha previsto l'analisi di cinque soluzioni di sucralfato in concentrazioni diverse. La soluzione standard è stata preparata sciogliendo una quantità esattamente pesata di polvere (250 mg) in 10 ml di una miscela di acido solforico concentrato 4 M e sodio idrossido 2,2 M in proporzioni 1:1. Dopo cinque minuti di sonicazione è stato aggiunto alla soluzione mantenuta sotto agitazione un volume misurato V in ml di una soluzione 0,1 N fino ad ottenere un pH di circa 2. Infine la soluzione è stata diluita con un volume di acqua pari a (15,0 – V) ml. Dopo 1 minuto di agitazione e 5 minuti di centrifugazione, la soluzione standard è stata fatta equilibrare fino a stabilizzazione del pH, che deve essere compreso tra 2,3 e 3,5. Questa procedura è necessaria per ottenere in soluzione il saccarosio octasolfato che è la porzione di sucralfato visibile dal detector[63]. I campioni di soluzioni

surnatanti sono quindi stati trattati con lo stesso processo prima di essere iniettati in HPLC.



**Figura 14.** Retta di taratura per l'analisi HPLC di sucralfato

Le soluzioni di cinque concentrazioni diverse sono state iniettate tre volte l'una e dai risultati ottenuti sono state calcolate la linearità, la precisione, il limite di rilevazione (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ) del metodo. Il coefficiente di correlazione  $R^2$  è risultato essere di 0,99787 che indica una buona linearità anche in questa situazione. I parametri di precisione (RSD %) e sensibilità (LOD e LOQ) sono al limite delle specifiche ma restituiscono un risultato complessivo di riproducibilità e affidabilità del metodo (tabella 7).

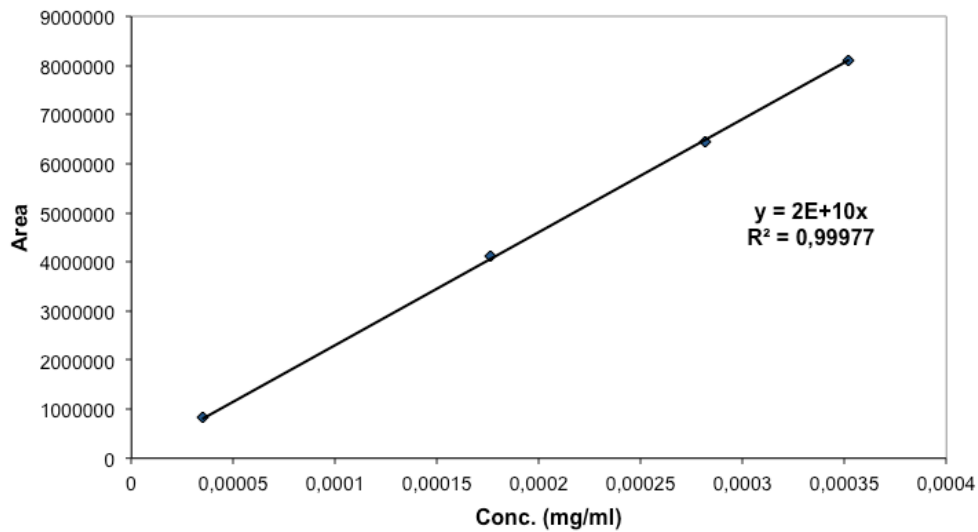
**Tab. 7** Deviazione standard e RSD % dei campioni di sucralfato iniettati in HPLC per la convalida

Concentrazione (mol/L)	Assorbanza (U.A.)	Deviazione standard	RSD %
0,00034	72342	5613	1,645
0,00086	175045,5	7177,8	1,667
0,00103	239249	16891,4	2,006
0,00257	504728,5	26208,9	1,572
0,00878	1587900,5	71984,2	1,421

Il limite di rilevazione è risultato pari a 0,00072 mol/L di sucralfato mentre il limite di quantificazione era di 0,0024 mol/L.

#### 4.2.2 Reina

La reina è stata quantificata secondo il metodo descritto nel capitolo 3. Per la realizzazione della retta di calibrazione (figura 15) sono state analizzate quattro soluzioni di reina in concentrazioni diverse. Le soluzioni sono state preparate sciogliendo una quantità esattamente pesata di polvere in PBS[64].



**Figura 15.** Retta di taratura per l'analisi HPLC di rena

Anche in questo caso le soluzioni di cinque concentrazioni diverse sono state iniettate tre volte l'una e dai risultati ottenuti sono state calcolate la linearità, la precisione, il limite di rilevazione (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ) del metodo. Il coefficiente di correlazione  $R^2$  è di 0,99977 che indica un'ottima correlazione tra la concentrazione dell'analita risposta dallo strumento. I parametri di precisione (RSD %) e sensibilità (LOD e LOQ) indicano che il metodo è riproducibile e di buona sensibilità (tabella 8).

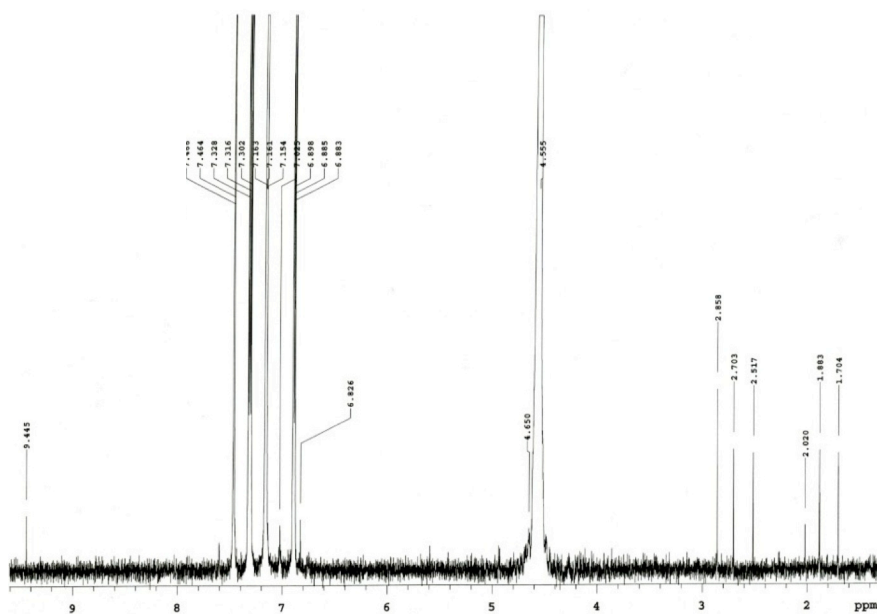
**Tabella 8** Deviazione standard e RSD % dei campioni di reina iniettati in HPLC per la convalida

Concentrazione (mol/L)	Assorbanza (U.A.)	Deviazione standard	RSD %
$3,52 \cdot 10^{-5}$	845408,5	1341,4	0,16
0,00018	4106505	1202,1	0,03
0,00028	6433250	203,6	0,003
0,00035	8113886	14246,8	0,176

Il limite di rilevazione era di  $1,53 \cdot 10^{-6}$  mol/L di reina mentre il limite di quantificazione era di  $5,1 \cdot 10^{-6}$  mol/L.

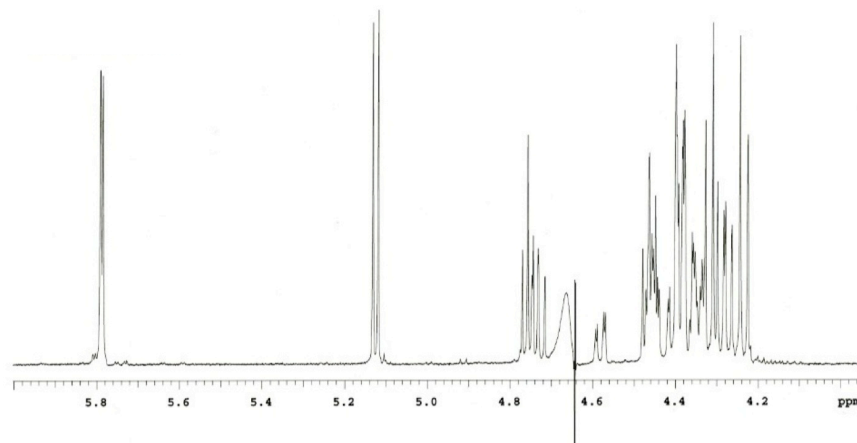
### **4.3 $^1\text{H}$ NMR**

Gli spettri  $^1\text{H}$  NMR registrati per le materie prime in PBS hanno mostrato i picchi caratteristici degli idrogeni presenti all'interno delle molecole. Lo spettro della reina registrato a una temperatura di  $37\text{ }^\circ\text{C}$  e con aggiunta di DSS (figura 16) mostra picchi ben definiti in cui sono evidenti gli idrogeni del nucleo aromatico nell'intervallo tra 6,8 e 7,6 ppm.



**Figura 16.** Spettro  $^1\text{H}$  NMR di rena in PBS a 37 °C con DSS

Lo spettro  $^1\text{H}$  NMR del sucralfato (figura 17) mostra una serie di picchi frastagliati e molto ravvicinati nell'intervallo compreso tra 4,2 e 4,5 ppm e risulta in accordo con quello riportato in letteratura per quanto riguarda il saccarosio octasolfato[67-69]. Anche in questo caso gli spettri sono stati registrati dopo aggiunta di DSS come standard interno.

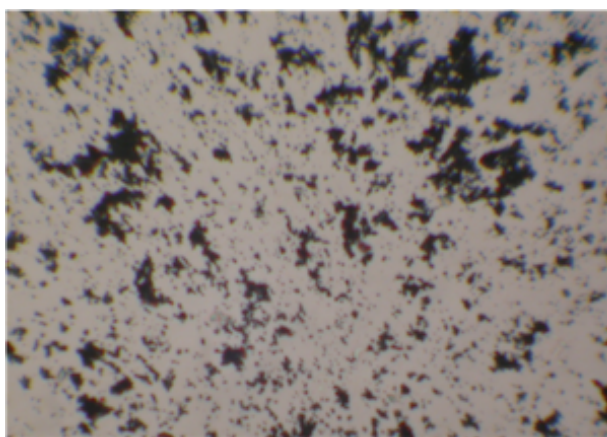


**Figura 17.** Spettro  $^1\text{H}$  NMR di sucralfato in PBS a 37 °C con DSS

#### ***4.4 Caratterizzazione dello stato solido delle materie prime***

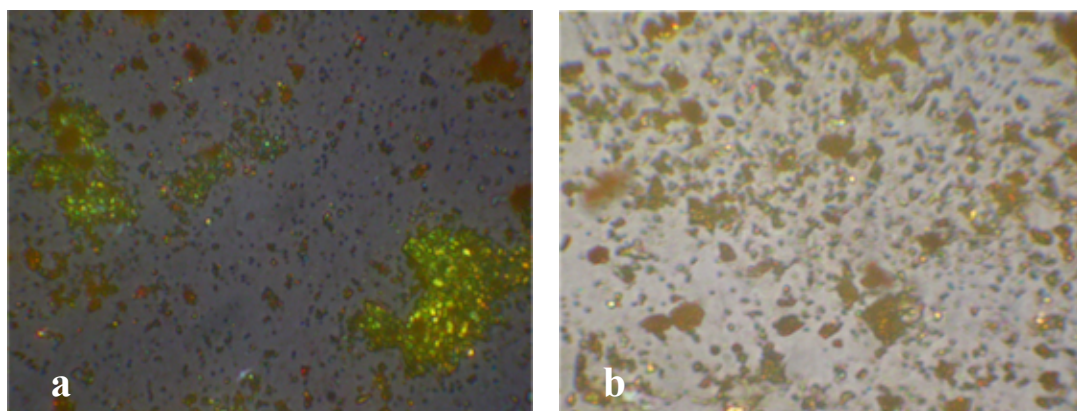
##### **4.4.1 Microscopia ottica**

Il sucralfato è una sostanza amorfa e quindi priva di struttura cristallina. La sua natura anisotropa riflette la mancanza di un ordine a lungo raggio nella disposizione tridimensionale della molecola. Questa caratteristica rende l'osservazione della polvere con luce polarizzata poco indicativa poiché essa non riflette le radiazioni luminose secondo angoli predefiniti e regolari. Il sucralfato valutato con microscopia ottica (figura 18) appare quindi scuro e senza struttura.



**Figura 18.** Immagine di sucralfato in polvere al microscopio ottico ad un ingrandimento di 40x

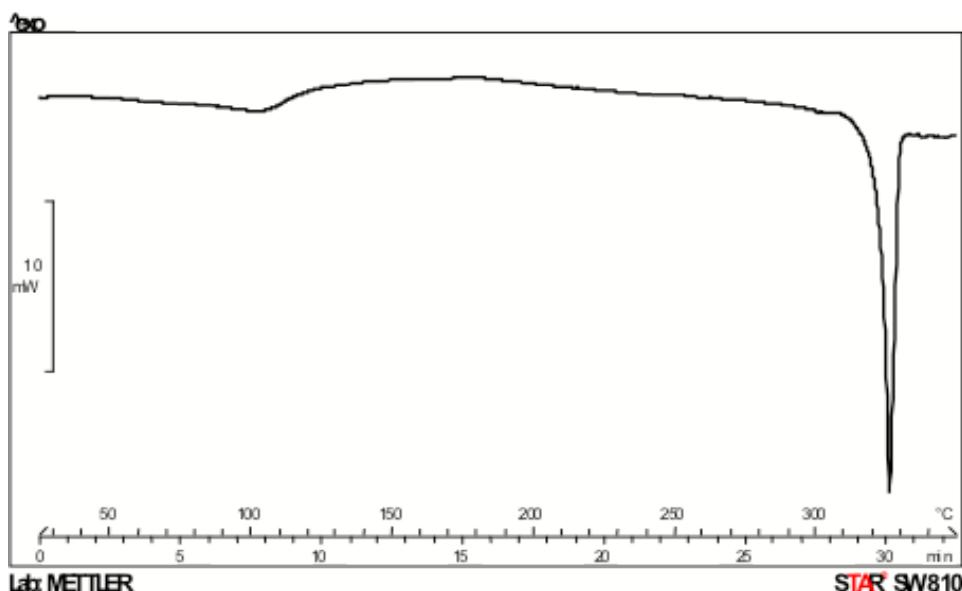
L'osservazione della reina al microscopio ottico mostra invece interessanti caratteristiche della polvere (figura 19 a e b). La natura cristallina di questo composto permette di definire la morfologia dei cristalli che risultano di piccola dimensione e con un habitus irregolare. Detti cristalli si presentano inoltre spesso aggregati.



**Figura 19.** Immagini di reina al microscopio ottico ad un ingrandimento di 40 x con differenti intensità di luce polarizzata (a,b).

#### 4.4.2 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

L'analisi di calorimetria differenziale a scansione per la reina ha previsto un programma di riscaldamento da 25 °C a 350 °C a 10 °C/min in atmosfera secca di azoto. Il tracciato DSC della reina (figura 20) mostra una lieve endoterma allargata tra circa 50 e 120 °C probabilmente attribuibile al desorbimento di umidità residua, seguita da un picco endotermico che indica il punto di fusione a circa 325 °C in accordo coi dati di letteratura[70]



**Figura 20.** Tracciato DSC di reina

Il sucralfato è stato sottoposto ad analisi DSC impiegando lo stesso metodo utilizzato per caratterizzare la reina e il tracciato DSC che si è ottenuto (figura 21) mostra la tipica natura amorfa del sucralfato senza un punto di fusione. Il picco allargato che si osserva intorno ai 100 °C è riferibile al desorbimento dell'acqua presente nella molecola in alte quantità.

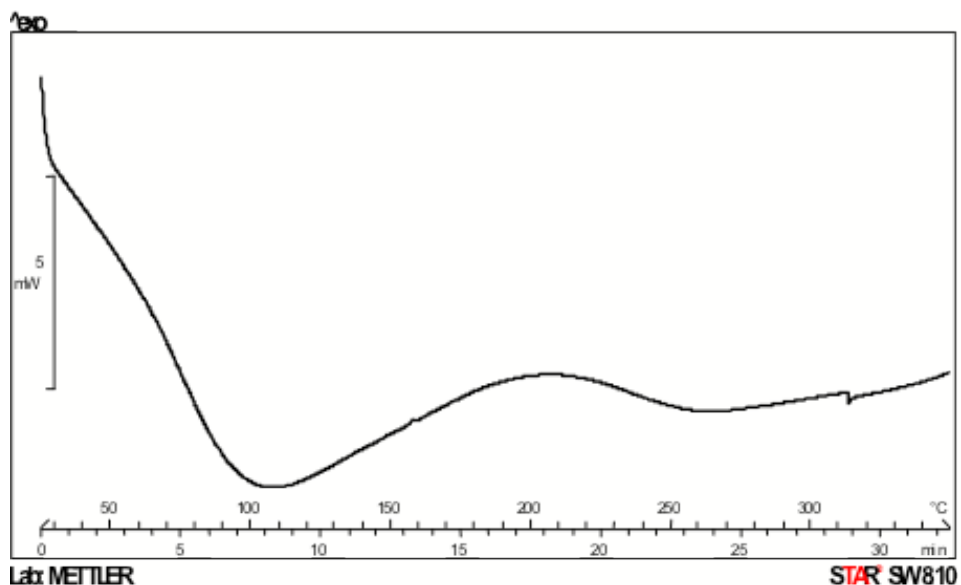


Figura 21. Tracciato DSC di sucralfato

#### 4.4.3 Diffrazione di raggi X su polvere (PXRD)

La caratterizzazione della reina e del sucralfato ha previsto inoltre un'analisi di diffrazione di raggi X su polvere. Il diffrattogramma della reina (figura 22) mostra una serie di picchi ben definiti indicativi della natura cristallina del solido, mentre il tracciato del sucralfato (figura 23) è pressoché piatto con il tipico innalzamento della linea di base originato da sostanze amorphe.

