



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO
DOTTORATO DI RICERCA INTERNAZIONALE
IN SCIENZE DEL FARMACO
XXV CICLO**

DOTT.ssa ROBERTA AUDITORE

**PROGETTAZIONE E CARATTERIZZAZIONE, MEDIANTE METODICHE
ANALITICHE CLASSICHE E INNOVATIVE, DI UNA POSSIBILE
FORMULAZIONE FARMACEUTICA A BASE DI AMLODIPINA
BESILATO**

TESI DI DOTTORATO

**Relatore
Chiar.mo Prof. N. A. Santagati
Coordinatore
Chiar.mo Prof. G. Ronsisvalle**

TRIENNIO 2009-2012

Thanks for all you've done...

INDICE

INTRODUZIONE	4
CAP.1 L'IPERTENSIONE NELL'UOMO, NEGLI ANIMALI DA AFFEZIONE	10
1.1 L'ipertensione nell'uomo	10
1.1.1 Epidemiologia	11
1.1.2 Classificazione ed eziologia	11
1.1.3 Complicanze	14
1.1.4 Sintomatologia	15
1.1.5 Trattamento dell'ipertensione	16
1.1.6 Ipertensione resistente	18
1.2 L'ipertensione negli animali da affezione	20
1.2.1 Fattori coinvolti nell'ipertensione dell'animale: dieta, età, razza, sesso	21
CAP.2 GLI AGENTI ANTIIPERTENSIVI E L'AMLODIPINA	23
2.1 Classificazione degli agenti antiipertensivi e meccanismo d'azione dei CCBs	24
2.1.1 Bloccanti dei canali del calcio (CCBs)	24
2.2 L'Amlodipina Besilato	27
2.2.1 Interazioni	29
2.2.2 Effetti collaterali	29
2.2.3 Farmacocinetica	30
2.2.4 Meccanismo d'azione	31
2.2.5 Classificazione dell'AML secondo la BCS	31
CAP.3 LE CICLODESTRINE (CDs)	34
3.1 Generalità	34
3.1.1 Applicazioni generali	35

3.2 Proprietà chimico-fisiche	35
3.3 Struttura chimica, sostituzione e classificazione	36
3.4 Ciclodestrine di interesse farmaceutico	39
3.4.1 Principali applicazioni in campo farmaceutico	39
3.4.2 Limitazioni nell'impiego	40
3.5 Complessi farmaco/CDs	40
3.5.1 Metodiche di inclusione farmaco/CD	41
CAP.4 SELETTORI CHIRALI E FASI STAZIONARIE CHIRALI (CSPs)	44
4.1 Generalità	44
4.2 CSPs a base di polisaccaridi clorurati	46
4.2.1 Siti di interazione racemato/CSP	46
CAP.5 TECNICHE CROMATOGRAFICHE MINIATURIZZATE	48
5.1 Cromatografia liquida capillare (CLC)	48
5.2 Elettrocromatografia capillare (CEC)	52
CAP.6 MATERIALI E METODI	55
6.1 Materiali: parte I	55
6.2 Metodi: parte I	56
6.2.1 Caratterizzazione dell'AML	57
6.2.2 Determinazione spettrofotometrica della solubilità dell'AML	58
6.2.3 Studi di stabilità	58
6.2.4 Retta di taratura HPLC	58
6.2.5 Retta di taratura UV	59
6.2.6 Preparazione del complesso AML/CD	60
6.2.7 Analisi del complesso AML/CD	60
6.2.8 Analisi di solubilità del complesso AML/CD	69
6.3 Materiali e metodi: parte II	70

6.3.1 Soluzioni	71
6.3.2 Strumentazioni	71
6.3.4 Preparazione della colonna capillare	73
CAP.7 PARTE SPERIMENTALE: RISULTATI E DISCUSSIONI	75
PARTE I	75
7.1 Studi di preformulazione	75
7.1.1 Studi di stabilità dell'AML	76
7.1.2 Studi di solubilità di fase	76
7.1.3 Calcolo del rapporto stechiometrico AML/CD	77
7.1.4 Calcolo della costante di complessazione	77
7.2 Studi di formulazione	77
7.3 Caratterizzazione del complesso	78
7.3.1 Tecniche in fase liquida: studi UV e dicroismo circolare	78
7.3.2 Tecniche in fase solida: studi DSC e IR	79
7.3.3 Analisi morfologica e dimensionale	81
7.4 Analisi di solubilità del complesso AML/CD	81
7.5 Studi di stabilità del complesso AML/CD	82
PARTE II	83
7.6 Studi di enantioseparazione mediante CLC	84
7.6.1 Effetto della concentrazione di modificatore organico nella fase mobile	84
7.6.2 Effetto del tipo di modificatore organico nella fase mobile	85
7.6.3 Effetto della variazione di pH	86
7.6.4 Effetto della variazione del flusso d'analisi	87
7.6.5 Effetto della concentrazione del tampone	87
7.7 Ottimizzazione del metodo d'analisi mediante CEC	87

7.7.1 Effetto della tipologia di iniezione	88
7.7.2 Effetto del voltaggio applicato	89
7.7.3 Effetto della variazione di pH	89
CONCLUSIONI	92
BIBLIOGRAFIA	94
RINGRAZIAMENTI	98

INTRODUZIONE

L'ipertensione è una malattia comune che, se non trattata efficacemente, determina un significativo aumento della probabilità di trombosi coronarica, di infarto e di insufficienza renale. Seppure l'ipertensione sembri una malattia che colpisce solo gli uomini, anche i cani e i gatti ne possono soffrire, ma a riguardo ci sono poche informazioni in quanto è difficoltoso fare accurate misure della pressione arteriosa nell'animale [1].

Altrettanto complicato risulta il trattamento farmacologico, in quanto gli agenti antiipertensivi che possono essere utilizzati sono pochi e spesso non si presentano in formulazioni facilmente somministrabile all'animale. Spesso vengono utilizzati dei farmaci che sono stati approvati per l'uomo, quali l'Amlodipina Besilato, farmaco di prima scelta per il trattamento dell'ipertensione nel cane e nel gatto. E' un farmaco a struttura diidropiridinica ad attività calcio-antagonista, il quale inibisce il flusso transmembrana degli ioni calcio nel muscolo liscio vascolare e nel muscolo cardiaco. L'effetto complessivo consiste nel rilassare i muscoli delle arterie in modo che si dilatino e la pressione arteriosa al loro interno diminuisca [2][3]. Mentre gli altri antagonisti dei canali del calcio sono rapidamente e completamente assorbiti dopo l'ingestione, l'Amlodipina Besilato presenta una velocità di assorbimento molto lenta. La concentrazione di picco plasmatico si verifica da 4 a 12 ore nel cane e una simile velocità è stata riportata nel gatto [4].

Secondo la BCS (*Biopharmaceutics Classification System*), l'Amlodipina Besilato appartiene alla I classe (alta solubilità e alta permeabilità), ma secondo la *Ph. Eur 6° Ed.* è considerata "slightly soluble" in acqua [5], infatti la biodisponibilità *in vivo* varia dal 80 al 85% [6].

Inoltre, l'uso in veterinaria è spesso difficile, in quanto in commercio ci sono solo compresse da 2.5 mg, 5 e 10 mg che devono essere suddivise in più parti, poiché per un cane di taglia media (10 kg) il dosaggio orale dell'Amlodipina Besilato è di 0.6-0.1mg/Kg/die [7]. Suddividere quindi una piccola compressa in 8 parti non è semplice e non è garantita la divisione in parti uguali. In tal modo si perde non solo l'accuratezza della dose, ma diminuisce anche la *compliance* dell'animale che difficilmente è invogliato ad assumere una formulazione solida per via orale, rischiando di non riuscire a mantenere costante la terapia.

Per tali motivi, sarebbe utile avere una soluzione liquida da somministrare per via orale, che garantisca maggiore sicurezza, per quanto riguarda la dose, ed una più facile somministrazione all'animale.

Una via promettente per superare questi problemi è quella di aumentare la velocità di dissoluzione *in vivo* dell'Amlodipina Besilato sviluppando delle polveri stabili e molto solubili del farmaco.

Un farmaco per essere assorbito e quindi raggiungere la circolazione sistemica per dare l'effetto terapeutico, deve essere in soluzione.

Per farmaci poco solubili in acqua, la bassa velocità di dissoluzione, rappresenta lo *step* limitante il processo di assorbimento e causa problemi di scarso e/o variabile biodisponibilità.

Si può intervenire ad esempio riducendo le dimensioni delle particelle di farmaco, aumentando così la superficie di esposizione al solvente o formandone dei sali.

Si possono altresì usare eccipienti particolari, come ad esempio le ciclodestrine, che influenzano positivamente l'efficacia terapeutica di un farmaco poco solubile, grazie alla loro capacità di formare complessi di inclusione, vale a dire ospitare nella loro cavità idrofobica molecole chimiche poco idrofile e di opportuna grandezza.

Le ciclodestrine stanno riscuotendo un grande successo in campo farmaceutico perchè tale fenomeno viene sfruttato appunto per aumentare la solubilità, stabilità e biodisponibilità di farmaci poco solubili in acqua come l'amlodipina.

Tuttavia il loro uso in forme farmaceutiche è limitato da una serie di motivi come il costo, il peso molecolare elevato e la tossicità.

L'utilizzo di complessi farmaco/ciclodestrina in forme farmaceutiche richiede dunque adeguati studi di preformulazione, che consentono la scelta del tipo di *carrier* più efficace e della tecnica preparativa più conveniente.

Esistono diverse tecniche per la preparazione del complesso e la scelta viene fatta in base a vari fattori: semplicità di esecuzione, resa, trasposizione su scala industriale, *performance* del prodotto finito.

In questa tesi, basandosi sui dati di letteratura [8][9], dove vengono riportati alcuni complessi dell'Amlodipina Besilato con la β -ciclodestrina e i suoi derivati quali 2-idrossipropil- β -ciclodestrina e metil- β -ciclodestrina, è stato scelto come polimero promotore della velocità di dissoluzione, il derivato solubile della β -ciclodestrina [10]. Tale polimero è molto solubile in acqua ed aumenta l'apparente solubilità e la biodisponibilità di farmaci insolubili o poco solubili senza modificarne le proprietà farmacocinetiche [11].

Dal momento che l'efficienza di complessazione è spesso non molto alta e quindi quantità relativamente grandi di ciclodestrina devono essere usati per ottenere l'effetto desiderato, per raggiungere un compromesso tra l'ottimizzazione della complessazione farmaco/polimero e l'aumento di velocità di dissoluzione in acqua del farmaco, il miglior rapporto di

concentrazione farmaco/polimero è stato scelto tramite il calcolo della solubilità isotermica, il rapporto stechiometrico e la costante di stabilità. Inoltre, considerando la solubilità molto alta del polimero solubile di beta-ciclodestrina, è stato selezionato il metodo della solubilizzazione/liofilizzazione come tecnica di complessazione.

Infine è stata valutata anche l'influenza dei parametri formulativi sulle proprietà di dissoluzione/rilascio in acqua, morfologia, proprietà chimico-fisiche, comportamento del complesso in polvere prodotto.

Poiché il principio attivo preso in considerazione risulta essere chirale, è stato valutato anche questo aspetto nel tentativo di proporre una riduzione di dosaggio nelle varie formulazioni.

Molte molecole di interesse farmaceutico, biologico, ambientale, posseggono uno o più centri chirali. Nel caso in cui sia presente un unico centro chirale, il composto presenta due forme enantiomeriche. Gli enantiomeri hanno le stesse caratteristiche chimico-fisiche (con l'eccezione di far ruotare il piano della luce polarizzata in direzione opposta, ma in ugual misura) ma differiscono per il loro comportamento chimico quando si trovano in un ambiente chirale.

Un effetto del diverso comportamento degli enantiomeri in ambito chirale è costituito in farmacologia dall'interazione farmaco-recettore, necessaria, nel più comune dei meccanismi d'azione, all'ottenimento dell'effetto terapeutico desiderato. Infatti, dal diverso orientamento dei sostituenti legati al centro stereogenico del farmaco dipende il diverso adattamento alla molecola recettoriale, e questo spiega perché nella maggior parte dei casi l'efficacia dei due enantiomeri può essere diversa. Quello che interagisce in misura inferiore con il recettore, o non interagisce affatto, può, nella migliore delle ipotesi, produrre lo stesso effetto con intensità minore o non produrre alcun effetto. Spesso però si verifica che esso sia responsabile di effetti farmacologici diversi, effetti collaterali indesiderati o addirittura tossici.

Inoltre, anche gli enzimi metabolizzanti sono spesso stereoselettivi, di conseguenza i singoli enantiomeri di un farmaco possono seguire diversi destini metabolici (diverso assorbimento, distribuzione, eliminazione).

In campo farmaceutico il fenomeno della chiralità ha richiesto una sempre maggiore attenzione soprattutto a causa degli effetti tossici verificatisi in presenza di miscele racemiche. Del resto, la storia della regolamentazione del farmaco rispecchia il succedersi di eventi medici e sanitari che hanno indotto importanti mutamenti nell'opinione pubblica.

Le ultime linee guida riguardanti la progettazione e l'uso di nuovi farmaci [12, 13, 14,] hanno dedicato particolare attenzione nel descrivere gli obiettivi da perseguire qualora si intraprenda lo studio di una nuova molecola chirale o si decida, per esempio, di immettere sul mercato, di

un racemo già presente, un singolo enantiomero (*switch chirale*). Infatti i composti chirali esistono come unico stereoisomero solo in natura, mentre per ottenerli come tali per via sintetica sono necessari determinati accorgimenti.

A tal proposito l'ICH (*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*), a cui fanno riferimento in particolare Enti Regolatori europei, americani e giapponesi (tra cui la FDA, *Food and Drug Administration*, e l'EMA, *The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*) ha stilato una sezione, la Q6A, in cui sono contemplati paragrafi specifici per le sostanze chirali, riassunti nel diagramma in figura 1.

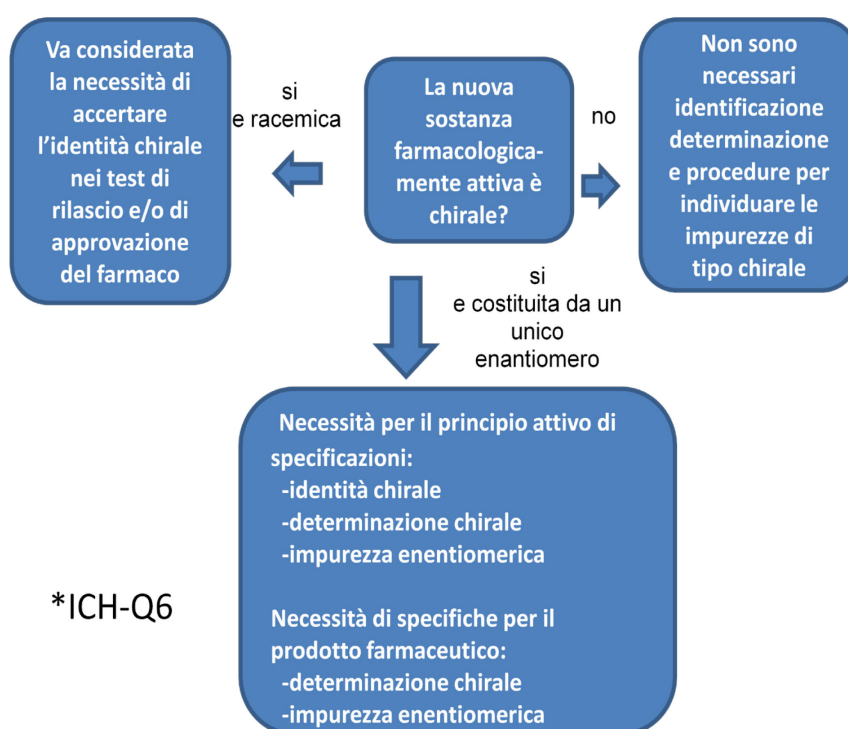


Figura 1: Diagramma di flusso secondo l'ICH Q6A - Come stabilire procedure per l'identificazione, la determinazione e la valutazione dell'impurezza enantiomerica per nuovi principi attivi chirali e nuovi prodotti farmaceutici contenenti principi attivi chirali

La decisione di sviluppare un singolo enantiomero, un racemato o una miscela enantiomerica (in cui il rapporto dei due enantiomeri varia) spetta a chi lo produce e dovrebbe essere basata su dati scientifici riguardanti la qualità, l'efficacia ed infine il rapporto rischio/beneficio del farmaco nelle condizioni proposte per l'uso.

Lo sviluppo di un racemato può essere motivato quando, ad esempio, gli enantiomeri sono configurazionalmente instabili *in vitro* e vanno incontro a racemizzazione *in vivo*, oppure quando le loro caratteristiche farmacologiche e tossicologiche sono simili. Tale scelta può

essere anche dettata dal fatto di non poter ottenere, per motivi di carattere tecnico, una sufficiente separazione, quantitativa e/o qualitativa dei due enantiomeri.

Nel caso in cui sia stata dimostrata la maggiore efficacia di un enantiomero nei confronti dell'altro, e comunque motivata la sua scelta per lo sviluppo di una nuova forma farmaceutica, è necessario intraprendere studi ulteriori sulla stabilità del composto (così come avviene per ogni principio attivo), prestando particolare attenzione che non si verifichi un'inversione chirale che porti alla formazione dell'altro antipodo ottico [14,15].

Già a livello di sintesi si può progettare di operare in modo enantioselettivo, ma questo non è sempre applicabile e comunque si dimostra in genere laborioso e costoso. I metodi classici di separazione di miscele racemiche, sia intermedi di reazione che di prodotti finali, prevedono la formazione di coppie diastereomeriche per mezzo dell'uso di selettori chirali (seguita da cristallizzazioni ripetute), l'impiego di enzimi stereoselettivi (particolare tipo di risoluzione cinetica) o la cristallizzazione preferenziale.

D'altra parte, per la loro praticità ed efficienza stanno assumendo una sempre maggiore importanza, su scala preparativa e analitica, a seconda dei casi, tecniche cromatografiche quali la cromatografia liquida (LC), la cromatografia in fase supercritica (SFC), la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), la cromatografia su strato sottile (TLC), la gascromatografia (GC) e più recentemente l'elettroforesi capillare (CE) e l'elettrocromatografia capillare (CEC). Con queste tecniche può essere applicato un metodo di separazione diretta (*via intermolecolare*) dove gli enantiomeri anziché essere, per esempio, convertiti irreversibilmente in diastereoisomeri (*via intramolecolare*), interagiscono diversamente con un ambiente chirale, creato da un opportuno selettore con differenti affinità di legame per ciascun antipodo ottico, formando complessi diastereomerici labili e reversibili [16].

In queste tecniche il selettore chirale può essere:

- disciolto nel tampone;
- legato alla parete del capillare/colonna;
- incluso in un gel;
- legato ad una fase stazionaria con cui è impaccato il capillare/colonna.

In questo studio è stata esaminata la separazione dei due enantiomeri della Amlodipina Besilato e di due delle sue impurezze otticamente attive.

La separazione chirale è stata effettuata per mezzo di una recente tecnica analitica: la cromatografia liquida capillare (CLC) utilizzando una strumentazione costruita per l'elettrocromatografia capillare (CEC).

Basandosi su esperienze precedenti, è stata impiegata una colonna capillare di silice fusa impaccata con una fase di silice modificata con un selettore chirale, appartenente alla famiglia dei polisaccaridi (*Sepapak-4*).

La preparazione dei capillari è stata effettuata considerando un loro eventuale successivo utilizzo in CEC, per confrontare, nelle medesime condizioni le due tecniche analitiche.

CAPITOLO 1

L'IPERTENSIONE NELL'UOMO E NEGLI ANIMALI DA AFFEZIONE

1.1 L'IPERTENSIONE NELL'UOMO

L'ipertensione o ipertensione arteriosa, è una malattia cronica in cui la pressione del sangue nelle arterie della circolazione sistemica risulta elevata. Ciò comporta un aumento di lavoro per il cuore.

La pressione arteriosa è riassunta da due misure, sistolica e diastolica, che dipendono dal fatto che il muscolo cardiaco si contraiga (sistole) o si rilassi (diastole) tra un battito e l'altro.

Il valore di pressione sanguigna normale a riposo è compresa tra i 100 e i 140 mmHg di sistolica e tra i 60 e i 90 mmHg di diastolica. Un soggetto viene considerato iperteso se mostra un valore di pressione costantemente pari o superiore ai 140/90 mmHg.

L'ipertensione viene classificata come primaria (essenziale) o come secondaria. Circa il 90-95% dei casi sono classificati come "ipertensione primaria", il che significa che tali casi manifestano pressione alta senza evidenti cause mediche di base. Il restante 5-10% dei casi, classificati come "ipertensione secondaria" sono causati da altre malattie che colpiscono i reni, le arterie, il cuore o il sistema endocrino.

L'ipertensione, inoltre, è un fattore di rischio per ictus, infarto del miocardio, insufficienza cardiaca, aneurisma aortico, aterosclerosi diffusa, embolia polmonare, malattia arteriosa periferica ed è una causa della malattia renale cronica.

Pertanto, anche moderate elevazioni della pressione sanguigna arteriosa vengono associate ad una riduzione dell'aspettativa di vita.

Cambiamenti nella dieta e nello stile di vita sono in grado di migliorare sensibilmente il controllo della pressione sanguigna e di ridurre il rischio di complicazioni per la salute. Tuttavia il trattamento farmacologico è spesso necessario in persone per le quali i cambiamenti dello stile di vita risultino inefficaci o insufficienti.

1.1.1 Epidemiologia

A partire dal 2000, quasi un miliardo di persone nel mondo, circa il 26% della popolazione adulta, soffre di ipertensione. La condizione si presenta sia nei paesi industrializzati (333 milioni) che in quelli in via di sviluppo (639 milioni). Tuttavia, i tassi variano notevolmente in base al luogo, con valori che partono dal 3,4% (negli uomini) e 6,8% (nelle donne) rilevati nelle zone rurali dell'India fino ad arrivare al 68,9% (uomini) e 72,5% (donne) della Polonia.

Nel 1995 è stato stimato che 43 milioni di persone negli Stati Uniti presentavano ipertensione o stavano assumendo farmaci antipertensivi, quasi il 24% della popolazione adulta degli Stati Uniti. La prevalenza negli Stati Uniti è in aumento e ha raggiunto il 29% nel 2004.

A partire dal 2006, l'ipertensione colpisce 76.000.000 adulti degli Stati Uniti, il 34% della popolazione, gli afro-americani adulti hanno tra i più alti tassi di ipertensione nel mondo: raggiungono infatti valori del 44%. È più frequente nei neri e nei nativi americani e meno negli americani bianchi e nei messicani, i valori aumentano con l'età ed si riscontrano più elevati nel sud-est degli Stati Uniti.

La prevalenza dell'ipertensione nei giovani è in aumento. La maggior parte dell'ipertensione infantile, in particolare nei preadolescenti, risulta essere secondaria ad una malattia di base. A parte l'obesità, la malattia renale è la causa più frequente (60-70%) di ipertensione nei bambini.

1.1.2 Classificazione ed eziologia

L'ipertensione arteriosa essenziale o primaria

L'ipertensione arteriosa essenziale o primaria è una malattia dell'apparato circolatorio. Al contrario dell'ipertensione secondaria (per la quale sono note le cause scatenanti la patologia), per l'ipertensione essenziale non sono stati scoperti ed identificati i fattori scatenanti.

L'ipertensione primaria è perciò una patologia nella quale è possibile individuare un livello di pressione sanguigna che è superiore ai livelli normali. La patologia richiede un controllo farmacologico per evitare che, con il persistere della condizione, possa essere causa per lo sviluppo di complicanze a carico del sistema cardio-circolatorio.

Questo tipo di ipertensione è definita indistintamente come primaria o essenziale. Il termine primaria evidenzia come questo tipo di ipertensione non sia scatenata da fattori secondari (come patologie a carico di alcuni organi), ma sia dovuta a cause non ancora identificate. Il termine essenziale è stato invece coniato dai primi studiosi della patologia i quali cominciarono ad evidenziare come, con l'aumentare dell'età, l'ipertensione si riscontrasse in numero sempre maggiore di individui. Pensarono perciò che l'ipertensione fosse una condizione necessaria, quindi essenziale, e la definirono appunto ipertensione essenziale.

Le cause dell'ipertensione essenziale non sono ancora state accertate, e perciò non è ancora possibile capire il fattore scatenante la patologia. È però risultato sempre più chiaro che esistono dei fattori che favoriscono l'insorgenza e lo sviluppo dell'ipertensione primaria.

Sicuramente uno di questi è la componente genetica, tuttavia la base genetica dell'ipertensione è ancora poco conosciuta.

L'età ed uno stile di vita sedentario unitamente ad una dieta ipercalorica e con un alto contenuto di sodio contribuiscono all'instaurarsi dell'ipertensione. Anche la componente razziale sembra rappresentare un fattore importante nell'ipertensione: popolazioni nere con stili di vita occidentali presentano una maggior incidenza di ipertensione rispetto alle popolazioni caucasiche o dell'estremo oriente che vivono nelle stesse condizioni.

Inoltre, L'insulino-resistenza, che è comune nell'obesità è una componente della sindrome metabolica che viene ritenuta una possibile concausa all'ipertensione.

Recenti studi hanno inoltre evidenziato alcuni eventi risalenti ai primi anni di vita, come ad esempio: un basso peso alla nascita, il tabagismo della madre in gravidanza e la mancanza di allattamento al seno come fattori di rischio per lo sviluppo dell'ipertensione essenziale da adulti, anche se i meccanismi che collegano tali esposizioni restano oscuri.

Epidemiologia correlata all'età, alla razza e a fattori ambientali:

La pressione del sangue tende ad aumentare con l'età: utilizzando come valore soglia 140/90 mmHg, circa un terzo degli individui di mezza età e due terzi degli individui in età più avanzata risultano ipertesi.

Infatti, un individuo su due nella fascia di età compresa tra 60 e 69 anni soffre di ipertensione e tre su quattro tra gli individui con un'età maggiore di 70 anni [17]. Circa il 40% dei bianchi e più del 50% dei neri di età maggiore di 65 anni soffre di una qualche forma di ipertensione negli USA. Studi epidemiologici hanno dimostrato un aumento di incidenza anche in Cina, dal 5,11% nel 1958 si è passati al 7,73% nel 1980 e all'11,79% nel 1991. Sebbene questa percentuale resti più bassa rispetto ai paesi più sviluppati come USA e Canada, rappresenta una popolazione di 50 milioni nel 1980 e di 90 milioni nel 1991 a causa dell'elevato numero della popolazione cinese.

Studi epidemiologici hanno dimostrato che una diminuzione di 10 mmHg della pressione riduce il rischio di infarto del 56% e le malattie coronariche del 37%.

In un'analisi di 61 studi prospettici che coinvolgono un milione di individui è stata studiata la relazione tra il livello della pressione del sangue e 12.000 casi di infarto e 34.000 casi di malattie ischemiche del miocardio. Nella fascia di età compresa tra 40 e 89 anni una riduzione

della pressione sistolica di 20 mmHg o della pressione diastolica di 10 mmHg è associata con una riduzione di decessi da infarto o da malattie ischemiche del miocardio di circa la metà. Questa riduzione è stata maggiore nei pazienti più giovani e minore in quelli più anziani.

In un'analisi più recente di 9 studi che coinvolge 420.000 individui, che analizza la relazione tra il livello della pressione arteriosa e 843 casi di infarto e 4.856 casi di malattie ischemiche del miocardio, è stato dimostrato che una riduzione dei livelli di pressione di 5, 7,5 e 10 mmHg è associata ad una diminuzione del rischio di infarto del 34%, 46% e 56% rispettivamente e ad una diminuzione di malattie ischemiche del miocardio del 21%, 29% e 37% rispettivamente. La relazione tra la pressione del sangue e il rischio di malattia è costante in un grande intervallo e non è stato possibile stabilire un valore oltre il quale un ulteriore abbassamento della pressione non comporta riduzione del rischio.

Ci sono anche differenze etniche nella prevalenza dell'ipertensione.

Nei pazienti Afro-Americani, la prevalenza di ipertensione e la mortalità conseguente alle complicazioni cardiovascolari, cerebrovascolari e renali è più alta rispetto ad altri gruppi etnici. Nella popolazione Afro-Caraibica la mortalità dovuta alle conseguenze dell'ipertensione è 3,5 volte più alta della media nazionale inglese.

Gli Anglo-Asiatici mostrano un aumento della mortalità dovuta alle complicazioni dell'ipertensione di 1,5 volte rispetto alla media inglese [18].

Le temperature fredde rendono l'ipertensione più grave e le stagioni fredde registrano il maggiore grado di morbilità e mortalità legate alle malattie cardiovascolari. Originariamente si credeva che l'elevarsi della pressione arteriosa fosse dovuto all'effetto vasocostrittivo diretto del sistema nervoso simpatico. Infatti, il sistema nervoso simpatico è attivato dall'esposizione cronica al freddo e il livello di catecolamine nel plasma e nelle urine è aumentato significativamente. Però la risposta contrattile all'agonista α_1 fenilefrina è significativamente ridotta dall'esposizione cronica al freddo. Quindi gli adrenorecettori α_1 sono sottoespressi durante l'esposizione al freddo. Molti studi hanno dimostrato che il blocco del sistema renina-angiotensina in diversi siti può attenuare o prevenire l'innalzamento della pressione arteriosa provocato dalle basse temperature. Quindi l'iperattività del sistema nervoso simpatico provoca l'ipertensione indotta dal freddo attivando il sistema renina-angiotensina.

Ipertensione secondaria

L'ipertensione secondaria è dovuta ad una causa identificabile. La malattia renale è la causa più comune, ma questa tipologia di ipertensione può anche essere causata da condizioni endocrine,

come la *sindrome di Cushing*, l'ipertiroidismo, l'ipotiroidismo, l'acromegalia, la *sindrome di Conn* o iperaldosteronismo, l'iperparatiroidismo e il feocromocitoma.

Altre cause dell'ipertensione secondaria sono l'obesità, l'apnea notturna, la gravidanza, la coartazione dell'aorta, il consumo eccessivo di liquirizia e di alcuni medicinali soggetti a prescrizione, rimedi a base di erbe e droghe illegali.

L'obesità è la maggiore causa di ipertensione nei paesi industrializzati. Sebbene il meccanismo dell'ipertensione da obesità non è noto, molte evidenze suggeriscono che l'eccessivo riassorbimento di sodio a livello renale e lo spostamento ipertensivo della pressione di natriuresi giocano il ruolo principale. L'attivazione simpatica sembra mediare almeno una parte della ritenzione di sodio e dell'ipertensione indotti dall'obesità, dal momento che il blocco adrenergico e la denervazione renale riduce marcatamente questi segni. Recenti osservazioni suggeriscono che la leptina e le sue molteplici interazioni con i neuropeptidi nell'ipotalamo lega l'eccessivo peso corporeo con l'aumentata attività simpatica. La leptina è prodotta dagli adipociti e sembra regolare il bilancio energetico agendo sull'ipotalamo per ridurre l'assunzione di cibo e per aumentare il consumo energetico, attivando il sistema simpatico.

1.1.3 Complicanze

La malattia ipertensiva è responsabile della diminuzione delle aspettative di vita dei pazienti affetti.

I disturbi provocati dall'ipertensione gravano sugli organi vitali: cervello, cuore, retina, vasi arteriosi e rene (fig.2).

Per quanto riguarda il cuore, in un primo tempo si ha ipertrofia concentrica del ventricolo sinistro, in seguito il ventricolo sinistro si dilata e sopraggiunge l'ipertrofia eccentrica, con possibile scompenso emodinamico. Inoltre l'aumento della massa cardiaca espone a maggior rischio di ischemia cardiaca e morte improvvisa.

La sclerosi vasale, microaneurismi con possibile rottura ed emorragia intracranica, mal di testa, vertigini, sincope, sono tutte complicanze che possono occorrere al sistema nervoso centrale in seguito all'ipertensione.

Anche l'apparato visivo può risentire di condizione ipertensiva a lunga durata. Tipici effetti sulla retina sono: restringimento e sclerosi arteriolare diffusa, con aree ischemiche, microaneurismi e dilatazione capillare. Tutto ciò può comportare una diminuzione del *visus*.

Gli effetti sui reni possono essere vari: progressiva sclerosi dei vasi intrarenali con diminuzione della filtrazione glomerulare e conseguente riduzione della funzionalità dell'organo, fino

all'insufficienza renale. Mentre i vasi arteriosi possono andare incontro ad aterosclerosi e microaneurismi.

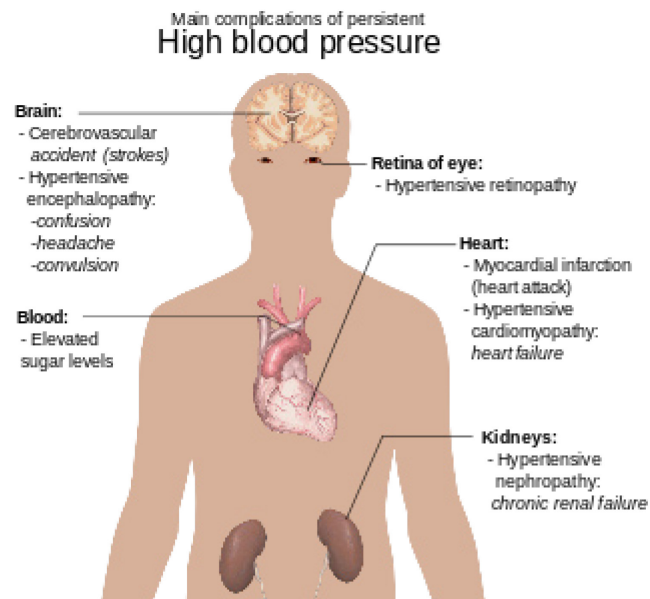


Figura 2: Possibili complicanze dell'ipertensione

1.1.4 Sintomatologia

Raramente l'ipertensione viene accompagnata da sintomi e la sua identificazione avviene solitamente attraverso lo *screening* o quando ci si cura per un altro problema non correlato.

Una parte delle persone con ipertensione, tuttavia, lamenta mal di testa, così come stordimento, vertigini, tinnito (ronzio o sibilo nelle orecchie), visione alterata e episodi di svenimento, respiro sibilante. Questi sintomi sono però più probabilmente correlati all'ansia associata piuttosto che all'ipertensione stessa.

Durante l'esame obiettivo, l'ipertensione può essere sospettata sulla base della presenza di retinopatia ipertensiva, rilevata mediante l'esame ottico del *fundus oculi*, eseguito con l'oftalmoscopio. I risultati della oftalmoscopia possono anche dare alcune indicazioni sul periodo in cui una persona è stata ipertesa.

Alcuni segni e sintomi aggiuntivi possono suggerire ipertensione arteriosa secondaria, cioè l'ipertensione dovuta ad una causa identificabile come le malattie renali o le malattie endocrine. Per esempio, l'obesità, l'intolleranza al glucosio, smagliature viola suggeriscono la *sindrome di Cushing*. Le malattie della tiroide e l'acromegalia possono inoltre causare ipertensione e presentano sintomi e segni caratteristici. Un soffio addominale può essere un indicatore di stenosi dell'arteria renale (un restringimento delle arterie che perfondono i reni), mentre la riduzione della pressione arteriosa degli arti inferiori può indicare una coartazione aortica (un restringimento dell'aorta poco lontano dal cuore). L'ipertensione labile o parossistica

accompagnata da mal di testa, palpitazioni, pallore e sudorazione, deve indurre il sospetto di feocromocitoma.

Inoltre, se l'ipertensione si presenta come complicata i pazienti soffrono maggiormente di ipertrofia ventricolare sinistra, rivascolarizzazione coronarica, precedenti infarti del miocardio, *angina pectoris*, malattie vascolari, malattie cerebrovascolari e microalbuminuria.

1.1.5 Trattamento dell'ipertensione

A causa della sua prevalenza, il trattamento dell'ipertensione pone grandi esigenze in materia di assistenza sanitaria. Gestire con successo l'ipertensione è una priorità.

Storia medica, esami fisici e test diagnostici sono utili ad identificare il profilo individuale del paziente di rischio cardiovascolare, che include età, sesso, livello di lipidi e livello di glucosio nel sangue, e precedenti familiari di malattie cardiovascolari.

Le linee guida identificano i seguenti test per ottenere un accurato profilo di rischio cardiovascolare. Questi test possono rilevare diabete, prove di lesioni provocati dall'ipertensione nel cuore o nei reni e cause secondarie di ipertensione, quali malattie renali:

- Test urine per sangue e proteine;
- Elettroliti del sangue e creatinina;
- Livello di glucosio nel sangue;
- Colesterolo HDL;
- Elettrocardiogramma.

La presenza di proteine nelle urine indica danno renale, ma non distingue i pazienti con malattie renali e ipertensione secondaria dai pazienti nei quali l'ipertensione ha determinato la malattia renale.

I livelli di potassio e sodio sono misurati per escludere che l'ipertensione sia dovuta a malattie surrenali.

I livelli di creatinina e di urea sono misurati per escludere che malattie renali siano causa secondaria di ipertensione.

Il livello di glucosio è misurato per valutare il diabete e il profilo di colesterolo per valutare il rischio cardiovascolare.

Sono stati sviluppati dei modelli di rischio che permettono ai medici di valutare la probabilità di un paziente di sviluppare malattie cardiovascolari, analizzando lo stile di vita del paziente e i *markers* clinici. Anche se variano nei dettagli, i modelli di rischio permettono di stimare il rischio individuale di malattie coronariche e di infarto nei prossimi dieci anni, analizzando

sesso, età, stato diabetico, fumo, livello di colesterolo totale nel sangue, livello di lipoproteine LDL nel sangue e pressione arteriosa.

Un importante aspetto dei modelli di rischio consiste nel fatto che questi modelli permettono ai medici di indirizzarsi verso un profilo complessivo del paziente invece di trattare un singolo fattore di rischio in modo indipendente dagli altri fattori. Infatti, i fattori di rischio hanno un effetto cumulativo, e un paziente con un basso livello dei singoli fattori potrebbe avere un rischio maggiore di sviluppo di malattie cardiovascolari rispetto ad un paziente che presenta un solo valore alterato anche se il livello è elevato.

Molti fattori di rischio possono essere potenzialmente modificati ed è importante scegliere verso quale fattore indirizzare le proprie attenzioni e in quale ordine.

Analizzare lo stile di vita permette di valutare quali fattori possono essere modificati per indurre un abbassamento dei valori di pressione arteriosa che permetterà di rimandare l'inizio di una terapia farmacologica.

Terapia farmacologica:

Esistono numerose classi di farmaci, chiamati farmaci antipertensivi, in grado di ridurre la pressione arteriosa mediante vari meccanismi. Le principali classi di farmaci antiipertensivi attualmente utilizzate sono:

- **ACE inibitori:** captopril, enalapril, zofenopril, fosinopril, lisinopril, quinapril, ramipril;
- **Antagonista del recettore per l'angiotensina II, ARBs (Angiotensin II Receptor Blocker) o sartani:** telmisartan, irbesartan, losartan, valsartan, candesartan, olmesartan;
- **Calcio antagonisti, CCBs (*calcium channels blockers*):** nifedipina, amlodipina, lacidipina, lercadipina o barnidipina;
- **Diuretici:** il clortalidone, la idroclorotiazide, la furosemide, la torasemide;
- **Alfa bloccanti:** prazosina e la doxazosina;
- **Beta bloccanti:** atenololo, labetalolo, metoprololo, propranololo;
- **Alfa-Beta bloccanti:** farmaci antiadrenergici ad azione mista come il carvedilolo ed il bisoprololo;
- **Simpatolitici ad azione centrale:** clonidina e metildopa;
- **Inibitori del sistema renina-angiotensina-aldosterone:** recente classe di farmaci antiipertensivi il cui capostipite è l'aliskiren.

Tutte le molecole citate possono essere usate da sole o in combinazione. Alcune combinazioni, come per esempio ACE-inibitore + diuretico o ARB + diuretico o ACE-inibitore + Calcio

Antagonista sono in commercio in associazione in una unica compressa, per migliorare la *compliance* del paziente.

Terapia non farmacologica

Tutti i pazienti affetti da ipertensione arteriosa dovrebbero essere incoraggiati a modificare lo stile di vita indipendentemente dalla necessità o meno di terapia farmacologica. I principali interventi non farmacologici da consigliare al paziente iperteso, che si sono dimostrati in grado di ridurre i valori tensivi, ma anche di garantire effetti benefici nei confronti di altri fattori di rischio cardiovascolare, come il diabete mellito, l'obesità, la dislipidemia sono:

- Il controllo del peso corporeo;
- La limitazione del consumo di alcool;
- La pratica di esercizio fisico regolare;
- La limitazione del consumo di sodio (sale da cucina) con la dieta.

1.1.6 Ipertensione resistente

L'ipertensione è definita resistente quando, nonostante un trattamento che utilizza contemporaneamente tre agenti antiipertensivi di tre classi farmacologiche diverse, non viene regolarizzata. Può verificarsi anche pseudoresistenza, quando si fanno errori nella lettura dei valori della pressione arteriosa, per esempio viene misurata quando il paziente non è calmo o si effettua la misura con un polsino troppo piccolo. Ma si verifica pseudoresistenza anche se il paziente non segue attentamente la terapia. Diverse analisi retrospettive indicano che il 40% dei pazienti a cui è stata diagnosticata l'ipertensione non segue la terapia con regolarità durante il primo anno di trattamento [18,19].

Recentemente fra le terapie non farmacologiche, nell'ipertensione resistente (IR) alla terapia è stata inserita la denervazione simpatica.

Per ipertensione arteriosa resistente si intende la persistenza di una pressione arteriosa non controllata (PA sistolica \geq 140 mmHg e/o PA diastolica \geq 90 mmHg), nonostante corrette abitudini di vita e l'assunzione continuativa e controllata di almeno tre farmaci antipertensivi, tra cui un diuretico.

La prevalenza dell'IR varia dal 5% nelle misurazioni dal medico curante, sino al 50% negli ambulatori nefrologici e rappresenta un notevole problema in quanto la sua presenza determina un incremento del danno d'organo a livello del cuore, del cervello e del rene.

La denervazione dell'arteria renale mediante ablazione transcatetere con radiofrequenza a bassa energia, è stata proposta per risolvere quei casi in cui tutte le altre strategie hanno fallito.

Questa tecnica si basa sul fatto che le terminazioni simpatiche renali afferenti ed efferenti contribuirebbero alla patogenesi dell'ipertensione arteriosa.

Le attuali conoscenze sull'ipertensione sono basate anche sullo studio di modelli animali di ipertensione. I modelli animali di ipertensione comprendono sia l'ipertensione primaria che l'ipertensione secondaria. I modelli di ipertensione primaria includono l'ipertensione indotta clinicamente e l'ipertensione indotta dall'ambiente. I modelli di ipertensione secondaria includono l'ipertensione indotta farmacologicamente e l'ipertensione indotta per via renale. Gli animali subiscono manipolazioni genetiche artificiali che li rendono predestinati all'ipertensione.

Dal momento che l'eziologia dell'ipertensione non è nota, l'uso di diversi modelli di ricerca, ognuno dei quali agisce con meccanismi diversi, risulta vantaggioso e permette di adottare nuove misure per la prevenzione e la terapia.

Nonostante l'elevata mortalità e morbilità il suo controllo è ancora insoddisfacente. Approssimativamente un terzo degli adulti è inconsapevole di soffrire di ipertensione, circa il 40% degli individui ipertesi non è in trattamento e due terzi dei pazienti ipertesi continua ad avere elevati valori della pressione arteriosa nonostante il trattamento (fig.3 e 4).

In uno studio effettuato in diversi paesi dell'Europa e degli Stati Uniti, è stato evidenziato che la velocità di normalizzazione dei valori di pressione arteriosa è del 31% in Italia, del 26% nel Regno Unito, del 40% in Germania e in Spagna, del 46% in Francia e del 63% negli Stati Uniti. Questo, come altri studi, ha rilevato un'elevata eterogeneità nel trattamento farmacologico tra Europa e Nord America.

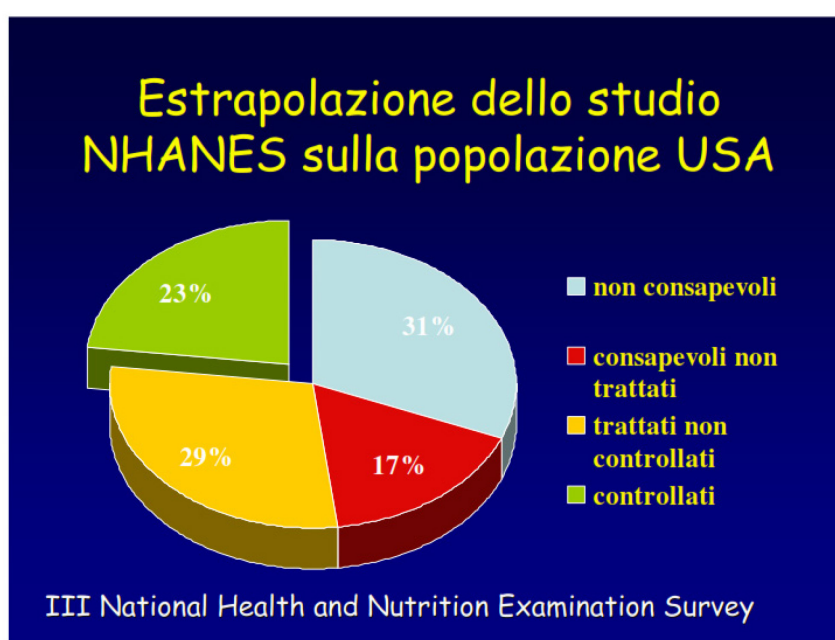


Figura 3: studio NHANE

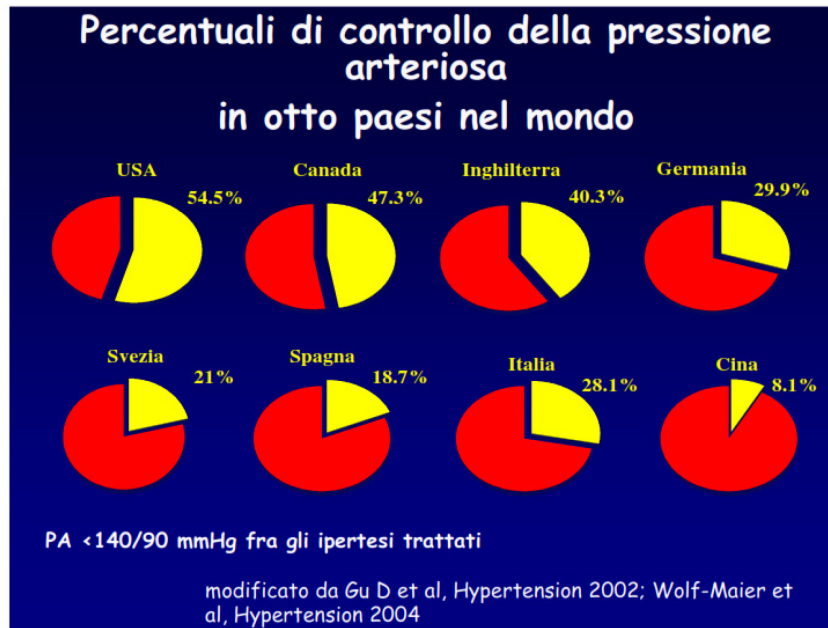


Figura 4: percentuali di controllo in otto paesi del mondo.

1.2 L'IPERTENSIONE NEGLI ANIMALI DA AFFEZIONE

Seppure l'ipertensione sembrerebbe essere una malattia che colpisce solo gli uomini anche i cani e i gatti ne possono soffrire. Ci sono poche informazioni riguardo l'ipertensione naturale negli animali, probabilmente perché risulta difficile effettuare accurate misure della pressione arteriosa nell'animale. Il comune metodo che nell'uomo utilizza lo stetoscopio non è applicabile all'animale, in quanto il suono di Korotkoff non viene percepito, pertanto, nell'ambito della ricerca, vengono utilizzati metodi invasivi che prevedono la cannulazione diretta dell'arteria femorale, praticata sull'animale cosciente.

Il problema principale risulta essere la determinazione dei valori di pressione arteriosa ritenuti "normali". Tali valori sono comunque stati fissati a $148 \pm 16 \text{ mmHg}$ per la pressione sistolica e $87 \pm 8 \text{ mmHg}$ per quella diastolica [20].

Sono stati riportati pochi casi d'ipertensione essenziale. Invece l'ipertensione secondaria è spesso dovuta a lesioni renali.

Dal momento che l'obesità colpisce il 20-40% della popolazione canina, è stato necessario eseguire ulteriori studi i quali hanno permesso di capire quali possono essere le conseguenze secondarie di un elevato peso corporeo [21].

Sembra che il peso corporeo sia correlato all'età dell'animale, dal momento che gli animali più anziani sono più colpiti da obesità e altri problemi di salute. L'obesità indotta sperimentalmente determina innalzamento della pressione arteriosa, ma non è chiaro se l'ipertensione sia una

conseguenza diretta dell'obesità o della dieta ricca di grassi somministrata all'animale per indurre l'aumento di peso corporeo.

Il tessuto adiposo canino, oltre a conservare l'eccesso di energia, secreta molte molecole, dette complessivamente adipochine. Una di queste molecole, angiotensina II, non solo influenza la pressione arteriosa attraverso il rene, ma agisce sui terminali presinaptici per aumentare l'attività del sistema nervoso simpatico. Quindi l'eccesso di tessuto adiposo può spiegare l'aumentata incidenza di ipertensione.

Diversi studi hanno suggerito un legame tra iperinsulinemia, aumentata attività del sistema nervoso simpatico e ipertensione correlata all'obesità. L'insulino-resistenza sembra essere la comune anomalia metabolica mostrata da queste tre condizioni. Questa ipotesi è supportata da numerosi studi che documentano una relazione tra insulino-resistenza e ipertensione.

Un'ipotesi alternativa per spiegare la patogenesi dell'ipertensione indotta dall'obesità è che l'attivazione cronica del sistema nervoso simpatico lega insulino-resistenza e ipertensione. L'aumentata stimolazione del sistema nervoso simpatico si verifica negli individui obesi.

Hall e coll. hanno eseguito degli studi preliminari che hanno evidenziato che effettuando una terapia combinata di α e β -bloccanti, per 7 giorni, si manifesta una riduzione della pressione arteriosa in misura maggiore nei cani obesi rispetto a quelli normopeso.

1.2.1 Fattori coinvolti nell'ipertensione dell'animale: dieta, età, taglia, razza, sesso.

La funzione del sistema nervoso simpatico è strettamente legata alla dieta. La diminuzione delle calorie assunte diminuisce l'attività del sistema simpatico, mentre l'eccessiva alimentazione ne aumenta l'attività. Questo non è dovuto alle calorie, ma al contenuto di grassi e carboidrati.

Anche la leptina, un ormone secreto dagli adipociti del cane, stimola il sistema nervoso simpatico. Inoltre una dieta povera di sodio associata alla somministrazione di furosemide, previene l'ipertensione provocata da un'eccessiva alimentazione del cane, ma non influenza lo sviluppo di insulino-resistenza. Questi risultati coincidono con l'osservazione fatta da *Kassab e coll.*, i quali hanno dimostrato che la denervazione renale bilaterale previene l'ipertensione e la ritenzione di sodio associate all'obesità del cane concludendo, dunque, che l'innervazione simpatica renale gioca un ruolo fondamentale nel mediare l'ipertensione e la ritenzione di sodio associate ad un'alimentazione ricca di grassi. Inoltre sembra che la denervazione non prevenga l'insulino-resistenza associata all'obesità [22].

Alcuni studi hanno mostrato che anche l'età gioca un ruolo nello sviluppo dell'ipertensione, ma questo sembra verificarsi soprattutto negli animali che soffrono di altre patologie concomitanti. L'aspettativa di vita dei cani varia con la razza e le dimensioni dell'animale; le razze più grandi presentano un'aspettativa di vita più breve rispetto alle razze più piccole.

Sono necessari, pertanto, degli studi che correlino l'età con l'aspettativa di vita per verificare in che modo questi fattori possono influenzare la pressione arteriosa.

È stato dimostrato in diverse occasioni che l'esercizio fisico regolare nell'uomo riduce la pressione arteriosa per inibizione del tono simpatico, analogamente ciò può essere affermato per l'animale.

Anche il sesso dell'animale influenza la pressione arteriosa; le femmine hanno dei valori di pressione più bassi rispetto ai maschi, mentre gli animali sterilizzati presentano dei valori intermedi.

Nell'ipertensione essenziale umana è noto che gioca un ruolo importante l'ereditarietà nell'omeostasi della pressione. Sembra che l'eredità risulti fondamentale anche come fattore di rischio per i cani, ma non si conosce ancora in che modo essa agisca.

Come nell'uomo, l'ipertensione negli animali può causare gravi danni ad organi come cuore, cervello, occhi e reni.

A livello cerebrale può provocare la formazione di edema o di ictus; a livello oculare possono formarsi emorragie intraoculari; a livello del cuore può verificarsi ipertrofia ventricolare sinistra. Inoltre, nei cani con malattie valvolari croniche, l'ipertensione aumenta il rischio di insufficienza cardiaca congestizia.

CAPITOLO 2

GLI AGENTI ANTIIPERTENSIVI E L'AMLODIPINA

Diversi agenti antiipertensivi agiscono mediante differenti meccanismi d'azione e spesso sono usati in terapia in combinazione, con lo scopo di controllare la pressione sanguigna minimizzando gli effetti collaterali e la tossicità.

È stato ampiamente documentato che la monoterapia riesce a controllare l'ipertensione solo nel 50% dei casi. Pertanto una notevole percentuale di pazienti necessita di almeno due farmaci per controllare la pressione del sangue e i sintomi dell'ipertensione.

Combinando differenti classi di farmaci antiipertensivi a basse dosi, i rispettivi meccanismi d'azione provocano una risposta sinergica la quale promuove un'abbassamento della pressione arteriosa e nel contempo minimizza gli effetti collaterali e migliora le condizioni di gradimento. Ciò risulta efficace soprattutto per i diuretici tiazidici, i quali aumentano significativamente il controllo della pressione arteriosa quando sono somministrati in combinazione con molte, se non tutte, le altre classi farmacologiche. Ci sono invece pochi dati sulla combinazione di tre o più farmaci.

La raccomandazione di una specifica combinazione di più farmaci è soprattutto empirica. Intuitivamente sembra appropriato combinare farmaci con diverso meccanismo d'azione. Per esempio una combinazione che comprende un ACE-inibitore, un bloccante dei canali del calcio e un diuretico tiazidico è efficace e generalmente ben tollerato.

Recenti studi suggeriscono che la somministrazione di un ACE-inibitore e di un bloccante dei recettori dell'angiotensina o un bloccante dei canali del calcio di tipo diidropiridinico o non diidropiridinico offre un significativo effetto antiipertensivo addizionale rispetto alla monoterapia con i diversi farmaci.

I pazienti con patologie multiple richiedono terapie complesse, che risultano spesso in una terapia polifarmaci. In questi casi è difficile per il paziente seguire con regolarità la terapia, risulta quindi utile fare delle formulazioni che comprendono due molecole nella stessa dose farmacologica, in modo tale da ridurre il numero di farmaci, aumentando la *compliance* del paziente, il quale potrà più facilmente attenersi alla terapia prescritta.

Nella gestione del paziente iperteso è fondamentale mantenere i valori della pressione ai livelli raccomandati.

La terapia dell'ipertensione deve essere personalizzata e progressivamente adattata, basandosi sulla coesistenza dei fattori di rischio, inclusi valori della pressione alti rispetto alla norma, la

gravità della malattia, la presenza di implicazioni cardiovascolari o altri fattori di rischio, la risposta alla terapia e la tollerabilità agli effetti collaterali [6, 23, 24].

2.1 CLASSIFICAZIONE DEGLI AGENTI ANTIIPERTENSIVI E MECCANISMO D'AZIONE DEI CCBs

Nella terapia farmacologica dell'ipertensione essenziale possono essere utilizzate diverse classi di farmaci, che comprendono:

- Inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina;
- Antagonisti del recettore dell'angiotensina II;
- Bloccanti dei canali del calcio (CCBs);
- Diuretici tiazidici;
- Diuretici risparmiatori di potassio;
- Antagonisti dei recettori β adrenergici;
- Antagonisti dei recettori α adrenergici;
- Agonisti dei recettori α_2 adrenergici.

2.1.1 Bloccanti dei canali del calcio (CCBs)

L'identificazione di composti che potevano bloccare il movimento d'entrata degli ioni Ca^{2+} attraverso i canali lenti del muscolo cardiaco fu effettuata già agli inizi degli anni '60. Fu anche dimostrato che il verapamil e altre fenilalchilammine possedevano un effetto inotropo negativo ed effetti cronotropici che li distinguevano dagli altri vasodilatatori coronarici. Questi composti mimano gli effetti cardiaci di ritorno del Ca^{2+} , infatti, riducono la forza contrattile senza influenzare l'azione del potenziale.

Attualmente sono disponibili per gli usi terapeutici dieci CCBs. Questi composti presentano differenti strutture chimiche e possono essere raggruppati in una delle quattro classificazioni chimiche, ciascuna delle quali possiede un distinto profilo farmacologico: le 1,4-diidropiridine (ad esempio nifedipina, Amlodipina Besilato), le fenilalchilammine (ad esempio verapamil), le benzotioazepine (ad esempio diltiazem) e gli esteri del diamminopropanolo (ad esempio bepridil).

Tutti questi farmaci si legano alla subunità α_1 del canale del calcio di tipo L a livello cardiaco ma a siti diversi, ognuno dei quali interagisce allostericamente con gli altri e con il sistema di cancello del canale, prevenendo indirettamente la diffusione del calcio attraverso il suo poro quando il canale è aperto.

Molti CCBs mostrano la classica proprietà di dipendenza d'uso, in altre parole essi bloccano più efficacemente quelle cellule nelle quali i canali del calcio sono più attivi. Per lo stesso motivo hanno anche attività di blocco voltaggio-dipendente, determinando un blocco maggiore quando la membrana è depolarizzata, causando l'apertura del canale del calcio e la sua inattivazione.

Le diidropiridine influenzano la funzione dei canali del calcio in un modo complesso, non semplicemente attraverso un'ostruzione fisica del poro.

I canali del calcio esistono in uno dei tre stati distinti, chiamati "modi". Quando un canale è nel modo 0 non si apre in risposta alla depolarizzazione; nel modo 1, la depolarizzazione porta ad una bassa probabilità di apertura, e ogni apertura è breve; nel modo 2, la depolarizzazione porta ad una probabilità di apertura molto alta e ogni singola apertura è prolungata.

In condizioni normali circa il 70% dei canali si trova nel modo 1, e solo l'1% nel modo 2. Ogni canale passa casualmente e lentamente da uno stato all'altro.

Le diidropiridine di tipo antagonista legano selettivamente i canali nel modo 0, e quindi favoriscono questo stato di non apertura; al contrario gli agonisti legano i canali nel modo 2. Questo tipo di modulazione bidirezionale porta a ipotizzare l'esistenza di un mediatore endogeno diidropiridino-simile con effetti regolatori sull'ingresso del calcio.

I principali effetti dei CCBs sono limitati alla muscolatura cardiaca e liscia. Il verapamil influisce principalmente sul cuore, mentre la maggior parte delle diidropiridine esercita un effetto più significativo sulla muscolatura liscia piuttosto che sul cuore. Il diltiazem ha effetti intermedi.

I CCBs possono causare blocco AV e determinare una diminuzione della frequenza cardiaca mediante le loro azioni sui tessuti di conduzione, questo effetto è contrastato dall'aumento riflesso dell'attività simpatica secondaria alla loro azione vasodilatatrice.

Presentano anche un effetto inotropo negativo, dovuto all'inibizione della corrente lenta verso l'interno durante il plateau del potenziale d'azione. Nonostante questo, la gittata cardiaca normalmente rimane costante o aumenta a causa della tachicardia riflessa causata dalla riduzione delle resistenze periferiche.

Inoltre ci sono differenze cliniche importanti tra le diverse classi di farmaci, ad es. il verapamil ha un effetto inotropo negativo più marcato e quindi è controindicato nell'insufficienza cardiaca, così come lo è la maggior parte dei CCBs. Un'eccezione è rappresentata dall'Amlodipina Besilato che non peggiora la mortalità cardiovascolare in pazienti con grave insufficienza cardiaca cronica.

I CCBs causano una dilatazione arteriolare generalizzata, ma non influiscono in modo rilevante sullo stato delle vene. Influiscono su tutti i letti vascolari. Questi farmaci causano vasodilatazione coronarica negli individui normali e in pazienti con spasmi delle arterie coronariche (angina variante).

I CCBs in uso clinico vengono ben assorbiti dal tratto gastrointestinale e vengono somministrati per via orale. Essi sono ampiamente metabolizzati, sottoposti al metabolismo epatico di primo passaggio. Infatti, con la sola eccezione della nisoldipina, le 1,4-diidropiridine subiscono un metabolismo epatico ossidativo ad opera del sistema citocromo P450 dando luogo ad una varietà di composti inattivi.

In molti casi l'anello diidropiridinico è inizialmente ossidato ad un analogo inattivo della piridina. Questi metaboliti iniziali sono ulteriormente trasformati per idrolisi, coniugazione ed ulteriori percorsi ossidativi.

I CCBs dovrebbero essere usati con cautela nei pazienti con disturbi epatici, a causa delle notevoli trasformazioni dovute al metabolismo epatico. Per questi pazienti si raccomandano la riduzione del dosaggio ed uno stretto monitoraggio terapeutico.

Parecchi effetti indesiderati dei CCBs sono estensioni delle loro principali azioni farmacologiche.

Le diidropiridine a breve durata d'azione causano arrossamenti e mal di testa a causa della loro azione vasodilatatrice; l'uso cronico delle diidropiridine determina gonfiori alle caviglie e aumento della pressione nei capillari, probabilmente a causa della dilatazione arteriolare e dell'aumento della permeabilità delle venule postcapillari.

Il verapamil causa spesso costipazione, probabilmente a causa degli effetti sui canali del calcio nei nervi gastrointestinali o sulla muscolatura liscia dell'intestino.

In tutti i casi, questa classe di farmaci non sembra determinare effetti indesiderati gravi o non prevedibili.

I CCBs sono autorizzati per il trattamento di aritmie e dell'ipertensione e per la prevenzione dell'angina.

Il bepridil è l'unico tra questi composti la cui azione non è solo basata sulla sua capacità di bloccare i canali del calcio voltaggio-dipendenti di tipo L. A differenza degli altri CCBs, infatti, il bepridil può anche esercitare il blocco dei canali rapidi del Na^+ e di quelli del Ca^{2+} regolati dal recettore. Queste ulteriori azioni sono quelle che determinano la capacità del bepridil di inibire la conduzione cardiaca, la conduzione lenta AV nodale, l'incremento del periodo di refrattarietà, il rallentamento della gittata cardiaca ed il prolungamento dell'intervallo QT.

L'assorbimento di questo farmaco per via orale è superiore al 90%, ma è soggetto al metabolismo di primo passaggio e quindi la biodisponibilità è pari al 59%, viene metabolizzato quasi completamente e almeno uno dei metaboliti è attivo: il 4-idrossifenil analogo.

Il bepridil è indicato nel trattamento orale dell'angina pectoris cronica stabile, solo nei pazienti intolleranti o insensibili ad altri farmaci.