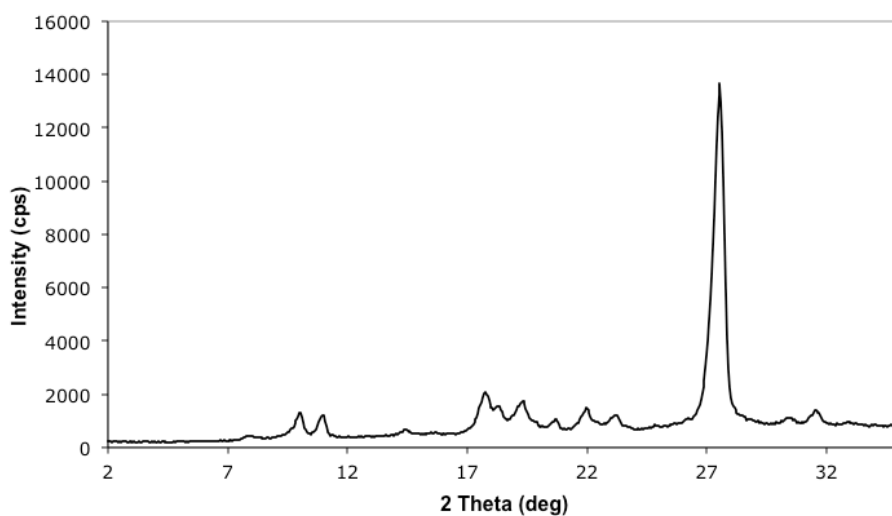
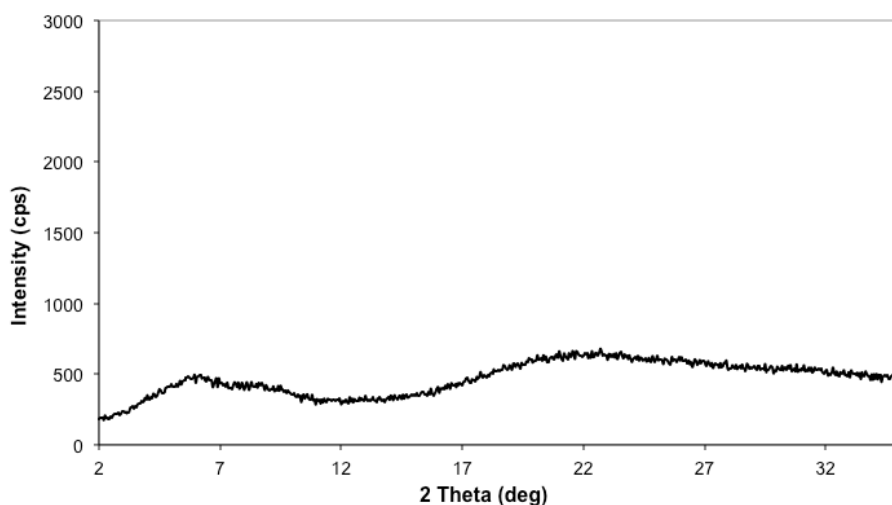


Figura 22. Diffrattogramma di raggi X su polvere di reina



**Figura 23.** Difrattogramma di raggi X su polvere di sucralfato

#### ***4.5 Teoria di formazione dei complessi***

Lo studio del comportamento delle sostanze che si scelgono per preparare una forma farmaceutica è fondamentale per riuscire a maneggiarla con sicurezza. La consapevolezza di come la reina e il sucralfato interagiscono tra loro è quindi indispensabile per allestire una formulazione adeguata. I dati presenti in letteratura fanno ipotizzare la possibile formazione di un complesso tra le due molecole in cui il sucralfato funge da legante e la reina da substrato [54; 56].

##### **4.5.1 Regola delle fasi**

Le interazioni molecolari tra due sostanze sono esaminabili attraverso misurazioni di solubilità del substrato in presenza del suo legante in soluzione [71]. A questo proposito la *regola delle fasi* di Gibbs è di grande aiuto poiché permette di avere un'idea precisa di quante specie sono presenti in determinati sistemi. La regola delle fasi si basa principalmente sulla variazione di tre parametri fondamentali di un sistema

che sono le *fasi*, i *composti*, e i *gradi di libertà*. Una *fase* è una porzione omogenea della materia (esempio di fase è un liquido o un solido puro, una soluzione, un gas). Il numero di fasi in un sistema è indicato normalmente con la lettera **P**. Un *composto* è invece un costituente di un sistema la cui concentrazione può variare indipendentemente dalle altre entità presenti. Nel sistema descritto da  $A+B=AB$ , per esempio, i costituenti sono tre (A, B, AB) ma solamente due (i composti) possono variare indipendentemente la loro concentrazione mentre il terzo costituente cambierà secondo l'equilibrio stabilito dai due composti, indicati normalmente con la lettera **C**. Il *numero dei gradi di libertà* di un sistema, invece, è il numero di quei fattori variabili (pressione, temperatura e concentrazione dei composti) che per garantire una composizione ben definita del sistema devono essere fissi. Il numero dei gradi di libertà è indicato normalmente con la lettera **F**. A una data temperatura e pressione un sistema è in equilibrio se la concentrazione dei componenti è costante.

Il numero di fasi, composti e gradi di libertà in un sistema sono descritti da una semplice relazione chiamata quindi la regola delle fasi di Gibbs:

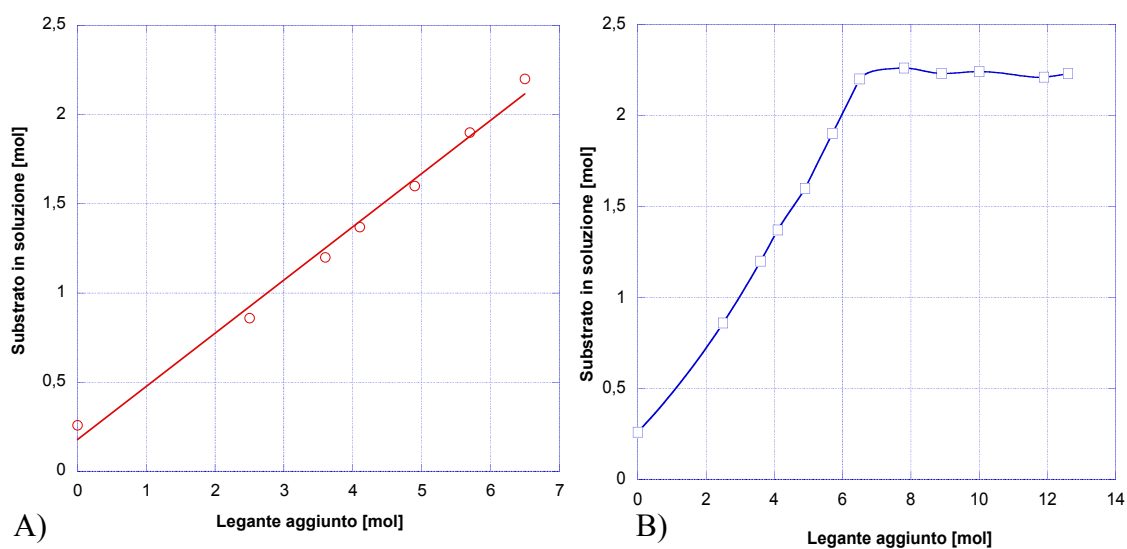
$$\mathbf{F} = \mathbf{C} - \mathbf{P} + 2 \quad [3]$$

Essa fornisce il punto di partenza di diversi metodi analitici poiché offre la possibilità di ricavare importanti informazioni riguardo all'equilibrio di un sistema e il numero di specie presenti al suo interno.

#### 4.5.2 Diagrammi di solubilità di fase

I sistemi di solubilità in cui sono presenti interazioni molecolari possono essere studiati in modo particolareggiato utilizzando metodi che permettono di acquisirne una dettagliata conoscenza. Un'operazione generale ricavata dalle tecniche di solubilità isoterma di fase descritte da Higuchi e Connors[71] prevede l'aggiunta in diverse provette o contenitori di una quantità di sostanza (il substrato) in eccesso rispetto alla sua solubilità nel solvente considerato. Ad ogni contenitore è aggiunta poi una quantità costante di solvente tale da ottenere una soluzione sovrasatura del substrato con presenza di corpo di fondo. Queste sospensioni sono in seguito fatte equilibrare a temperatura costante con quantità differenti e crescenti di agente legante o complessante. Infine, le soluzioni surnatanti limpide sono analizzate con un metodo appropriato per quanto riguarda la concentrazione del substrato. Questo metodo permette di costruire un diagramma di solubilità di fase riportando sull'asse delle ascisse la concentrazione molare di sostanza legante aggiunta al sistema mentre sull'asse delle ordinate la concentrazione molare del substrato rilevata nella soluzione surnatante. I grafici che si ottengono con questa procedura in presenza di interazioni molecolari possono essere suddivisi in due classi: i diagrammi di tipo A e i diagrammi di tipo B.

La prima categoria di diagrammi di fase, cioè di TIPO A, descrive un aumento costante della solubilità apparente del substrato in soluzione con l'aggiunta di quantità maggiori di legante (figura 24).

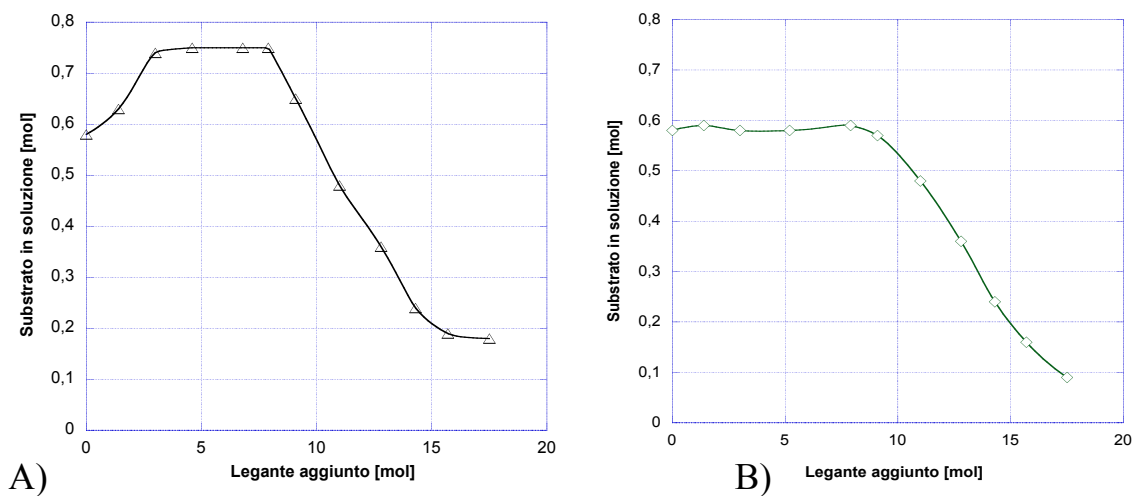


**Figura 24.** Esempi di diagramma di fase di tipo A

L'aumento in soluzione della concentrazione di substrato è dovuto alla formazione di una o più entità chimiche distinte tra le due sostanze che possono essere chiamate complessi. In questo caso i complessi sono solubili e quindi aumentano la quantità di substrato nel surnatante finché la fase in soluzione è in equilibrio con la fase solida (figura 24A). Esistono casi in cui l'aumento della solubilità apparente del substrato raggiunge un plateau dove la maggiore quantità di legante aggiunta non provoca cambiamenti di concentrazione del substrato (figura 24B). Questa situazione si osserva in due casi: uno quando il substrato è completamente solubilizzato, l'altro caso quando il legante raggiunge la sua saturazione in soluzione (nel caso esso non sia molto solubile).

La seconda classe di diagrammi di solubilità di fase, cioè quelli di TIPO B sono quelli che caratterizzano la formazione di complessi insolubili. Anche in questo caso i diagrammi di fase possono mostrare andamenti leggermente diversi. In figura 25 sono riportati esempi di questo tipo di diagramma di solubilità. Nel primo caso (figura 25A)

si ha un leggero aumento della solubilità apparente del substrato che è dovuto alla formazione del complesso solubile, come nel caso dei diagrammi di tipo A. Questo aumento è però ristretto a causa della bassa solubilità del complesso e quando si è vicini al suo limite di solubilità, l'aggiunta di ulteriore legante provoca la precipitazione del complesso insolubile. In alcune situazioni la solubilità del complesso è talmente bassa che non è possibile determinarne la concentrazione in soluzione e quindi il diagramma di fase assume una forma diversa dal caso appena descritto, in cui non è presente alcun aumento iniziale della solubilità apparente del substrato. In questo caso sarà possibile registrare solamente la diminuzione del substrato nel surnatante che è causata dal suo sequestro da parte del legante per la formazione del complesso insolubile (figura 25B).



**Figura 25.** Esempi di diagramma di fase di tipo B

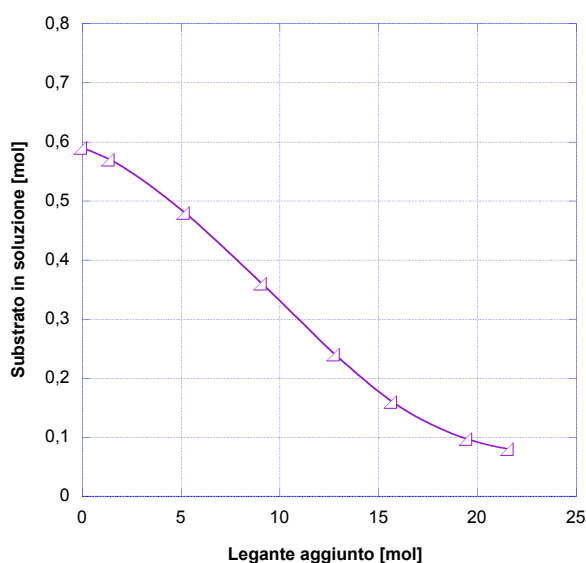
Quando ci si trova ad analizzare un diagramma di tipo B riferibile a quello illustrato in figura 25A si può affermare che, se il complesso responsabile dell'iniziale innalzamento della solubilità apparente del substrato è lo stesso che precipita lungo la

parte finale discendente del diagramma, allora l'aumento di concentrazione iniziale deve essere uguale al valore di concentrazione finale del substrato. I casi in cui si osserva questa condizione non sono frequenti poiché spesso in questi sistemi si assiste alla formazione di due o più complessi di cui solo uno potrebbe essere responsabile dell'innalzamento iniziale della solubilità apparente del substrato mentre un altro precipita nell'ultima parte del diagramma sequestrando tutto il substrato disponibile. L'aumento della solubilità apparente dovuto alla formazione di uno o più complessi può essere rilevato in alcuni casi anche oltre la parte finale del diagramma. Questo tipo di andamento sarebbe causato dalla formazione di un nuovo complesso più solubile di quello responsabile della diminuzione iniziale del diagramma.

Nei diagrammi di solubilità di fase di tipo B è interessante applicare la regola delle fasi precedentemente discussa per riuscire a determinare il numero di fasi e di composti presenti all'interno del sistema. Nella parte discendente del diagramma le fasi presenti all'interno del sistema sono almeno due (fase solida e fase liquida). I gradi di libertà in questa porzione di diagramma sono tre, cioè la temperatura, la pressione e la concentrazione del substrato (la concentrazione del legante è mantenuta costante dal sistema per complessare il substrato che rimane libero in soluzione). La regola delle fasi quindi indica che sono solamente due le fasi presenti in questa porzione di diagramma, per cui la fase solida presente può essere solamente un complesso insolubile o una soluzione solida tra due o più componenti.

Un tipo di diagramma di solubilità di fase che non appartiene alla classe dei diagrammi di tipo A né a quella dei diagrammi di tipo B (anche se è molto simile a quest'ultima categoria) mostra un andamento in cui la concentrazione molare di substrato in soluzione diminuisce immediatamente e progressivamente con l'aggiunta

di legante (figura 26). Una spiegazione di questo comportamento si ottiene anche in questo caso applicando la regola delle fasi. Essa infatti indica che in questa porzione di diagramma le fasi presenti all'interno del sistema sono due. Poiché una è la fase liquida e l'altra è la fase solida (rappresentata almeno nella parte iniziale dal substrato), l'ipotesi più attendibile è che il substrato formi una soluzione solida con il complesso che precipita



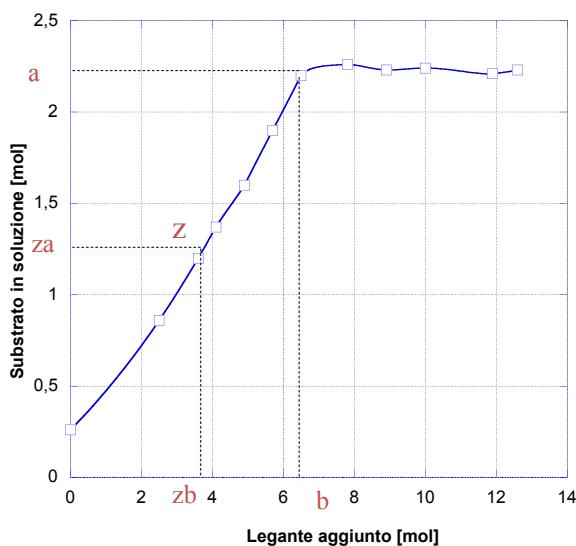
**Figura 26.** Esempio di diagramma di fase

Lo studio dei diagrammi di solubilità di fase permette sia di identificare le interazioni molecolari tra le sostanze presenti in un sistema ma anche di determinare la misura in cui queste interazioni avvengono. Diventa quindi molto interessante riuscire a individuare la stechiometria e le costanti di equilibrio della formazione di composti di interazione.