2.2 L'AMLODIPINA BESILATO (AML)

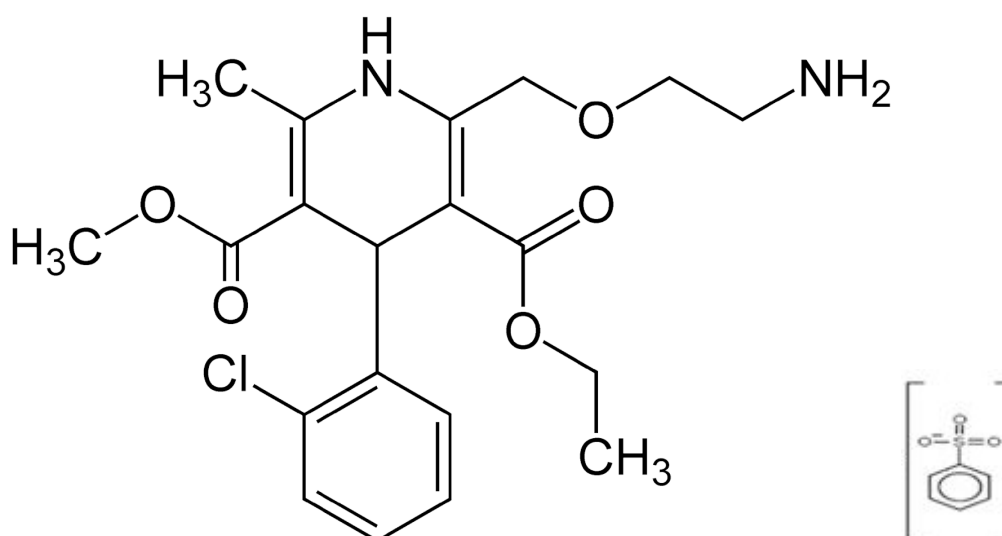


Figura 5: Amlodipina Besilato

L'Amlodipina Besilato (AML) (fig.5) è un farmaco chirale a struttura diidropiridinica appartenente alla classe di composti ad attività calcio-antagonista (III generazione), che può essere usato una volta al giorno nell'ipertensione.

È un derivato 1,4-diidropiridinico con attività di vasodilatatore simile a quella della nifedipina. La presenza di un gruppo aminico $-NH_2$ sulla catena laterale in posizione 2 dell'anello diidropiridinico conferisce alla molecola proprietà basiche (pK_a 8,6). A pH fisiologico, quindi, l'AML è in forma ionizzata per più del 90%.

L'AML, come tutti i CCBs, inibisce il flusso transmembrana di ioni calcio a livello miocardico e della muscolatura liscia, bloccando i canali lenti per il calcio. La ridotta disponibilità intracellulare dello ione provoca rilascio muscolare con conseguente vasodilatazione a livello sistemico e coronarico.

Risulta essere il più efficace CCBs risultando 4-5 volte più potente delle altre 1,4-diidropiridine nell'inibire la contrazione indotta da calcio.

In vitro l'AML è risultata 2 volte più potente della nifedipina (dopo 3,5 ore di incubazione) nell'inibire le contrazioni calcio-indotte [25].

La velocità di associazione e di dissociazione dell'AML con i recettori è 2-3 volte inferiore a quella delle altre 1,4-diidropiridine con conseguente insorgenza e durata d'azione più gradualmente (più tardiva, l'insorgenza; più prolungata, la durata). La gradualità dell'azione riduce il rischio di ipotensione da prima dose e l'induzione di tachicardia riflessa.

La somministrazione di una singola dose è, pertanto, sufficiente ad indurre e mantenere il controllo pressorio nelle 24 ore.

La farmacocinetica della molecola dimostra che l'effettivo livello nel sangue e quindi il controllo della pressione arteriosa sono mantenuti durante l'intervallo tra le dosi. Gli studi sulle dosi ottimali da somministrare hanno mostrato che la dose iniziale appropriata è di 5 mg una volta al giorno, che può essere successivamente portata a 10 mg se necessario.

Studi comparativi con altri agenti hanno mostrato che l'AML ha un'efficacia antiipertensiva superiore al verapamil e confrontabile con l'Atenololo, l'Idroclorotiazide e il Captopril. L'associazione a inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina, beta-bloccanti o diuretici tiazidici, può produrre importanti effetti addizionali antiipertensivi.

I dati sull'AML sono stati ottenuti da studi clinici effettuati negli Stati Uniti, in Canada e in Europa. Il dossier clinico che descrive l'efficacia e la sicurezza dell'AML nel trattamento dell'ipertensione mostra che tale farmaco riesce a controllare la pressione arteriosa per 24 ore senza provocare ipotensione ortostatica, inoltre non produce tolleranza nelle somministrazioni a lungo termine sia in monoterapia che in associazione con altri farmaci antiipertensivi.

L'AML non ha effetto sulla frequenza cardiaca. Determina una significativa regressione dell'ipertrofia ventricolare sinistra, una significativa riduzione della resistenza periferica totale e aumento del riempimento diastolico ventricolare sinistro.

L'AML è risultata efficace e con pochi effetti collaterali anche per il trattamento di bambini con ipertensione. La dose somministrata ai bambini è 0.16 ± 0.12 mg/kg/giorno.

Gli effetti indesiderati associati all'utilizzo di questo farmaco includono vertigini, fatica, vampate di calore ed edema alle gambe, effetti che diminuiscono con la riduzione della dose; inoltre, va usato con cautela nei pazienti con insufficienza cardiaca congestizia, in quanto può aggravare l'angina e l'ischemia del miocardio.

Come per tutti i farmaci diidropiridinici, la maggior parte degli effetti indesiderati sono dovuti all'effetto vasodilatatorio.

2.2.1 Interazioni

- L'uso contemporaneo di anestetici inalatori può produrre ipotensione addizionale. Sebbene i CCBs siano utili per prevenire la tachicardia sopraventricolare, l'ipertensione o gli spasmi coronarici, durante un intervento chirurgico, bisogna fare molta attenzione durante l'uso;
- Gli antiinfiammatori non steroidei, in modo particolare l'indometacina, possono ridurre l'effetto antiipertensivo dell'AML per inibizione della sintesi renale delle prostaglandine e causare ritenzione di sodio;
- Sebbene i dati a riguardo gli effetti indesiderati dell'interazione dell'AML con i beta-bloccanti siano pochi, bisogna fare molta attenzione durante la co-somministrazione data la somiglianza dell'AML con la nifedipina. Infatti, l'associazione nifedipina-beta-bloccanti può produrre eccessiva ipotensione e in rari casi aumentare la possibilità di insufficienza cardiaca congestizia;
- È necessario fare molta attenzione nell'associazione tra AML e farmaci ad alto legame alle proteine plasmatiche, quali anticonvulsivanti (idantoina), anticoagulanti (cumarina), farmaci antiinfiammatori non steroidei, salicilati, sulfonpirazone. Questi farmaci possono determinare cambiamenti nella concentrazione di farmaco libero nel plasma;
- L'effetto antiipertensivo può essere potenziato dall'associazione con altri farmaci antiipertensivi. Questo effetto viene sfruttato anche terapeutamente, ma bisogna diminuire le dosi dei singoli farmaci;
- L'associazione con il litio può provocare neurotossicità che si manifesta con nausea, vomito, diarrea, atassia, tremori e tinnito;
- L'uso concomitante con simpaticomimetici può ridurre l'effetto antiipertensivo dell'AML, viceversa la ritenzione di fluidi indotta dagli estrogeni determina aumento della pressione arteriosa nei pazienti trattati con AML. Quindi, in entrambi i casi, i pazienti devono essere attentamente monitorati per confermare che l'effetto desiderato sia stato ottenuto.

2.2.2 Effetti collaterali

Nel normale uso terapeutico si sono manifestati emicrania, problemi gastrointestinali ed eruzioni cutanee. Sono effetti più rari la ginecomastia e mioclonie.

In caso di eccessiva assunzione si possono verificare bradicardia asintomatica o una blanda ipotensione che può manifestarsi come vertigini, fatica e stordimento.

La tossicità grave si manifesta con profonda bradicardia, aritmia (incluso completo blocco cardiaco) e ipotensione che determina *shock* cardiogeno e disfunzione d'organo, inclusi letargia, sincope, alterazioni dello stato mentale, ischemia cerebrale, insufficienza renale, acidosi metabolica, coma e morte.

Per trattare l'avvelenamento da AML si somministra atropina, per combattere la bradicardia, la quale risulta inefficace nei casi di grave avvelenamento, in tali casi si somministra il calcio per via intravenosa e vasocostrittori per innalzare la pressione sanguigna.

In tutti i casi di eccessiva ingestione si somministra il carbone attivo. Se l'ingestione è recente può essere effettuato un lavaggio gastrico.

2.2.3 Farmacocinetica

L'AML mostra un lento assorbimento e un effetto prolungato. È lentamente ma completamente assorbita con una biodisponibilità del 80-85% nell'uomo.

L'AML subisce un minimo metabolismo presistemico e un lento ma esteso metabolismo epatico (90%). Il metabolismo avviene ad opera del CYP3A, espresso nel fegato e nell'intestino.

Il succo di pompelmo inibisce l'attività del CYP3A espresso nell'intestino, che rappresenta il primo enzima ossidativo che incontra il farmaco dopo la somministrazione orale [26,27], di conseguenza la biodisponibilità dell'AML aumenta cosiccome la sua concentrazione in circolo. Rispetto alle altre diidropiridine l'aumento di concentrazione libera del farmaco è meno incidente. Infatti la biodisponibilità passa dall' 81% all'88%.

Nessuno dei metaboliti dell'AML è attivo, questi ultimi vengono escreti con l'urina e con le feci. Al contrario delle altre diidropiridine, l'AML ha un basso profilo di escrezione epatica ciò spiega l'elevata biodisponibilità.

Grazie all'elevato grado di legame ai tessuti, l'AML somministrata per via orale è assorbita dal fegato e poi redistribuita al circolo sistemico. Queste proprietà risultano in un aumento della latenza del picco plasmatico e una maggiore emivita di eliminazione rispetto alle altre diidropiridine. L'AML subisce, inoltre, un esteso metabolismo epatico dei derivati piridinici.

L'escrezione renale riguarda il 60% della dose con circa il 5% di AML immodificata e il 20-25% è escreta con la bile e le feci. Non viene allontanata dal corpo con l'emodialisi.

Il cibo non ha effetto sui parametri tossicocinetici e sulla biodisponibilità. Il picco plasmatico di una dose di 6-7 ng/ml si verifica in 6-12 ore.

L'AML è legata alle proteine plasmatiche per il 97-99%. È rapidamente distribuita ai tessuti, dai quali viene rilasciata lentamente.

A differenza degli altri farmaci diidropiridinici, l'AML ha un elevato volume di distribuzione, circa 20L/kg. È stato affermato che l'età, gravi malattie epatiche e renali influenzano il profilo farmacocinetico portando ad una maggiore concentrazione plasmatica e ad una maggiore emivita.

In condizioni normali l'emivita dell'AML varia da 35 a 50 ore. Con la somministrazione di dosi ripetute l'emivita cresce fino a 45 ore. Questo determina accumulo del farmaco, con aumento del livello stazionario e della concentrazione media e minima durante l'intervallo tra le dosi.

Nei pazienti anziani il tempo di eliminazione può crescere fino a raggiungere 65 ore. Sono necessarie invece 60 ore nei pazienti con disfunzioni epatiche.

2.2.4 Meccanismo d'azione

Come tutti gli agenti diidropiridinici, ad attività CCBs, l'AML inibisce il flusso di calcio attraverso la membrana cellulare nel muscolo liscio cardiaco e vascolare, con un effetto maggiore nel muscolo liscio vascolare. È un vasodilatatore delle arterie periferiche, pertanto riduce il post-carico.

L'AML a valori di pH fisiologico è ionizzata al 90% e, a differenza delle altre diidropiridine, è lentamente associata ai siti recettoriali. Questo può essere il motivo della lunga emivita plasmatica e della lunga durata d'azione.

Il suo principale svantaggio è la fotosensibilità. Come tutte le molecole 1,4-diidropiridiniche, anche l'AML viene degradata dalla luce, mediante trasformazione dell'anello diidropiridinico in anello piridinico. Il risultante derivato piridinico presenta perdita di attività farmacologica e tossicità, ed inoltre è un potenziale agente cancerogeno.

L'inclusione dell'AML in ciclodestrine, oltre ad evitare il fenomeno della fotodegradazione, determina l'aumento della solubilità in acqua e l'aumento della biodisponibilità permettendo la riduzione della dose necessaria e di conseguenza la riduzione degli effetti collaterali associati [28].

2.2.5 Classificazione dell'AML secondo la BCS

La *Food and Drug Administration* (FDA) ha proposto una classificazione dei farmaci in uno schema scientifico chiamato *Biopharmaceutic Classification System* (BCS) [29]. Secondo questo criterio tutti i farmaci sono classificati in quattro categorie in funzione della loro solubilità e permeabilità.

- Farmaci di classe I: non presentano problemi in ambito formulativo, in quanto sono caratterizzati da un'elevata solubilità e da un'elevata permeabilità di membrana;
- Farmaci di classe IV: sono caratterizzati da una bassa solubilità e una bassa permeabilità di membrana e presentano notevoli difficoltà nell'ambito del *drug delivery*;
- Farmaci di classe II: sono caratterizzati da bassa solubilità ed elevata permeabilità e sono suscettibili a modifiche formulative al fine di aumentare la biodisponibilità orale;
- Farmaci di classe III: presentano elevata solubilità e scarsa permeabilità.

Il BCS classifica un farmaco come altamente solubile quando la più elevata dose è solubile in 250 ml o in un volume inferiore di mezzo acquoso all'interno di un range di pH 1-7.5 a 37°C.

Un farmaco è considerato altamente permeabile quando il 90% della dose somministrata è assorbito.

Secondo questa classificazione, considerando sia solubilità che permeabilità, l'AML è stata assegnata alla classe I, mostrando, infatti, una biodisponibilità assoluta del 60-65% e una permeabilità classificata come "alta" a causa dei metaboliti escreti con le urine (90-95%).

Le ciclodestrine possono aumentare la solubilità in acqua di farmaci lipofili senza influenzare la permeabilità attraverso le membrane. Quindi attraverso la complessazione in ciclodestrine è possibile spostare farmaci di classe II, e a volte anche di classe IV, in classe I.

Tuttavia le ciclodestrine possono diminuire la biodisponibilità dei farmaci di classe I e in molti casi non aumentano la biodisponibilità dei farmaci di classe III.

Le ciclodestrine idrofile non sono capaci di aumentare la biodisponibilità dei farmaci di classe I, tuttavia sono utilizzate per ridurre l'irritazione locale determinata dai farmaci e per aumentare la velocità di assorbimento.

I farmaci di classe II hanno solubilità limitata che determina una lenta velocità di assorbimento orale. Quindi la solubilità acquosa ostacola la velocità di dissoluzione. I complessi di questi farmaci con le ciclodestrine solubili in acqua aumentano la loro diffusione attraverso la mucosa e quindi la loro biodisponibilità orale.

I farmaci di classe III sono solubili in acqua ma non superano rapidamente le membrane biologiche a causa delle dimensioni e dell'estensione dell'idratazione. Di conseguenza la formazione di farmaci idrofili grazie alla complessazione con le ciclodestrine non aumenterà la loro biodisponibilità orale, ma ridurrà la distribuzione tra l'esterno acquoso e la mucosa gastrointestinale. I farmaci di classe IV sono solubili in acqua e non superano rapidamente la membrana biologica lipofila. I composti idrofili insolubili in acqua non formano complessi con le ciclodestrine.

Tuttavia le ciclodestrine sono capaci di aumentare la solubilità in acqua di molte grandi molecole lipofile determinando un aumento della disponibilità del farmaco alla superficie della mucosa con conseguente aumento della biodisponibilità orale.

Inoltre, l'AML possiede nella sua struttura un centro stereogenico, pertanto, esistono due enantiomeri, ovvero l'(R)-AML e l'(S)-AML. Attualmente il farmaco viene commercializzato come racemato, nonostante dati di letteratura confermano che solo l'(S)-AML mostra una potente attività CCBs [30,31], mentre l'enantiomero (R)-AML promuove il rilascio di ossido nitrico nei vasi sanguigni periferici, aumentando il rischio di edema.

Pertanto, per ridurre l'incidenza di questo ed altri effetti collaterali sarebbe utile separare l'enantiomero (R) dalla miscela racemica (R,S)-AML.

CAPITOLO 3

LE CICLODESTRINE

3.1 GENERALITA'

Le ciclodestrine (CDs) sono oligosaccaridi ciclici, con una superficie idrofila e una cavità centrale lipofila, costituiti da unità di D-(+)-glucosio legate da legami glucosidici α (1 \rightarrow 4).

Sono ottenute per degradazione enzimatica dell'amido ad opera di un enzima ciclizzante, la cicloglicosiltransferasi (CGTase). La CGTase stacca dall'elica glucosidica frammenti contenenti da 6 a 12 unità di glucosio, ne collega gli estremi e dà origine a una miscela di molecole cicliche, la cui frazione principale è costituita dalle α - β - e γ -CD, che sono costituite rispettivamente da 6, 7 e 8 unità di glucosio (fig.6).

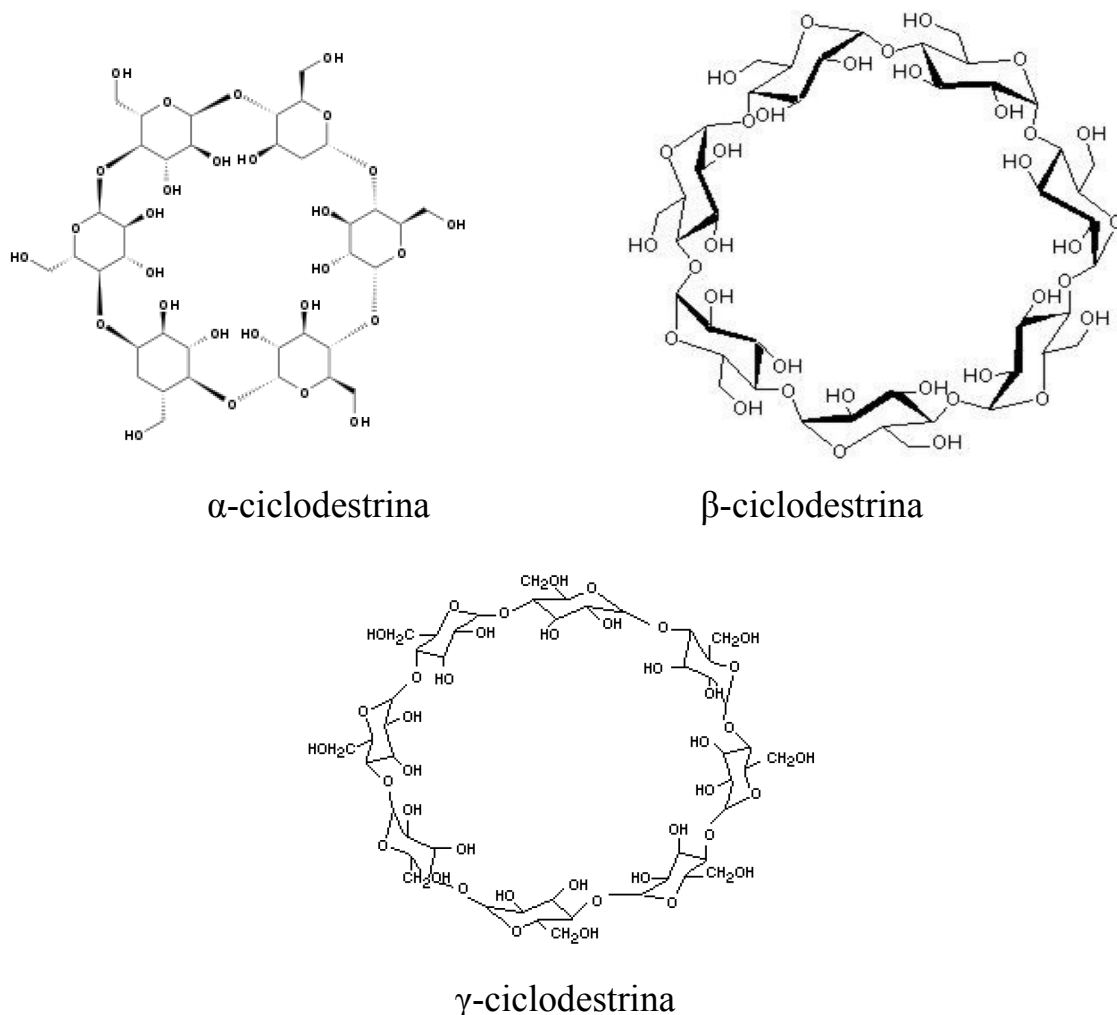


Figura 6: Ciclodestrine

3.1.1 Applicazioni generali

Attualmente le CDs vengono utilizzate in diversi campi:

- Farmaceutico, che è il principale;
- Nell'industria alimentare per eliminare i cattivi sapori;
- Nell'industria chimica come fase stazionaria in colonne cromatografiche per separare molecole chirali;
- Nella cosmetica (dentifrici, creme per la pelle, ecc.) per migliorare la stabilità e l'odore, ma soprattutto per convertire ingredienti liquido-volatili in forma solida;
- Nell'agro-industria, per la produzione di sostanze chimiche usate in agricoltura come insetticidi, erbicidi, fungicidi, repellenti, ferormoni e regolatori della crescita, in quanto aumentano la solubilità e stabilità delle sostanze in questione;
- Come adesivi, complessanti, tensioattivi, e nella produzione di rivestimenti polimerici

3.2 PROPRIETA' CHIMICO-FISICHE

Le CDs naturali sono sostanze di natura cristallina con p.f. con decomposizione intorno a 280°C.

Il loro profilo termo-analitico è caratterizzato da:

- Banda di disidratazione (range 25-120°C)
- Banda di decomposizione intorno ai 250°C

In tabella 1 sono riportati le principali caratteristiche chimico-fisiche, a seconda del tipo di CD utilizzata.

	α	β	γ
n° unità glucosio	6	7	8
P.M. (anidro)	972	1135	1297
Solubilità in H ₂ O g/100 mL a 25°C	14.2	1.85	23.2
Intervallo del p.f. in °C	255-260	255-265	240-245
Volume cavità in (mL/mol)	174	262	472
Diametro medio cavità anello maggiore (Å)	5.7	7.8	9.5
Diametro esterno medio anello maggiore (Å)	13.7	15.3	16.9
Altezza anello (Å)	8	8	8
Molecole di H ₂ O dentro la cavità	6	11	17

Tabella 1: Caratteristiche chimico-fisiche delle ciclodestrine naturali utilizzate.

La solubilità in acqua delle CD, a 25 °C è strettamente correlata alla capacità dei gruppi ossidrilici di formare legami ad idrogeno con il solvente. La disposizione spaziale dei monomeri di glucosio determina sia il numero sia l'intensità di interazioni tra gli ossidrili. Pertanto la γ -CD possedendo una struttura meno rigida è la più solubile (23,2 g/100 ml), seguono la α -CD (14,5 g/100 ml) e la β -CD (1,85 g/100 ml).

All'aumentare della temperatura la solubilità delle CDs naturali aumenta, mentre le CDs derivate (ad esempio dimetil- β -CD e trimetil- β -CD) hanno un comportamento opposto.

Ciò è stato spiegato col fenomeno di progressiva disidratazione all'aumentare della temperatura.

3.3 STRUTTURA CHIMICA, SOSTITUZIONE E CLASSIFICAZIONE

Le CDs sono oligosaccaridi ciclici formati da 6-8 unità di glucosio unite fra loro mediante legami α -1,4-glucosidico (fig.7). Nello spazio assumono una forma tronco-conica come illustrato in figura 8 e 9.

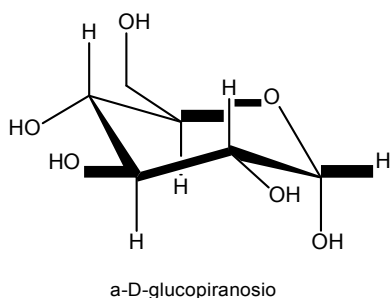


Figura 7

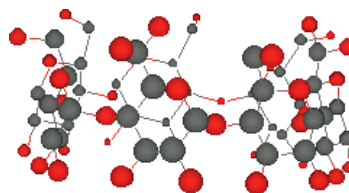


Figura 8

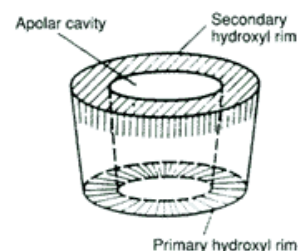


Figura 9

Nell'unità glucosidica si evidenziano 3 -OH: quello in C6, primario, e quelli in C2 e C3, secondari (fig.10). Gli -OH primari si trovano sul lato più stretto della cavità, mentre gli -OH secondari in quello più largo. Tutti gli ossidrili si trovano sulla superficie esterna che pertanto presenta carattere idrofilo. La cavità interna invece è piuttosto idrofobica per i gruppi -CH- e per gli -O glucosidici che con i loro doppietti liberi determinano alta densità elettronica conferendo alla sostanza un carattere di *base di Lewis* [32].

La struttura ad anello delle CDs è stabilizzata da legami a idrogeno intramolecolari che coinvolgono i gruppi ossidrilici secondari di due unità glucosidiche adiacenti.

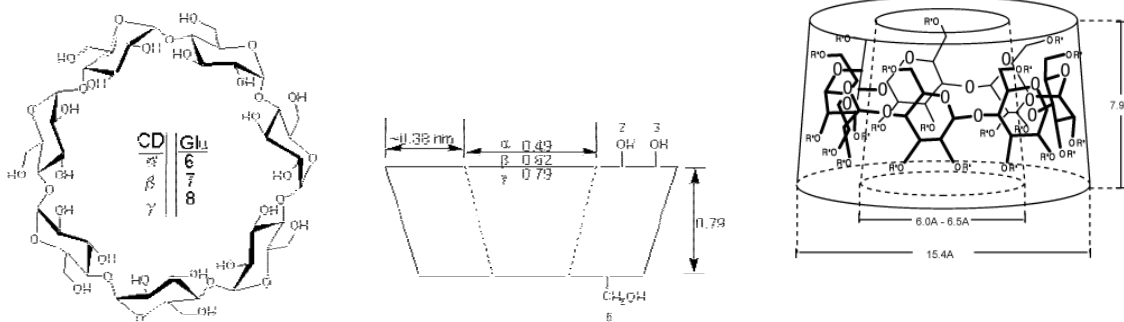


Figura 10

Gli -OH primari presenti nella cavità inferiore, sono più “mobili” rispetto a quelli secondari, permettendo dunque alla cavità di allargarsi.

Le CDs sono classificate in:

- a) CDs naturali;
- b) CDs derivate o semisintetiche, che comprendono:
 - CDs alchilate;
 - CDs ramificate;
 - CDs polimeriche;
 - CDs collegate.

Le CDs naturali sono quelle direttamente derivate dall'idrolisi enzimatica ossia le α -CD, β -CD, γ -CD, sostanze di natura cristallina che fondono con decomposizione sui 280 °C (fig.11).

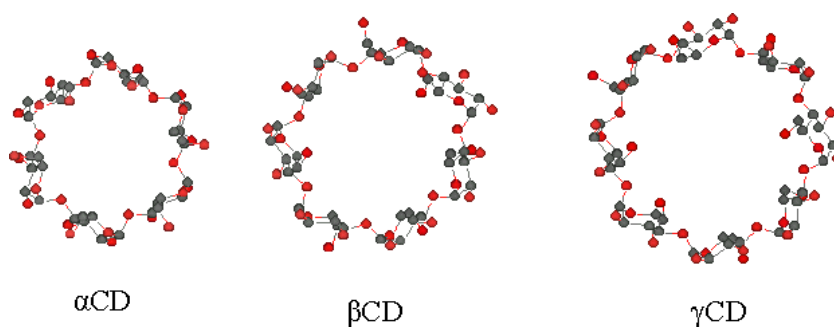


Figura 11

Le CDs derivate o semisintetiche, si ottengono per sostituzione degli atomi di -H degli -OH presenti su ciascuna unità glucosio:

- Le CDs alchilate: presentano una migliore solubilità in H₂O, anche se i gruppi sostituenti sono a carattere lipofilo (metile e idrossipropile);

- Le CDs ramificate hanno una solubilità $> 50\text{g}/100\text{mL}$, non hanno proprietà emolitiche ma presentano un minore potere complessante (glucosio e diglucosil- β -CD e maltosil e dimaltosil- β -CD);
- Le CDs collegate sono dei dimeri collegati con catena adatta. Sono state progettate per permettere l'inclusione di molecole di grosse dimensioni (fig.12);
- Le CDs polimeriche (fig.13) sono usate come eccipienti per le forme a rilascio prolungato perché poco solubili.

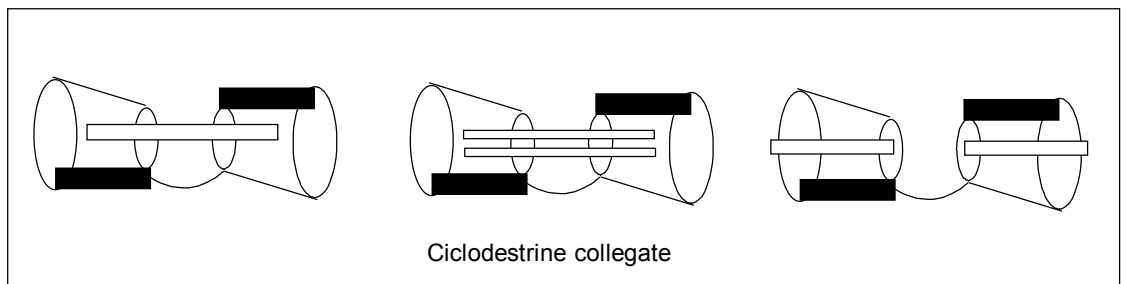


Figura 12

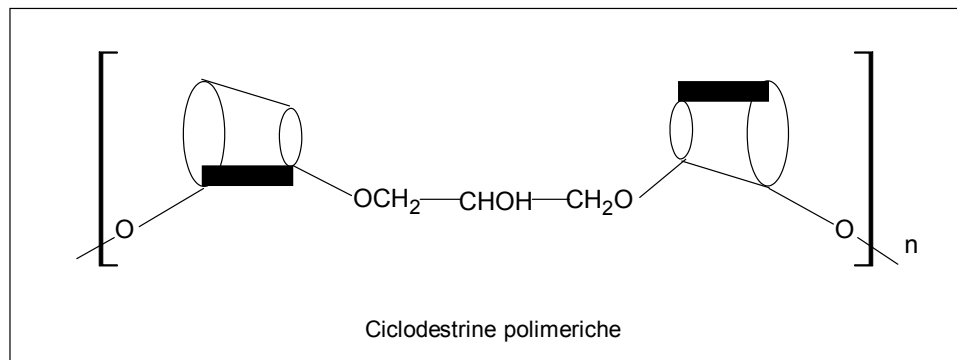


Figura 13

Molti polimeri di β -CD sono stati ottenuti per reticolazione della β -CD con l'epicloridina. Si prevede che questi polimeri siano capaci di trattenere diverse molecole organiche adsorbendole nel loro reticolo o formando complessi di inclusione con la β -CD. Le β -CD possono essere reticolate con reagenti bi- o multi- funzionali per ottenere differenti polimeri solubili o insolubili. I polimeri solubili sono ottenuti impiegando un minore tempo di reazione o una minore concentrazione iniziale di CD rispetto a quelli necessari per ottenere polimeri insolubili. Queste resine hanno molte applicazioni.

Il polimero solubile della β -CD mostra il vantaggio di una maggiore solubilità in acqua rispetto alla β -CD nativa e può essere usato per modulare la solubilità in acqua.

I polimeri insolubili sono capaci di assorbire una grande quantità di acqua e rigonfiarsi senza sciogliersi, quindi possono essere usati come assorbenti di inquinanti e coloranti dalle acque reflue. La maggiore capacità assorbente delle diverse molecole è correlata ai meccanismi di assorbimento che coinvolgono sia l'adsorbimento fisico nel loro reticolo sia la formazione di complessi di inclusione con le β -CDs.

I polimeri idrofili e rigonfiabili sono spesso usati come *carrier* di farmaci. In tutte queste applicazioni, sia la capacità di rigonfiamento, sia le proprietà meccaniche giocano un ruolo importante.

A seconda della quantità di reagente usato nella sintesi e della temperatura di reazione, i polimeri ottenuti conterranno diverse percentuali di β -CDs e diverse strutture.

Il polimero insolubile con il 74% di β -CD sembra possedere meno CD disponibile rispetto a quello con il 65% di β -CD, probabilmente a causa del maggiore grado di reticolazione.

Inoltre si ha una maggiore disponibilità di CD nel polimero solubile il quale contiene il 48% di β -CD [29, 33].

3.4 CICLODESTRINE DI INTERESSE FARMACEUTICO

I diversi derivati delle CDs che hanno ottenuto interesse farmaceutico includono le idrossipropil β - e γ -CDs, la β -CD metilata, la sulfobutiletere β -CD, ecc. Le CDs idrofile a dosaggi bassi e moderati non sono tossiche e possono essere usate in formulazioni topiche e orali, ma solo la α -CD e i derivati idrofili della β - e della γ -CD possono essere usate nelle formulazioni parenterali. Le CDs lipofile sono molto ben assorbite e quindi sono tossiche se somministrate per via parenterale.

3.4.1 Principali applicazioni in campo farmaceutico:

- **Aumento della solubilità e della velocità di dissoluzione di farmaci scarsamente idrosolubili:** sono stati raggiunti grandi risultati nell'applicazione a ormoni steroidei, Fans e prostaglandine. Infatti l'aumento della solubilità ha portato un aumento della biodisponibilità del principio attivo, con conseguente abbassamento della dose e riduzione degli effetti collaterali [34, 35];
- **Miglioramento della biodisponibilità orale [36], rettale, transdermica, nasale, oculare, sublinguale:** in seguito a un aumento del tempo di contatto al sito di assorbimento e a una riduzione dell'irritazione;
- **Aumento della stabilità:** in seguito ad una maggiore protezione della molecola inclusa contro reazioni di degradazione ossidativa e termica, e idrolisi; l'effetto stabilizzante

determinato dalle CDs dipende dalla natura del gruppo funzionale del farmaco e dall'effetto di questo gruppo sulla stabilità del farmaco e sul veicolo;

- **Mascheramento di odori e sapori sgradevoli;**
- **Trasformazione di farmaci liquidi in polveri:** olii essenziali e nitroglicerina, clofibrato, ecc. per una migliore manipolazione nella produzione della forma farmaceutica;
- **Diminuzione della volatilità:** per sostanze volatili come mentolo e canfora;
- **Possibilità di rilascio prolungato:** per principi attivi con tempo di emivita breve;
- **Eccipienti per compresse [37]:** ad es. la β -CD ha proprietà leganti, le CDs polimeriche invece sono rigonfiabili ed hanno proprietà disgreganti.
- **Eliminazione di incompatibilità:** in forme farmaceutiche multicomponenti;
- **Separazione analitica di enantiomeri:** per principi attivi che presentano centri stereogenici (es. Amlodipina Besilato);
- **Catalisi di reazioni stereospecifiche.**

3.4.2 Limitazioni nell'impiego:

- **Dimensione e proprietà della cavità della CD:** il farmaco deva avere un buon “*fit*” con la cavità della CD affinché avvenga l'inclusione;
- **Dose del farmaco:** dato il peso molecolare delle CDs (970-1200), nel caso di elevata quantità di farmaco da includere nella CD, in rapporto equimolare, la forma farmaceutica, ad es. in compressa, risulterebbe di notevole volume;
- **Tossicità:** associata soprattutto alla somministrazione orale di alcune CDs lipofile;
- **Scarsa solubilità delle CD naturali e scarsa stabilità di complessi;**
- **Costo:** relativamente elevato.

3.5 COMPLESSI FARMACO/CDs:

Le CDs formano complessi di inclusione in cui la CD è la molecola “*host*” (ospitante) e il farmaco è il “*guest*”. Le interazioni implicate nella formazione di tali complessi sono di tipo fisico, ovvero, forze di *Van der Waals*, legami a idrogeno, interazioni idrofobiche, che consentono un rapido rilascio del principio attivo.

La formazione del complesso dipende da alcune caratteristiche chimico-fisiche del farmaco, esso deve avere dimensioni adatte per essere contenuto all'interno della cavità della CD, si deve orientare in modo opportuno da rendere massimo il contatto con la cavità idrofoba della CD, deve avere caratteristiche lipofile, non deve formare legami covalenti con la CD in modo

tale da essere in equilibrio con le molecole del complesso.

Quando le CDs si trovano in soluzione acquosa, le molecole di acqua ne occupano la cavità dando luogo ad una interazione polare-apolare termodinamicamente sfavorita. Se in soluzione è presente un farmaco lipofilo, esso sposta le molecole di acqua e ne prende il posto, creando un complesso energeticamente più stabile (interazione apolare-apolare); questo meccanismo è chiamato “*squeezing-out*”.

La forza motrice per la formazione del complesso è la riduzione di energia libera del sistema rispetto alle molecole, ciclodestrina e farmaco, considerati separatamente.

In genere il complesso di inclusione è costituito da una molecola ospite per CD 1:1 (fig.14), ma sono noti anche complessi in cui il rapporto molecola ospite per CD è 2:1 o 1:2 (fig.15).

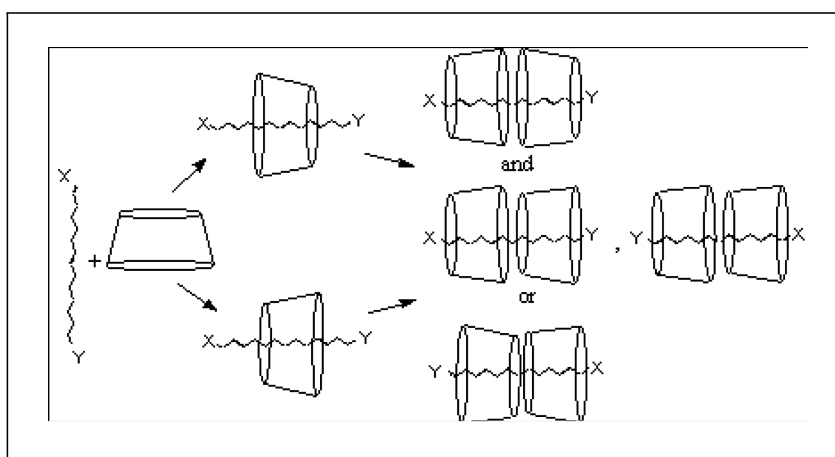


Figura 14

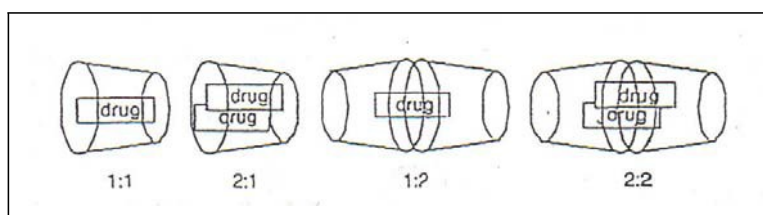


Figura 15

3.5.1 Metodiche di inclusione farmaco/CD

I metodi utilizzati per la preparazione dei complessi si scelgono in base a diversi parametri:

- caratteristiche del farmaco e della CD;
- migliore resa;
- facilità e rapidità di esecuzione;
- costo e possibilità di applicazione su larga scala.

I metodi di preparazione si suddividono in:

- 1. Metodi in fase solida;
- 2. Metodi in fase semisolida;
- 3. Metodi in fase liquida.

METODI IN FASE SOLIDA

Miscela fisica: consiste nella semplice miscelazione in capsula di porcellana, con spatola di osso, di un piccolo quantitativo di farmaco e CD, in un preciso rapporto stechiometrico, per un determinato tempo (15').

La miscela fisica è alla base per la preparazione di complessi mediante altre tecniche quali la macinazione e *kneading*, e viene considerata come riferimento nella dimostrazione della formazione di un complesso con varie tecniche.

Grinding o ball-milling (macinazione in molino ad alta energia): preparata la miscela fisica essa viene messa in particolari contenitori cilindrici con delle sfere. Questi contenitori vengono montati su opportuni alloggiamenti semimobili a cui viene impartito un movimento oscillatorio di opportuna frequenza, per un certo tempo.

In seguito a una duplice azione meccanica dovuta allo sfregamento delle sfere e della polvere con le pareti dei cilindri si ha una riduzione del *particle-size* e maggiore omogeneizzazione della miscela fisica. Ciò comporta una maggiore interazione “*host-guest*” con miglioramento della solubilità rispetto alla miscela fisica. L'energia fornita al sistema può comportare transizioni polimorfe o amorfizzazione.

Tale metodo non può esser utilizzato per sostanze termolabili e viscosi, risulta efficace, invece, per molecole facilmente idrolizzabili.

Sealed heating: la miscela fisica farmaco/CD viene messa con pochissima acqua in una particolare fiala che verrà sigillata e posta in stufa ad una temperatura di poco inferiore a quella di fusione del farmaco per un certo tempo. La temperatura e la pressione, dovuta alla evaporazione dell'acqua, favoriscono la formazione del complesso. La sostanza viene recuperata previo raffreddamento e rottura della fiala.

METODI IN FASE SEMISOLIDA

Kneading o impasto molle: si tratta la miscela fisica farmaco/CD, in rapporto stechiometrico 1:1, con poche gocce di solvente opportuno e si miscela energicamente in mortaio l'impasto ottenuto per alcuni minuti, fino a che il solvente sia completamente evaporato. Si precede con una triturazione di un'ora in metanolo/acqua e infine con l'essiccamento a temperatura

ambiente a pressione ridotta. Questo metodo risulta efficace per molecole scarsamente solubili in acqua.

METODI IN FASE LIQUIDA

Coevaporazione o coprecipitazione: si solubilizza la CD in acqua a 60 °C e il farmaco in opportuno solvente volatile. Le due soluzioni vengono poi unite in pallone agitate e sottoposte ad evaporazione sottovuoto, per un'ora, a 60°C e quindi raffreddamento prima di eseguire la filtrazione. Il precipitato costituisce il complesso.

Liofilizzazione o freeze-drying: si aggiunge il farmaco ad una soluzione acquosa o in miscela acqua/etanolo di CD, sotto agitazione magnetica per facilitare la solubilizzazione. La soluzione viene sottoposta prima a congelamento, raggiungendo temperature inferiori al punto triplo del diagramma di fase dell'acqua e poi a eliminazione del solvente per sublimazione. Si tratta di un metodo che permette la completa eliminazione del solvente, aumenta la bagnabilità del farmaco e quindi la sua solubilità, facilita l'amorfizzazione.

È un metodo utile per sostanze termolabili ma ha un grande svantaggio che ne limita l'applicazione ovvero l'impiego di grandi volumi di solvente.

Spray-drying: si prepara una soluzione farmaco-CD la quale verrà nebulizzata, mediante un atomizzatore, all'interno di una camera di essiccamento. Le goccioline che si formano vengono sottoposte ad un getto d'aria calda che fa evaporare istantaneamente il solvente, ottenendo così una polvere finissima.

Questo metodo è molto efficace per sostanze termolabili ma presenta uno svantaggio in quanto la polvere micronizzata tende a formare degli agglomerati fra particelle dovuti alle cariche elettrostatiche presenti sulla superficie.

CAPITOLO 4

SELETTORI CHIRALI E FASI STAZIONARIE CHIRALI (CSPs)

4.1 GENERALITA'

Allo scopo di separare miscele enantiomeriche, fino ad oggi sono stati studiati diversi tipi di selettori chirali di origine naturale, sintetica e semisintetica. Tra questi hanno trovato efficace applicazione ciclodestrine, macrocicli sintetici (eteri corona) e non (antibiotici macrociclici), calixareni, polimeri chirali, proteine.

In generale, nello sviluppo di un appropriato selettore chirale, vanno presi in considerazione innanzitutto i modelli che analizzano i requisiti necessari per ottenere una ricognizione chirale. Tra questi quello più accreditato è il modello dell'interazione a tre punti, meglio noto come regola di *Dalgliesh*, che postula la necessità di almeno tre interazioni tra analita e selettore, di cui almeno una deve essere stereoselettiva (fig.16).

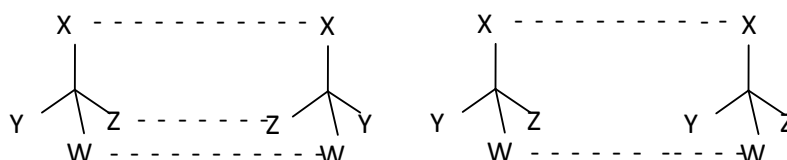


Figura 16: Modello di interazione a tre punti

Inoltre, le interazioni tra soluti enantiomerici e selettori chirali non solo devono essere selettive, ma devono anche permettere l'instaurazione di rapidi equilibri di associazione [16].

I tipi di interazione che si verificano tra selettore e i composti da analizzare e che permettono di discriminare le coppie di enantiomeri dipendono dalle caratteristiche chimico-fisiche del selettore stesso. Tali interazioni comprendono legami idrogeno multipli, complessi π a trasferimento di carica, coordinazione con ioni metallici, interazioni coulombiane, interazioni idrofobiche. A seconda della struttura del selettore, si può inoltre verificare la formazione di complessi di inclusione, per cui anche l'ingombro sterico viene a costituire un meccanismo aggiuntivo di selezione.

Altra prerogativa importante di un selettore è rappresentata dalla sua stabilità e, nel caso esso vada a costituire una fase stazionaria, è indispensabile che esso sia insolubile nella fase mobile

[38]. I selettori chirali possono, infatti, svolgere la loro azione sia disciolti in una fase mobile, sia venendo chimicamente legati ad un supporto inerte, formando una fase stazionaria chirale (*Chiral Stationary Phase*, CSP). Questa permetterà la trasformazione di una ricognizione chirale in una separazione chirale.

Le CSPs il cui utilizzo viene maggiormente riportato in letteratura includono quelle a trasferimento di carica, con eteri corona, a scambio di legante, con ciclodestrine, fasi chirali a largo spettro (quali le *Pirkle Type Chiral Stationary Phases*), o fasi di tipo polimerico quali supporti con cavità chirali, polimeri chirali naturali (proteine, polisaccaridi, ecc.) o sintetici (poliacrilammidi). Di seguito viene riportato più dettagliatamente il meccanismo di enantiorisoluzione di alcune di queste.

Ad esempio, le CSPs contenenti ciclodestrine (CDs), che sono state tra i primi selettori chirali ad essere usati, devono la loro facoltà di ricognizione chirale alla loro peculiare struttura. Si tratta infatti di oligosaccaridi ciclici composti da sei (α -CD), sette (β -CD) o otto (γ -CD) unità di glucopiranosio, che costituiscono una cavità chirale che permette di formare complessi di inclusione. La loro struttura a cono tronco presenta internamente una superficie idrofobica ed esternamente una superficie idrofila con le quali è possibile stabilire quindi diversi tipi di interazione. L'enantioselettività delle CDs può essere variata notevolmente derivatizzandole in più modi a seconda delle esigenze.

Altri composti con cui si possono ottenere CSPs e con cui si verifica la formazione di un complesso di inclusione sono gli eteri corona, che permettono un'inclusione stereoselettiva delle ammine primarie soprattutto attraverso la formazione di legami idrogeno.

L'impiego di proteine e polisaccaridi invece caratterizza la ricognizione chirale basata sulla formazione di complessi di affinità [39]; si verificano in questo caso interazioni molto simili se non addirittura identiche alle interazioni che avvengono in natura. Questa straordinaria selettività, per quanto utilissima per esempio in campo biomolecolare, non è sempre una caratteristica opinabile per un selettore chirale. Visto infatti il costo delle CSPs, è auspicabile che una stessa fase possa permettere la separazione di più miscele racemiche. Purtroppo sono in generale pochi i selettori chirali che riescono ad offrire contemporaneamente un alto grado di selettività nei confronti di classi differenti di composti ed un'alta efficienza.

4.2 CSPs A BASE DI POLISACCARIDI CLORURATI

Fasi stazionari a base di polisaccaridi clorurati sono facilmente preparate mediante la reazione tra la cellulosa e il corrispondente derivato fenil-isotiocianico.

L'esatta struttura di questi fenil-carbammati di cellulosa risulta essere importante per il meccanismo di ricognizione chirale.

Tali derivati della cellulosa presentano una struttura a tripla elica levogira, pertanto, se un racemato riesce ad entrare all'interno dell'elica avrà luogo la separazione. Inoltre, l'elica deve avere una struttura altamente regolare, la presenza di gruppi elettrone-attrattori, come sostituenti al residuo fenil-carbammico contribuisce a stabilizzare l'elica mediante formazione di legami a idrogeno interni [40].

L'enantiorisoluzione associata a queste CSPs, legate al gel di silice mediante *coating* o legami covalenti, dipende dai sostituenti presenti sul gruppo fenilico del residuo fenil-carbammico.

La simultanea introduzione di un gruppo elettrone-attrattore e di uno elettrone-repulsore, come il cloro o il metile (fig.17), al residuo fenil-carbammico, si è mostrata efficace per l'ottenimento dell'enantiorisoluzione. Infatti, tali derivati mostrano una più ampia ricognizione chirale rispetto ai fenil-carbammati non sostituiti.

Il più importante sito di interazione tra il racemato e queste CSPs potrebbe essere il residuo carbammico vicino all'unità di glucosio chirale della cellulosa, la polarità di tale residuo è influenzata dai sostituenti sul gruppo fenile:

- Gruppo elettrone-donatore (-CH₃) introdotto sul fenile: aumenta la densità elettronica del carbonile;
- Gruppo elettrone-repulsore (-Cl) introdotto sul fenile: aumenta l'acidità dell'ammino gruppo;
- Gruppo metossi o nitro introdotti sul fenile: diminuiscono l'abilità di queste CSPs nel dare enantiorisoluzione.

4.2.1 Siti di interazione racemato/CSP:

1. Residuo carbammico vicino all'unità di glucosio chirale della cellulosa, tale sito risulta essere il più importante;
2. Gruppo fenilico, specialmente in condizioni di fase inversa, mediante interazione π - π ;
3. Racemati contenenti gruppi carbonilici o ossidrilici interagiscono rispettivamente con i gruppi amminici e carbonilici del residuo fenilcarbammico;

4. Racemati contenenti gruppi metossi o nitro mostrano una bassa ricognizione chirale molto probabilmente perché interagiscono con il selettore chirale lontano dall'unità di glucosio chirale.

In commercio esistono delle colonne per cromatografia chirale a base di polisaccaridi clorurati chiamate LUX o Sepapak.

In questo studio è stata utilizzata come CSP la Sepapak-4 (*Cellulose tris(4-chloro-3-methylphenylcarbamate)*).

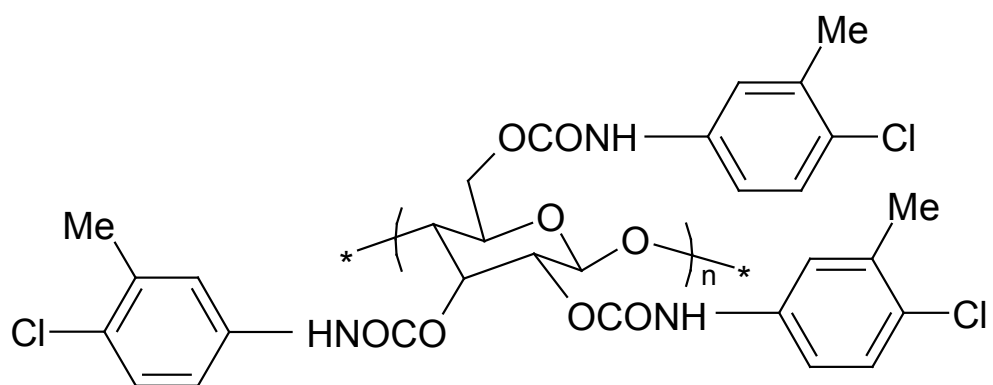


Figura 17: Selettore chirale: Sepapak-4

CAPITOLO 5

TECNICHE CROMATOGRAFICHE MINIATURIZZATE: aspetti teorici.

5.1 CROMATOGRAFIA LIQUIDA CAPILLARE (CLC)

La cromatografia può essere descritta come un procedimento che permette di separare i componenti di una miscela sfruttando la loro diversa distribuzione tra due fasi, una delle quali è fissa, mentre l'altra è in movimento. La fase fissa o stazionaria può essere solida o liquida, ma è comunque sempre un sistema ad elevatissimo sviluppo superficiale attraverso cui scorre (solitamente sotto la spinta di un'adeguata pressione) la fase mobile, liquida o gassosa. Alcuni soluti tendono a rimanere più tempo di altri in fase fissa, avendo per quest'ultima una maggiore affinità, e vengono selettivamente ritardati. Si verificano così differenti velocità di migrazione nel sistema bifasico sopra descritto, che permettono la separazione dei composti in esame.

I principali meccanismi che causano il ritardo selettivo sono riassumibili nei seguenti: adsorbimento (cromatografia liquido-solido); permeabilità ristretta alla porosità del solido che costituisce la fase stazionaria (cromatografia ad esclusione sterica); partizione (cromatografia liquido-liquido, cromatografia a fase legata); interazione elettrostatica con gruppi ionici immobilizzati (cromatografia a scambio ionico); legame a biopolimeri con struttura specifica (cromatografia di affinità) [41].

In questo studio è stata presa in considerazione la cromatografia liquida, la cui caratteristica è quella di impiegare una fase mobile liquida, ed è stato analizzato il caso in cui la fase stazionaria è solida e il suo supporto costituito da una colonna. Come sopra accennato il meccanismo principale di separazione è quello di adsorbimento. Le interazioni tra soluto e fase stazionaria dipendono dal tipo di fase stazionaria impiegata, che fundamentalmente viene distinta in polare e apolare, e che a sua volta condiziona la scelta della fase mobile. I tipi di interazione comprendono da una parte legami idrogeno, attrazione ionica, formazione di complessi a trasferimento di carica, interazione dipolo-dipolo e dall'altra fundamentalmente forze di *Van Der Waals*.

Tutte le variabili che possono influenzare il bilanciamento delle forze intermolecolari responsabili del selettivo ritardo delle molecole di soluto influenzano la separazione, per cui è possibile raggiungere le condizioni ottimali con un'appropriata scelta del modo di separazione, della struttura della fase stazionaria e della composizione della fase mobile.

I parametri indispensabili per la comprensione del processo cromatografico sono descritti dalle relazioni riportate di seguito [41, 42].

t_R è il tempo di ritenzione, definito come il tempo che intercorre tra l'iniezione di un campione e la comparsa di un picco di soluto al rivelatore di una colonna cromatografica:

$$t_R = t_0 + t_1^R \quad (1)$$

Questo parametro è dato dalla somma di t_0 , detto anche tempo morto (t_M), che è il tempo trascorso dal soluto nella fase mobile (quindi richiesto ad una specie non trattenuta per attraversare la colonna), e di t_1^R che è il tempo trascorso nella fase stazionaria. Questi parametri di ritenzione dipendono dalla velocità di flusso dell'eluente. A flusso costante t_0 è indipendente dalle sostanze da separare; coincide cioè con il tempo di eluizione dell'eluente.

Il fattore di ritenzione k' (o fattore di capacità) viene invece così descritto:

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (2)$$

Questo rappresenta un importante parametro sperimentale largamente utilizzato per descrivere la velocità di migrazione dei soluti lungo la colonna. In LC i fattori di ritenzione possono essere spesso appositamente modificati per ottenere migliori separazioni attraverso variazioni di composizione della fase mobile e della fase stazionaria.

Il fattore di selettività α permette di valutare la selettività del sistema per due specie ed è uguale al rapporto tra il fattore di ritenzione del soluto più trattenuto e il fattore di ritenzione del soluto meno fortemente trattenuto, per una medesima fase stazionaria, nelle medesime condizioni cromatografiche. Tale parametro costituisce una misura dell'efficacia della colonna nella separazione dei due analiti ed è dato quindi dalla seguente relazione:

$$\alpha = k'_2 / k'_1 = (t_{R2} - t_0) / (t_{R1} - t_0) \quad (3)$$

La risoluzione R_s , che permette di descrivere le separazioni dei picchi, può essere calcolata come sotto riportato:

$$R_s = 1.18 \Delta t / (w_{h1} + w_{h2}) \quad (4)$$

dove Δt è la differenza tra i tempi di ritenzione degli analiti, e w_{h1} e w_{h2} sono l'ampiezza dei rispettivi picchi a metà altezza. L'equazione riportata è quella che si adatta meglio alle condizioni in cui i picchi non sono separati fino alla linea di base. Dal punto di vista teorico, sono state formulate diverse equazioni per correlare la risoluzione ad alcune variabili cromatografiche quali selettività ed efficienza, e tra queste la più utilizzata è la seguente:

$$R_s = [\sqrt{N} / 4] [(\alpha - 1) / \alpha] [k_2 / (1 + k_2)] \quad (5)$$

dove N è il numero dei piatti teorici.

Le formule sopra riportate sono state utilizzate anche per il calcolo dei valori assunti da questi stessi fattori in CEC, con l'accortezza di motivare eventuali differenze nei risultati ottenuti con richiami agli aspetti teorici che permettono di distinguere le due tecniche.

Infine, in cromatografia, i parametri che influiscono sull'efficienza della colonna (e quindi sull'allargamento di banda) possono essere riassunti nell'equazione di *Van Deemter*:

$$H = B/u + C_s u + C_M u \quad (6)$$

dove H è l'altezza del piatto teorico, con cui si misura, così come con il numero dei piatti teorici, l'efficienza della colonna. B/u è il coefficiente di diffusione longitudinale, che a sua volta dipende in maniera inversamente proporzionale dalla velocità lineare u dell'eluente, poiché quanto minor tempo trascorre l'analita nella colonna, minore sarà il fenomeno della diffusione dal centro della banda verso gli estremi. Questo termine ha comunque uno scarso significato in LC, mentre maggiore importanza assumono i termini $C_s u$ e $C_M u$. Il coefficiente $C_s u$ di trasferimento di massa nella fase stazionaria è direttamente proporzionale al quadrato dello spessore di film sulle particelle di supporto e inversamente proporzionale al coefficiente di diffusione del soluto nel film. Il coefficiente $C_M u$ per il trasferimento di massa nella fase mobile è direttamente proporzionale al quadrato del diametro delle particelle dell'impaccamento, del diametro della colonna e della velocità di flusso e inversamente proporzionale al coefficiente di diffusione dell'analita nella fase mobile [41,42,43].

Dato che quindi proprio determinate caratteristiche della colonna sono coinvolte nell'efficienza di quest'ultima, gli studi si sono concentrati su queste in modo da apportarvi modifiche tali da permettere una continua evoluzione della tecnica cromatografica. In generale si può dire che tre aspetti fondamentali della tecnologia delle colonne cromatografiche attirano il massimo interesse [44]:

- la cinetica del sistema;
- la termodinamica;
- la geometria della colonna.

Gli studi sulla cinetica, che è legata direttamente all'efficienza della colonna, hanno contribuito enormemente alla conoscenza dei materiali di supporto e dei metodi di riempimento.

I due parametri termodinamici α e k' sono legati alla chimica del sistema e sono di fondamentale importanza per il processo di separazione. Essi compaiono infatti, come visto precedentemente, anche nell'equazione del calcolo della risoluzione.

Per quanto riguarda infine la geometria della colonna, essa influisce sulla velocità delle analisi, sulla sensibilità e sul consumo di solvente. Negli ultimi anni si è manifestata a tal proposito una duplice tendenza, consistente nella riduzione sia delle dimensioni delle particelle che della

lunghezza della colonna. La riduzione della dimensione delle particelle in una colonna di lunghezza fissa fa diminuire la dispersione, aumentare l'efficienza e di conseguenza la risoluzione. In particolare, una delle innovazioni più rivoluzionarie è stata l'introduzione di microparticelle (di diametro 3, 5, 10 μm) in seguito ai lavori fondamentali di *Huber, Van Deemter e Kirkland* [45, 46, 47, 48]. Un crescente interesse viene inoltre rivolto attualmente verso l'utilizzo di colonne aventi diametro molto piccolo. Queste colonne offrono una serie di vantaggi all'analista, principalmente in termini di economia di esercizio, sensibilità, efficienza, nonché di possibilità di interfaccia LC/MS. I primi tentativi di usare colonne impaccate di diametro piccolo in HPLC risalgono alla fine degli anni sessanta da parte di *Horvath*, che eseguì i primi esperimenti di cromatografia liquida capillare con capillari di acciaio inox impaccati, di 1 mm di diametro interno. Al giorno d'oggi la CLC, che impiega colonne più piccole e più corte, impaccate con fasi stazionarie con particelle di diametro di 5, 3 o 1 μm , sta diventando uno strumento per separazioni potente e ad ampio spettro nella chimica analitica.

I benefici esibiti dalla CLC rispetto alla HPLC consistono in prestazioni migliori, quantitativi di componenti per fase mobile/fase stazionaria e di campioni considerevolmente più bassi, sensibilità di rivelazione più alta. I costi dell'attrezzatura sono paragonabili tra le due tecniche, ma il risparmio che si ha in CLC a livello di materiale necessario per le analisi è notevole. Di fondamentale importanza risulta anche a livello ambientale il vantaggio dovuto al ridotto consumo di modificatori organici.

La CLC è una tecnica molto versatile, e tra le sue molteplici applicazioni assume particolare rilevanza il suo uso in ambito farmaceutico per la determinazione del componente principale e delle impurezze nella forma farmaceutica e dei metaboliti nei fluidi biologici [49, 50, 51].

Così come per ogni altra tecnica, anche la CLC necessita di un sistema che permetta che tutte le operazioni siano automatizzate. Al momento attuale ciò che crea maggiore difficoltà nel far sì che questa tecnica sia considerata pratica e attuabile è la scarsità di autoiniettori commercialmente disponibili per essere usati specificatamente per la CLC [52]. Nel nostro caso, poiché le analisi sono state condotte con uno strumento specifico per CE e CEC, il problema è stato aggirato in quanto il sistema era comunque impostato per un'iniezione "a dimensione" capillare. In questo modo è stato possibile arrivare all'ordine dei nanolitri sia a livello di iniezione che di flusso al minuto.

5.2 ELETTROCROMATOLOGRAFIA CAPILLARE (CEC)

L'elettrocromatografia capillare è una moderna tecnica analitica utilizzata per la separazione qualitativa e/o quantitativa di specie sia neutre che cariche. Essa può essere considerata una tecnica ibrida che combina caratteristiche dell'HPLC e dell'elettroforesi capillare (CE), sia per quanto riguarda il processo di separazione, che implica più meccanismi, sia per quanto riguarda i vantaggi presentati.

La separazione avviene in capillari contenenti una fase stazionaria che può essere legata alla parete (*open tubular*, o-CEC), legata alla silice (*packed*, p-CEC) o legata a polimeri (fasi monolitiche).

Come in CE, in CEC la forza principale che spinge sia la fase mobile che gli analiti verso il rivelatore è un elevato flusso elettroosmotico (EOF). Questo viene generato dal campo elettrico applicato e dipende da vari parametri come per esempio il tipo di fase stazionaria, la natura e la composizione della fase mobile, la temperatura, e così via.

I vantaggi della CEC includono una maggiore efficienza dell'HPLC, un ridotto consumo di solvente organico, la necessità di piccoli volumi di campione, la riduzione dei tempi di analisi.

Negli ultimi anni l'interesse verso questa tecnica è cresciuto in modo considerevole. La CEC si propone come un metodo complementare ed, in alcuni casi, alternativo ad altri, come per esempio all'HPLC; tuttavia si trova ancora in fase di sviluppo e non può essere considerata una tecnica matura. Ad esempio la maggior parte della letteratura riporta infatti l'uso di colonne "preparate in casa" ed anche per questo particolare studio è stato appositamente preparato in laboratorio un capillare impaccato.

Quando si sceglie la CEC come tecnica di analisi e si procede all'ottimizzazione e convalida di un metodo, è necessario soffermarsi sui punti di seguito elencati [38, 53].