La rappresentazione grafica dei diagrammi di solubilità permette quindi di determinare, anche se in alcuni casi in modo approssimativo, sia la stechiometria che la costante di complessazione e il prodotto di solubilità dei complessi.

### 4.5.3 Calcolo della stechiometria

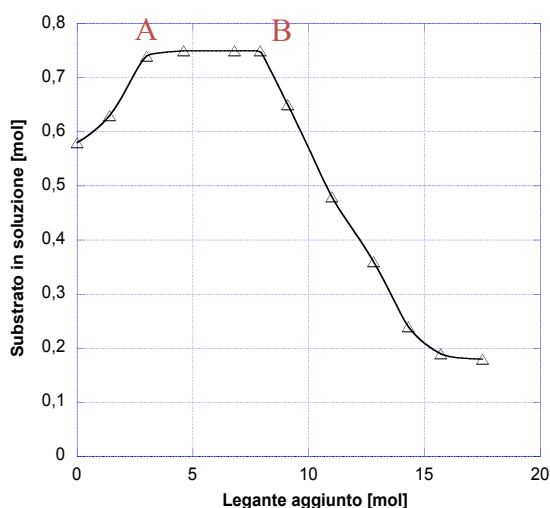
Per quanto riguarda i diagrammi di solubilità di fase di tipo A, il calcolo stechiometrico non è possibile se nel grafico non si raggiunge un plateau nella concentrazione del substrato come nel caso della figura 24A. Questo è dovuto al fatto che la presenza continua di substrato solido ne mantiene un'attività costante e quindi non è possibile determinarne l'ordine di complessazione. Nel caso in cui la concentrazione di substrato raggiunga un plateau di concentrazione (fig. 24B), allora è possibile calcolare la stechiometria del complesso. L'aumento della solubilità apparente dei due composti è proporzionale alla loro quantità che entra a far parte del complesso. Il calcolo della stechiometria quindi avviene rapportando gli intervalli di solubilità crescente del substrato e l'intervallo di solubilità crescente del legante (esempio in figura 36) partendo dalle loro solubilità iniziali (Z).



$$\frac{[a] - [za]}{[b] - [zb]} = \text{rapp. di coeff. stechiometrici}$$

**Figura 27.** Esempio di calcolo di coefficiente stechiometrico per diagramma di fase di tipo A

Al contrario del diagramma di tipo A, per un diagramma di tipo B è sempre possibile calcolare i coefficienti stechiometrici. In figura 28 è riportato un caso di diagramma di tipo B in cui si ha un innalzamento iniziale della solubilità apparente del substrato. Il calcolo stechiometrico avviene considerando la quantità totale di legante rappresentata dal plateau come quella che entra a far parte del complesso mentre per quanto riguarda il substrato, la parte che viene complessata è uguale a quella presente come sostanza libera non disciolta al punto A che si ottiene sottraendo la quantità di substrato totale introdotta ( $[S]_{tot}$ ) alla quantità di substrato in soluzione al punto A ( $[S]_A$ ).



$$\frac{[S]_{tot} - [S]_A}{[L]_B - [L]_A} \text{ rapp. di coeff. stechiometrici}$$

**Figura 28.** Esempio di calcolo di coefficiente stechiometrico per diagramma di fase di tipo B

Lo stesso tipo di calcolo per il coefficiente stechiometrico può essere applicato a un diagramma di tipo B che non presenta un innalzamento iniziale della solubilità apparente del substrato. In questo caso il punto A sarà sull'asse delle coordinate e corrisponderà alla concentrazione di legante uguale a zero.

Nel caso in cui la porzione discendente del diagramma è una linea dritta che si estende vicino all'asse x, è possibile ottenere la stechiometria del complesso estrapolando la curva del diagramma alla concentrazione del substrato che corrisponde allo zero. La differenza tra la concentrazione dell'agente legante all'inizio della curva e quella al punto estrapolato, meno la quantità di legante presente nel complesso solubile è uguale alla quantità di legante necessario per interagire con il substrato libero in soluzione. Il rapporto tra la concentrazione di legante necessaria a complessare il substrato e il substrato in soluzione indica i coefficienti stechiometrici del complesso.

#### 4.5.4 Calcolo delle costanti di equilibrio

Higuchi e Connors nel loro lavoro sui diagrammi di solubilità di fase hanno altresì espresso un metodo per il calcolo approssimativo delle costanti di equilibrio nella formazione di un complesso. Come già accennato è doveroso precisare che i sistemi in cui avvengono interazioni molecolari sono complicati da analizzare in modo dettagliato, per cui così come il calcolo stechiometrico di un complesso può risultare approssimativo, per quanto riguarda le costanti di equilibrio si deve affermare che nella maggior parte dei casi si parlerà di costanti di equilibrio *apparenti*. Per questo motivo l'applicazione di queste costanti potrebbe risultare limitata e non completamente affidabile per interpretazioni sofisticate e dettagliate. Poiché esse si basano su un rapporto stechiometrico dei componenti ricavato da un calcolo delle concentrazioni di questi in soluzione, tutte le costanti considerate in questo paragrafo sono *costanti di concentrazione*, con le concentrazioni espresse in molarità.

La formula generale di un complesso tra due molecole è  $S_mL_n$  in cui "S" è il substrato, "L" il legante o complessante ed "m" e "n" i rapporti stechiometrici dei due. Se

consideriamo un diagramma di solubilità di fase di tipo A, il calcolo della costante di equilibrio vale anche per la porzione ascendente iniziale del diagramma di fase di tipo B. La costante di formazione del complesso è data da:

$$K = \frac{(S_m L_n)}{(S)^m (L)^n} \quad [4]$$

Esprimendo le concentrazioni in termini di quantità note rilevate dal diagramma di solubilità in cui  $S_t$  è la concentrazione di substrato maggiore determinata in soluzione, indipendentemente dal suo stato molecolare,  $L_t$  è la concentrazione totale di legante aggiunto e  $S_0$  la solubilità del substrato in assenza di legante si ottiene, per  $n=1$ , un grafico espresso da una retta da cui è possibile ricavare la costante di equilibrio del sistema:

$$S_t = \frac{mKS_0^m L_t}{1+KS_0^m} + S_0 \quad [5]$$

Un grafico quindi che rappresenta la formazione di un complesso di stechiometria  $S_m L$  in cui sono riportate sull'asse delle ascisse le concentrazioni  $L_t$  e sull'asse delle ordinate le concentrazioni  $S_t$  è costituito da una retta (diagramma di tipo A) la cui intercetta è uguale a  $S_0$  e la sua pendenza (e quindi il suo coefficiente angolare) è data da:

$$Pendenza = \frac{mKS_0^m}{1 + KS_0^m} \quad [6]$$

Se "m" è noto, è possibile calcolare quindi la costante di equilibrio dalla pendenza della retta descritta dall'equilibrio di solubilità di fase del complesso e in particolare se  $m=1$ , cioè se il complesso che si forma è in rapporto stechiometrico di 1:1, si può semplificare ulteriormente l'equazione:

$$[7]$$

$$K_{1:1} = \frac{\text{pendenza}}{S_0(1 - \text{pendenza})}$$

Nel caso in cui il diagramma di fase tipo A non sia una retta, è possibile che si trovi in soluzione un complesso di stechiometria 1:2 oltre che 1:1 che quindi sono caratterizzate dalle costanti:

$$K_{1:1} = \frac{(SL)}{(S)(L)} \quad [8]$$

$$K_{1:2} = \frac{(SL_2)}{(SL)(L)} \quad [9]$$

Le equazioni del bilancio di massa risultano essere quindi:

$$S_t = (S) + (SL) + (SL_2) \quad [10]$$

$$L_t = (L) + (SL) + 2(SL_2) \quad [11]$$

Combinando le equazioni appena descritte per il diagramma di fase si tipo A diverso da una retta si ottiene:

$$S_t = \frac{L_t[K_{1:1}S_0 + K_{1:1}K_{1:2}S_0(L)]}{1 + K_{1:1}S_0 + 2K_{1:1}K_{1:2}S_0(L)} + S_0 \quad [12]$$

in cui il grafico di  $S_t$  contro  $L_t$  avrà un'intercetta di  $S_0$  e una pendenza che è una funzione di  $(L)$ .

Le descrizioni appena viste si applicano anche al segmento iniziale dei diagrammi di tipo B in cui si osserva un aumento iniziale della solubilità apparente del substrato. È possibile inoltre determinare le costanti di stabilità della parte discendente dei diagrammi di tipo B, assumendo che la stechiometria del complesso sia nota.

La costante di equilibrio del complesso è sempre la stessa descritta per il diagramma di fase di tipo A, ovvero:

$$K = \frac{(S_m L_n)}{(S)^m (L)^n} \quad [13]$$

In questo caso il bilancio di massa dei due componenti in un punto x del diagramma risulta essere:

$$S_x = (S) + m(S_m L_n) \quad [14]$$

$$L_x = (L) + n(S_m L_n) \quad [15]$$

In questo tipo di diagramma la concentrazione del complesso è costante lungo tutto il tratto discendente della curva, poiché la soluzione è in equilibrio con il complesso in fase solida. La concentrazione del substrato nel punto finale del tratto discendente (punto B) è minima e attribuibile al complesso in soluzione, in quanto il substrato dovrebbe essere tutto sequestrato dal legante per formare il complesso, per cui:

$$K_{m:n} = \frac{S_b}{(S_x - mS_b)^m (L_x - nS_b)^n} \quad [16]$$

Se il complesso è responsabile dell'andamento lungo tutta la curva del diagramma di solubilità allora  $S_b$  può essere sostituito dall'aumento di concentrazione iniziale da  $S_0$  al punto di inizio del plateau.

#### ***4.6 Solubilità di reina e sucralfato***

Per condurre in un modo adeguato le analisi di interazione tra reina e sucralfato è stata dapprima testata la solubilità delle due molecole mediante spettrofotometria Uv-vis per la reina e HPLC per il sucralfato. In tabella 9 sono riportati i valori di solubilità

della reina in differenti solventi e a diverse temperature mentre in tabella 10 sono riportate le solubilità del sucralfato in acqua e PBS a 25 e 37 °C.

**Tabella 9.** Solubilità della reina in diversi solventi e a diverse temperature

	<b>Solubilità a 25 °C (mol/L)</b>	<b>Solubilità a 37 °C (mol/L)</b>
<b>Acqua</b>	0,00032 ± 0,0001	0,0022 ± 0,0002
<b>PBS pH 7,4</b>	0,00032 ± 0,0001	0,006 ± 0,0002
<b>Etanolo</b>	0,0006	-
<b>Metanolo</b>	0,0024	-
<b>DMSO</b>	0,034	-
<b>Acetone</b>	0,0103	-

**Tabella 10.** Solubilità del sucralfato in diversi solventi e a diverse temperature

	<b>Solubilità a 25 °C (mol/L)</b>	<b>Solubilità a 37 °C (mol/L)</b>
<b>Acqua</b>	-	-
<b>PBS pH 7,4</b>	0,0019 ± 0,0001	0,0023 ± 0,0001

La solubilità del sucralfato è favorita dalla presenza dei sali di fosfato in soluzione di PBS grazie alla natura anfotera dell'alluminio idrossido che lo costituisce. Tuttavia si deve sottolineare che i valori riportati in tabella 10 risultano essere scarsamente attendibili poiché molto prossimi ai valori di LOQ del metodo. Anche per quanto riguarda la reina si osserva un consistente aumento della solubilità in soluzioni

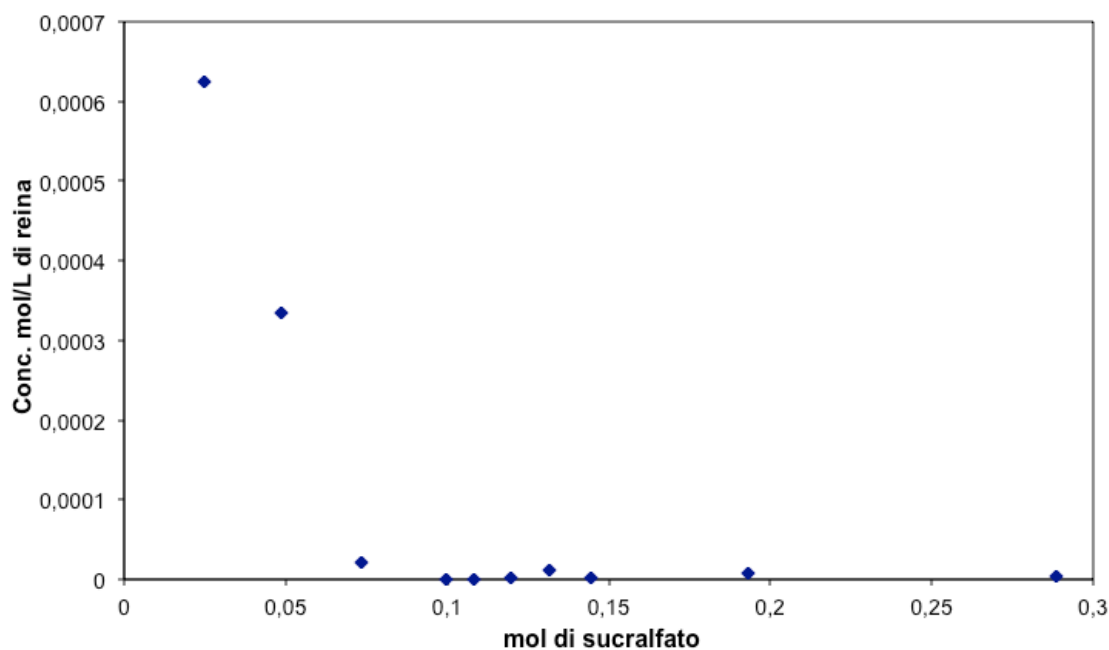
acquose. In questo caso è però la temperatura che favorisce il processo di dissoluzione della sostanza.

## ***4.7 Interazione tra reina e sucralfato***

### **4.7.1 Identificazione dell'interazione**

Lo studio di interazione tra reina e sucralfato è stato condotto ispirandosi alle teorie di Higuchi Connors appena descritte. Studi preliminari per verificare la presenza di interazione tra le due molecole hanno previsto la preparazione di soluzioni di reina di concentrazione  $2,11 \cdot 10^{-3}$  mol/L in cui sono state aggiunte differenti quantità di sucralfato a temperatura ambiente e in NaOH 0,1 M e PBS a pH 7,4. L'utilizzo di NaOH è stato scelto per la buona solubilità che la reina mostra in questo tipo di solvente, il che è dovuto alla formazione in soluzione del suo sale sodico che appare rosso intenso.

L'introduzione di sucralfato nelle soluzioni colorate ha permesso l'ottenimento di quantità visibili di precipitato rosso scuro crescenti ma comunque in quantità esigue. Le provette sigillate contenenti le soluzioni col precipitato sono state mantenute a una temperatura costante di 25°C per tre giorni e sottoposte periodicamente ad agitazione. Le soluzioni surnatanti sono poi state analizzate con spettrofotometro UV per la determinazione della concentrazione. Dai risultati ottenuti si è ricavato il grafico rappresentante l'andamento della quantità di reina disciolta nel surnatante, in funzione della quantità di sucralfato aggiunta (Figura 29):



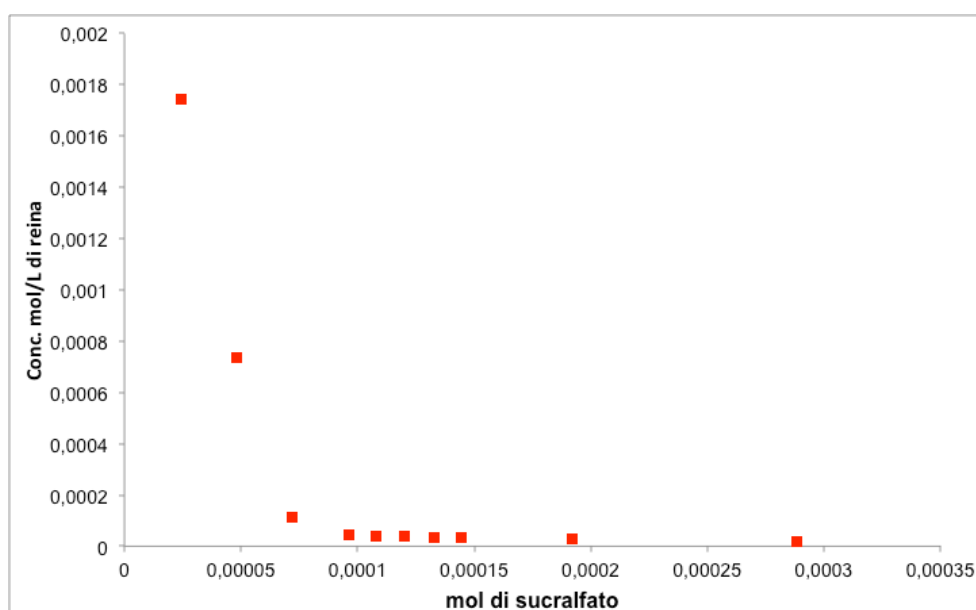
**Figura 29.** Andamento della concentrazione di reina in soluzione di NaOH 0,1 M in funzione del sucralfato aggiunto

L'andamento della concentrazione di reina in soluzione è decisamente influenzato dalla presenza del sucralfato e più precisamente diminuisce all'aumentare della quantità di sucralfato introdotta. La porzione di sucralfato necessaria per ridurre a zero la concentrazione di reina in soluzione è di 0,1 mol.