➤ L'applicazione di un campo elettrico produce un movimento di specie ioniche in base al loro rapporto carica/raggio. Si verifica così un meccanismo di selezione alternativo che va ad aggiungersi a quello che si ottiene con il solo processo cromatografico, basato sulla ripartizione. Quest'ultimo resta comunque essenziale, in quanto rappresenta l'unico mezzo per effettuare la separazione delle sostanze neutre.

➤ Il meccanismo che genera il flusso elettroosmotico in CEC è simile a quello della CE. La superficie della parete del capillare e della fase stazionaria, che riempie la colonna capillare, sono entrambe cariche negativamente a causa della presenza dei gruppi silanolicci sulla superficie. A questi strati carichi si sovrappongono cariche di segno opposto dell'elettrolita che costituisce la fase mobile, formando così un doppio strato elettrico. L'applicazione di un campo elettrico attraverso la colonna spinge il doppio strato elettrico a muoversi verso il polo negativo,

generando così un flusso di eluente che prende appunto il nome di flusso elettrosmotico, EOF (fig.18).

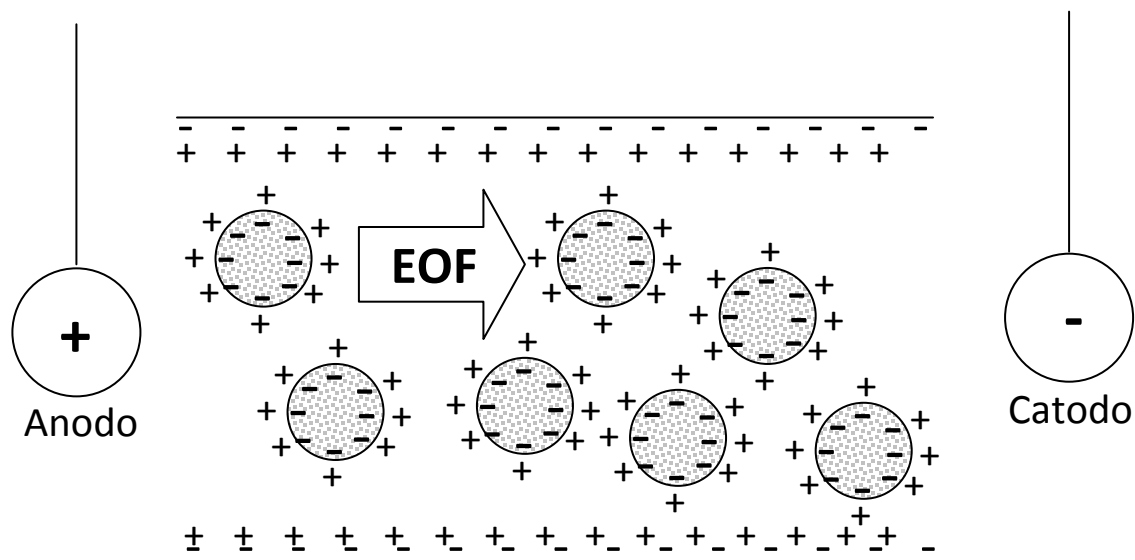


Figura 18: Generazione dell'EOF in seguito all'applicazione di un campo elettrico.

La grandezza dell'EOF generato, μ_{eof} , è proporzionale al potenziale ζ sviluppato dal doppio strato di ioni ed è dato dalla seguente equazione [54]:

$$\mu_{eof} = \gamma \varepsilon_0 \varepsilon \zeta / \eta \quad (7)$$

dove ε_0 è la costante dielettrica del vuoto, ε ed η sono rispettivamente costante dielettrica e viscosità del solvente, γ è un fattore dimensionale che tiene conto della porosità e della tortuosità dell'impaccamento.

Il contributo della parete del capillare alla generazione dell'EOF è minimo e quindi trascurabile, poiché l'area superficiale della fase stazionaria è molto più grande, e ζ dipende dalla densità di carica sulla superficie σ , secondo la seguente equazione:

$$\zeta = \sigma \delta / (\varepsilon_0 \varepsilon) \quad (8)$$

dove δ rappresenta lo spessore del doppio strato. δ è correlato alla concentrazione dell'elettrolita in modo tale che diminuendo la forza ionica si osserva un aumento dello spessore del doppio strato e, come conseguenza, un aumento dell'EOF.

La velocità lineare dell'EOF, u_{eo} , è correlata all'intensità del campo elettrico E , come di seguito:

$$u_{eo} = \mu_{eo} E = \mu_{eo} V/L \quad (9)$$

dove V è il voltaggio e L la lunghezza totale della colonna.

Di conseguenza, in CEC l'EOF può essere modificato variando la costante dielettrica e la viscosità (attraverso la scelta di un'adatta fase mobile e della temperatura), la carica superficiale (variando il pH e la fase stazionaria), la forza ionica della fase mobile e l'intensità del campo elettrico applicato.

- L'utilizzo dell'EOF come “*driving force*” presenta due vantaggi fondamentali:
- 1) Un profilo piatto del flusso elettrosmotico sicuramente vantaggioso per ottenere un minore allargamento della banda e quindi maggiore efficienza. Tale situazione è molto differente da quella esistente in altre tecniche basate sulla pressione, dove il flusso ha un profilo parabolico e, generalmente, sono osservate minori efficienze.
 - 2) Il flusso non dipende dalle dimensioni delle particelle e dalla geometria del materiale di impaccamento, così come risulta dalle eq. (7) e (9).

In CEC è possibile dunque ridurre il diametro delle particelle, al fine di aumentare l'efficienza, andando incontro a minori complicazioni rispetto a quanto avviene in HPLC.

L'introduzione di una fase stazionaria fa sì che anche nelle colonne per CEC l'altezza del piatto possa essere ricavata dall'equazione di *Van Deemter*, che può essere così scritta[51]:

$$H = B Dm/u + C u d_p^2/Dm + A d_p \quad (10)$$

dove A , B e C rappresentano le costanti di *Van Deemter*, correlate rispettivamente alla diffusione di Eddy, alla diffusione longitudinale e al trasferimento di massa; d_p è il diametro delle particelle, u è la velocità lineare della fase mobile, Dm è il coefficiente di diffusione del soluto. A causa del profilo piatto dell'EOF, il valore di A è molto più piccolo di quello che si ha in HPLC, e per di più sia A che C possono essere ulteriormente ridotti diminuendo il diametro delle particelle dell'impaccamento.

Inoltre, recenti studi su analisi elettrocromatografiche hanno dimostrato che la sostanziale caratteristica di un flusso spinto elettrocineticamente, che porta ad una maggiore efficienza del picco, è la creazione di un flusso intraparticellare significativo. In questo modo la parte di fase mobile stagnante diminuisce sensibilmente, cosa che non si verifica nei modi di separazione spinti dalla pressione. Ciò comporta un miglioramento del trasferimento di massa all'interno delle particelle e, in accordo con l'eq. (10), una riduzione dell'altezza del piatto teorico.

Infine, in CEC così come in CE, è di massima importanza la termostatazione del sistema. Infatti, l'applicazione di un alto campo elettrico, combinata con l'alta forza ionica, implica spesso il verificarsi dell'effetto Joule con disturbi della corrente e della linea di base.

Ci sono poi determinate considerazioni da tenere in conto anche a livello pratico, che proprio in quanto tali verranno esaminate nella parte sperimentale. Esse riguardano fondamentalmente l'impaccamento del capillare, la rivelazione degli analiti e la formazione di bolle.

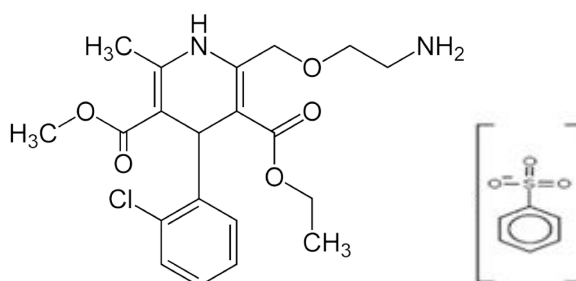
CAPITOLO 6

MATERIALI E METODI

6.1 MATERIALI : parte I

Amlodipina Besilato

L'Amlodipina Besilato (AML) è stata fornita dalla Sigma Aldrich (CAS No 111470-99-6, peso molecolare: 567,1 g mol⁻¹)



Nome chimico e Formula bruta:

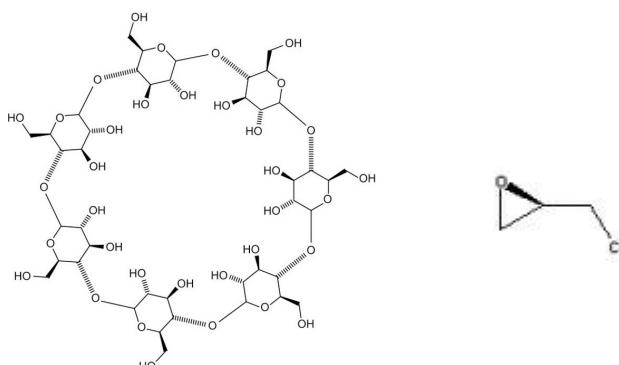
2 ((2-aminoethoxy) metile) - 4 (2-chlorophenyl) – benzenesulfonate 3-ethoxycarbonyl-5-methoxycarbonyl-6-methyl-1,4-dihydropyridine: C₂₀H₂₅ClN₂O₅ x C₆H₆O₃S

Caratteristiche chimico-fisiche:

	Amlodipina Besilato
Lunghezza d'onda	237 nm
$E_{1\text{cm}}^{1\%} \text{ H}_2\text{O}$	82
Solubilità in H ₂ O	4 g/L
Diametro medio particelle	200 μm
Aspetto	Polvere cristallina bianca

Polimero solubile di β -ciclodestrina

Il polimero solubile della β -ciclodestrina (EP- β -CD) ci è stato fornito da Cyclolab (Budapest, Ungheria).



Caratteristiche chimico-fisiche:

	EP- β-ciclodestrina
Peso Molecolare	3000-5000
Solubilità in H ₂ O	> 20 (intesa come g/100 cm ³ H ₂ O)
Contenuto in CD	58,2% solubile in H ₂ O 40-50% legato all'epicloridina
Aspetto	Solido bianco

6.2 METODI: parte I

Sono stati effettuati studi di pre-formulazione, studi di formulazione e analisi sul complesso ottenuto.

Gli studi di pre-formulazione per l'AML in soluzione acquosa hanno previsto:

1. Valutazione della purezza dello standard di AML (Sigma-Aldrich) mediante analisi HPLC-UV, svolta in triplicato, operando nelle medesime condizioni sperimentali riportate nella scheda monografica della Eu.Ph VI ed.;
2. Valutazione della stabilità dell'AML mediante metodica HPLC (come riportato da monografia della Eu.Ph. VI ed.), secondo test accelerati ICH *Guidelines, International Conference on Harmonization*, 2003, di n=5 batch di principio attivo non formulato,

mantenuto ($t= 6h$) al riparo dalla luce a temperature di degradazione in vitro di: 50, 60, 70, 80 e 90 °C; la stabilità della molecola è stata monitorata mediante analisi HPLC-UV, sottoponendo a *stress* termico tre differenti concentrazioni di AML in H₂O (0.1-0.6 µg/mL), interpolate con una retta di calibrazione allestita nel *range* di concentrazione tra 2.5 e 10 mg/L ($n=5$).

3. Studi di solubilità di fase, calcolo stechiometrico e calcolo della costante di complessazione per ottenere rapporti AML/CD ottimali secondo la metodica di *Higuchi e Connors*;
4. Scelta della tecnica di complessazione solubilizzazione e liofilizzazione per l'ottenimento del complesso AML/CD.

Controllo di qualità del principio attivo isolato e del formulato

Il complesso ottenuto e il principio attivo sono stati caratterizzati in termini di:

- analisi dimensionale e morfologica (Microscopia a fluorescenza);
- analisi spettrofotometrica (UV-VIS);
- analisi termica (DSC: calorimetria differenziale a scansione);
- spettroscopica (FTIR e Dicroismo Circolare);
- test di dissoluzione/rilascio *in vitro*.

6.2.1 Caratterizzazione dell'AML

Sono state determinate sperimentalmente alcune proprietà chimico-fisiche dell'AML, lo spettro UV/VIS e la solubilità in acqua.

Per determinare l'assorbanza dell'AML, da una soluzione madre di AML in etanolo 1:1 m/v è stata prelevata una quantità di soluzione portata a volume con H₂O, tale da avere una concentrazione 100 mg/L. La lettura è avvenuta con uno spettrofotometro UV/VIS (UV λ 25, Perkin Elmer) in una cella di quarzo da 1 mm, utilizzando un intervallo di λ tra 200 e 500 nm.: $\lambda_{max} = 237$ nm per l'AML.

Per effettuare i test di dissoluzione sono stati determinati anche i valori di $E^{1\%/1cm}$ (assorbanza di una soluzione all'1% in una cella da 1 cm) in acqua. Applicando la Legge di *Lambert Beer*, è stato possibile costruire una retta di calibrazione Assorbanza/Concentrazione, utilizzando soluzioni a concentrazioni note.

$$A = \epsilon C l$$

A = assorbanza

C = concentrazione in mg/100 ml

ϵ = E1%1cm

l = lunghezza della cella

6.2.2 Determinazione spettrofotometrica della solubilità dell'AML

La solubilità dell'AML è stata sperimentalmente determinata a $\lambda = 237$ nm in acqua utilizzando uno spettrofotometro UV/VIS (UV λ 25, Perkin Elmer).

6.2.3 Studi di stabilità

La valutazione della stabilità chimico-fisica dell'AML e del complesso AML/CD è stata effettuata mediante test di stress accelerati, secondo le linee guida ICH (*International Conference on Harmonization, 2003*). Le *vials* di vetro, contenenti una quantità di AML equivalente a 0.662 mg sono state conservate per 6 ore alle temperature di 50°, 60°, 70°, 80° e 90°C \pm 2°C in bagno termostatico. Sono stati effettuati dei prelievi in tempi prestabiliti (0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 ore), successivamente questi campioni sono stati analizzati mediante analisi HPLC, per ogni singolo campione sono state effettuate in triplicato.

6.2.4 Retta di taratura HPLC

L' HPLC (*Varian Prostar mod.230, Varian, Milano, Italia*) utilizzato è dotato di valvola di iniezione di 20 μ l (*Rheodyne 7125, Cotati, Ca, USA*) autocampionatore Varian mod D10 (*Varian, Milano, Italia*), un detector UV-VIS settato a λ 237 (*Ph. Eur.5°Ed.*) e un Software Galaxie. L'analisi cromatografica è stata effettuata utilizzando una colonna RP su *Lichrosphere®* 100 C₁₈ RP (particle size 5 μ m; 250 x 4 mm I.D.; Merck, Damstadt, Germania), dotata di una pre-colonna da 5 μ m *Lichrosphere®* 100 C₁₈ RP (4 x 4 mm I.D.; Merck, Damstadt, Germania). L'eluizione è stata effettuata isocraticamente a temperatura ambiente. La fase mobile è costituita da una soluzione 70:30 (v/v) di metanolo/acqua, contenente 2.3 g of CH₃COO⁻NH₄⁺ (*Ph. Eur 5°*); il flusso, lineare è stato settato a 0.4 ml/min. la soluzione standard è stata preparata, in triplicato, a 5 diverse concentrazioni (0.1-0.6 μ g/mL) e ciascuna è stata iniettata, con volume di 20 μ l. A questo punto è possibile tracciare la retta di taratura, riportando l'area dei picchi ottenuti dalla serie di calibrazione in funzione della concentrazione delle soluzioni. Tale retta è stata analizzata usando l'equazione di regressione lineare derivata dall'area dei picchi ($y=269.69x+3.1441$, $R^2 = 0.993$ (fig.19), dove y è l'area del picco e x la concentrazione utilizzata). Il picco associato all'AML è stato identificato dal tempo di ritenzione (6 min.).

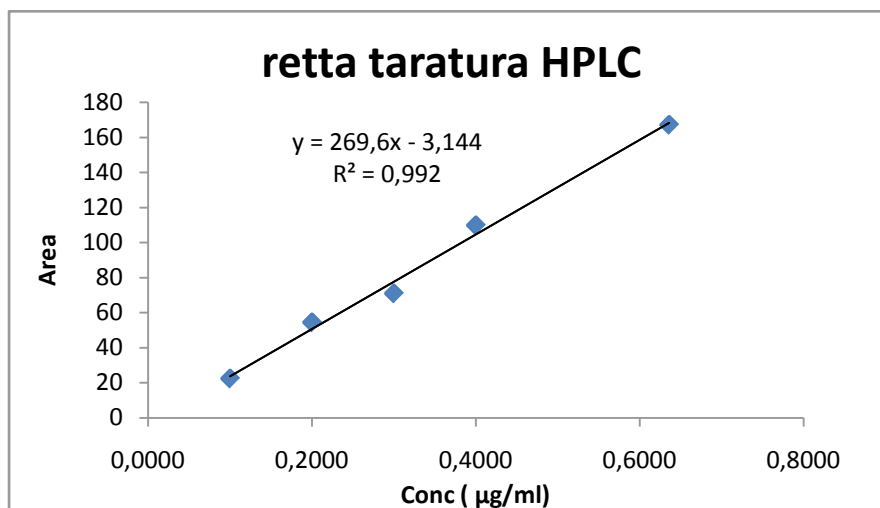


Figura 19: Retta di taratura mediante metodica HPLC

6.2.5 Retta di taratura UV

La proporzionalità tra assorbanza e concentrazione è stata verificata nel range tra 2,5 e 10 mg/L ($R^2 > 0,999$) (fig.20) tramite uno spettrofotometro (UV/lambda 25, Perkin Elmer)

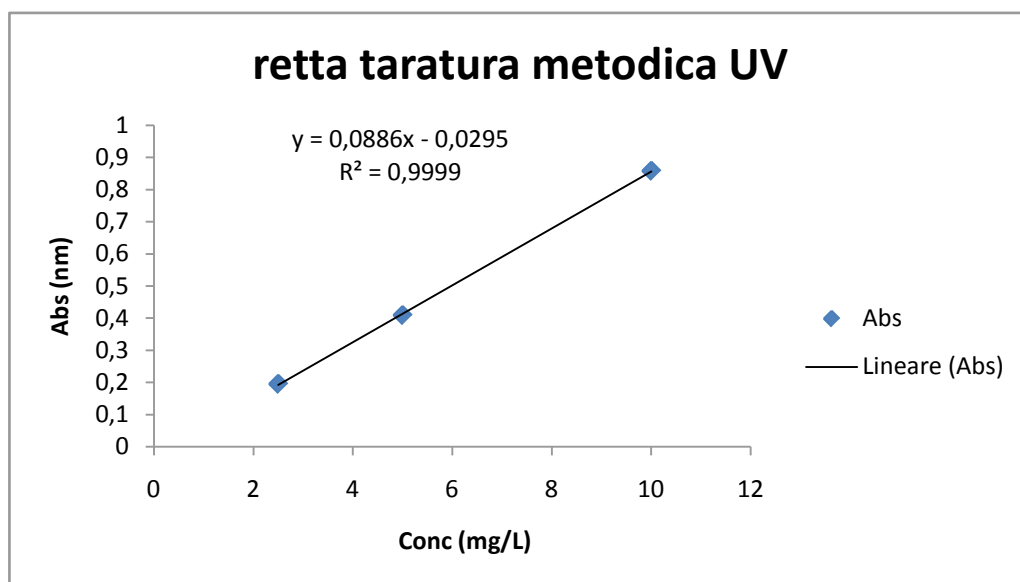


Figura 20: Retta di taratura mediante metodica UV

6.2.6 Preparazione del complesso AML/CD

Per la preparazione del complesso farmaco/CD è stata utilizzata una tecnica in fase liquida: tecnica della solubilizzazione/liofilizzazione.

Solubilizzazione: in 1,5 mL di acqua sono stati solubilizzati 5mg di CD a cui è stato aggiunto 1 mg di AML. Il campione così ottenuto è stato vortexato per 60 sec. e poi lasciato decantare per 120 min. a 4°C.

Liofilizzazione: dopo aver congelato il campione per 24 ore, raggiungendo temperature inferiori al punto triplo del diagramma di fase dell'acqua, il solvente è stato allontanato tramite liofilizzazione a -2°C per 24 ore.

6.2.7 Analisi del complesso AML/CD

Dopo che si è ottenuto il complesso farmaco/CD, sono state effettuate diverse analisi per convalidare la effettiva inclusione, verificare le eventuali variazioni delle proprietà chimico-fisiche del farmaco stesso, determinarne il rapporto stechiometrico ed i parametri termodinamici dell'interazione.

Tali analisi comprendono:

- a) Studi di equilibrio solido-soluzione
- b) Studi allo stato liquido
- c) Studi allo stato solido

a) Studi di equilibrio solido-soluzione

Si basano sulla reazione di formazione del complesso:



dove: S = substrato o farmaco

L = legante o ciclodestrina

n, m = coefficienti stechiometrici

Determinazione del rapporto stechiometrico

Permette di determinare il rapporto n/m, tenendo costante $[L_{Tot}] + [S_{Tot}]$.

Esistono due metodi:

1) Metodo di Job o delle variazioni continue:

Si preparano due soluzioni equimolari del legante e del substrato e si preparano miscele delle due soluzioni, prelevando aliquote tali che volume e concentrazione totale siano costanti.

Per ogni soluzione si misura una proprietà del farmaco che varia in funzione della complessazione, ad es. assorbanza o fluorescenza, e si calcola la variazione rispetto al riferimento che è la soluzione a quella stessa concentrazione del solo farmaco.

Si costruisce il grafico che per ha:

- ascissa il rapporto: $[L_{Tot}] / ([L_{Tot}] + [S_{Tot}])$ che è la frazione molare del legante,
- per ordinata i valori di variazione di assorbanza o fluorescenza, chiamata ΔA .

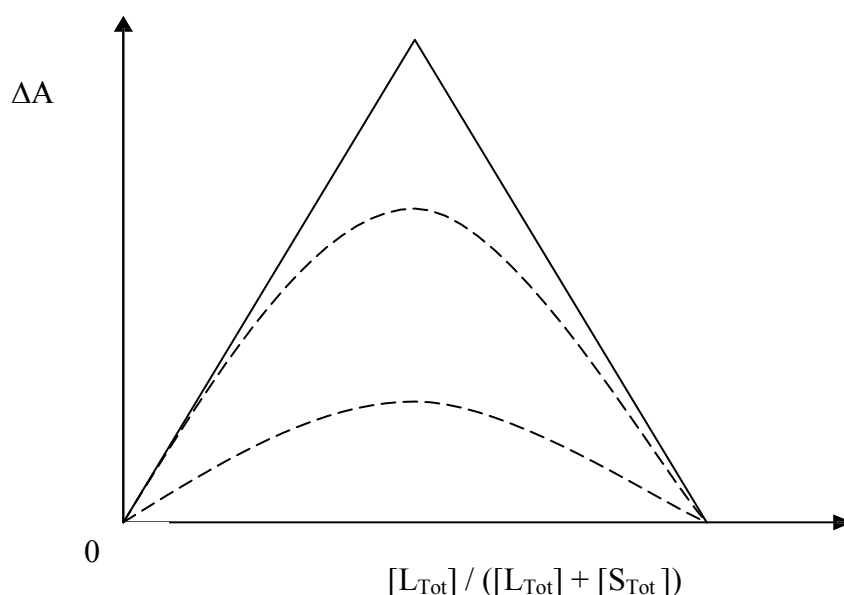


Figura 21: Diagramma di Job

Dal grafico (fig.21) si osserva che l'assorbanza aumenta con l'aumentare del legante, fino al raggiungimento del massimo che coincide col miglior rapporto stechiometrico.

Se tale massimo corrisponde ad un valore delle x di 0.5, significa che la stechiometria del complesso farmaco-ciclodestrina è di 1:1.

Questo metodo ci permette di valutare anche la stabilità del complesso. Nel grafico sono mostrate tre tipi di curve: più netta è la variazione, più stabile è il complesso.

2) Metodo del rapporto di mole (analogo al precedente):

Si preparano una serie di soluzioni in cui viene mantenuta costante la concentrazione del substrato e viene aumentata gradualmente la concentrazione del legante

Anche in questo metodo si misura la variazione di un parametro tipico del farmaco ad, es. l'assorbanza, sia del farmaco libero che del complesso.

Riportando in grafico i valori di ΔA sull'asse delle y e i valori di $[L_{Tot}]/[S_{Tot}]$ su quella delle x, si ottengono curve con brusche variazioni di pendenza in corrispondenza del rapporto stechiometrico ottimale.

Nel caso specifico, la quantità di legante che reagisce per formare il complesso nel tratto A - B è data da $LB - LA$ mentre la quantità di substrato è uguale $S = ST - S'$ (dove ST equivale alla quantità totale di p.a., mentre S' equivale alla concentrazione molare del complesso). Dal rapporto delle due concentrazioni si ottiene il rapporto stechiometrico (fig.22).

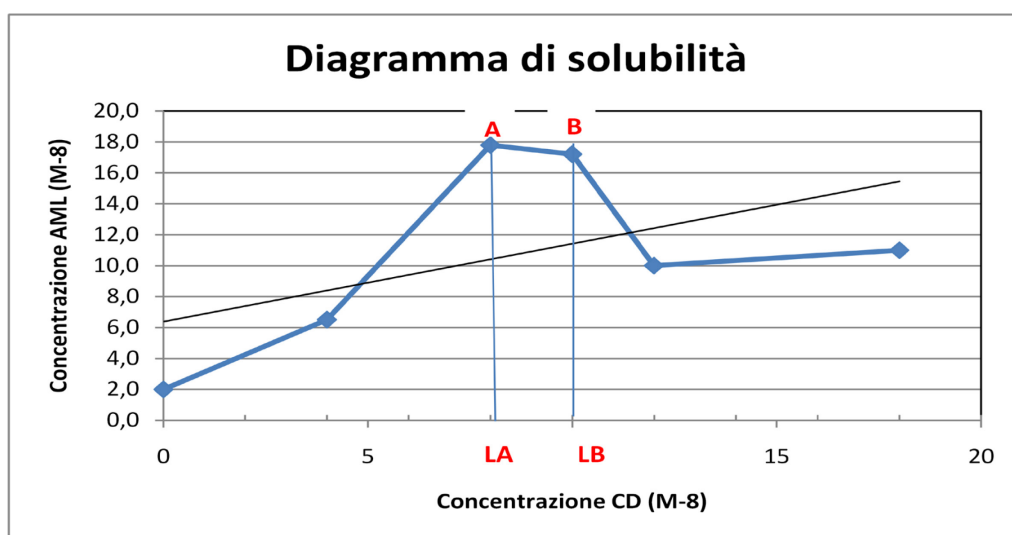


Figura 22: Diagramma di solubilità

Studi di solubilità di fase

Tali studi si fanno aggiungendo un eccesso di principio attivo in un certo volume di solvente contenente quantità crescenti di CD, mantenuti ad una certa temperatura e sotto agitazione magnetica, per un tempo necessario al raggiungimento dell'equilibrio.

Si valuta la concentrazione del farmaco in soluzione all'equilibrio, generalmente mediante metodi spettroscopici. L'equilibrio è raggiunto quando si ottengono due valori di concentrazione uguali per due prelievi successivi.

Si costruisce il grafico mettendo sull'asse delle y la concentrazione totale del farmaco e su quello delle x la concentrazione crescente di CD. In tal modo ottengo il diagramma di solubilità di fase (fig.23).

Secondo la classificazione di Higuchi e Connors esistono due tipi di diagrammi: quelli di tipo A e quelli di tipo B [55].

1) DIAGRAMMI DI TIPO A

Sono tipici di complessi solubili, esistono tre sottotipi (fig.24):

A_L : correlazione lineare, formazione di complessi farmaco/CD rapporto 1:1;

A_P : deviazione positiva dalla linearità formazione di complessi farmaco/CD con rapporto diverso da 1:1;

A_N : deviazione negativa dalla linearità, dovuta a fenomeni di auto-associazione del legante oppure a mancanza di corpo di fondo.

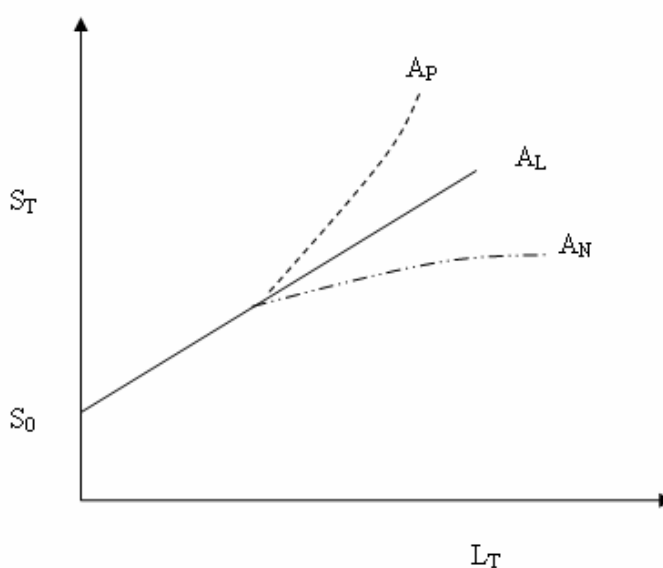


Figura 24

2) DIAGRAMMI DI TIPO B

Caratteristici dei complessi insolubili, utili per la preparazione di prodotti con effetto prolungato (fig.25). Si possono avere anche qui due sottotipi:

B_S : dove la concentrazione del substrato aumenta linearmente fino ad A dove comincia a precipitare il complesso per ulteriore aggiunta del legante. Si ha un *plateau* A-B dove la concentrazione del substrato rimane costante. Al punto B è esaurito tutto il substrato presente come corpo di fondo; il complesso continua a formarsi a discapito del substrato libero, ossia la

sua concentrazione diminuisce fino a raggiungere un secondo *plateau* che rappresenta la solubilità del complesso

La quantità di legante che reagisce per formare il complesso nel tratto A - B è data da $L_B - L_A$ mentre la quantità di substrato è uguale $S = S_T - S'$.

Dal rapporto delle due concentrazioni si ottiene il rapporto stechiometrico.

B_I : analogo al precedente, ma non c'è aumento della concentrazione del substrato, il complesso precipita subito.

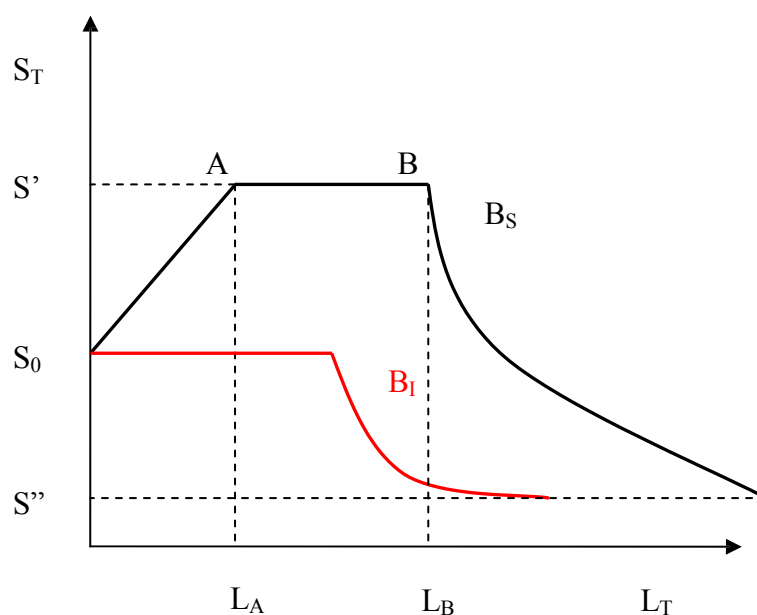


Figura 25

I campioni sono stati messi sotto agitazione e conservati a temperatura ambiente, dopo 1 ora, la fase liquida è stata centrifugata per 5 minuti a 3000 rpm, il supernatante è stato filtrato, mediante filtro di $0,45 \mu\text{m}$ e analizzato mediante apparato UV, utilizzando celle di 1 mm, ad una lunghezza d'onda di 237 nm.