Le analisi successive di interazione hanno previsto l'utilizzo di PBS a pH 7,4 come solvente anziché NaOH 0,1 M. Anche in questo caso la concentrazione iniziale delle soluzioni di reina era di  $2,11 \cdot 10^{-3}$  mol/L. Le provette sigillate contenenti i campioni sono state mantenute a una temperatura costante di 25°C per tre giorni e sottoposte periodicamente ad agitazione. I parametri con cui sono state allestite queste analisi sono riportati in tabella 1 nella sezione 3.2.2.

Dopo l'aggiunta delle differenti quantità di sucralfato si osserva la formazione di precipitato rosa scuro con diverse sfumature tendenti all'arancione o al rosso secondo

la quantità di sucralfato introdotta. In particolare, aumentando la dose di quest'ultimo, si osserva che il precipitato (in questo caso più abbondante dell'analisi precedente) schiarisce sempre di più, il che indica un accumulo della sostanza in eccesso. I risultati ottenuti hanno di nuovo mostrato una buona interazione tra reina e sucralfato (figura 30).



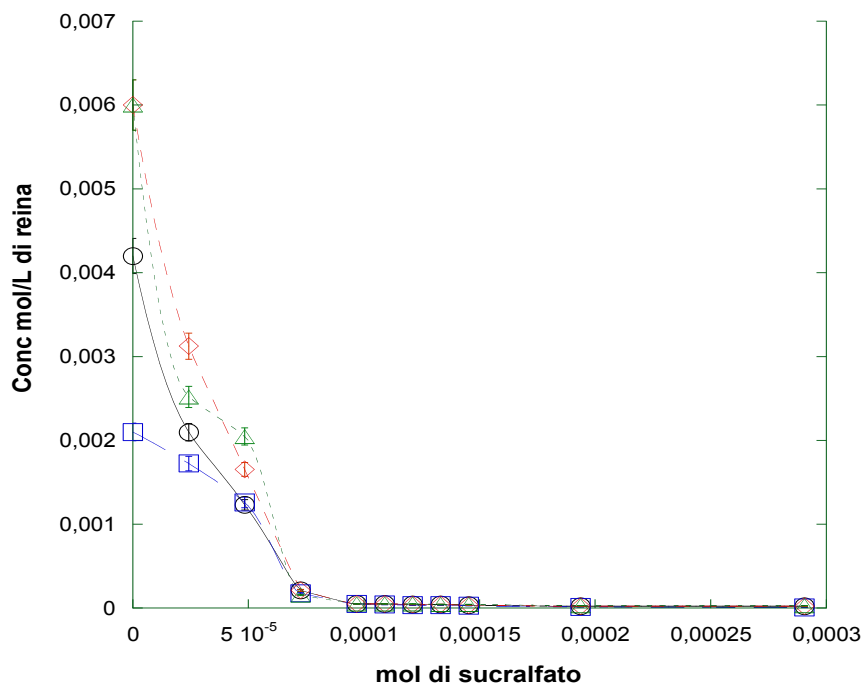
**Figura 30.** Andamento della concentrazione di reina in soluzione del PBS in funzione del sucralfato

La quantità di sucralfato necessaria per ridurre completamente la concentrazione di reina si è mostrata essere anche in questo caso di 0,1 mol.

Lo stadio successivo ha quindi previsto l'allestimento di un'analisi che simuli il più possibile le condizioni fisiologiche in cui l'interazione tra le due molecole dovrebbe avvenire. Si è deciso quindi di mantenere i campioni preparati in PBS ad una temperatura di 37°C per tre giorni. La composizione in materie prime dei campioni per questo tipo di studio di interazione è riportata in tab. 2 nella sezione 3.2.2.

Il primo ciclo di analisi ha previsto l'allestimento di campioni in cui il volume di PBS era mantenuto costante (5 ml) mentre sono variate le quantità di reina e sucralfato

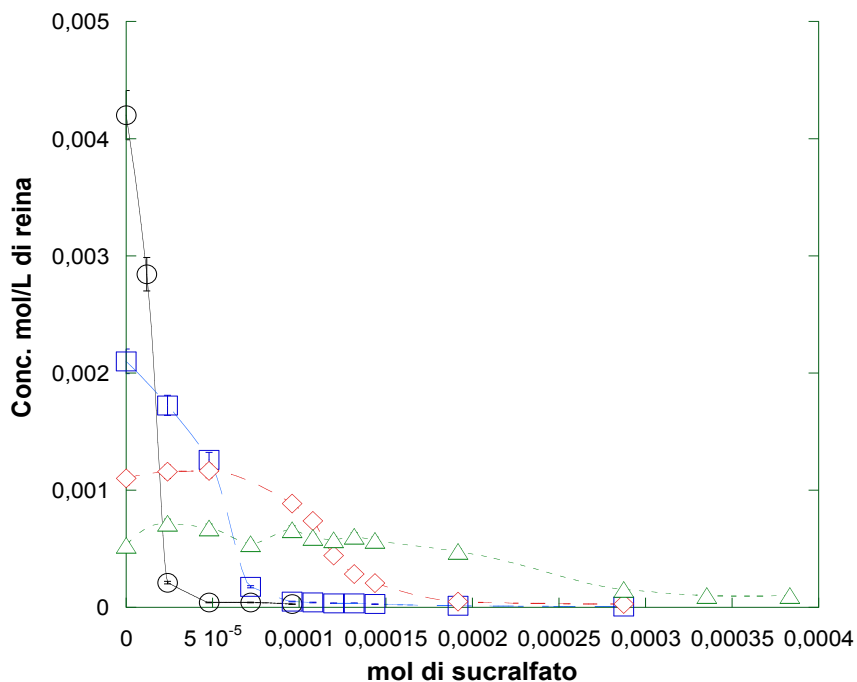
introdotte nei campioni. In figura 31 è riportato il grafico che mostra l'andamento della concentrazione di reina in questo studio di interazione.



**Figura 31.** Andamento della concentrazione di reina in 5 ml di PBS a 37 °C. I diversi colori si riferiscono alle differenti quantità di reina introdotte inizialmente nel campione, in particolare:  $4,22 \cdot 10^{-5}$  mol (rombi rossi),  $8,44 \cdot 10^{-5}$  mol (triangoli verdi),  $2,11 \cdot 10^{-5}$  mol (cerchi neri),  $1,06 \cdot 10^{-5}$  mol (quadrati blu).

È interessante notare che l'andamento del grafico è simile in tutti i casi studiati. La quantità di sucralfate necessaria per ridurre la concentrazione della reina in soluzione non dipende dalla dose di reina introdotta inizialmente nel campione. Si può infatti notare che la saturazione del sistema si raggiunge in ogni caso con 0,0001 mol di sucralfate. L'osservazione di questi dati induce a pensare che il parametro che condiziona maggiormente il sistema sia la quantità di sucralfate in soluzione piuttosto che la dose di reina introdotta. A conferma di tale ipotesi è stato quindi allestito un

secondo ciclo di analisi in cui la quantità di reina inizialmente introdotta rimane costante ( $1,06 \cdot 10^{-5}$  mol) mentre variava il volume di PBS e le quantità di sucralfato introdotte. In figura 32 è riportato il grafico che mostra l'andamento della concentrazione di reina in questo studio di interazione.



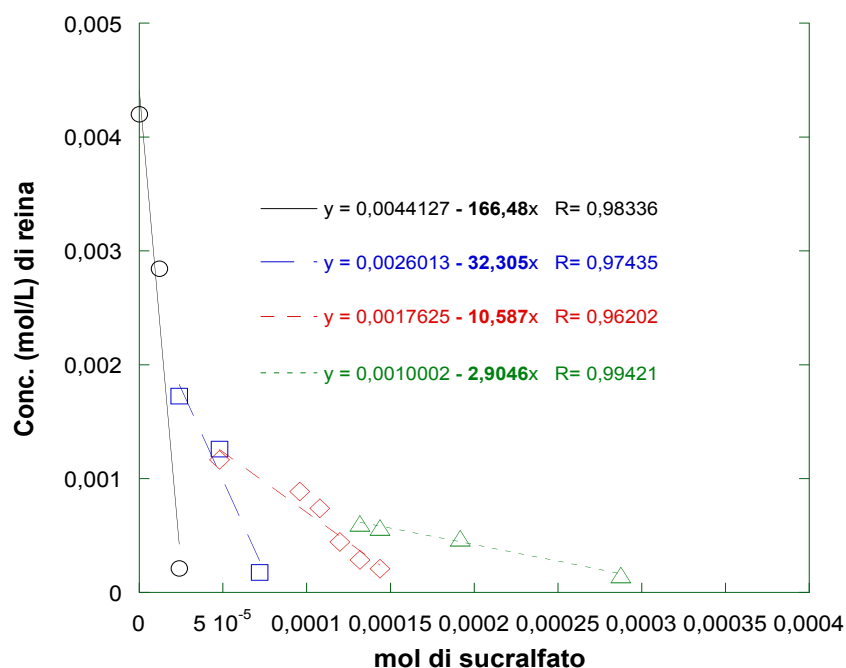
**Figura 32.** Andamento della concentrazione di  $1,06 \cdot 10^{-5}$  mol di reina in PBS a 37 °C. I diversi colori si riferiscono ai differenti volumi di PBS, in particolare: 2,5 ml (cerchi neri), 5 ml (quadrati blu), 10 ml (rombi rossi), 20 ml (triangoli verdi).

I risultati ottenuti da questo secondo ciclo di analisi mostrano interessanti andamenti di concentrazione della reina variando il volume di solvente in cui è condotto l'esperimento.

L'andamento del grafico ottenuto dall'analisi svolta in 2,5 ml di PBS (cerchi neri) è simile a quello visto nel ciclo di esperimenti precedente in cui la concentrazione di reina diminuisce in modo repentino dopo aggiunta di esigue quantità di sucralfato. In

questo caso la concentrazione iniziale della reina in soluzione è alta e pressoché uguale alla sua solubilità in PBS. L'aumento del volume di analisi causa una modificazione dell'andamento della concentrazione della reina in soluzione, la quale diminuisce in modo meno repentino. I diagrammi ottenuti dagli esperimenti svolti in volumi di 10 e 20 ml mostrano un andamento molto diverso da quelli osservati a concentrazioni di reina di partenza superiori. In questi casi i grafici assumono un andamento riferibile a un tipico diagramma di solubilità di fase di tipo B [71]. L'osservazione dettagliata dei diagrammi ottenuti dall'analisi in volumi di 10 e 20 ml infatti mostra un lieve aumento iniziale della concentrazione apparente della reina in soluzione, che potrebbe essere dovuto alla presenza di un composto di interazione in soluzione. Una delle spiegazioni possibili di questo comportamento può essere data dal fatto che alte concentrazioni di reina non permettono l'identificazione del composto di interazione tra le due molecole. La reina potrebbe infatti interferire con la misurazione del composto in soluzione oppure anche con il processo di formazione dello stesso. Nel caso, infatti, la reina formasse una soluzione solida con il sucralfato in eccesso, non sarebbe possibile la formazione di più composto di interazione[71]. Al contrario, nelle analisi svolte con soluzioni di reina più diluite, era meno probabile l'interferenza della reina libera.

La pendenza della curva che descrive la riduzione della concentrazione della reina in soluzione, diminuisce con l'aumentare del volume di analisi. In figura 33 sono riportate le porzioni di grafico che descrivono la diminuzione della concentrazione di reina unitamente ai dati di regressione lineare dei punti che le costituiscono. Il coefficiente angolare di queste rette in valore assoluto diminuisce con l'aumento del volume.

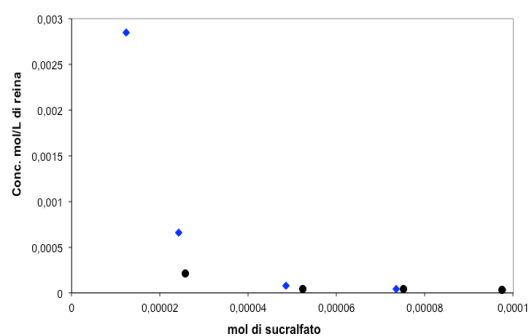


**Figura 33.** Approssimazione della diminuzione lineare della concentrazione di rena in soluzione in diversi volumi di PBS: 2,5 ml (cerchi neri), 5 ml (quadrati blu), 10 ml (rombi rossi), 20 ml (triangoli verdi).

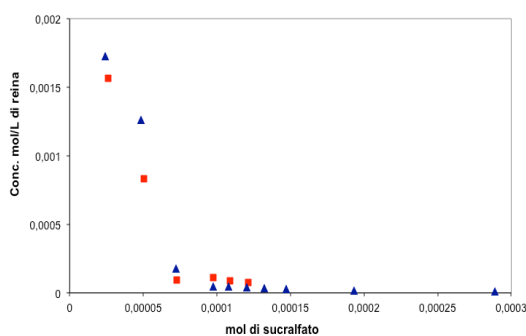
La spiegazione di questo comportamento potrebbe risiedere nella presenza di un terzo composto in soluzione che assorbe all'UV-vis alla lunghezza d'onda della rena. Questa affermazione è confermata anche dal fatto che nell'analisi condotta in volumi di 10 e 20 ml si nota un aumento iniziale della quantità di rena rispetto alla dose presente nel campione. Secondo Higuchi e Connors[71] l'apparente aumento della solubilità di una sostanza in soluzione potrebbe essere dovuto alla formazione di un complesso per cui la molecola legante porta in soluzione una maggiore quantità di substrato. Questa ipotesi è supportata anche dal fatto che la parte finale del grafico ottenuto dall'interazione in 10 e 20 ml non raggiunge mai una concentrazione di rena pari a zero. Sembra piuttosto che una piccola parte di rena rimanga in soluzione

indipendentemente dall'ulteriore aggiunta di sucralfato. La reina rilevata dallo spettrofotometro in questa parte di grafico potrebbe essere quella complessata con il sucralfato.

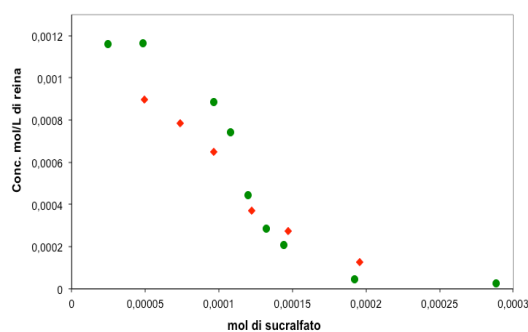
Le stesse soluzioni surnatanti misurate quantitativamente mediante spettrofotometria UV-vis sono state analizzate anche tramite un'analisi HPLC. Lo studio cromatografico dei campioni ottenuti è stato allestito per fornire informazioni riguardo la presenza dell'ipotetico composto di interazione. Infatti il passaggio della soluzione surnatante all'interno della colonna cromatografica sottopone le sostanze presenti in soluzione a forze intermolecolari che dipendono dalla composizione della fase stazionaria. La diversa affinità di ogni composto verso la fase stazionaria determina il tempo di ritenzione con cui detti composti sono eluiti e quindi rilevati dal detector. Ammettendo che nelle soluzioni esaminate l'affinità della reina per il sucralfato nell'ipotetico complesso sia più alta dell'affinità per la fase stazionaria, ci si deve attendere che la reina libera eluisca con un tempo di ritenzione uguale a quello delle soluzioni standard di riferimento mentre la reina legata al sucralfato nel complesso non sia ritenuta in colonna e non venga pertanto rivelata. La conseguenza di questa assunzione è che nel caso di formazione di un complesso l'analisi HPLC dovrebbe restituire una concentrazione di reina nei surnatanti inferiore rispetto a quella misurata con il metodo UV-vis che non discerne per la reina libera e quella complessata dal principio attivo. I risultati ottenuti mediante analisi HPLC delle soluzioni surnatanti sono riportati in figura 34 a confronto con i dati di spettrofotometria UV-vis.



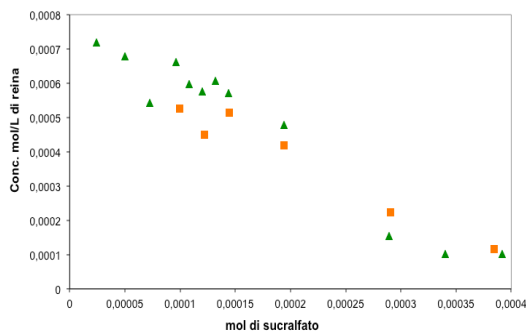
A)



B)



C)



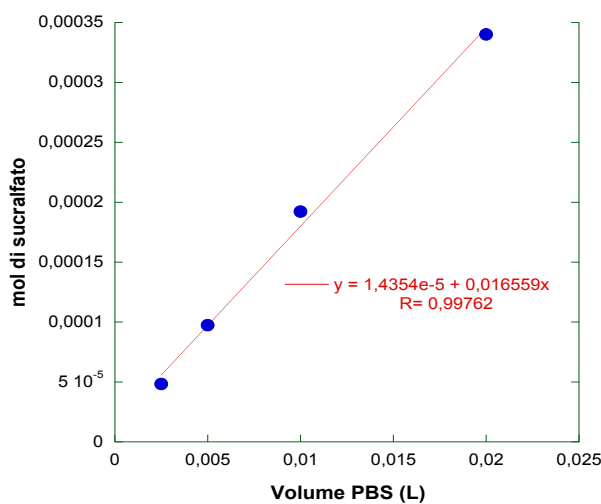
D)

**Fig. 34.** Confronto dei dati ottenuti mediante spettrofotometria UV-vis con dati misurati con HPLC in diversi volumi: A) 2,5 ml di PBS (HPLC in blu e Uv-vis in nero); B) 5 ml di PBS (HPLC in rosso e Uv.vis in blu); C) 10 ml di PBS (HPLC in rosso e Uv.vis in verde); D) 20 ml di PBS (HPLC in arancio e Uv-vis in verde)

I dati ottenuti con HPLC si sono mostrati per lo più sovrapponibili ai dati ottenuti mediante spettrofotometria Uv-vis. È da notare però l'andamento delle concentrazioni della reina nelle parti iniziali dei diagrammi. In particolare per quanto riguarda i dati riferiti alle soluzioni più diluite, si osserva che i valori di concentrazione misurati mediante HPLC, pur mostrando lo stesso andamento di quelli misurati con spettrofotometria UV-vis risultano essere lievemente inferiori rispetto a questi ultimi. Questa osservazione sembrerebbe quindi avvalorare l'assunzione fatta e conferma l'ipotesi di lavoro. Si può ritenere che le elevate dimensioni molecolari del composto

di interazione non permettano una forte interazione con la fase stazionaria della colonna HPLC per cui il composto non era ritenuto in colonna e veniva eluito rapidamente insieme al solvente.