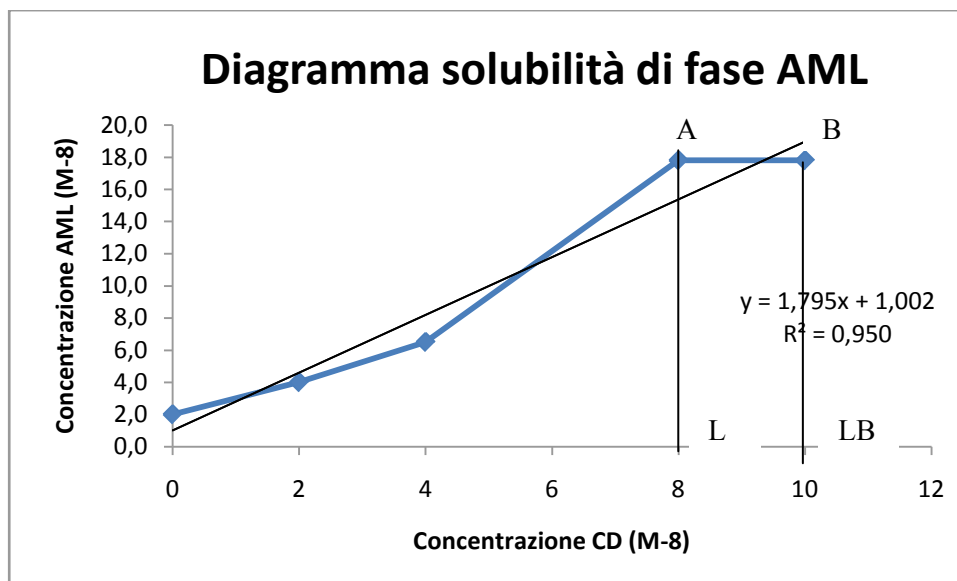


Figura 23: Diagramma solubilità di fase AML

Costante di complessazione

La costante di stabilità del complesso AML/CD è stata calcolata dal diagramma di solubilità di fase:

- $K_{c2:1} = \text{slope} / (S_0)^2 (2 - \text{slope})$

Dove:

- k_c è la costante di stabilità (L mol⁻¹)
- *slope* è stato ottenuto dalla relazione lineare tra la concentrazione lineare dell'AML e β -CD.
- S_0 è la solubilità dell'AML (mmol-1L), ovvero, la concentrazione di AML in assenza di CD.

b) Studi allo stato liquido

Sono stati effettuati studi UV e Dicroismo circolare

Entrambi gli studi sono stati effettuati considerando una concentrazione di AML costante di 0,6 mg in 0,75mL di acqua. Le soluzioni di AML pura, AML/CD e CD pura sono state sottoposte a scanning da 200-400 nm.

Spettroscopia UV-VISIBILE

La formazione del complesso può alterare lo spettro originale di assorbimento UV- visibile del farmaco, determinando uno *shift* batocromico e/o un allargamento della sua tipica banda di assorbimento. Lo *shift* verso il rosso può essere dovuto alla schermatura degli elettroni eccitabili nella cavità della CD.

Da tali variazioni si determina la costante di stabilità del complesso attraverso l'equazione di *Benesi-Hildebrand* o quella di *Scott*, che derivano per successive rielaborazioni matematiche dalla legge di *Lambert-Beer*:

$$\text{Lambert-Beer} \quad A = \varepsilon b [\text{St}]$$

Dove:

ε = coefficiente di estinzione molare ad una determinata lunghezza d'onda λ

b = cammino ottico che in genere è 1 cm

St = concentrazione totale del substrato

$$\text{Benesi-Hildebrand} \quad \frac{b}{\Delta A} = \frac{1}{[\text{St}] \cdot K_{1:1} \cdot \Delta \varepsilon_{1:1} \cdot [\text{L}]} + \frac{1}{\Delta \varepsilon_{1:1} \cdot [\text{St}]}$$

Dove:

$K_{1:1}$ = costante stabilità del complesso con stechiometria 1:1

$\Delta \varepsilon_{1:1}$ = coefficiente di estinzione molare del complesso con stechiometria 1:1

Ponendo $[\text{L}] = [\text{Lt}]$ e riportando in grafico la variazione di assorbanza in funzione della concentrazione di CD, ottengo una retta, dai cui parametri si calcola la costante di stabilità:

$K_{1:1} = \text{intercetta} / \text{pendenza}$

Moltiplicando numeratore e denominatore per $[\text{L}]$ ottengo un'equazione simile di *Scott*:

dove la costante di stabilità è $K_{1:1} = \text{pendenza} / \text{intercetta}$

$$\text{Scott} \quad \frac{b \cdot [\text{L}]}{\Delta A} = \frac{1}{[\text{St}] \cdot K_{1:1} \cdot \Delta \varepsilon_{1:1}} + \frac{[\text{L}]}{\Delta \varepsilon_{1:1} \cdot [\text{St}]}$$

Dicroismo circolare

E' tipico di molecole chirali capaci di indurre una modificazione ellittica al piano di luce polarizzata circolarmente. La radiazione incidente è nel range dell'UV.

Le CDs sono molecole otticamente attive ma per la loro alta simmetria non danno spettri di dicroismo circolare.

Se al loro interno si trova una molecola di per sé chirale, si hanno modifiche dello spettro della molecola, mentre se la molecola è achirale ma contenente un cromoforo, si ha il fenomeno dicroismo circolare indotto (*effetto Cotton indotto*), in seguito alla riduzione della simmetria della molecola della CD, causata dall'inclusione del *guest*.

La misura della variazione di ellitticità molecolare in seguito a complessazione può essere usata per determinare il rapporto stechiometrico *host-guest* col *metodo di Job* o la costante di stabilità del complesso col *metodo di Scott*.

c) Studi in fase solida

Sono state effettuate analisi DSC e FTIR per valutare le eventuali interazioni tra farmaco e CD.

Analisi termica (DSC)

Comprende tutti i metodi nei quali viene misurato uno specifico parametro durante il riscaldamento del campione (fig.26).

Il parametro valutato dipende dal tipo di tecnica . Nel nostro caso si tratta del valore di entalpia misurata con la calorimetria differenziale a scansione, DSC.

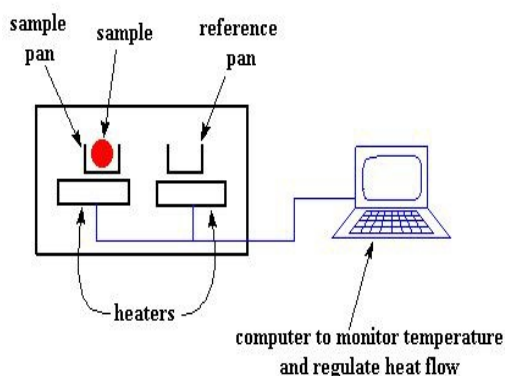


Figura 26

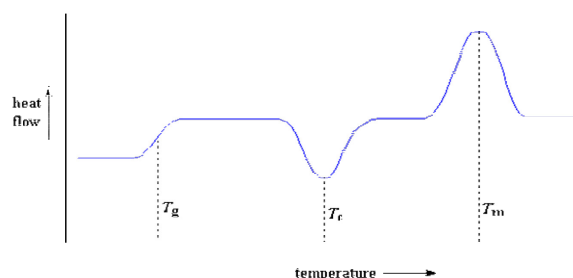


Figura 27

Questa tecnica è una delle più usate per la caratterizzazione solida dei complessi perché:

- permette un'analisi qualitativa e quantitativa;
- si individuano principalmente i seguenti fenomeni (fig.27):
 1. picchi endotermici di fusione;
 2. transizioni vetrose;
 3. bande endotermiche di disidratazione o solvatazione o sublimazione;
 4. picchi esotermici di cristallizzazione;
 5. fenomeni di ossidazione (eso ed endotermici);
 6. fenomeni di decomposizione (eso ed endotermici);
 7. amorfizzazione.

Procedura: al fine di studiare il comportamento termico delle polveri formulate sono state effettuate analisi di calorimetria differenziale a scansione (DSC) mediante un apparecchio DSC 821e (*Mettler Toledo*, OH, USA) il cui principio di funzionamento si basa sull'utilizzo di una cella di misura contenente due crogioli di alluminio collegati tra loro da una termocoppia. Un crogiolo è vuoto, l'altro contiene il campione da sottoporre all'analisi: la differenza di flusso di calore tra i due crogioli è rilevata dalla termocoppia, quantificata e riportata in grafico in funzione del tempo e della temperatura della cella. Lo strumento consente la misura degli eventi eso- ed endotermici legati a trasformazioni del campione (fusione, cristallizzazione, decomposizione, perdita dell'acqua ecc.).

I campioni sono stati pesati (1-1,5mg) con una microbilancia (MTS *Mettler Toledo*, USA) e sottoposti a scansione a doppio ciclo in crogioli di alluminio chiusi e bucati sotto flusso di azoto inerte (150 ml/min).

E' stato effettuato un ciclo a scansione dinamica a singolo segmento per rilevare il riarrangiamento della sostanza sottoposta a temperatura ed il suo punto finale di fusione (da 25°C a 400°C, 10°C/min.).

Si confrontano le curve DSC del farmaco e della CD separatamente, della loro miscela fisica e di prodotti ottenuti con le varie tecniche di complessazione. La variazione del picco endotermico di fusione (scomparsa o spostamento del massimo o riduzione di intensità) indica che esiste interazione farmaco/CD.

La scomparsa dell'endoterma di fusione può essere dovuta alla formazione del complesso ma può darsi pure che si sia semplicemente ottenuto un composto amorfo.

Occorre quindi confermare una delle due ipotesi con l'aiuto di analisi complementari come l'IR.

Analisi strutturale (Spettroscopia Infrarossa)

Tecnica analitica quali-quantitativa con la quale si possono avere informazioni complementari sulla interazione *host-guest*, particolarmente utile per evidenziare la presenza di polimorfi.

Procedura: Campioni di ogni lotto di microparticelle e di materie prime sono stati analizzati con dischi di KBr nel range tra 400-4000 cm^{-1} usando uno spettrofotometro *Jasco FT-300-IE*, (Jasco, Japan) spettrometro IR a trasformata di *Fourier* (FTIR).

Dopo aver messo a confronto i vari spettri si valuta la variazione di intensità e/o lo *shift* di alcune bande, indice di interazione fra le componenti del complesso.

Analisi Morfologica

La morfologia delle polveri è stata studiata mediante microscopia a fluorescenza (FM). Le analisi sono state condotte con un microscopio a fluorescenza *Zeiss Axiophot*, dotato di un obiettivo 63x1.4 NA *project Apochromat*, oil immersion (*Carl Zeiss Vision, München. Hallbergmoss*, Germania) usando come filtro il 4,6-diamidino-2-fenil-diolo (DAPI) che emette una fluorescenza blu (max 456 nm).

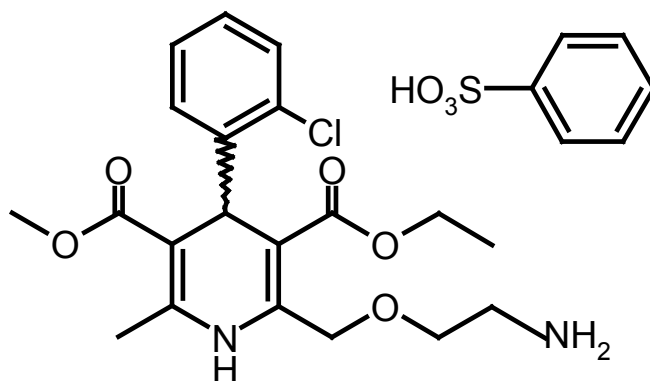
6.2.8 Analisi di solubilità del complesso AML/CD

Il test di dissoluzione/rilascio in vitro del complesso AML/CD (corrispondente a 2,5 mg di AML) è stato eseguito in *sink conditions* in acqua, in un *becker* della capacità di 20 mL sotto agitazione (100 rpm) a 37°C, in un volume totale di 10 mL. Il test è stato eseguito sei volte (deviazione standard < 5%). I prelievi sono stati effettuati a 5, 10, 15, 20 e 30 min e le letture sono state eseguite mediante UV. I risultati sono stati poi confrontati con AML non complessata.

6.3 MATERIALI E METODI: parte II

Amlodipina Besilato

L'Amlodipina Besilato (AML) è stata fornita dalla Farmacopea Europea (peso molecolare: 567,1 g mol⁻¹)

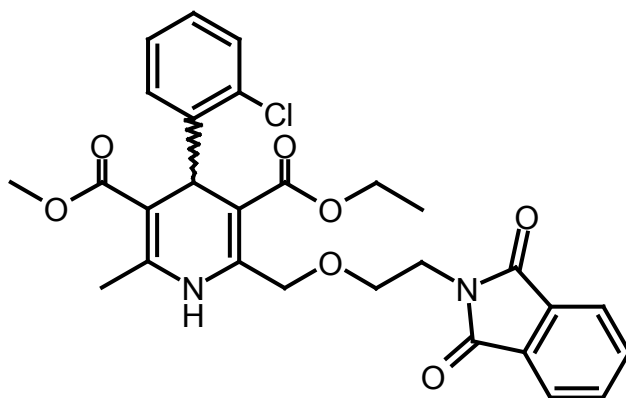


Nome chimico e Formula bruta:

2 ((2-aminoethoxy) metile) - 4 (2-chlorophenyl) - benzenesulfonate 3-ethoxycarbonyl-5-methoxycarbonyl-6-methyl-1,4-dihydropyridine: C₂₀H₂₅ClN₂O₅ x C₆H₆O₃S

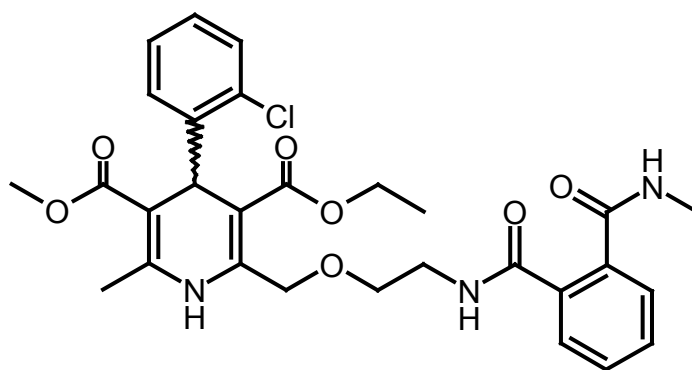
Impurezza A e B:

le due impurezze dell'AML sono state fornite dalla farmacopea Europea



Nome chimico e Formula bruta:

IMPUREZZA A → 3-ethyl 5 methyl (4RS)-4-(2-chlorophenyl)-2-[[2-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isindol-2-yl)ethoxy]methyl]-6-methyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate



Nome chimico e Formula bruta:

IMPUREZZA B → 3-ethyl 5 methyl (4RS)-4-(2-chlorophenyl)-6-methyl-2-[[2- [[2-(methylcarbamoyl)benzoyl]ethoxy]methyl]-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate

Selettore chirale

Cellulose tris(4-chloro-3 methylphenylcarbamate), diametro particellare 3-5 μm è stato fornito gentilmente dal Prof. Chankvetadze.

Tutti i prodotti chimici usati in questo studio sono di grado analitico e sono stati usati senza ulteriore purificazione.

L'acido borico è stato ottenuto dalla Carlo Erba (Milano, Italia). L'acetonitrile (ACN), il metanolo (MeOH), sono stati acquistati dalla BDH (Poole, UK).

6.3.1 Soluzioni

Sono state preparate soluzioni *stock* degli analiti in ACN (1 mg/ml) e conservate a 4 °C; queste soluzioni sono state diluite quotidianamente in fase mobile o acetonitrile fino alla concentrazione desiderata e quindi iniettate per le analisi.

La soluzione *stock* di ammonio borato (250 mM) è stata preparata diluendo in acqua l'appropriato volume di acido borico e titolata con NH_3 1 M fino al pH desiderato. La fase mobile, usata per gli esperimenti, è stata preparata giornalmente mescolando gli appropriati volumi della soluzione *stock* di campione, acqua e solventi organici in modo da ottenere una concentrazione finale di tampone pari a 5 mM.

6.3.2 Strumentazione

Soluzioni e “*slurries*” sono stati sonicati con un bagno a ultrasuoni FS 100b (*Decon, Hove, UK*) mentre un pHmetro MicropH 2001 (*Crison, Barcellona, Spagna*) è stato usato per misurare il pH.

Gli esperimenti sia di CLC che di CEC sono stati effettuati in automatico con il sistema ^{3D}CE della *Agilent Technologies (Waldbronn, Germania)* equipaggiato con un rivelatore a serie di diodi UV-visibile, con lunghezza d'onda di lettura a 206 nm. Per raccogliere e trattare i dati è stato impiegato il software ^{3D}CE Chemstation (Rev. A.09.01, *Agilent Technologies, Waldbronn, Germania*) (fig.28,29)

I capillari di silice fusa (50-100-150 µm ID, 375 µm OD), sono stati acquistati dalla *Composite Metal Services (Hallow, UK)*. Il capillare è stato impaccato usando una pompa *Series 10 HPLC (Perkin Elmer, Palo Alto, CA, USA)*.

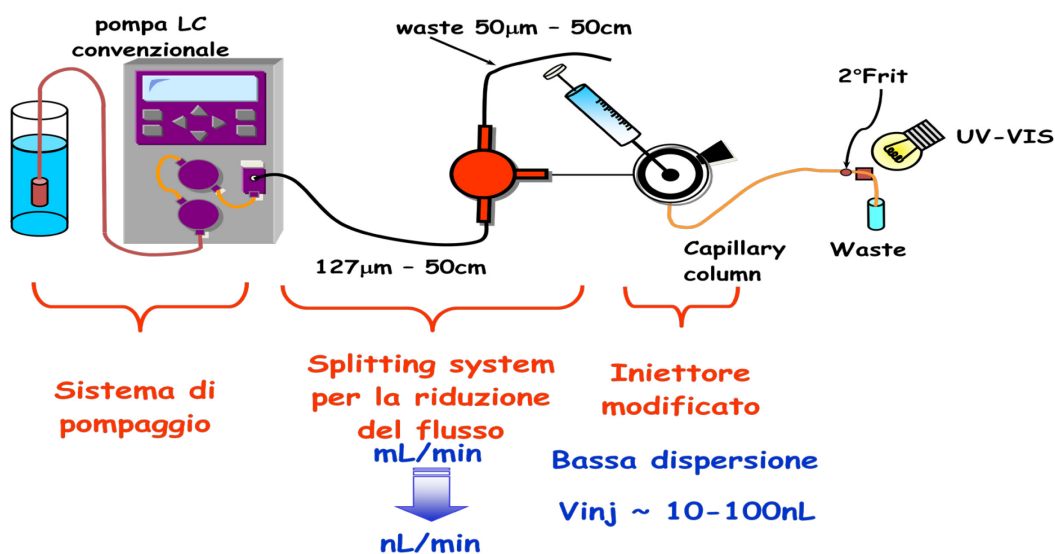


Figura 28: Schema della strumentazione per CLC

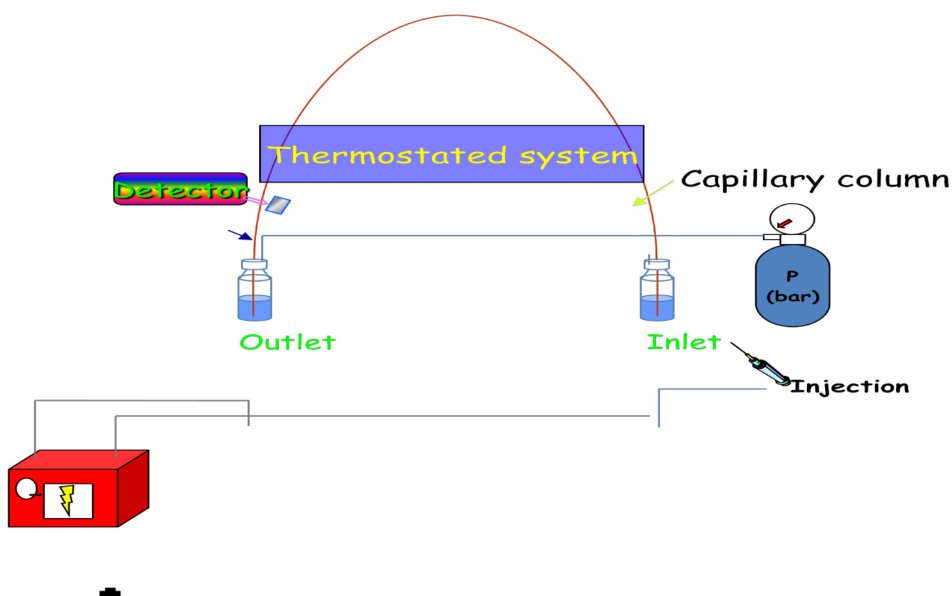


Figura 29: Schema della strumentazione per CEC

6.3.3 Preparazione della colonna capillare

- Un'estremità del capillare (ID= 75 μm , lunghezza circa 55 cm) è stata connessa ad un *frit* meccanico temporaneo (costituito da un setto poroso) per trattenere la fase da impaccare, mentre l'altra ad una precolonna HPLC usata come *reservoir* per lo *slurry* e connessa alla pompa HPLC (fig.31);
- È stato preparato uno *slurry* di Sepapak-4 in MeOH;
- La precolonna è stata riempita con lo *slurry* e il capillare è stato impaccato per almeno 35 cm, ad una pressione di circa 80 MPa;
- Il capillare è stato compattato mediante sbalzi pressori, ottenuti agendo sulla valvola di sfiato della pompa, ciclicamente, per 10 minuti;
- Dopo essere stato compattato, il capillare è stato lavato in flusso di MeOH;
- Successivamente, prima della preparazione dei *frits*, il capillare è stato fatto fluire con una soluzione di MeOH/H₂O 80:20;
- Il primo *frit* è stato preparato surriscaldando con un filamento di Ni-Cr ad una temperatura di circa 600 °C per 7 sec, l'estremità del capillare collegata al *frit* meccanico, dopo essersi assicurati che la pressione della pompa fosse al massimo (60 MPa);
- Il capillare è stato tagliato in prossimità del *frit* meccanico;
- Controllata l'integrità del primo *frit*, è stato preparato il secondo *frit* nelle medesime condizioni usate per il primo, surriscaldando per un tempo inferiore, pari a 4 s;
- Il capillare è stato poi montato nel verso opposto e lavato con MeOH per eliminare la fase stazionaria in eccesso, con velocità di flusso e pressione ridotti;
- La finestra è stata ottenuta rimuovendo la poliimmide ad una distanza di 2 cm dal secondo *frit*;
- Il capillare è stato tagliato in modo da ottenere una lunghezza totale di 35 cm (impaccato per 25) in modo tale da poter essere utilizzato in entrambe le tecniche analitiche (CLC e CEC) (fig.30)

Prima dell'uso il capillare è stato condizionato con la fase mobile per circa 30 minuti ad una pressione di circa 15 MPa.

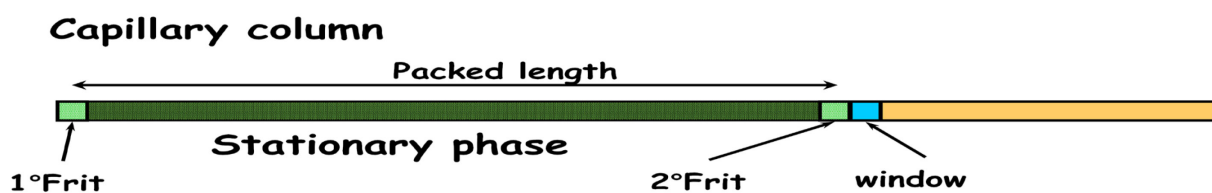


Figura 30: Rappresentazione della colonna capillare

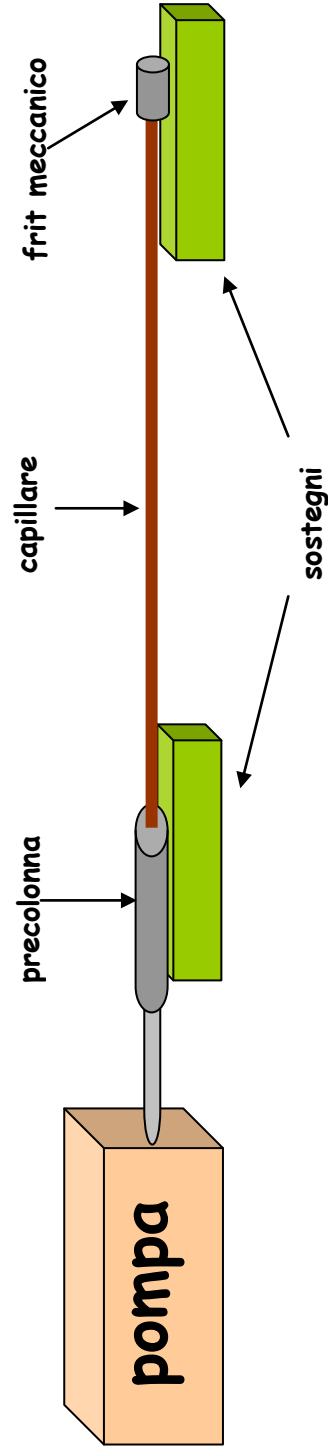


Figura 31: Schema della strumentazione utilizzata per l'impaccamento del capillare.

CAPITOLO 7

PARTE SPERIMENTALE: RISULTATI E DISCUSSIONI

PARTE I

7.1 STUDI DI PRE-FORMULAZIONE

L'AML appartiene alla I classe secondo il BSC (alta solubilità e alta permeabilità secondo la *Biopharmaceutics Classification System*), ma secondo la USP e la *Ph. Eur* è considerata “*slightly soluble*” in acqua, infatti la biodisponibilità varia dal 60 al 65%.

Inoltre, l'uso in veterinaria è spesso difficile, in quanto in commercio non sono disponibili forme farmaceutiche adatte.

L'obiettivo della tesi è stato pertanto preparare una polvere di AML molto solubile in acqua al fine di poterla ricostituire estemporaneamente ed ottenere una soluzione acquosa facilmente somministrabile per via orale.

Per raggiungere tale scopo sono stati eseguiti prima studi di pre-formulazione, con l'intento di caratterizzare dal punto di vista chimico-fisico il principio attivo preso in considerazione, poi studi di formulazione.

In particolare, gli studi di pre-formulazione per l'AML hanno previsto:

- valutazione della stabilità, al riparo dalla luce, della molecola tal quale, secondo test accelerati *ICH Guidelines*, (50°, 60°, 70°, 80 e 90°C per 6 ore) di degradazione *in vitro* mediante metodica HPLC (come riportato da monografia della Eu.Ph. 5°);
- selezione del polimero solubile di β -CD per aumentare la velocità di dissoluzione dell'AML;
- studi di solubilità di fase, calcolo stechiometrico e calcolo della costante di complessazione per ottenere rapporti AML/CD ottimali;
- selezione della tecnica della solubilizzazione/liofilizzazione per la formazione del complesso AML/CD;
- studi chimico-fisici, morfologici e dimensionali sul p.a, e sul polimero solubile di β -CD tramite Microscopia a Fluorescenza, Analisi dimensionale, spettrofotometria UV, FTIR, DSC.

Nella fase di formulazione, sulla base degli studi di pre-formulazione, si è poi messo a punto la formulazione del complesso AML/CD ottimale in termini di solubilità, biodisponibilità e stabilità.

Infine il complesso ottenuto è stato caratterizzato in termini di analisi morfologica (Microscopia a fluorescenza); analisi spettrofotometrica (UV-VIS), analisi termica (DSC) e spettroscopica (FTIR e Dicroismo Circolare).

7.1.1 Studi di stabilità dell'AML

La valutazione della stabilità chimico-fisica dell'AML è stata effettuata mediante test di stress accelerati, secondo le linee guida ICH (*International Conference on Harmonization*, 2003). Le *vials*, contenenti 0.662 mg sono state conservate per 6 ore alle temperature di 50°-60°-70°-80° e 90°C ± 2°C in bagno termostatico. Sono stati effettuati dei prelievi in tempi prestabiliti (0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 ore), successivamente questi campioni sono stati analizzati mediante analisi HPLC, per ogni singolo campione sono state effettuate analisi in triplicato.

La soluzione risulta stabile alle alte temperature dal momento che non vengono rilevati altri picchi oltre a quello caratteristico dell'AML (Rt= 6 min.).

7.1.2 Studi di solubilità di fase

I diagrammi di solubilità di fase del complesso di inclusione AML/CD sono stati determinati utilizzando la metodica di *Higuchi e Connors* (1965).

Per effettuare gli studi di solubilità di fase sono stati aggiunti ad 1 mL di acqua AML in eccesso e CD nei seguenti rapporti CD/AML:

- 1:1
- 1:1,5
- 1:2
- 1:2,5

I campioni sono stati messi sotto agitazione e conservati a temperatura ambiente, dopo 1 ora, la fase liquida è stata centrifugata per 5 minuti a 3000 rpm, il supernatante è stato filtrato, mediante filtro di 0,45 µm e analizzato mediante apparato UV, utilizzando celle di 1 mm, ad una lunghezza d'onda di 237 nm.

La solubilità dell'AML misurata a 237 nm in acqua è risultata essere di 4 g/l.

Dal grafico si evince che il diagramma ottenuto è di tipo AP quindi il rapporto molare tra Amlodipina Besilato e ciclodestrina è diverso da 1:1.

Ciò è confermato anche dallo slope che ha valore >1.

Si ha poi un *plateau* probabilmente correlato ad un limite di solubilità del complesso (fig.32).

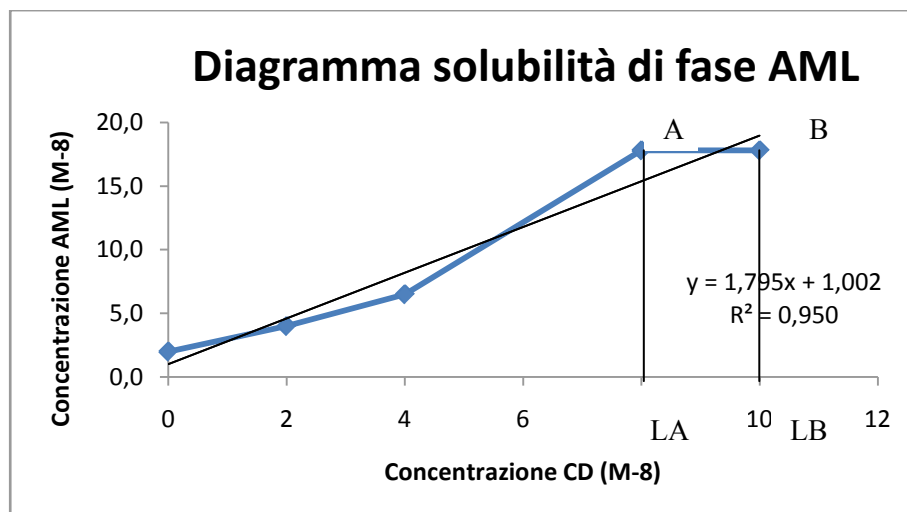


Figura 32: Diagramma solubilità di fase AML

7.1.3 Calcolo del rapporto stechiometrico AML/CD

La quantità di legante che reagisce per formare il complesso nel tratto A - B è data da LB - LA mentre la quantità di substrato è uguale $S = ST - S'$ (dove ST equivale alla quantità totale di p.a, mentre S' equivale alla concentrazione molare del complesso).

Dal rapporto delle due concentrazioni si ottiene il rapporto stechiometrico.

- ST (M-8) = 19
- S' (M-8) = 18
- LA (M-8) = 8
- LB (M-8) = 10

Il rapporto stechiometrico $ST - S' / LB - LA = 1/2$ ossia il rapporto molare AML/CD è di 2:1.

7.1.4 Calcolo della costante di complessazione

La costante di stabilità del complesso AML/ CD è stata calcolata dal diagramma di solubilità di fase: $K_{c2:1} = \text{slope} / (S_0)^2(2 - \text{slope}) \rightarrow K_{c2:1} = 1,79 / (0,2)^2(2 - 1,79) = 392 \text{ M}^{-1}$

In genere, per avere un buon grado di complessazione, la Kc deve essere compresa tra 200 M⁻¹ e 1000 M⁻¹.

7.2 STUDI DI FORMULAZIONE

Considerati i risultati degli studi di pre-formulazione, la metodica di complessazione applicata è stata quella della solubilizzazione/liofilizzazione, in cui si è mantenuto il rapporto di 2:1 AML/CD, che è risultato il migliore per ottenere una complessazione ottimale del farmaco.

7.3 CARATTERIZZAZIONE DEL COMPLESSO

La caratterizzazione del complesso è stata effettuata mediante tecniche diverse, sia allo stato solido che allo stato liquido.

7.3.1 Tecniche in fase liquida: studi UV e dicroismo circolare

Sono stati eseguiti spettri UV delle sostanze pure (AML e CD) e del complesso AML/CD.

Il complesso mostra uno *shift* basso della lunghezza d'onda da 237 a 240 nm ed un effetto ipocromico dovuti probabilmente ad una lieve interazione tra l'AML e la CD causata da legami ad idrogeno, come confermato dall'analisi FTIR (fig.33).

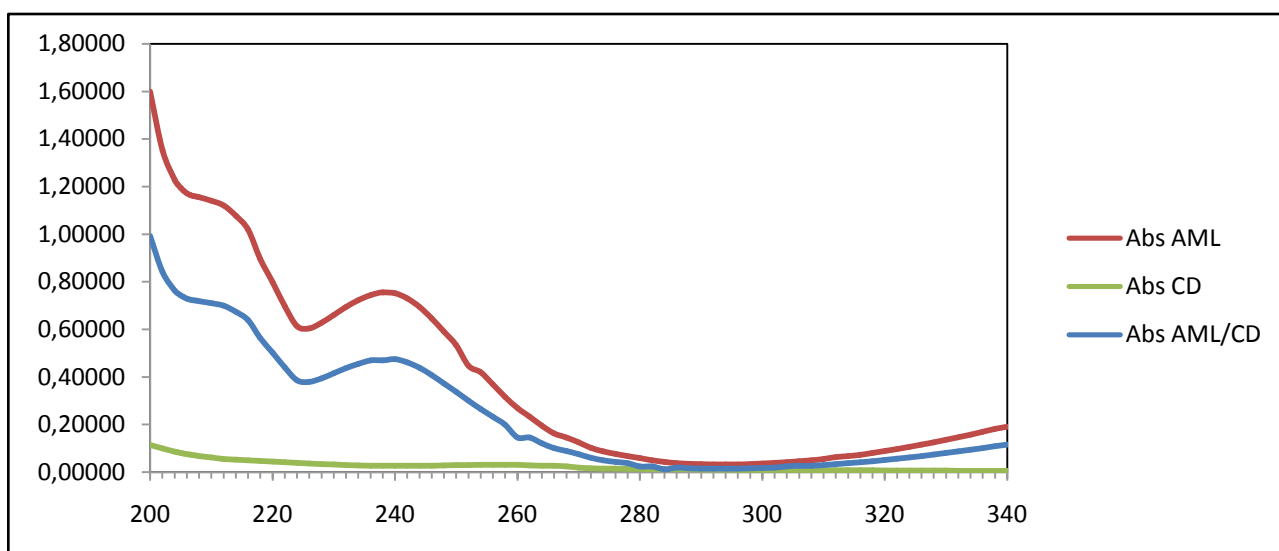


Figura 33: Spettri UV della polvere di Amlodipina Besilato (AML/CD), del polimero solubile di beta-ciclodestrina (CD) e del complesso AML/CD.

Questi dati sono confermati dall'analisi eseguita al dicroismo circolare, in cui non si ha un vero effetto *Cotton* ma è evidente l'effetto ipocromico e lo *shift* della banda negativa da 278 nm (-0,68948) per l'AML a 276 nm (-1,51219) per il complesso (fig.34).

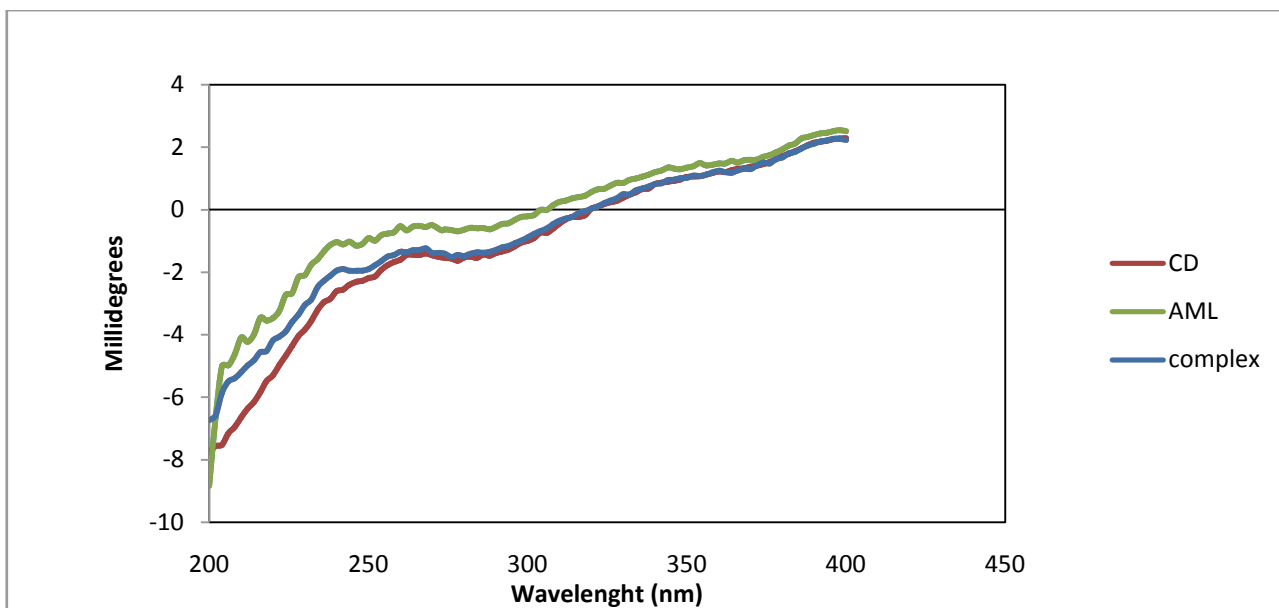


Figura 34: Analisi mediante dicroismo circolare della polvere di Amlodipina Besilato (AML), del polimero solubile di beta-ciclodestrina (CD) e del complesso AML/CD (complex).

7.3.2 Tecniche in fase solida: studi DSC e IR

1) Studi DSC

Il profilo termico dell'AML (fig.35) mostra un "melting point" a 206.4°C circa. L'assenza di questo valore nel profilo termico del complesso AML/CD conferma l'inclusione dell'AML all'interno della cavità della CD, come mostrato anche dagli studi FTIR e dalle immagini al Microscopio a Fluorescenza.

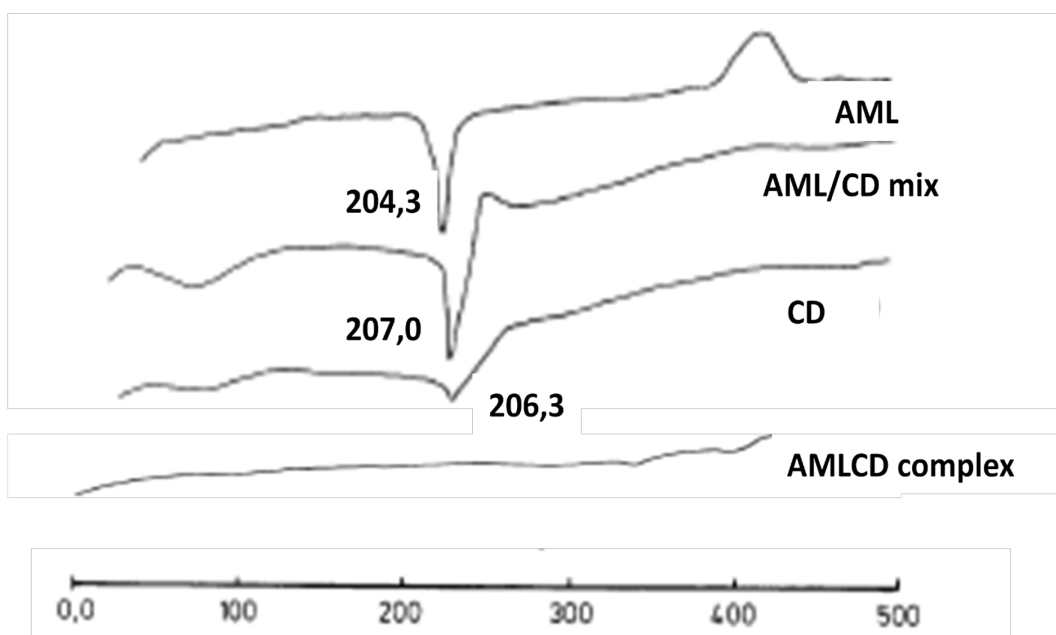


Figura 35: Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC) del complesso AML/CD paragonata ai profili termogravimetrici dell'Amlodipina Besilato non complessata (AML), del polimero puro (CD) e della miscela fisica AML/CD mix.

2) Studi FTIR

Lo spettro IR dell'AML nel range tra 3500 e 3300 cm^{-1} , presenta una banda a 3410 cm^{-1} come risultato della vibrazione del legame N-H, mentre la banda a 1492 cm^{-1} corrisponde alla distorsione dello stesso legame.

La vibrazione dei gruppi alifatici C-H produce la banda a 2983 cm^{-1} .

I segnali intensi a 1697 cm^{-1} and 1677 cm^{-1} sono caratteristici della vibrazione dei gruppi C=O e C=C rispettivamente.

Le due bande a 1303 cm^{-1} e 1098 cm^{-1} sono il risultato della vibrazione del legame C-O.

La vibrazione del legame C-N appare nella banda a 1208 cm^{-1} .

La parte aromatica è caratterizzata dalle bande che appaiono a 1611 cm^{-1} e 755 cm^{-1} , risultato della deformazione dei legami C=C e C-H.

Lo spettro IR del complesso AML/CD non presenta le bande tipiche per intensità e posizione dell'AML. Ciò sta ad indicare che l'AML si trova disposta nella cavità della CD, come confermato anche dalle immagini FM. Inoltre, nei casi in cui la DSC descriveva la presenza di interazioni od amorfizzazione, gli spettri IR del complesso AML/CD mettono in evidenza una nuova banda a 1690 cm^{-1} , e lo shift delle bande 1208 cm^{-1} e 1492 cm^{-1} rispettivamente a 1214 cm^{-1} e 1512 cm^{-1} , indice di un'interazione dovuta probabilmente a legami a idrogeno tra la CD e i gruppi NH (fig.36).

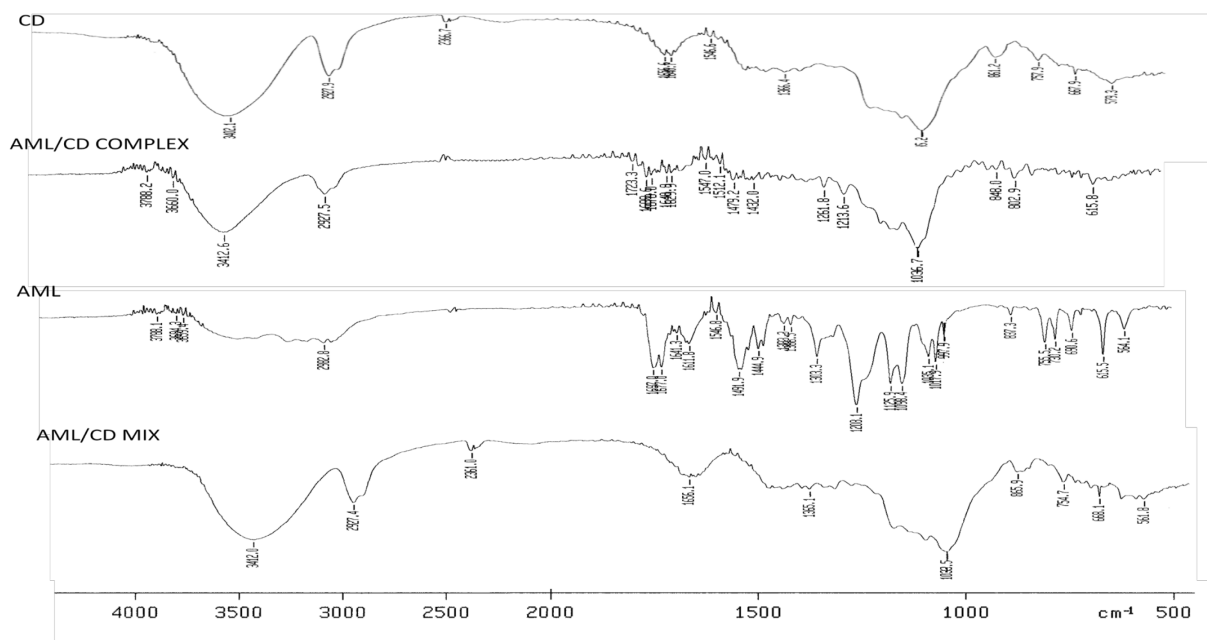


Figura 36: Spettri FTIR delle polveri di Amlodipina Besilato (AML), polimero solubile della beta ciclodestrina (CD) e della miscela fisica farmaco/polimero(AML/CD MIX)

7.3.3 Analisi morfologica e dimensionale

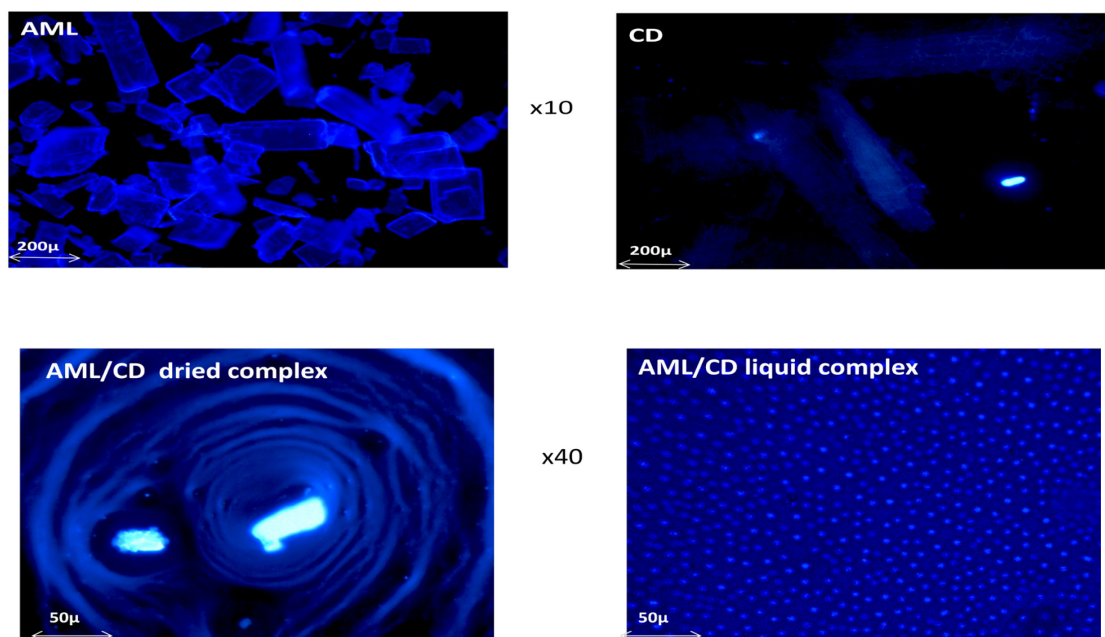


Figura 37: Microscopia a Fluorescenza della polvere di Amlodipina Besilato (AML) del polimero solubile di beta ciclo destrina (CD) e del complesso AML/CD in fase solida ed essiccato su vetrino.

Come si evince dall'analisi eseguita mediante microscopia a fluorescenza (fig.37), il farmaco (AML) presenta una struttura cristallina, delle dimensioni di circa 200-300 μm , probabilmente responsabile della bassa velocità di dissoluzione del farmaco in acqua, mentre la CD ha una struttura lamellare (dm 500 μm).

Dopo la complessazione, in fase liquida (*AML/CD liquid complex*) si notano delle goccioline ben strutturate di circa 3 μm con contorno ben definito di colorazione blu scuro come la CD, mentre all'interno è evidente la presenza dell'AML.

Essiccato il complesso sul vetrino, le goccioline subiscono il fenomeno della coalescenza ed il farmaco ricristallizza. Si ha una sorta di co-precipitazione e si vede chiaramente che il farmaco continua ad essere inglobato in una rete concentrica costituita dal polimero CD.

7.4 ANALISI DI SOLUBILITA' DEL COMPLESSO AML/CD

Il test di dissoluzione/rilascio *in vitro* del complesso AML/CD (corrispondente a 2,5 mg di AML) è stato eseguito in *sink conditions*.

Come si nota dal grafico dei risultati riportato in figura 38, mentre l'AML dissolve al 75% in 5 min., nello stesso tempo viene rilasciata/dissolve al 98%, dal complesso AML/CD e all'80% dalla miscela fisica AML/CD *mix*. Ciò indica che già nella miscela fisica il polimero solubile

della β -CD è in grado di incrementare leggermente la bagnabilità e la solubilità del farmaco; nel complesso invece riesce anche ad incrementare notevolmente la velocità di dissoluzione dell'AML in acqua.

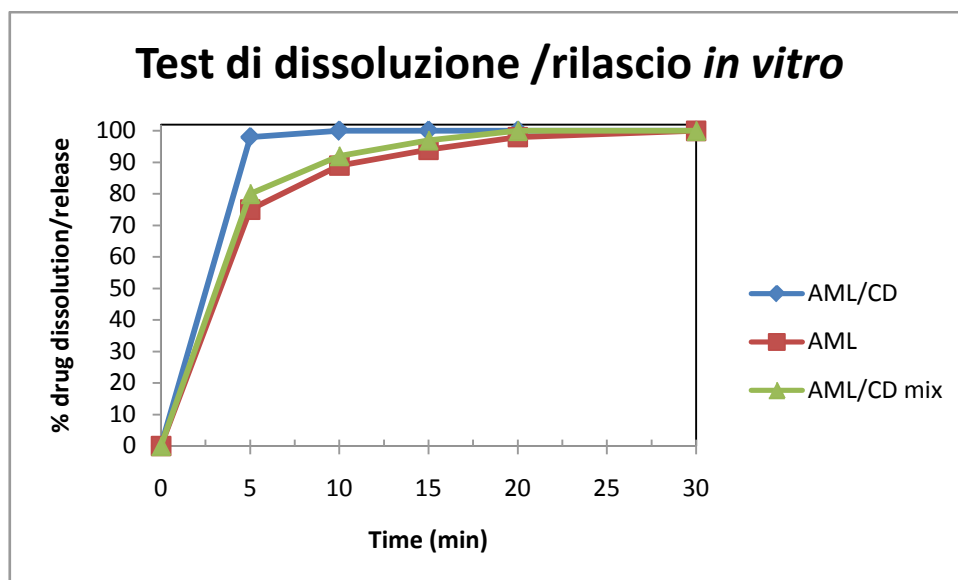


Figura 38: Profilo di dissoluzione/rilascio in vitro dell'Amlodipina Besilato dal complesso AML/CD, confrontato con il profilo di dissoluzione dell'Amlodipina Besilato libera, in acqua e con la miscela fisica AML/CD mix

7.5 STUDI DI STABILITA' DEL COMPLESSO AML/CD

Gli studi di stabilità eseguiti secondo ICH (50°, 60°, 70°, 80°, 90° per 6 ore) hanno dimostrato che sia il farmaco, sia il complesso sono stabili alle temperature d'analisi.

PARTE II

L'AML è un farmaco chirale, nel tentativo di poter abbassare ulteriormente il dosaggio e di ridurre, di conseguenza, gli effetti collaterali, in questo studio si è cercato di ottenerne la separazione enantiomerica, poiché l'effetto antipertensivo di questa molecola è associato soltanto all'enantiomero (S)-AML.

È stato scelto come selettore chirale un polimero a base di cellulosa ovvero Sepapak-4, detto anche LUX-4 (*[cellulose tris (4-chloro-3-methylphenylcarbamate)]*).

Tale selettore chirale presenta sia gruppi amminici che carbonilici, per cui sulla superficie della fase stazionaria possono originarsi sia cariche positive che negative.

Dopo aver effettuato delle prove preliminari di ripetibilità con la talidomide, per verificare la funzionalità del capillare, si è proceduto all'ottimizzazione del metodo analitico CLC, studiando l'effetto di determinati parametri sulle prestazioni del metodo stesso in termini di risoluzione, fattori di ritenzione ed efficienza. Sono stati valutati sia parametri strumentali sia parametri riguardanti la composizione della fase mobile, quali concentrazione di acetonitrile e tipo/percentuale di altri modificatori organici (MeOH), utilizzo di modificatori di pH. Lo stesso tipo di studio è stato intrapreso anche per la CEC, includendo il voltaggio tra i parametri da esaminare.

I dati presenti in letteratura evidenziano la risoluzione enantiomerica dell'AML sia mediante metodiche cromatografiche che elettroforetiche:

- α e β -CDs (CE);
- α 1-glicoproteine acide (LC);
- CSPs a base di vancomicina (LC);
- CSPs a base di polisaccaridi clorurati (LC) [56].

Partendo da questi ultimi risultati, ottenuti fino ad oggi mediante l'utilizzo di tecniche cromatografiche classiche, con il presente studio si è cercato di traslare tali risultati utilizzando tecniche miniaturizzate (CLC e CEC).

Le condizioni di partenza hanno dunque previsto l'utilizzo di una miscela acetonitrile, dietilammina, acido formico (100%ACN/0,1%DEA/0,01%FA) come fase mobile (MP).

Tali condizioni sono state leggermente variate in quanto per ottenere una buona linea di base si è dovuto utilizzare una percentuale di FA paragonabile a quella di DEA.

Tali condizioni non hanno portato all'enantiorisoluzione dell'AML, enantiorisoluzione che invece è stata ottenuta per le due impurezze (fig.39)

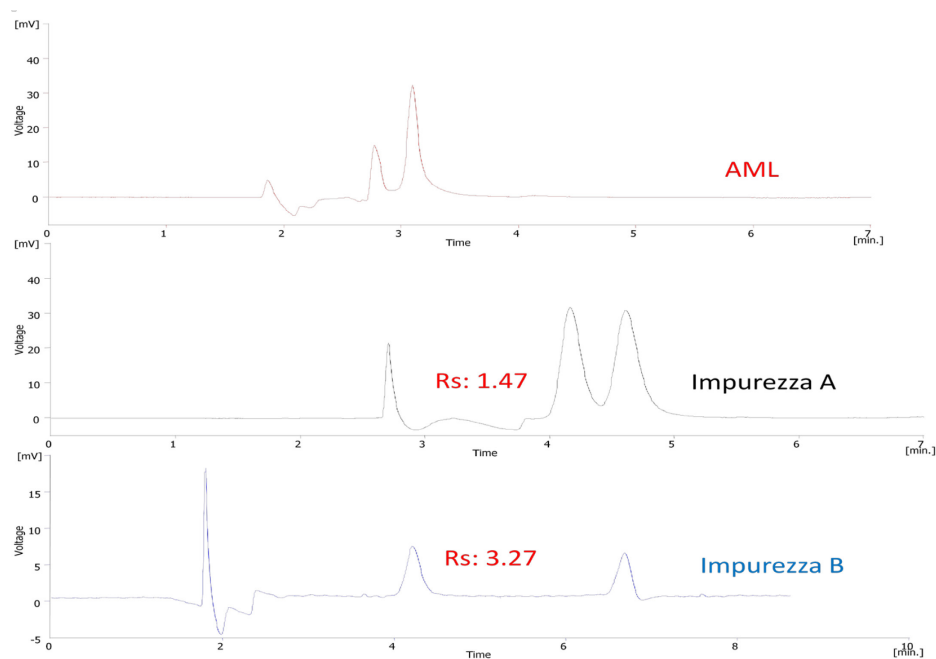


Figura 39: Cromatogrammi ottenuti in MP: 100%ACN/0,1%DEA/0,01%FA

7.6 STUDI DI ENANTIOSEPARAZIONE MEDIANTE CLC

Pertanto, partendo da una soluzione costituita dal 100% di ACN è stato effettuato uno *screening* sulla composizione della MP, il quale ha previsto diversi *step*:

1. Effetto della concentrazione di modificatore organico nella fase mobile;
2. Effetto del tipo di modificatore organico;
3. Effetto del pH (sia acidi che basici), utilizzando diversi tamponi (acetato, formiato, borato);
4. Effetto del controione del tampone (Na^+ ; NH_4^+);
5. Effetto della concentrazione del tampone;
6. Effetto della variazione del flusso di analisi.

7.6.1 Effetto della concentrazione di modificatore organico nella fase mobile

È stato inizialmente valutato l'effetto della variazione di concentrazione di ACN nella MP. Tale concentrazione è stata quindi variata preparando diverse miscele ACN/H₂O aggiungendo differenti percentuali di H₂O nel range 10%-50% (v/v). Non è stato possibile aumentare ulteriormente la percentuale di H₂O in quanto la fase stazionaria utilizzata, a base polisaccaridica, viene degradata.

In base ai risultati ottenuti è stato quindi deciso di proseguire le analisi utilizzando una concentrazione di modificatore organico pari al 90%, il quale ha permesso di ottenere una

completa risoluzione enantiomerica delle due impurezze ed una buona efficienza dei relativi picchi (fig.40).

Tale fase mobile non ha portato ad alcuna risoluzione dell'AML, la quale, in tali condizioni sembra essere adsorbita sulla CSPs.

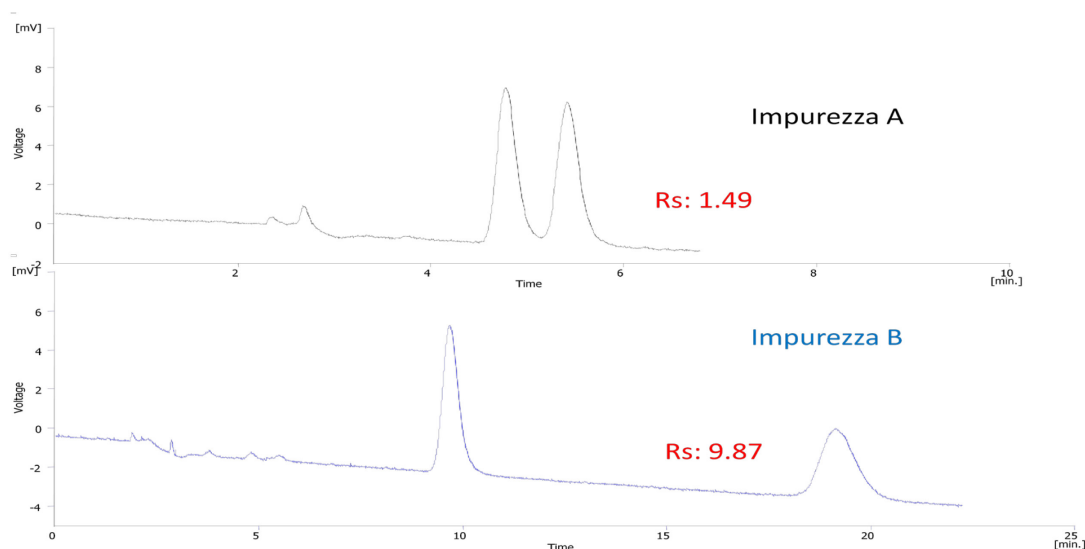


Figura 40: Cromatogrammi ottenuti in MP: 90%ACN/10%H₂O

7.6.2 Effetto del tipo di modificatore organico nella fase mobile

Si è continuato quindi lo studio variando la composizione della fase mobile aggiungendo un secondo modificatore organico, il metanolo (MeOH), in modo da tenere costante la percentuale di fase organica totale (90%). Di conseguenza, la concentrazione di MeOH è stata variata nel range 0-20% , mentre quella di ACN nel range 90-70%.

All'aumento della concentrazione di MeOH non si evidenzia alcuna risoluzione per l'AML, la quale comigra con il t₀ e inoltre si ha una perdita di risoluzione e di efficienza per le due impurezze.

Infatti i modificatori organici differiscono l'uno dall'altro, a volte anche significativamente, per quel che riguarda proprietà fisiche quali polarità e viscosità, che fortemente influenzano i parametri suddetti. Inoltre essi agiscono a livello dell'interazione tra analiti e selettore chirale, in quanto, modificando le costanti di dissociazione, ne variano la carica.

7.6.3 Effetto della variazione di pH

Nel tentativo di ottenere la risoluzione enantiomerica dell'AML, partendo dalle condizioni di separazione ottimali per le due impurezze (MP: 90%ACN/10%H₂O) è stato effettuato uno *screening* di pH nel *range* compreso tra 2,5 e 11,5 (utilizzando diversi tamponi: acetato, formiato, borato).

Per valori di pH acidi non è stato ottenuto alcun risultato pur indagando sulla diversa forza ionica del tampone e sulla natura del controione.

A pH basici i migliori risultati sono stati ottenuti per valore di pH pari a 10 utilizzando come tampone il borato d'ammonio.

È stato utilizzato come controione NH₄⁺, in quanto mantenendo fissa al 90% la percentuale di fase organica, non è stato possibile utilizzare come controione il Na⁺, a causa della opalescenza della soluzione in seguito a precipitazione del sale (borato).

Pertanto la MP impiegata è costituita da: 90% ACN/ 10% H₂O borato d'ammonio pH10 (5mM).

In queste condizioni sono state testate anche le due impurezze nel tentativo di risolvere i tre campioni in un'unica corsa cromatografica. Ciò non è stato possibile in quanto sia l'AML che le sue due impurezze hanno lo stesso tempo di ritenzione.

Inoltre, in queste condizioni di MP, ottimali per l'AML si evidenzia una perdita di efficienza e risoluzione per le due impurezze (fig.41).

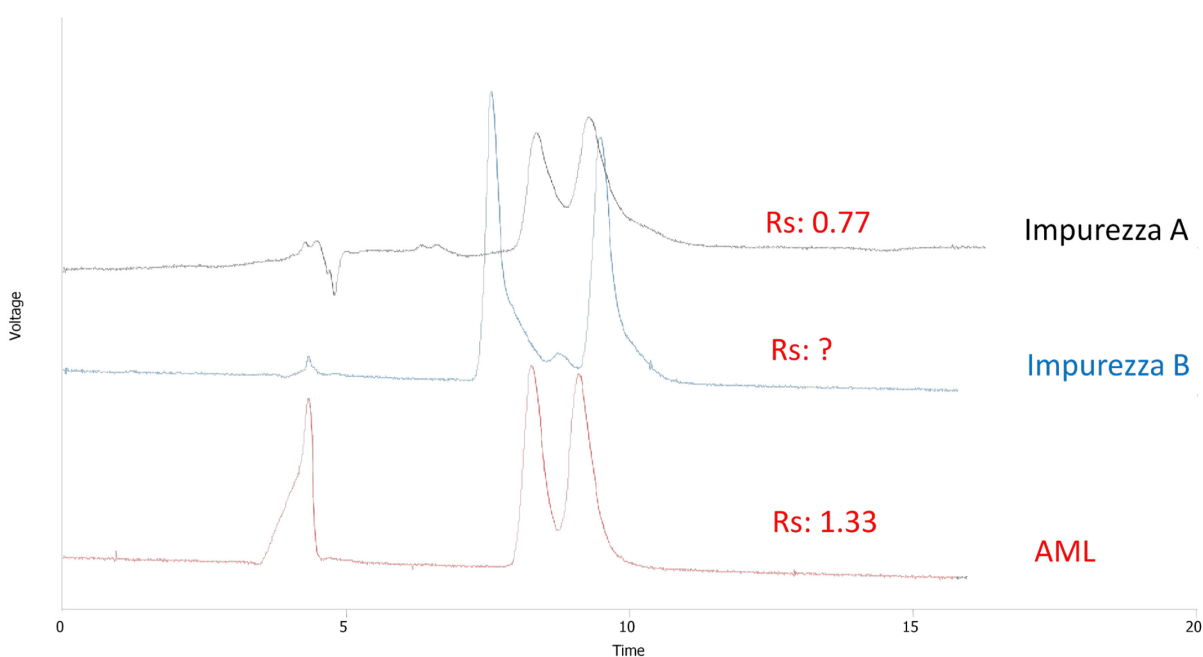


Figura 41: Cromatogrammi ottenuti in MP: 90%ACN/10%H₂O pH 10 borato d'ammonio 5 mM

7.6.4 Effetto della variazione del flusso di analisi

Inoltre, nel tentativo di migliorare il fattore di risoluzione (R_s) dell'AML è stato analizzato il flusso d'analisi nel range 100-50 nl/min, ottenendo per l'AML una risoluzione quasi alla linea di base (R_s : 1.45) come si può vedere dalla figura 42.