È interessante notare che a parità di quantità di reina in soluzione, le quantità di sucralfato necessarie per ridurre al minimo la concentrazione della reina nei diversi volumi di analisi crescevano in modo lineare con il volume delle soluzioni stesse (figura 35).

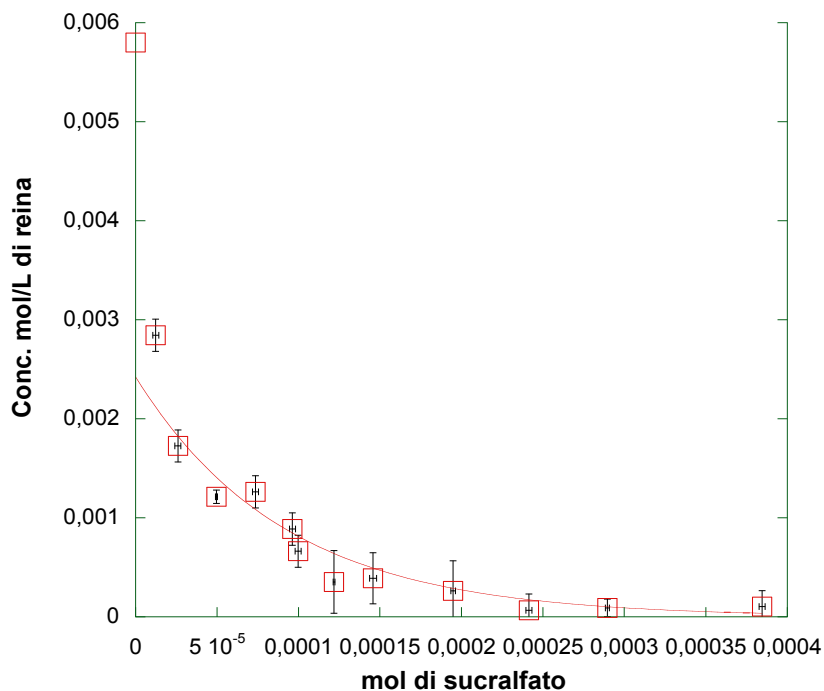


**Figura 35.** Relazione lineare tra quantità di sucralfato necessaria per ottenere la concentrazione minima di reina in soluzione e volume di analisi

Questa osservazione consente di corroborare e di precisare ulteriormente quanto affermato nel commento alla figura 31. In effetti il dato riportato in figura 35 indica che sia la concentrazione di sucralfato in soluzione (più che la sua quantità assoluta) il fattore che determina la formazione di un complesso insolubile.

I dati ottenuti in differenti volumi di analisi sono quindi stati elaborati in modo da ottenere una curva complessiva che descrive l'andamento della concentrazione della

reina in presenza di sucralfato (figura 36). Tale curva è stata disegnata riunendo in un unico tracciato i dati riportati in figura 32.

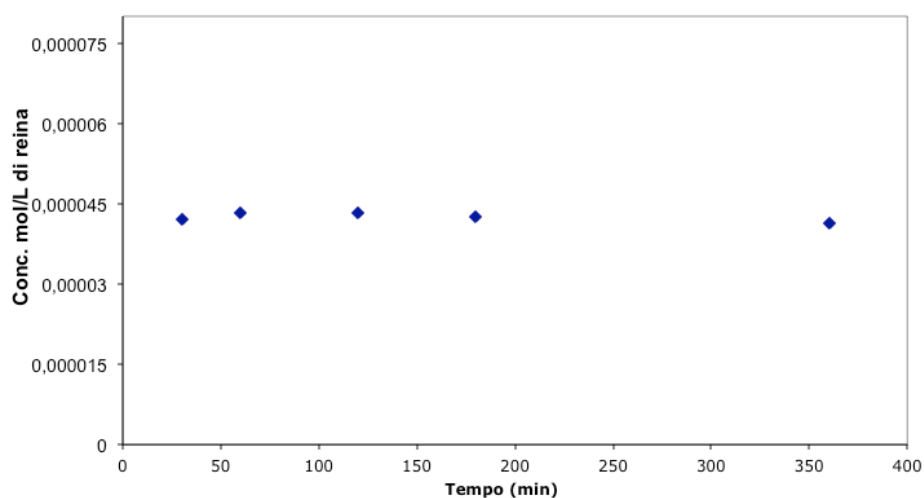


**Figura 36.** Andamento approssimato della concentrazione di rena in funzione del sucralfato in soluzione

L'andamento che segue la concentrazione della rena è definibile secondo Higuchi-Conners come un diagramma di solubilità particolare, ne di tipo B ne di tipo A. Il complesso che si forma tra le due molecole è molto insolubile e quindi non è rilevabile ad alte concentrazioni di rena. L'andamento di questo tipo di diagramma è stato anche descritto come un possibile effetto "salting out" in cui l'aggiunta di un composto provoca la precipitazione di un altro presente in soluzione[72]. Gli stessi autori propongono un'ulteriore ipotesi su questo tipo di comportamento secondo la quale la composizione del sistema dopo introduzione del legante abbia un effetto sull'assorbimento dello spettro del substrato. Queste supposizioni potrebbero essere

accettate se non fosse per il fatto che con l'osservazione di campioni più diluiti mostra andamenti riferibili alla formazione di un composto di interazione in soluzione. L'ipotesi che più si addice al caso in studio sembrerebbe piuttosto essere quella avanzata da Higuchi e Connors[71] riguardo a questo tipo di diagramma di solubilità di fase, che descrive la formazione di un complesso, il quale precipita formando una soluzione solida con il substrato presente ancora come corpo di fondo. Questo sarebbe infatti il motivo per cui aumentando la quantità di reina nei campioni (figura 31), la porzione di sucralfato necessaria a diminuirne la concentrazione non varia con il variare della dose. Le analisi svolte in un volume maggiore di solvente (figura 32) consegnano un'ulteriore informazione circa l'interazione tra le due molecole. In soluzioni di reina diluite diventa possibile individuare la formazione di un composto di interazione tra reina e sucralfato grazie al leggero aumento di assorbanza del campione rispetto all'assorbanza delle soluzioni di reina in assenza di sucralfato. Purtroppo i valori di concentrazione di reina in soluzione ottenuti al termine della curva (parte destra) sono troppo bassi per consentire un calcolo approssimativo della stechiometria del complesso.

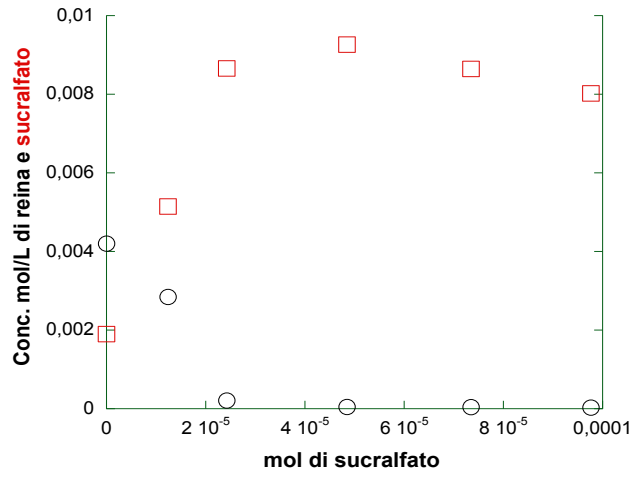
Per concludere la prima parte della descrizione dell'interazione tra reina e sucralfato è stato effettuato uno studio sul tempo che impiega il sucralfato a diminuire la concentrazione della reina in soluzione. In figura 37 è riportato un grafico che mostra la quantità di reina in soluzione di 3 ml di PBS in presenza di  $9,6 \cdot 10^{-5}$  mol di sucralfato a differenti tempi di prelievo.



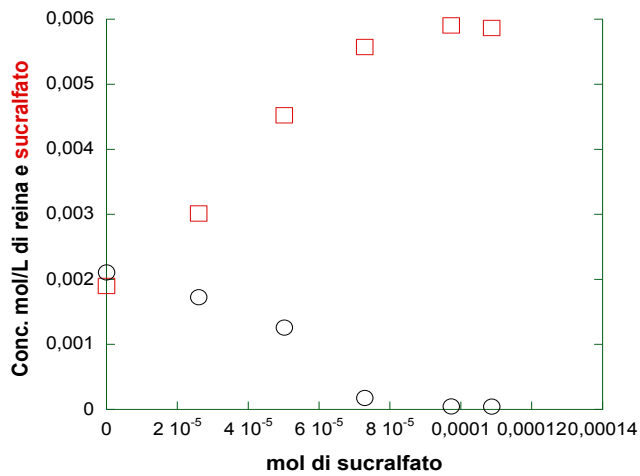
**Figura 37.** Andamento nel tempo della concentrazione della reina in soluzione di 3 ml di PBS in presenza di sucralfato ( $9,6 \cdot 10^{-5}$  mol)

La concentrazione di reina è ridotta al minimo già dopo 30 min di interazione tra le due molecole. Il dato risulta essere di particolare interesse in vista di un possibile sfruttamento dell'interazione tra sucralfato e reina per ridurre in tempi rapidi la concentrazione di quest'ultima nel grande intestino.

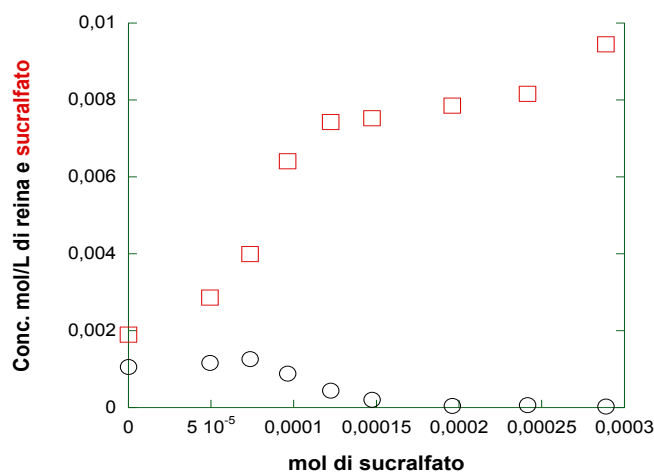
Si è deciso in seguito di studiare anche l'andamento della concentrazione del sucralfato in soluzione. Le stesse soluzioni surnatanti analizzate mediante spettrofotometria UV-vis per la determinazione della concentrazione della reina in differenti volumi di PBS, sono state sottoposte ad analisi HPLC per quantificare la concentrazione di sucralfato presente al loro interno. Nelle figure 38, 39, 40, 41 sono riportati singolarmente i grafici che mostrano l'andamento della concentrazione della reina (precedentemente riportati nella figura 32) e del sucralfato in soluzione in funzione della quantità di sucralfato aggiunta inizialmente.



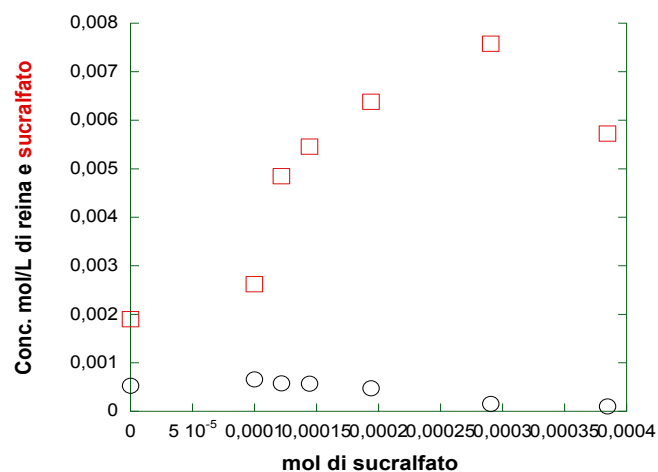
**Figura 38.** Andamento della concentrazione di sucralfato e reina in soluzione di PBS 2,5 ml



**Figura 39.** Andamento della concentrazione di sucralfato e reina in soluzione di PBS 5 ml



**Figura 40.** Andamento della concentrazione di sucralfato (in rosso) e della reina (in nero) in soluzione di PBS 10 ml



**Figura 41.** Andamento della concentrazione di sucralfato (in rosso) e della reina (in nero) in soluzione di PBS 20 ml

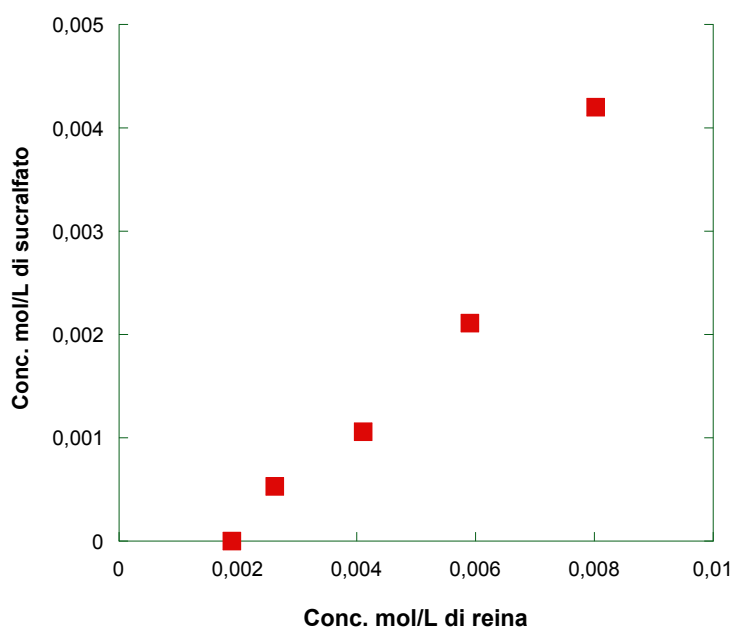
I profili di concentrazione ottenuti si prestano ad alcune interessanti considerazioni. Si osserva anzitutto che le quantità di sucralfato in soluzione aumentano con la quantità di sucralfato aggiunta. Si deve notare che il primo punto della curva (intercetta con l'asse y) rappresenta la solubilità del sucralfato all'equilibrio (0,0019 mol/L). Pertanto

i dati che costituiscono la curva del sucralfato sono tutti superiori al valore di solubilità del sucralfato. È altrettanto interessante osservare come le curve del sucralfato presentino un andamento sigmoidale crescente speculare rispetto all'andamento sigmoidale decrescente delle corrispondenti curve della reina.

Si deve altresì sottolineare che il metodo HPLC impiegato per la quantificazione del sucralfato prevede un trattamento preliminare del campione atto a liberare il saccarosio octasolfato che rappresenta la specie che viene quantificata dal metodo analitico. Pertanto pare evidente che il metodo HPLC presuppone la dissociazione del complesso e quantifica tutto il sucralfato nella soluzione campione, sia esso libero o complessato. Questa osservazione fornisce lo spunto per il calcolo del rapporto stechiometrico fra i componenti dell'ipotetico complesso ammettendo, contrariamente a quanto precedentemente affermato, che detto complesso sia solubile e rimanga in soluzione anziché dare luogo a una separazione di fase come conseguenza della formazione di un solido insolubile. Questa ipotesi si basa sull'osservazione del fatto che la concentrazione del sucralfato in soluzione aumenta oltre il valore di solubilità di questo principio attivo. Sulla base di questa ipotesi si può ammettere che la reina scompare dalla soluzione come composto libero poiché si lega al sucralfato dando luogo ad un composto nel quale, contrariamente al sucralfato, la reina non può essere rivelata con i metodi analitici adottati.

Pertanto la differenza fra i punti di concentrazione minima (iniziale) e massima (finale) per il sucralfato e di concentrazione massima (iniziale) e minima (finale) per la reina, delle curve riportate nelle figure 38-41 permette di calcolare il numero di moli di ciascuno dei componenti nel complesso. Dal rapporto tra il numero di moli di reina e quelle di sucralfato si può determinare il valore della stechiometria del complesso.

Tale valore è risultato pari a 1:2 moli di reina : sucralfato per la situazione riportata in figure 38 e 39. Il rapporto aumenta a 1:6,3 e 1:10 per le situazioni riportate nelle situazione 40 e 41 rispettivamente. Ciò indica che aumentando la diluizione del sistema serve un numero maggiore di moli di sucralfato per complessare una mole di reina. I dati relativi alla quantità di sucralfato di  $7,2 \cdot 10^{-5}$  (largamente superiore rispetto alla solubilità del sucralfato) di ciascuna delle figure 47-50 sono stati utilizzati per costruire un diagramma di solubilità di fase secondo Higuchi Connors [71] nel quale il substrato era rappresentato dal sucralfato stesso e il ligando era invece la reina. Il diagramma ottenuto è riportato in figura 42.

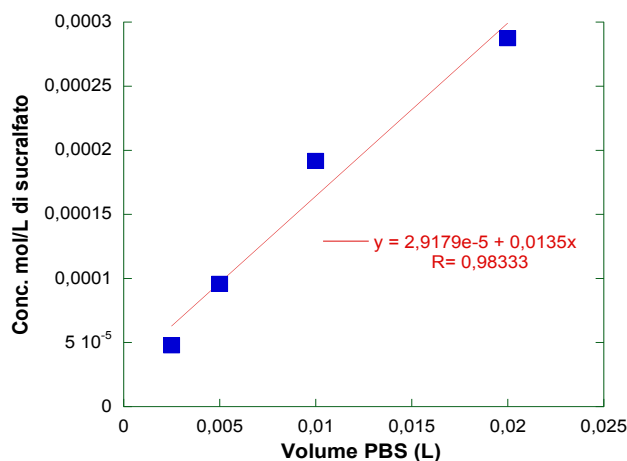


**Figura 42.** Diagramma che rappresenta l'andamento della concentrazione di sucralfato in funzione della concentrazione della reina.

Si osserva che il grafico corrisponde a un diagramma di tipo Ap, vale a dire a un diagramma che devia rispetto alla linearità. Secondo Higuchi e Connors tali tipi di diagrammi si ottengono quando si formano complessi di stechiometria variabile ( $S_nL$

dove in questo caso S è il sucralfato e L è la reina) e via via crescente in funzione della quantità di ligando [71]. Questo spiega l'aumento del valore di rapporto stechiometrico sopra descritto.

A supporto di questa analisi, in analogia con quanto già fatto per la reina (figura 35), in figura 43 è riportata la concentrazione massima di sucralfato in funzione del volume della soluzione considerata. Anche in questo caso si osserva una relazione lineare fra i parametri studiati



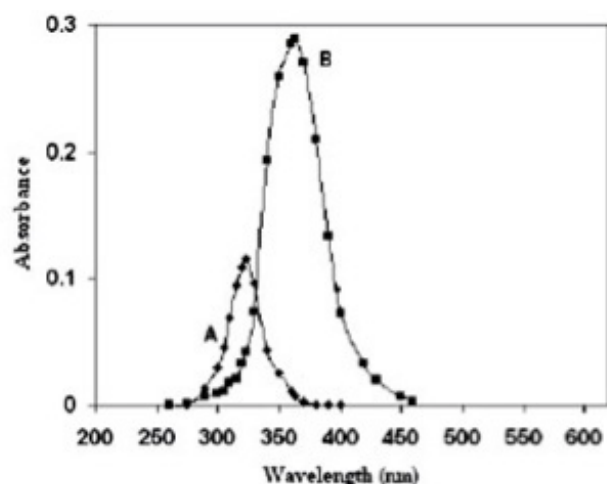
**Figura 43.** Relazione lineare tra concentrazione massima di sucralfato in soluzione e volume di analisi

#### 4.7.2 Analisi dello spettro Uv-vis delle soluzioni

La teoria di formazione dei complessi è un ottimo strumento per identificarne le interazioni tra diverse molecole. Tuttavia esistono tecniche strumentali molto affidabili che permettono di ottenere importanti informazioni non solo per quanto riguarda la presenza di un complesso in un sistema ma anche per quanto concerne la sua struttura.

La formazione di complessi può alterare alcune proprietà della soluzione in cui sono disciolti. Queste variazioni sono chiaramente rilevabili con tecniche come la spettrofotometria ultravioletta - visibile e la risonanza magnetica nucleare.

La spettrofotometria Uv-vis offre informazioni sull'assorbimento di energia da parte di una soluzione nella regione dello spettro elettromagnetico appartenente sia al campo del visibile (350 – 700 nm) che del vicino ultravioletto (200 – 350 nm). Lo spettro Uv è caratteristico per ogni sostanza ed è quindi utilizzato come metodo d'identificazione riconosciuto dalla Farmacopea Ufficiale[73]. La modificazione causata dalla formazione di un complesso era rilevabile poichè nella maggior parte dei casi si osserva uno shift batocromico di uno dei picchi caratteristici della sostanza. Lo shift batocromico (o red shift) consiste nello spostamento a lunghezze d'onda più alte (verso il rosso) della lunghezza d'onda di assorbimento del picco [74] [75]. Tale effetto dipende dalla presenza di gruppi funzionali, detti appunto batocromi, nelle adiacenze del cromoforo che è il gruppo della molecola responsabile dell'assorbimento. I gruppi batocromi possono schermare gli elettroni eccitabili dei gruppi cromofori che richiedono un'energia maggiore per l'assorbimento. In figura 44 è rappresentato un esempio di shift batocromico con aumento di intensità per la formazione di un complesso.

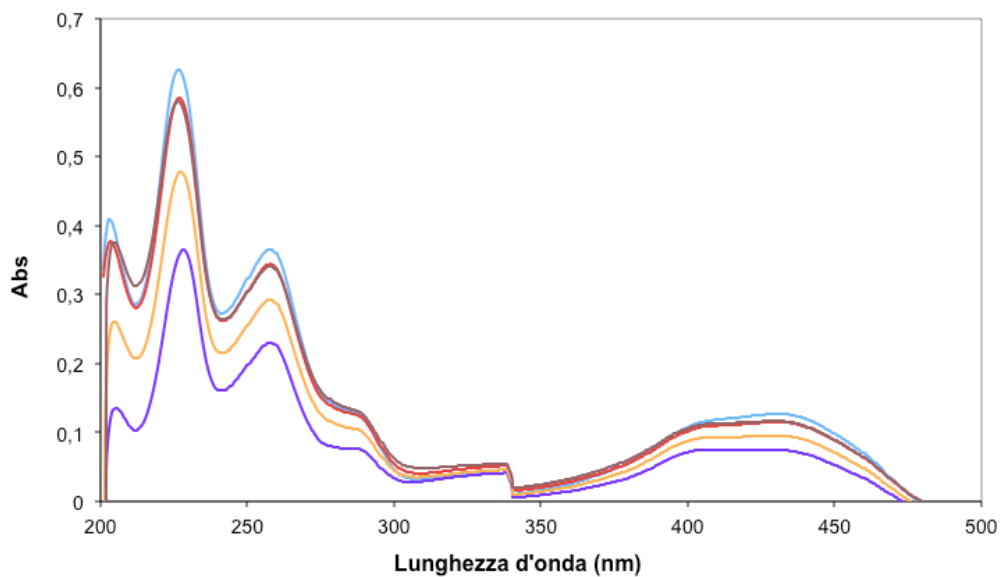


**Figura 44.** Confronto di spettri Uv-vis che mostrano uno shift batocromico causato dalla formazione di un complesso in soluzione [75].

Le soluzioni surnatanti ottenute dall'interazione tra reina e sucralfato sono quindi state analizzate con spettrofotometria UV-vis anche al fine di tracciare lo spettro completo delle sostanze. Lo scopo di questo studio era quello di identificare eventuali differenze nello spettro del campione rispetto a quello della reina pura.

Le soluzioni analizzate oltre alla reina pura sono state quelle che descrivono la parte iniziale del diagramma di solubilità di fase. In particolare sono state esaminate le soluzioni a volumi fissi ma con quantità di reina differente e quelle con quantità di reina fisse ma con volumi differenti.

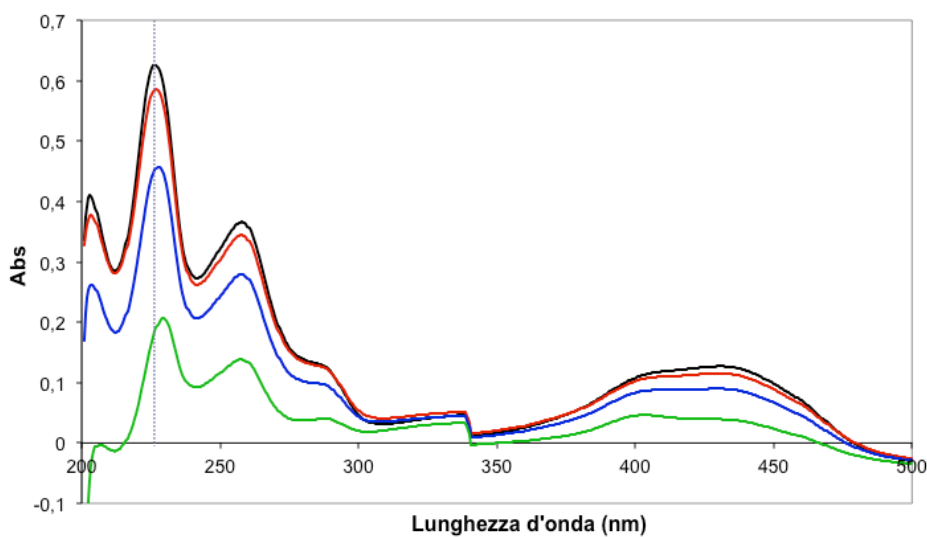
In figura 45 sono riportati gli spettri registrati dalle soluzioni surnatanti ottenute dall'interazione tra  $4,22 \cdot 10^{-5}$  mol,  $8,44 \cdot 10^{-5}$  mol,  $2,11 \cdot 10^{-5}$  mol,  $1,06 \cdot 10^{-5}$  mol e crescenti quantità di sucralfato in 5 ml di PBS.



**Figura 45.** Confronto di spettri Uv-vis della reina pura (azzurro) e dei campioni ottenuti dall'interazione in 5 ml di PBS di  $2,39 \cdot 10^{-5}$  mol di sucralfato con  $4,22 \cdot 10^{-5}$  mol (giallo),  $8,44 \cdot 10^{-5}$  mol (marrone chiaro),  $2,11 \cdot 10^{-5}$  mol (viola),  $1,06 \cdot 10^{-5}$  mol (rosso) di reina

Non si osserva alcuno shift batocromico per i picchi riportati in figura

Successivamente sono stati registrati gli spettri Uv-vis anche delle soluzioni più diluite. In figura 46 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi dei campioni preparati ponendo a contatto  $1,06 \cdot 10^{-5}$  mol di reina e  $2,39 \cdot 10^{-5}$  mol di sucralfato in 5, 10, 20 ml di PBS.

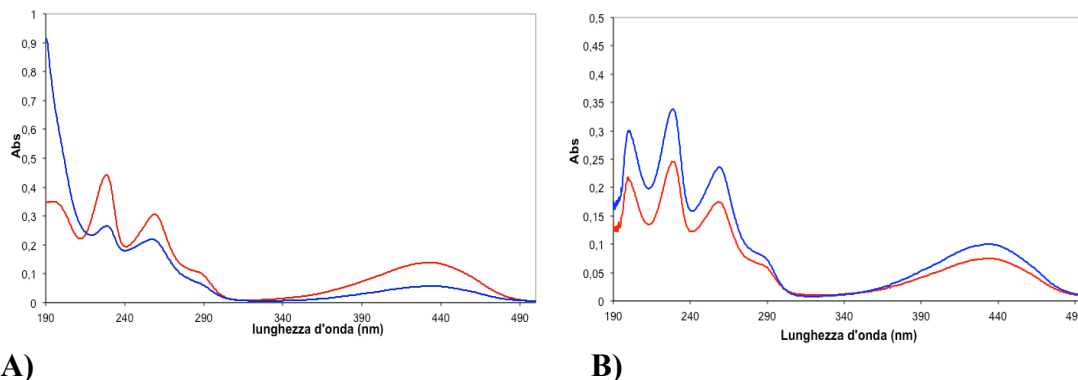


**Figura 46.** Confronto di spettri Uv-vis della reina pura (nero) e dei campioni ottenuti dall'interazione in 5 ml (rosso), 10 ml (blu), 20 ml (verde) di PBS di  $2,39 \cdot 10^{-5}$  mol di sucralfato con  $1,06 \cdot 10^{-5}$  mol di reina

È evidente un leggero shift batocromico del picco a 225 nm verso lunghezze d'onda maggiori nei campioni più diluiti, soprattutto in quello ottenuto in 20 ml di PBS. Questa soluzione effettivamente aveva mostrato all'analisi spettrofotometrica a singola lunghezza d'onda, un aumento dell'assorbanza e quindi della concentrazione apparente della reina rispetto ai valori iniziali.

L'interazione tra reina e sucralfato è stata studiata anche dopo preparazione di soluzioni sature delle due sostanze in PBS e acqua con e senza l'aggiunta di NaOH. Le soluzioni ottenute da questo studio di interazione sono state analizzate mediante spettrofotometria UV-vis.

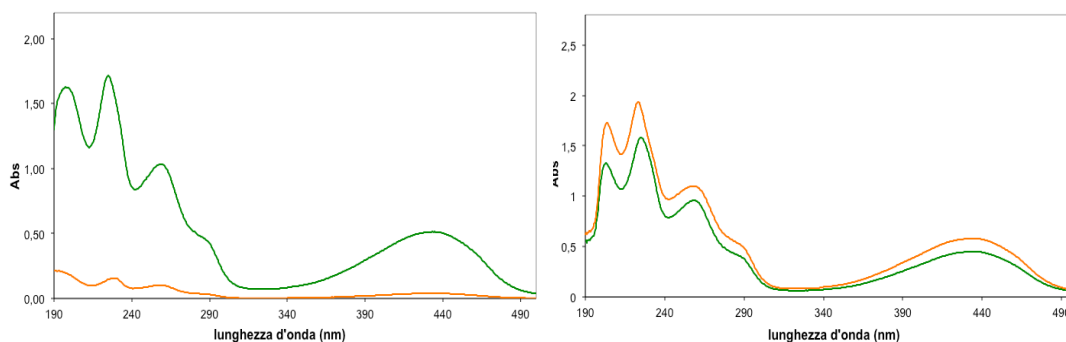
In figura 47 sono riportati gli spettri ottenuti dall'analisi di interazione in acqua e in PBS.



**Figura 47.** Confronto di spettri Uv-vis di soluzioni sature di reina pura (in rosso) e dei campioni ottenuti dall'interazione tra soluzioni sature di reina (in rosso) e sucralfato (in blu) in acqua (A) e PBS (B).

Gli spettri delle soluzioni ricavate dall'interazione tra le due molecole in acqua mostra interessanti differenze rispetto a quelli registrati per l'interazione avvenuta in PBS. Lo spettro del campione ottenuto in acqua diminuisce la sua intensità dopo aggiunta della soluzione di sucralfato mentre lo spettro del campione ottenuto in PBS aumenta la sua intensità. Questo fenomeno è dovuto al fatto che l'analisi di interazione in acqua mostra la formazione di un precipitato dopo aggiunta di sucralfato mentre l'analisi in PBS no. Il composto che si forma quindi tra le due molecole in PBS resta in soluzione e determina l'aumento di intensità dell'assorbanza.

In figura 48 sono riportati gli spettri Uv-vis dei campioni ottenuti dall'interazione delle soluzioni sature di reina e sucralfato in acqua e PBS con l'aggiunta di NaOH.



**A)**

**B)**

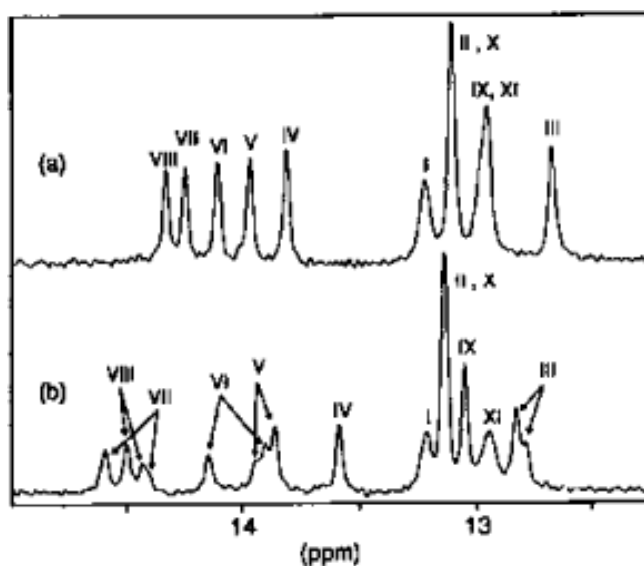
**Figura 48.** Confronto di spettri Uv-vis di soluzioni sature di reina pura (in verde) e dei campioni ottenuti dall'interazione tra soluzioni sature di reina e sucralfato (in arancio) in acqua e NaOH (A) e PBS e NaOH (B).

Gli spettri ottenuti dai campioni di interazione tra reina e sucralfato in acqua e PBS con l'aggiunta di NaOH mostrano interessanti differenze. Come già visto nel caso dell'interazione in acqua, si osserva la diminuzione di assorbanza per lo spettro del campione ottenuto in acqua e NaOH rispetto alla reina pura. Al contrario nel caso dell'interazione in PBS e NaOH si osserva un leggero aumento dell'assorbanza del campione rispetto alla reina pura. In questo caso però la formazione di precipitato si osserva nel campione ottenuto in PBS e NaOH mentre non è presente nel campione ottenuto in acqua e NaOH.

#### 4.7.3 Analisi $^1\text{H}$ NMR in soluzione

La risonanza magnetica nucleare è una delle tecniche maggiormente utilizzate per lo studio della formazione di complessi in soluzione. Questa tecnica è molto vantaggiosa poiché oltre a identificare la formazione di un composto, fornisce anche informazioni sulla sua struttura. Anche in questo caso lo studio dei complessi si basa su shift significativi dei segnali  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  NMR sia del substrato che del legante. I chemical

shift dipendono normalmente sia dalla differenza dell'intorno chimico degli atomi (dovuta alla presenza di interazioni molecolari e alla concentrazione di diversi atomi) ma anche dalla loro distanza e orientazione all'interno del complesso. Per questo motivo è possibile studiare la geometria del complesso con la tecnica NMR [76; 77]. In figura 49 è riportato un esempio di chemical shift rilevato con  $^1\text{H}$  NMR per la formazione di un complesso

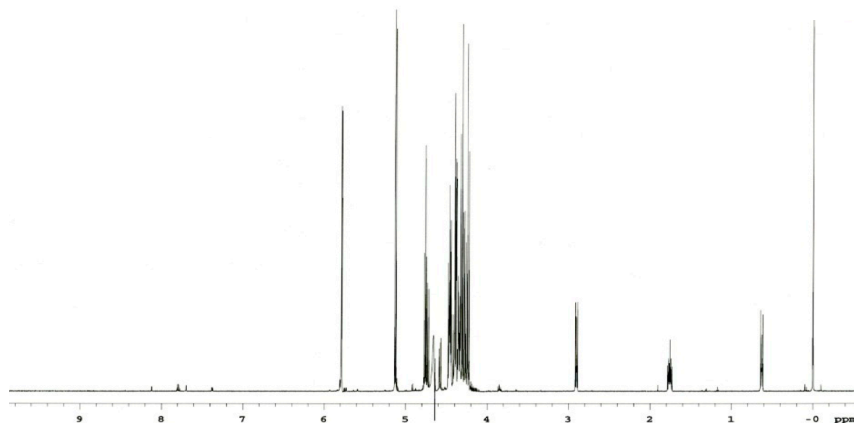


**Figura 49.** Spettro  $^1\text{H}$  NMR che mostra i cambiamenti di chemical shift per la formazione di un complesso (b) rispetto alla presenza di una specie in soluzione (a) [78].

L'analisi NMR è stata effettuata su due campioni di interazione tra reina e sucralfato, più precisamente sulle soluzioni ottenute dall'interazione tra  $1,06 \cdot 10^{-5}$  mol di reina e  $38,33 \cdot 10^{-5}$  mol e  $23,96 \cdot 10^{-5}$  mol di sucralfato in 20 ml.

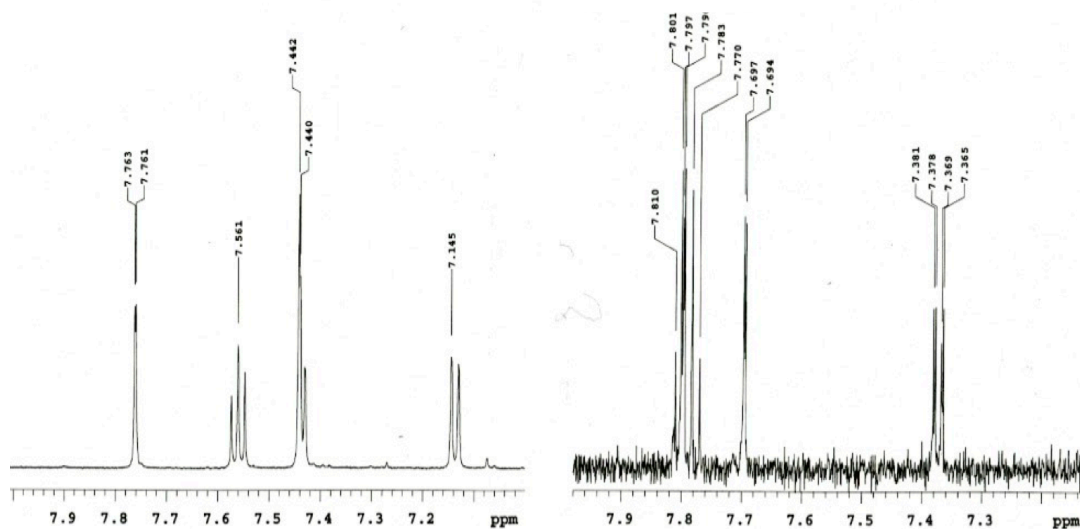
Sono riportati solamente i risultati ottenuti dall'analisi del campione contenente meno sucralfato poiché l'eccesso di sucralfato del primo campione analizzato non ha permesso di identificare la reina presente.

In figura 50 è riportato lo spettro ottenuto dalla misura  $^1\text{H}$  NMR della soluzione di interazione.



**Figura 50.** Spettro  $^1\text{H}$  NMR della soluzione ottenuta dall'interazione tra reina e sucralfato.

Nello spettro si nota tra i 4 e 6 ppm la consistente presenza di sucralfato in soluzione, il quale è nella sua forma libera poiché non mostra differenze rispetto allo spettro registrato con la sostanza pura (figura 17). I picchi rilevati fino ai 3 ppm sono dovuti alla presenza di DDS, mentre i picchi di bassa intensità visibili tra i 7 e 8,2 ppm sono riferibili alla reina. Il confronto tra questi picchi e lo spettro della reina tal quale è riportato in figura 51.



**Figura 51.** Confronto tra lo spettro  $^1\text{H}$  NMR della reina pura (a sinistra) e lo spettro della soluzione ottenuta dall'interazione tra reina e sucralfato (a destra)

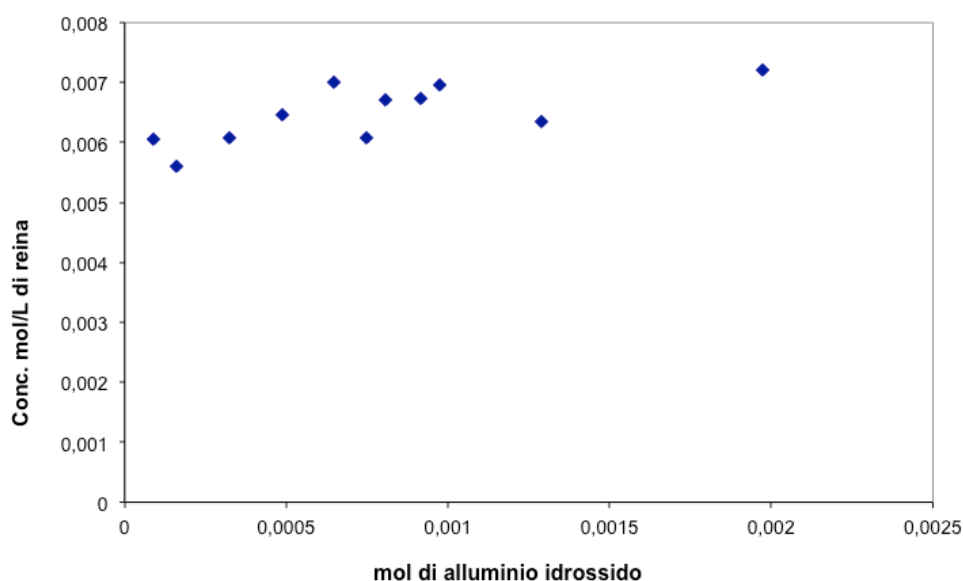
Il confronto dei due spettri ingranditi mostra chiaramente gli shift dei picchi della reina presente nel campione di interazione rispetto alla sostanza tal quale (figura 16).

#### 4.7.4 Interazione tra reina e alluminio idrossido

I dati sino a qui riportati convergono nell'indicare che si forma un complesso probabilmente di stechiometria non prefissata, tra reina e sucralfato in soluzione.

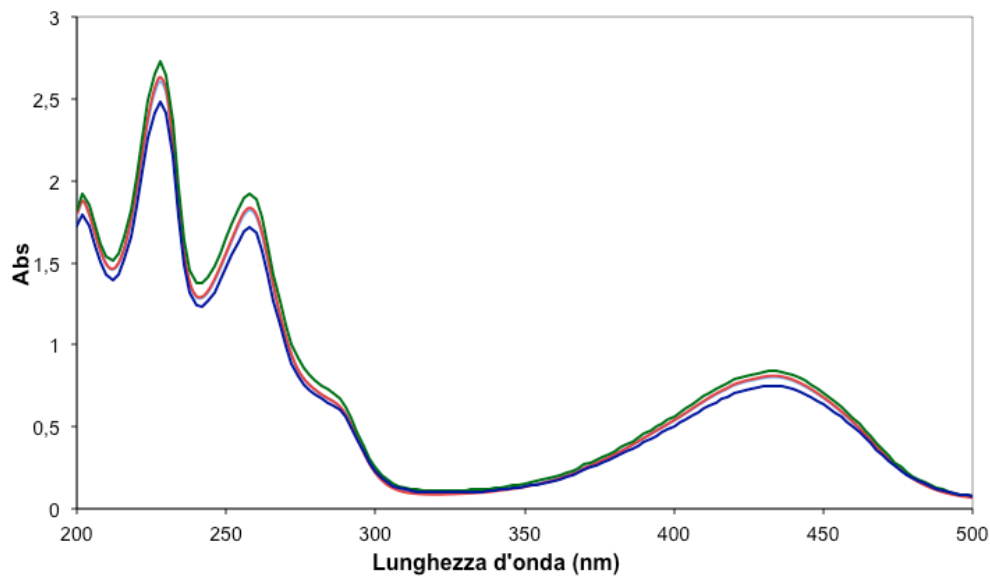
Poiché in letteratura è riportato che l'alluminio idrossido è in grado di formare complessi con numerose sostanze, si è deciso di investigare se la componente di  $\text{Al}(\text{OH})_3$  del sucralfato fosse coinvolta nell'interazione con la reina. Lo studio di interazione tra reina e alluminio idrossido ha previsto l'allestimento di un'analisi preliminare condotta in modo analogo a quelle eseguite con reina e sucralfato. Soluzioni di reina contenenti  $1,06 \cdot 10^{-5}$  mol di sostanza in 5 ml di PBS sono state fatte

interagire con quantità crescenti di alluminio idrossido. La quantità di tale composto è stata scelta in base al numero di moli presenti nelle dosi di sucralfato precedentemente impiegata nell'analisi di interazione con la reina. La composizione in materie prime dei campioni per questo tipo di studio di interazione è comunque riportata in tab. 3 nella sezione 3.2.2. In fig. 52 è riportato il grafico che mostra l'andamento della concentrazione di reina in presenza di quantità crescenti di alluminio idrossido.



**Figura 52.** Andamento della concentrazione della reina in funzione di alluminio idrossido.

Anche gli spettri UV-vis ottenuti dalle soluzioni surnatanti (figura 53) si mostrano sovrapposti tra loro e non diversi da quello della reina pura, indicando ulteriormente assenza di interazione tra reina e alluminio idrossido di interazione confrontati con lo spettro della reina tal quale.

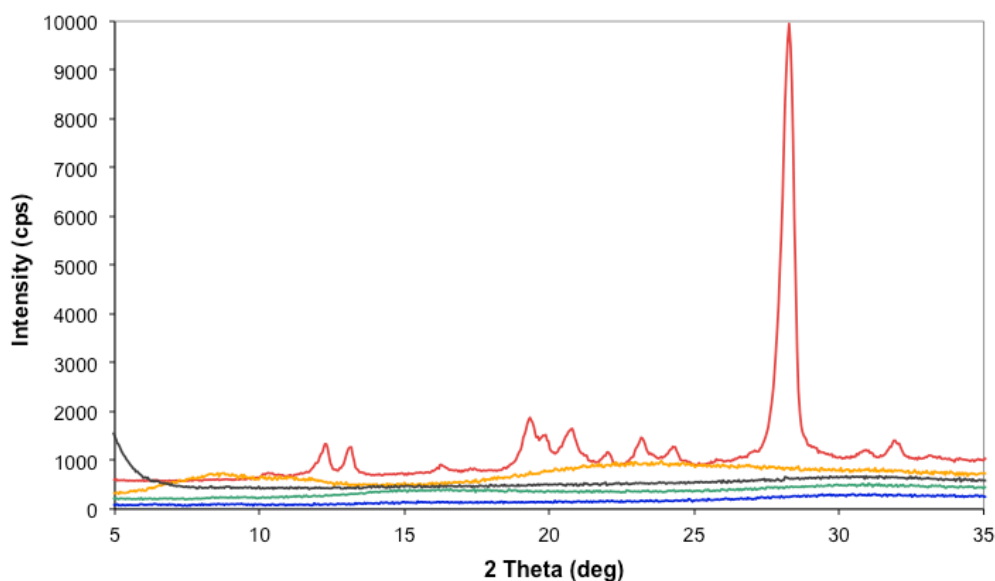


**Fig.53.** Confronto di spettri Uv-vis della reina (in blu) e di alcuni campioni ricavati dall'analisi di interazione tra reina e alluminio idrossido colloidale.

## ***4.8 Caratterizzazione dello stato solido***

### **4.8.1 Diffrazione di raggi X su polvere (PXRD)**

Le fasi solide recuperate dall'interazione tra reina e sucralfato sono state analizzate mediante raggi x su polvere. A titolo di esempio In figura 54 sono riportati i diffrattogrammi ottenuti dall'analisi dei campioni preparati in 5, 10, 20 ml di PBS,  $1,06 \cdot 10^{-5}$  mol di reina e  $2,4 \cdot 10^{-5}$  mol di sucralfato.



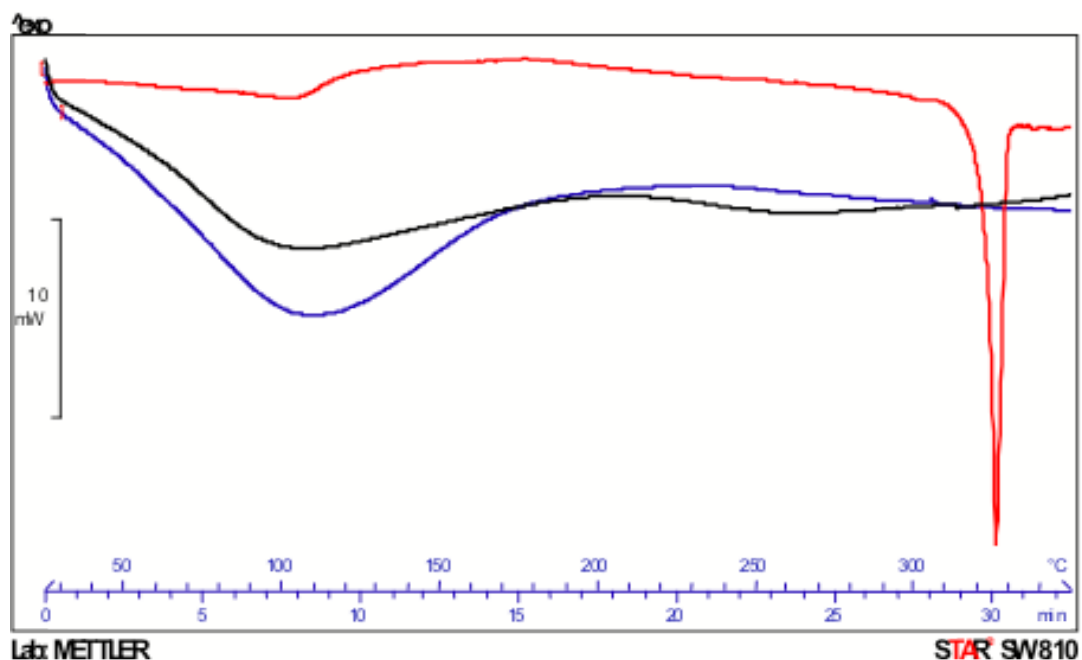
**Fig.54.** Confronto di diffrattogrammi di raggi X su polvere della reina (in rosso) e sucralfato (in giallo) e di campioni ottenuti dall'analisi di interazione tra reina e sucralfato in **5 ml**, **10 ml**, **20 ml** di PBS.

I tracciati ottenuti dai corpi di fondo recuperati dopo interazione tra reina e sucralfato indicano la natura completamente amorfa poiché non vi è alcun segno riconducibile a reina o ad altra struttura cristallina.

#### 4.8.2 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

L'analisi di calorimetria differenziale a scansione è stata effettuata sulle fasi solide ricavate dall'interazione delle soluzioni sature di reina e sucralfato. Le situazioni che hanno prodotto una fase solida esaminabile sono state solamente quelle generate dalle interazioni tra reina e sucralfato, in acqua, in PBS e HCl, e in PBS e NaOH.

In figura 55 sono riportati i tracciati DSC del precipitato ottenuto dall'analisi di interazione tra reina e sucralfato in PBS e NaOH confrontato con quello della reina e del sucralfato puri.

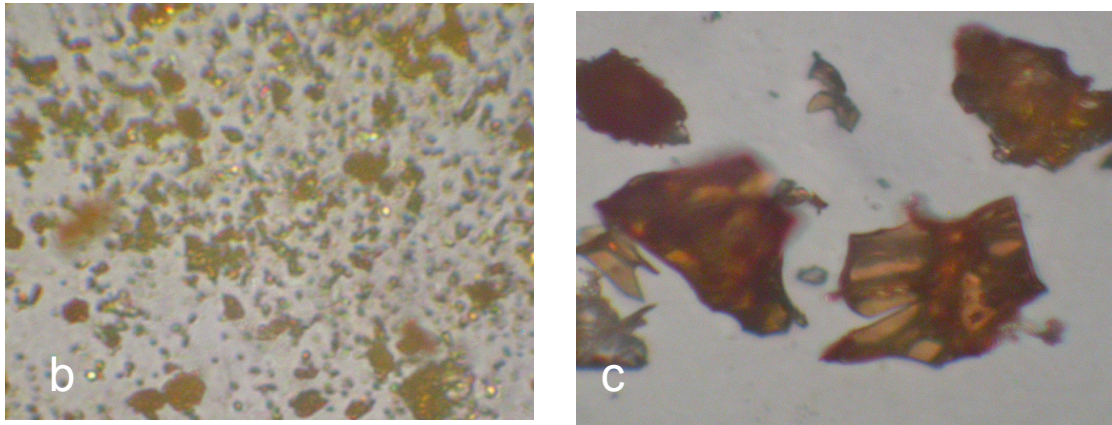


**Figura 55.** Confronto dei tracciati DSC della reina e del sucralfato con quello ottenuto dall'analisi del campione di interazione tra soluzioni sature delle due molecole in PBS e NaOH

Il tracciato DSC del composto di interazione mostra una endoterma dovuta al desorbimento di acqua tra 50 e 160 °C. Questa non è seguita da alcun picco che indichi la presenza di reina in forma cristallina poiché è assente il picco di fusione. Questo dato conferma la natura amorfa del composto di interazione come già osservato con le misure di diffrazione di raggi X.

#### 4.8.3 Microscopia ottica

Le fasi solide ricavate dall'interazione di soluzioni sature reina e sucralfato sono state infine analizzate mediante microscopia ottica per esaminarne le caratteristiche morfologiche (figura 56)



**Figura 56.** Confronto di fotografie al microscopio ottico della reina (a) e delle fasi solide ottenute mediante interazione di soluzioni sature di reina es ucralfato in PBS e HCl (b) e PBS e NaOH (c)

Le fotografie al microscopio ottico delle fasi solide ottenute dall'interazione in PBS e NaOH tra sucralf e reina mostrano delle scaglie intensamente colorate in rosso e di consistenza vetrosa. La morfologia di questo composto ne evidenzia la natura amorfa già rilevata con le analisi di raggi X e DSC. Inoltre la caratteristica colorazione rossastra sottolinea la presenza di reina nel composto.

## 5. Conclusioni

Questo lavoro di tesi ha messo in luce un quadro articolato e complesso per quanto riguarda l'interazione tra la reina e il sucralfato. Dai dati raccolti emerge in maniera sufficientemente chiara che le due sostanze interagiscono dando luogo ad un complesso. In particolare l'analisi degli spettri UV-vis e  $^1\text{H}$  NMR in soluzione ha fornito chiare evidenze della formazione di un complesso. La solubilità di detto complesso rappresenta un nodo che la presente sperimentazione non è stata in grado di sciogliere. In effetti, la maggior parte delle osservazioni effettuate sembra indicare la formazione di un complesso insolubile. Tuttavia altre evidenze sperimentali depongono a favore dell'ipotesi contraria, vale a dire la formazione di un complesso solubile che sottrae la reina non dalla fase di soluzione bensì dalla rilevazione della strumentazione utilizzata nell'analisi. In questo caso il complesso che si ottiene presenta una stechiometria di una mole di reina ogni due moli di sucralfato per soluzioni concentrate. Il contenuto di sucralfato aumenta per soluzioni più diluite.

Può essere messa in campo anche un'ulteriore ipotesi relativa alla formazione di una soluzione solida tra il sucralfato e il suo composto di interazione con la reina.

È stata isolata una fase solida dall'interazione fra i due composti che si è dimostrata essere amorfa e di natura vetrosa.

Rimane valida tuttavia l'ipotesi iniziale che l'interazione tra reina e sucralfato possiede un potenziale utilizzo in terapia al fine di ridurre i pesanti effetti collaterali della reina. L'allestimento di una forma farmaceutica orale con adeguate cinetiche di liberazione di sucralfato e diacereina/reina permetterebbe l'utilizzo della diacereina in terapia in modo sicuro poiché il suo principale e più fastidioso effetto collaterale

sarebbe eliminato. Appare evidente che la conferma finale della bontà di tale approccio debba essere ricercata in uno studio *in vivo*.

## Bibliografia

- [1] Brune, K., Renner, B. & Hinz, B. Using pharmacokinetic principles to optimize pain therapy. *Nature reviews rheumatology* 6, 589-598 (2010).
- [2] Ishibashi, M. et al. Elimination of the adverse effect of tacrolimus-based induction therapy by a five days exposure of optimal steady-state blood concentration in renal transplant patients in the early post-operative period. *Transplantation proceedings* 31, 2761-2762 (1999).
- [3] Fujioka, Y., Metsugi, Y., Ogawara, K., Higaki, K. & Kimura, T. Evaluation of in vivo dissolution behavior and GI transit of griseofulvin, a BCS class II drug. *Int J Pharm* 352, 36-43 (2008).
- [4] Thiel-Demby, V. E. et al. Biopharmaceutics Classification System: validation and learnings of an in vitro permeability assay. *Molecular pharmaceutics* 6, 11-18 (2008).
- [5] Lindenberg, M., Kopp, S. & Dressman, J. B. Classification of oral administered drugs on the World Health Organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Sci* 58, 265-278 (2004).
- [6] Rautio, J. et al. Prodrugs: design and clinical applications. *Nature reviews drug discovery* 7, 255-270 (2008).
- [7] O'Driscoll, C. M. & Griffin, B. T. Biopharmaceutical challenges associated with drugs with low aqueous solubility--the potential impact of lipid-based formulation. *Adv drug deliv rev* 60/, 617-624 (2008).
- [8] Bettini, R. et al. Didanosine polymorphism in a supercritical antisolvent process. *J Pharm Sci* 99, 1855-1870 (2010).

- [9] Braga, D. Il polimorfismo di farmaci: un problema di scienza e di mercato. *La chimica e l'industria* 4, 4-6 (2006).
- [10] Chen, M. L. Lipid excipients and delivery systems for pharmaceutical development: a regulatory perspective. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 768-777 (2008).
- [11] Dhanikula, A. B. et al. Long circulating lipid nanocapsules for drug detoxification. *Biomaterials* 28, 1248-1257 (2007).
- [12] Dhanikula, A. B., Lafleur, M. & Leroux, J. C. Characterization and in vitro evaluation of spherulites as sequestering vesicles with potential application in drug detoxification. *Biochimica et biophysica acta* 1758, 1787-1796 (2006).
- [13] Lee, D. W. et al. Aromatic-aromatic interaction of Amitriptyline: implication of overdosed drug detoxification. *Journal of pharmaceutical sciences* 94, 373-381 (2005).
- [14] Robbins, S. *Le basi patologiche delle malattie* 2000).
- [15] Sarzi-Puttini, P. et al. Osteoarthritis: an overview of the disease and its treatment strategies. *Seminars in arthritis and rheumatism* 35, 1-10 (2005).
- [16] Frost-Christensen, L. N. et al. Degeneration, inflammation, regeneration and pain/disability in dogs following destabilization of articular cartilage grooving the stifle joint. *osteoarthritis and cartilage* 16, 1327-1335 (2008).
- [17] Sandell, L. J. & Aigner, T. Articular cartilage and changes in arthritis, an introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis research* 3, 107-113 (2001).
- [18] Mendes, A. F., Caramona, M. M., de Carvalho, A. P. & Lopes, M. C. Diacerhein and rhein prevent interleukin-1 $\beta$ -induced nuclear factor-

kappaB activation by inhibiting the degradation of inhibitor kappaB-alpha. *Pharmacol Toxicol* 91, 22-28 (2002).

- [19] Tamura, T. et al. Rhein, an active metabolite of diacerein, down-regulates the production of pro-matrix metalloproteinases-1, -3, -9 and -13 and up-regulates the production of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in cultured rabbit articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 9, 257-263 (2001).
- [20] Tamura, T. & Ohmori, K. Rhein, an active metabolite of diacerein, suppresses the interleukin-1alpha-induced proteoglycan degradation in cultured rabbit articular chondrocytes. *Jpn J Pharmacol* 85, 101-104 (2001).
- [21] Tamura, T. & Ohmori, K. Diacerein suppresses the increase in plasma nitric oxide in rat adjuvant-induced arthritis. *Eur J Pharmacol* 419, 269-274 (2001).
- [22] Tamura, T., Shirai, T., Kosaka, N., Ohmori, K. & Takafumi, N. Pharmacological studies of diacerein in animal models of inflammation, arthritis and bone resorption. *Eur J Pharmacol* 448, 81-87 (2002).
- [23] Caporali, R., Caprioli, M., Bobbio-Pallavicini, F. & Montecucco, C. DMARDS and infections in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews* 8, 139-143 (2008).
- [24] Hochberg, M. C. & Dougados, M. Pharmacological therapy of osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15, 583-593 (2001).
- [25] Mazières, B. et al. Molecular markers of cartilage breakdown and synovitis at baseline as predictors of structural progression of hip osteoarthritis. The ECHODIAH cohort. *Annals of the rheumatic diseases* 65, 354-359 (2006).

- [26] Yaron, M., Shirazi, I. & Yaron, I. Anti-interleukin-1 effects of diacerein and rhein in human osteoarthritic synovial tissue and cartilage cultures. *Osteoarthritis Cartilage* 7, 272-280 (1999).
- [27] Van den Berg, W. B. Les mécanismes d'action de la diacérhéine, premier inhibiteur de l'interleukine 1 dans l'arthrose. *Presse médicale* 33, 1510-1512 (2004).
- [28] Beccerica, E., Ferretti, G., Curatola, G. & Cervini, C. Diacetylrhein and rhein: *in vivo* and *in vitro* effect on lymphocyte membrane and fluidity. *Pharmacological research* 22, 277-285 (1990).
- [29] Tamura, T., Yokoyama, T. & Ohmori, K. Effects of diacerein on indomethacin-induced gastric ulceration. *Pharmacology* 63, 228-233 (2001).
- [30] Quintao, N. L., Medeiros, R., Santos, A. R., Campos, M. M. & Calixto, J. B. The effects of diacerein on mechanical allodynia in inflammatory and neuropathic models of nociception in mice. *Anesth Analg* 101, 1763-1769 (2005).
- [31] Falgarone, G. & Dougados, M. Diacerein as a disease-modulating agent in osteoarthritis. *Current rheumatology reports* 3, 479-483 (2001).
- [32] AA.VV in *Merck Index* (ed Maynard, R. L.) 503 (United States pharmaceutical company Merck and Co., 1996).
- [33] Nicolas, P., Tod, M., Padoin, C. & Petitjean, O. Clinical pharmacokinetics of diacerein. *Clin Pharmacokinet* 35, 347-359 (1998).
- [34] Louthrenoo, W. et al. The efficacy, safety and carry-over effect of diacerein in the treatment of painful knee osteoarthritis: a randomised, double-blind, NSAID-controlled study. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 605-614 (2007).

- [35] Rintelen, B., Neumann, K. & Leeb, B. F. A meta-analysis of controlled clinical studies with diacerein in the treatment of osteoarthritis. *Archives of internal medicine* 166, 1899-1906 (2006).
- [36] A.A.V.V. in *Merck Index* (ed Maynard, R. L.) 1409 1996).
- [37] Losi, E. et al. Assemblage of novel release modules for the development of adaptable drug delivery systems. *Journal of controlled release* 111, 212-218 (2006).
- [38] Strusi, O. L. et al. Module-assemblage technology for floating system: in vitro flotation and in vivo gastro-retention. *Journal of controlled release* 129, 88-92 (2008).
- [39] Colombo, P., Bettini, R., Santi, P. & Peppas, N. A. Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanism and optimal performance. *Pharmaceutical science and technology today* 3, 198-204 (2000).
- [40] Das, S., Chaundhury, A. & Ng, K. Y. Preparation and evaluation of zinc-pectin-chitosan composite particles for drug delivery to the colon: role of chitosan in modifying in vitro and in vivo drug release. *Int J Pharm* (2011).
- [41] Siepmann, F., Siepmann, J., Walther, M., MacRae, R. J. & Bodmeier, R. Polymer blends for controlled release coatings. *Journal of controlled release* 125, 1-15 (2008).
- [42] Vandamme, T. F., Lenourry, A., Charrueau, C. & Chaumeil, J. C. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydrate polymers* 48, 219-231 (2002).
- [43] AA.VV. in *Medicamenta* (ed Farmaceutica, C.) 1997).
- [44] Mizuki, Y., Fujiwara, I. & Yamaguchi, T. Pharmacokinetic interactions related to the chemical structure of fluoroquinolones. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 37, 41-55 (1996).

- [45] Tarasevich, Y. I. & Klimova, G. M. Complex-forming adsorbents based on kaolinite, aluminium hydroxide and polyphosphates for the extraction and concentration of heavy metal ions from water solutions. *Applied clay science* 19, 95-101 (2001).
- [46] A.A.V.V. *Merk Index* (United States pharmaceutical company Merck & Co., 1996).
- [47] Meredith, R. et al. Sucralfate for radiation mucositis: results of a double-blind randomized trial. *International journal of oncology, biology, physics* 37, 275-279 (1997).
- [48] O'Brien, P. et al. A phase III double-blind randomised study of rectal sucralfate suspension in the prevention of acute radiation proctitis. *Radiotherapy and oncology* 45, 117-123 (1997).
- [49] Maggi, L., Conte, U., Giunchedi, P. & Colombo, P. Press-coated tablets for the sequential pulse administration of two different drugs. *Int J Pharm* 99, 173-179 (1993).
- [50] Vaira, D. et al. Gastric retention of sucralfate gel and suspension in upper gastrointestinal diseases. *Alimentary and pharmacology therapeutics* 7, 531-535 (1993).
- [51] AA.VV in *Medicamenta* (ed Farmaceutica, C.) 591-593 1997).
- [52] Henriksson, R., Franzen, L., Edbom, C. & Littbrand, B. Sucralfate: prophylaxis of mucosal damage during cancer therapy. *Scandinavian journal of gastroenterology* 30, 45-47 (1995).
- [53] Hollander, H. & Tygat, G. N. J. *SUCRALFATE, from basic science to the bedside* 1995).
- [54] Shoichi, H., Hirofumi, T., Hiromitsu, Y., Tomoaki, H. & Yoshiaki, K. Slow release of tetracycline from a mucoadhesive complex with sucralfate for

eradication of *Helicobacter pylori*. *Chemical Pharmaceutical bulletin* 56, 1412-1416 (2008).

- [55] Shoichi, H., Hirofumi, T., Hiromitsu, Y., Tomoaki, H. & Yoshiaki, K. The acidic complexation of tetracycline with sucralfate for its mucoadhesive preparation. *drug development and industrial pharmacy* 30, 715-724 (2004).
- [56] Higo, S., Takeuchi, H., Yamamoto, H., Hino, T. & Kawashima, Y. Slow release of tetracycline from a mucoadhesive complex with sucralfate for eradication of *helicobacter pylori*. *Chemical Pharmaceutical bulletin* 56, 1412-1416 (2008).
- [57] Shen, J. & Lerner, L. E. A comparison of the conformation of sucrose octasulfate, free and bound to acidic fibroblast growth factor. *Carbohydrate research* 273, 115-127 (1995).
- [58] Seok Yang, I. et al. Crystal structure of aprotinin and its complex with sucrose octasulfate reveal multiple modes of interactions with implications for heparin binding. *Biochemical and biophysical research communications* 397, 429-435 (2010).
- [59] Yeh, B. K. et al. Structural basis for activation of fibroblast growth factor signaling by sucrose octasulfate. *Molecular and cellular biology* 22, 7184-7192 (2002).
- [60] vari, A. *Farmacopea ufficiale della repubblica italiana* 2008).
- [61] Santi, C. in *Appunti di metodi fisici in chimica organica* 18-51
- [62] Hearn, G. M. A guide to validation in HPLC. 1-20 (1992).
- [63] Authors, M. *United States Pharmacopeia* 2008).
- [64] Giannellini, V., Salvatore, F., Bartolucci, G., Coran, S. A. & Bambagiotti-Alberti, M. A validated HPLC stability-indicating method for

- determination of diacerein in bulk drug substance. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 39, 776-780 (2005).
- [65] group, I. C. H. e. w. Validation of analytical procedures: methodology. *ICH harmonised tripartite guideline* 1-8 (1996).
- [66] Morcombe, C. R. & Zilm, K. W. Chemical shift referencing in MAS solid state NMR. *Journal of magnetic resonance* 162, 479-486 (2003).
- [67] Silvey, G. L. Two-dimensional and deuterium-induced, differential-isotope shift nuclear magnetic resonance characterization of potassium sucrose octasulfate and sucralfate. *J Pharm Sci* 81, 471-474 (1992).
- [68] Shen, J. & Lerner, L.E. A comparison of the conformation of sucrose octasulfate, free and bound to acidic fibroblast growth factor. *Carbohydrate research* 273, 115-127 (1995).
- [69] Desai, U. R., Vlahov, I. R., Pervin, A. & Linhard, R. J. Conformational analysis of sucrose octasulfate by high resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Carbohydrate research* 275, 391-401 (1995).
- [70] Nawa, H., Uchibayashi, M. & Matsuoka, T. Structure of rhein. *J org chem* 26, 979-981 (1961).
- [71] Higuchi, T. & Connors, A. in *ADVANCES IN ANALYTICAL CHEMISTRY AND INSTRUMENTATION* (ed Wiley-interscience) 117-212 (Nurnberg, H.W., 1965).
- [72] Havemeyer, R. & Higuchi, T. The complexing tendencies of cyanocobalamin with inorganic compounds. *Journal of the american pharmaceutical association* 49, 356-360 (1960).
- [73] vari, A. *Farmacopea ufficiale della repubblica italiana* 2008).

- [74] Zhang, Q. L. et al. Effect of intramolecular hydrogen-bond on the DNA photocleavage properties of polypyridyl cobalt(III). *Inorganica chimica acta* 339, 34-40 (2002).
- [75] Jain, K., Pillap, G. & Mandal, H. C. Liquid-liquid extraction, preconcentration and transport studies of lanthanum (III) with calix [4] resorcinarene-hydroxamic acid (C4RAHA). *Journal of the chilean chemical society* 52, 1177-1181
- [76] Homer, J. The significance of NMR chemical shifts which are assumed to reflect the formation of simple molecular complexes. *Journal of magnetic resonance* 34, 31-35 (1979).
- [77] Maiwald, M., Steinhof, O., Sleigh, C., Bernstein, M. & Hasse, H. in *NMR spectroscopy in pharmaceutical analysis* (eds Wawer, I., Holzgrabe, U. & Diehl, B.) 471-491 (Elsevier, 2008).
- [78] Rydzewski, J. M., Leupin, W. & Chazin, W. The width of the minor groove affects the binding of the bisquaternary heterocycle SN-6999 to duplex DNA. *Nucleic acids research* 24, 1287-1293