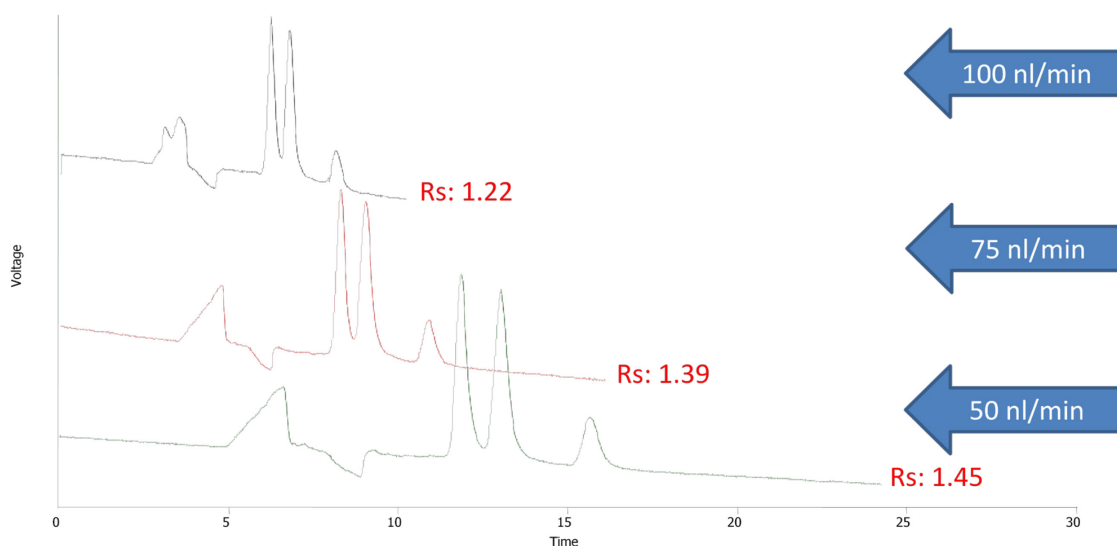


Figura 41: Cromatogrammi ottenuti in MP: 90%ACN/10%H₂O pH 10 borato d'ammonio 5 mM

7.6.5 Effetto della concentrazione del tampone

Nel tentativo di variare i tempi di ritenzione dei 3 campioni, è stato effettuato uno *screening* sulla concentrazione del tampone 5-25 mM.

Ciò ha portato ad una migliore risoluzione per valori di concentrazione del tampone pari a 15mM sia per l'AML che per le sue due impurezze, ma non ha portato alcuna variazione sui tempi di ritenzione.

7.7 OTTIMIZZAZIONE DEL METODO D'ANALISI MEDIANTE CEC

Una volta ottimizzato e convalidato il metodo CLC, si è deciso di verificare le prestazioni ottenibili trasferendolo e adattandolo alla CEC.

Nel tentativo di ottenere la risoluzione dell'AML e delle sue due impurezze in un'unica corsa cromatografica sono state effettuate le prove necessarie per valutare gli effetti della variazione di pH e della concentrazione del tampone, partendo dalle condizioni ottimali ottenute in CLC, le quali hanno previsto l'utilizzo di una miscela 90%ACN/10%H₂O pH 10 per borato d'ammonio 15 mM come MP.

Inoltre sono stati esaminati la variazione del voltaggio applicato (specifico per questo tipo di tecnica), e le diverse tipologie di iniezione:

- Iniezione per pressione: 8 bar per 0,5 min;
- Iniezione per voltaggio: 10 kV per 10 sec;
- Iniezione mista per voltaggio e pressione: 10 kV per 10 sec + *plug* 8 bar per 0,2 min.

7.7.1 Effetto della tipologia di iniezione

Partendo dalle stesse condizioni utilizzate in CLC, come possiamo vedere dai cromatogrammi in figura 42, con la CEC si ottengono picchi con maggiore efficienza e un fattore di risoluzione migliore, sia per l'AML che per le sue due impurezze.

Inoltre effettuando tipologie di iniezioni diverse, ovvero per pressione, per voltaggio, mista (fig.42,43), vediamo che quest'ultima tipologia risulta essere la migliore in termini di efficienza, risoluzione, selettività.

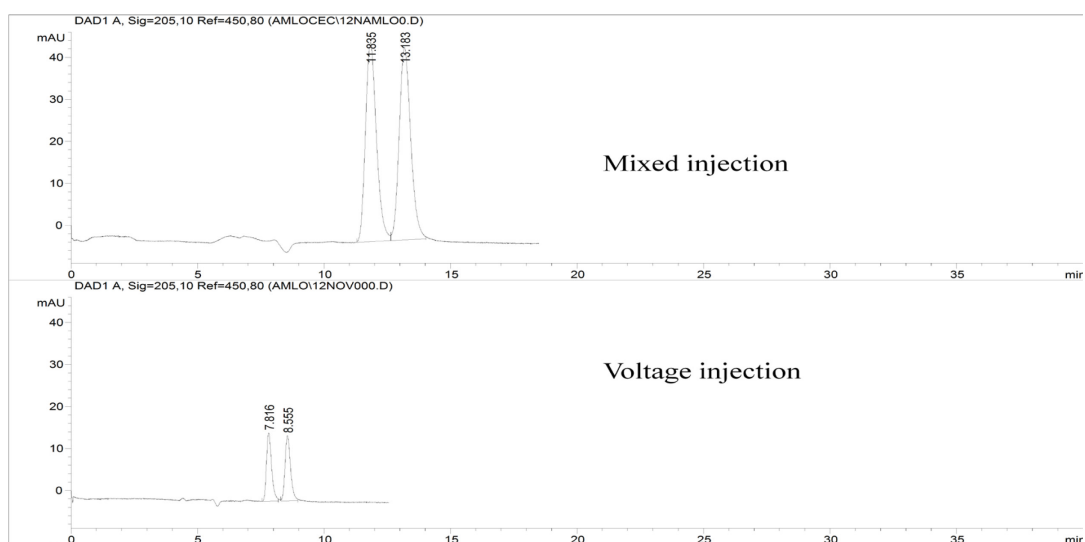


Figura 42: Cromatogrammi AML ottenuti in MP: 90%ACN/10%H₂O pH 10 borato d'ammonio 15 mM

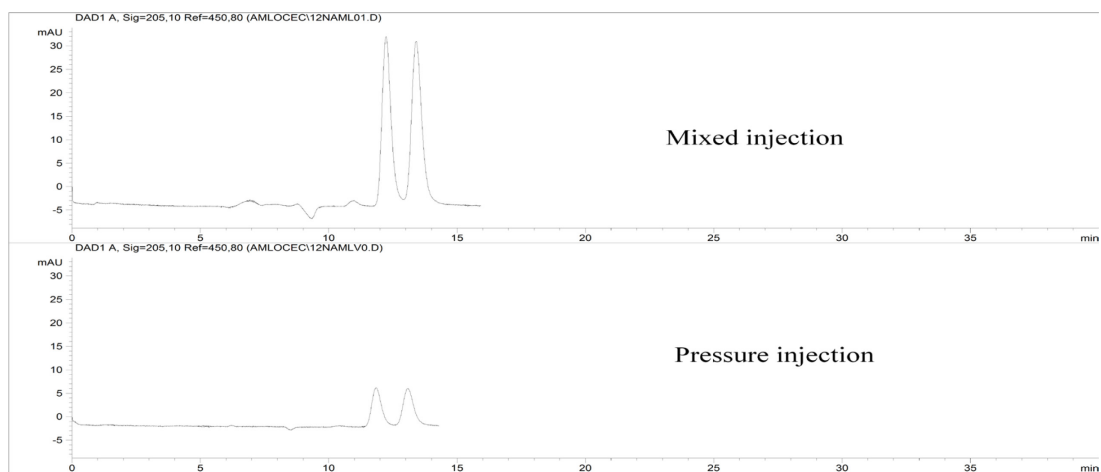


Figura 43: Cromatogrammi AML ottenuti in MP: 90%ACN/10%H₂O pH 10 borato d'ammonio 15 mM

Nelle stesse condizioni sono state iniettate anche le due impurezze, ottenendo dei risultati migliori rispetto a quelli ottenuti in CLC (fig.44).

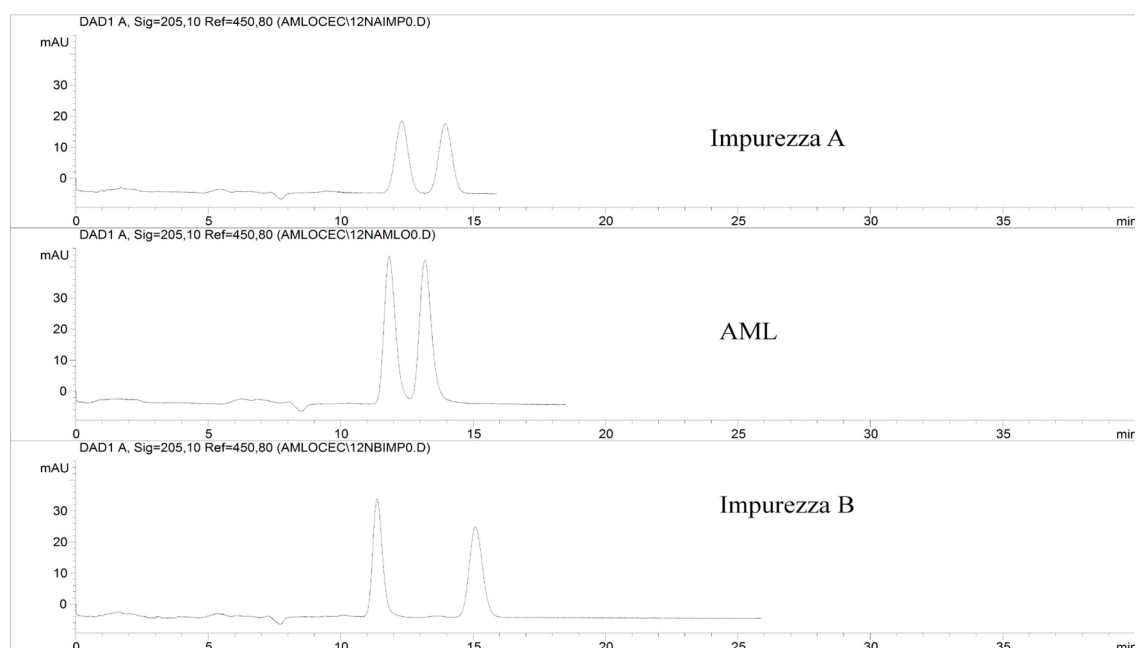


Figura 43: Cromatogrammi ottenuti in MP: 90%ACN/10%H₂O pH 10 borato d'ammonio 15 mM

L'obiettivo dello studio era quello di riuscire a separare enantiomericamente l'AML e le sue 2 impurezze in una sola corsa cromatografica. Lavorando in queste condizioni di pH si ha co-migrazione degli analiti, pertanto è stato effettuato uno *screening* di pH, mediante iniezione per voltaggio.

7.7.2 Effetto del voltaggio applicato

Il range di voltaggio esaminato è compreso tra 10 kV e 25 kV. L'aumento di corrente in funzione dell'intensità è risultato lineare così come l'aumento della velocità del flusso elettrosmotico. All'aumentare dell'intensità del campo elettrico applicato, diminuiscono i tempi di analisi, ma anche la risoluzione.

Sebbene a 20 kV il tempo di analisi fosse minore e la risoluzione fosse buona, si è preferito fissare il voltaggio a 15 kV.

7.7.3 Effetto della variazione di pH

Sono state effettuate prove sulla miscela (AML, impurezza A, impurezza B conc. 100 µg/ml) a tre valori diversi di pH (pH 8, 9, 10).

Al valore di pH ottimale è stato effettuato uno *screening* sulla concentrazione del tampone nel range 5-25 mM. I risultati ottenuti sono riportati in figura 44.

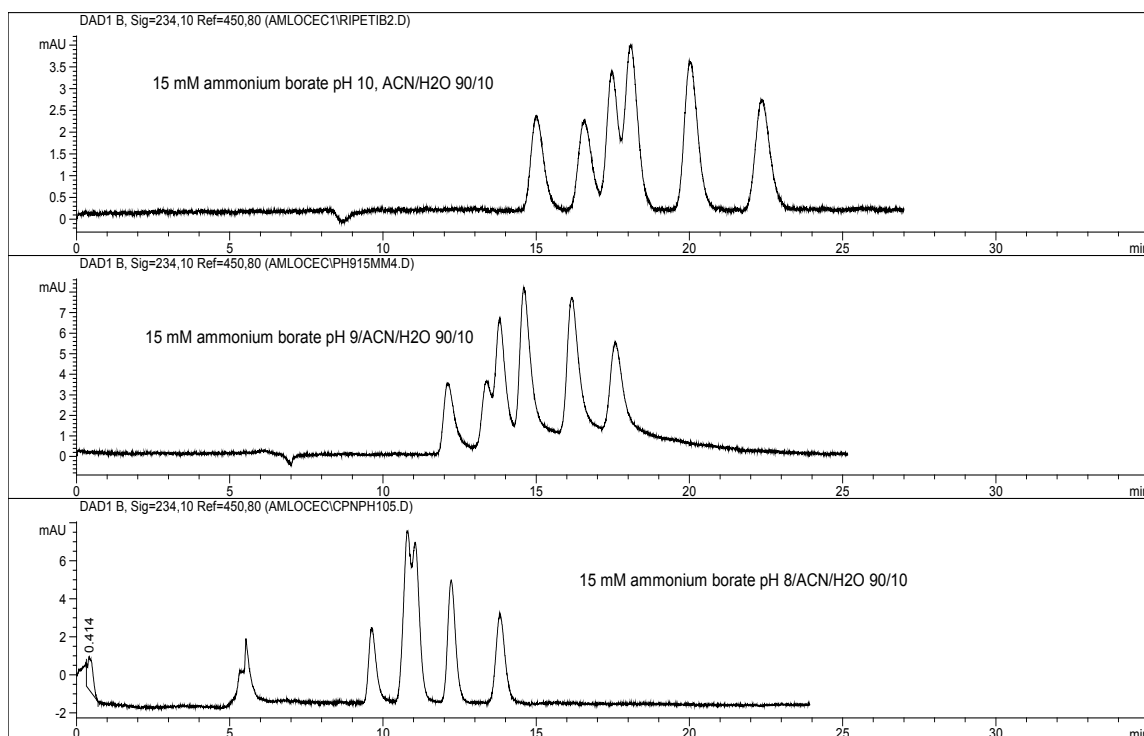


Figura 44: Cromatogrammi ottenuti in MP: 90%ACN/10%H₂O pH 10/9/8 borato d'ammonio 15 mM

Dai dati ottenuti è stato deciso di lavorare a pH 9 (MP: ACN/H₂O 90:10 pH 9 per borato d'ammonio 15 mM), ed effettuare modifiche sulla concentrazione di tampone.

Portando tale concentrazione a 5 mM si è ottenuta una completa risoluzione enantiomerica dell'AML e delle sue 2 impurezze in miscela (fig.45).

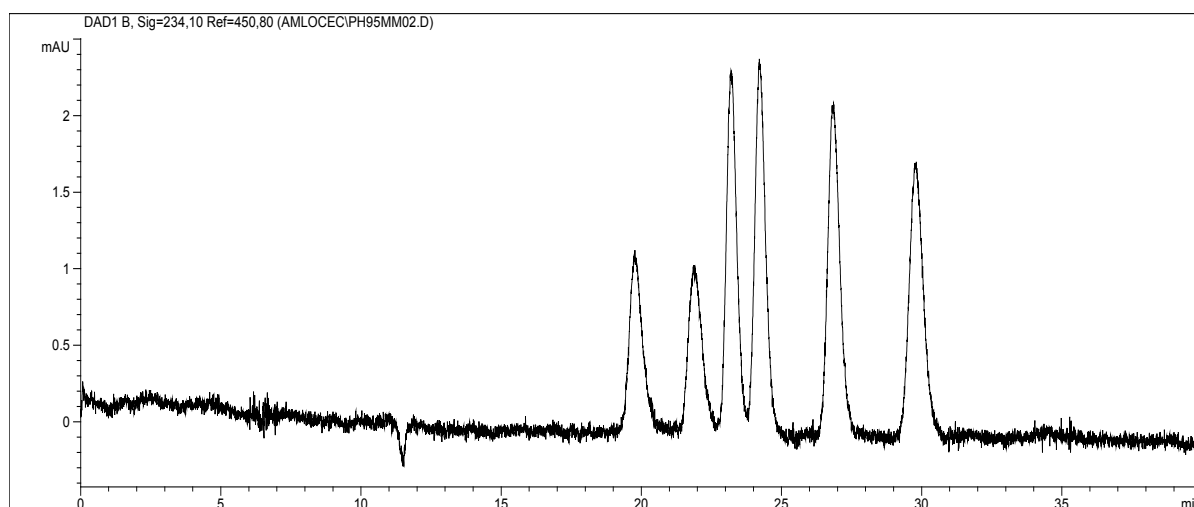


Figura 44: Cromatogrammi ottenuti in MP: 90%ACN/10%H₂O pH 9 borato d'ammonio 5 mM

L'ottimizzazione del metodo CEC è ancora in fase di studio, tuttavia già da queste prove preliminari è stato possibile fare dei primi confronti tra CLC e CEC. In condizioni paragonabili con la CEC si sono ottenuti valori più alti dei fattori di ritenzione, della risoluzione, della selettività e della efficienza. Inoltre con la CEC è stato possibile ottenere l'enantiorisoluzione dei tre composti in miscela in una sola corsa cromatografica, risultato che non era stato possibile ottenere mediante CLC.

CONCLUSIONI

L'Amlodipina Besilato è un farmaco caratterizzato da polveri cristalline lentamente solubili in acqua, anche se appartiene alla classe I BCS. Ciò implica che è difficile scioglierla rapidamente in acqua. Inoltre in commercio non è presente in formulazioni specifiche per gli animali, ma solo in compresse per l'uomo che risultano ad alto dosaggio per animali da affezione.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di riuscire ad ottenere una polvere facilmente solubile in acqua per scioglierla estemporaneamente e somministrarla nel dosaggio ottimale all'animale.

Inoltre, nel tentativo di abbassare il dosaggio si è cercato di ottenere l'enantiorisoluzione dell'AML dal momento che solo l'(S)-AML è responsabile dell'effetto antiipertensivo e al giorno d'oggi l'AML è disponibile in commercio solamente sottoforma di racemato.

Tale obiettivo è stato raggiunto usando:

- Come polimero in grado di aumentare la velocità di dissoluzione, il polimero solubile di β -CD;
- come tecnica di complessazione la solubilizzazione /liofilizzazione.

Gli studi pre-formulativi condotti hanno previsto:

- valutazione degli effetti delle diverse composizioni del complesso;
- valutazione della tecnica di complessazione utilizzata sulle proprietà morfologiche, analitiche e di dissoluzione della polvere ottenuta, rendendo possibile l'individuazione delle condizioni ottimali del processo di complessazione. Tali condizioni di processo risultano essere: utilizzo di un rapporto polimero/farmaco 1:2 adeguato per la preparazione di un complesso stabile ed altamente solubile.

La procedura usata è risultata efficace nel complessare l'AML e, in particolare, il complesso ottenuto ha mostrato un adeguato profilo di rilascio *in vitro*.

Quindi, il polimero solubile di β -CD sembra in grado non solo di aumentare la bagnabilità e la solubilità della polvere del farmaco in esame, ma anche di incrementare la velocità di dissoluzione dell'AML, rilasciando tutta la dose di p.a. caricata in acqua in pochi minuti (5 min, 98%), permettendo così di sciogliere rapidamente la polvere di farmaco complessata e di dosare perfettamente l'AML [57].

Inoltre con questo studio sono state trovate delle condizioni ottimali per poter separare enantiomericamente l'AML e poterla distinguere dalle due delle sue impurezze, mediante due tecniche la CLC e la CEC.

Ambedue le tecniche sono alquanto innovative e rispondono alle esigenze più comuni in campo analitico, ovvero alta efficienza, alta sensibilità, minimo consumo di reagenti, tempi di analisi ridotti. Almeno per la parte sperimentale fin qui condotta, la CEC sembra mostrare migliori risultati quanto a tempo di analisi e risoluzione.

Tuttavia l'applicazione di un voltaggio alle estremità di un capillare impaccato rende più lunghe le operazioni necessarie al condizionamento del capillare e necessita di una maggiore attenzione nel controllo degli effetti ad esso attribuibili (corrente, formazione di bolle).

Infine, non si esclude che sia possibile ottenere in futuro risultati migliori con entrambe le tecniche con nuove strumentazioni costruite *ad hoc*. Infatti, finora sono stati usati solo apparecchi nati per LC o CE opportunamente adattati.

Lo studio non è attualmente concluso, in quanto è in progetto di effettuare la convalida del metodo in CEC e l'applicazione a farmaci attualmente in uso.

Bibliografia

- [1] Brooks W. C. Veterinary Partner
<http://www.veterinarypartner.com/Content.plx?P=A&C=31&A=1215&S=0> (2009)
- [2] Clavijo GA, de Clavijo IV, Weart CW.: Amlodipine: a new calcium antagonist. *Am J Hosp Pharm.* 51(1), 59-68 (1994).
- [3] Murdoch D, Heel RC.: Amlodipine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in cardiovascular disease. *Drugs.* 41(3), 478-505 (1991).
- [4] Cooke, K.L.; Snyder, P.S.: Calcium channel blockers in veterinary medicine. *J. Vet. Intern. Med.* 12 (3), 123-131 (1998).
- [5] *European Pharmacopoeia* 6° Ed. Supplemento 6,7 Pagg 5626-5628. (2010)
- [6] H. P. Rang, M. M. Dale, J. M. Ritter, P. K. Moore *Farmacologia* Piccin (2005)
- [7] M. Poggi, L. Bergamasco, M. Borgarelli, C. Bussadori. Regolazione della pressione arteriosa ed ipertensione nel cane e nel gatto: fisiologia, fisiopatologia, clinica e terapia. *Veterinaria*, Anno 14, n. 1, Aprile 2000
- [8] Kapo A., Nikolić V., Nikolić L., Stanković M., Cakić M., Stanojević L., Ilić D.: Inclusion complexes of amlodipine besylate and cyclodextrins. *Central European Journal of Chemistry.* 8 (4), 834-841 (2010)
- [9] Mielcarek J., Czernielewska A., Czarczyńska B.: Inclusion Complexes of Felodipine and Amlodipine with Methyl- β -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.* 54 (1-2), 17-21 (2006).
- [10] Vélaz I., Isasi J. R., Sánchez M., Uzqueda M, Ponchel G.: Structural characteristics of some soluble and insoluble β -cyclodextrin polymers. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.* 57, (1-4), 65-68 (2007)
- [11] Ling, W., Xuehua, J., Weijuan, X., Chenrui, L.: Complexation of tanshinone IIA with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin: effect on aqueous solubility, dissolution rate, and intestinal absorption behavior in rats. *Int. J. Pharm.* 341, 58-67 (2007)
- [12] "Guidance for industry - ANDAs: Impurities in Drug Substance" U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), June 1998 CMC
- [13] "ICH Q6A Specifications: Test procedures and acceptance criteria for new drugs substances and new drugs products: chemical substances" International Conference on

- Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Humane Use (ICH), ICH Steering Committee, 6 October 1999
- [14] FDA, “*FDA’s policy statement for the development of new stereoisomeric drugs*”, Publication date: 5/1/92
- [15] “*Therapeutic Products Programme Guidance for Industry: Stereochemical Issues in Chiral Drug Development*”, 2000, Health Canada – Publications, Ottawa, Ontario, Canada
- [16] F. Gasparrini, D. Misiti, C. Villani, *La chimica & l’industria*, 72, 1990
- [17] Agency for Healthcare Research and Quality U.S. Department of Health and Human Services. Comparative Effectiveness of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors (ACEIs) and Angiotensin II Receptor Antagonists (ARBs) for Treating Essential Hypertension.
- [18] D. A. Calhoun, D. Jones, S. Textor, D. C. Goff, T. P. Murphy, R. D. Toto, A. White, W. C.ushman, W. White, D. Sica, K. Ferdinand, T. D. Giles, B. Falkner, R. M. Carey. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation and treatment: A scientific statement from the American heart association professional education committee of the council for high blood pressure research *American Heart Association* (2008)
- [19] ^ Ostchega Y, Dillon CF, Hughes JP, Carroll M, Yoon S (July 2007). *Trends in hypertension prevalence, awareness, treatment, and control in older U.S. adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey 1988 to 2004*. Journal of the American Geriatrics Society 55 (7): 1056–65. DOI:10.1111/j.1532-5415.2007.01215.x
- [20] F. E. tippet, G. A. Padgett, G. Eyster, G. Blanchard, T. Bele. *Primary hypertension in a colony of dogs*. (1987)
- [21] J. A. Montoya, P. J. Morris, I. Bautista, M. C. Juste, L. Suarez, C. Pena, R. M. Hackett, J. Rawlings. *Hypertension: A risk factor associated with weight status in dogs*. (2006)
- [22] A.P. Rocchini, J. Q. Yang, A. Gokee. *Hypertension and insulin resistance are not directly related in obese dogs*. (2004)
- [23] David A. Williams, Thomas L. Lemke. *Foye’s Principi di Chimica Farmaceutica*. IV edizione italiana ,CEA (2005)
- [24] Laurence L. Brunton, John S. Lazo, Keith L. POarker. *Goodman & Gilman Le Basi Farmacologiche Della Terapia*. XI edizione (2006)
- [25] Gennady Anachenko, Jasmina Novakovic, Johnatan Lewis, *Amlodipine Besylate, Profiles ofdrug substances, excipients, and related methodology*, vol.37, 2012 Elsevier.

- [26] S. Vincent, S. I. Harris, G. Fould, L. C. Dogolo, S. Willavize, H. L. Friedman. *Lack of effect of grapefruit juice on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of amlodipine.* (2000)
- [27] Y. Vesawa, K. Mohri. *Relationship between lipophilicities of 1,4-dihydropyridine derivatives and pharmacokinetic interaction strengths with grapefruit juice.* (2007)
- [28] Arun Rasheed, Ashok Kumar C.K., Sravanthi V. V. N. S. S. *Cyclodextrins As Drug Carrier Molecule: A Review* (2008)
- [29] I. Velaz, J. R. Isasi, M. Sanchez, M. Uzqueda, G. Ponchel. *Structural Characteristics of Some Soluble and Insoluble β -cyclodextrin Polymers* (2006)
- [30] Chung, Y. S.; Ha, M. C. Process for the preparation of (S)-(-)amlodipine. US2007/0155969A1, July 5, 2007
- [31] Rohini, R. J.; Ramesh, A. J.; Mukund, K. G. A process for the preparation of S-(-)-amlodipine salts. EP 1407773 A1, April 14, 2004.
- [32] Frömring K.H. and Szejtli J.; “Cyclodextrins in Pharmacy” (1994). Kluwer Academic Publishers.
- [33] A Kapor, V. Nikolic, M. Stankovic, M. Cakic, L. Stanojevic, D. Lir. *Inclusion complexes of amlodipine besylate and cyclodextrins* (2009)
- [34] Duchêne D. (1987). “Cyclodextrins and their industrial uses”. De Santè, Paris.
- [35] Loftsson T. and Brewster M., 1996. “Pharmaceutical applications of cyclodextrins”. 1. Drug solubilization and stabilization. J. Pharm. Sci. 85, 1017-1025
- [36] Veiga F., Fernandes C., Teixeira F. (2000). “Oral bioavailability and hypoglycaemic activity of tolbutamide/cyclodextrin inclusion complexes”. Int. J. Pharm. 202, 165-171.
- [37] Thomson D.O. (1997). “Cyclodextrins enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals”.
- [38] S. Fanali, P. Catarcini, G. Blaschke, B. Chankvetadze, *Electrophoresis* 22, 2001, 3131-3151
- [39] G. Gübitz, M. G. Schimid, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 179-225
- [40] K.Si-Ahmed, Z.Aturki, B.Chankvetadze, S.Fanali: *evaluation of novel amylose and cellulose-based chiral stationary phases for the stereoisomer separation of flavanones by means of nano-liquid chromatography.* Analytica Chimica Acta 738 (2012) 85-94
- [41] C. F. Poole “The essence of chromatography”, 2003, Elsevier Science B. V., Amsterdam
- [42] D. A. Skoog, D. G. West, F. J. Holler, “Fondamenti di chimica analitica”, 1998, EdiSES, Napoli

- [43] F. Gasparri, M. Giovannoli, B. Galli, *Ann. Ist. Super. Sanità*, vol. 18, N 4 (1982) 643-658
- [44] F. Gasparri et al., “Tecniche Cromatografiche ad Elevate Prestazioni”, Dossier di Chimica
- [45] C. G. Huber, *Mass Spectrometry rev.*, 20 (5) 310-343, Sep-Oct 2001
- [46] L. S. Snyder e J. J. Kirkland, “Introduction to modern liquid chromatography”, Wiley, New York, 1979
- [47] J. J. Kirkland, *J. Chromatogr. Sci.*, 38 (12) 535-545, Dec 2000
- [48] Van Deemter et al., *Chem. Eng. Sci.* 5 (1956) 271
- [49] B. Chankvetadze, I. Kartoziya, C. Yamamoto, Y. Okamoto, G. Blaschke, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1897-1906
- [50] L.O.Healy et al., *J. Chromatogr. A*, 924 (2001) 459-464
- [51] R.C.Simpson, *J. Chromatogr. A*, 691 (1995) 163-170
- [52] B. Devreese, K.P.C. Janssen, F. Venrobaeys, F. Van Herp, G.J.M. Martewa, J. Van Beeumen, *J. Chromatogr. A*, 976 (2002) 113-121.
- [53] K. Mistry, I. Krull, N. Grinberg, *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 935-958
- [54] *Methods in Molecular Biology*, Vol. 52, “Capillary Electrophoresis Guidebook”, 1996, Edited by K.D. Altria, Humana Press, Totowa, New Jersey
- [55] Higuchi T. and Connors K.A: “Phase-solubility techniques”. *Adv. Anal. Chem. Instrum.* 4, 117-212, 1965.
- [56] K.S.S.Dossou, B. Chankvetadze, J.Crommen *determination of enantiomeric purity of S-amlodipine by chiral LC with emphasis on reversal of enantiomer elution order*. *J.Sep.SCI.*2011, 34,1772-1780.
- [57] M.R Lauro, C.Carbone, R.Auditore, N.A. Santagati, G.Puglisi. *A new inclusion complex of amlodipine besylate and soluble β -cyclodextrin polymer: preparation, characterization and dissolution profile*. *J.Incl Phenom Macrocycl Chem* DOI 10.1007/s10847-012-0168-y, 2012.

RINGRAZIAMENTI:

Prof. Natale Alfredo Santagati, Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Catania.

Dott. Salvatore Fanali, direttore di ricerca, *Istituto di Metodologie Chimiche (IMC)*, Consiglio Nazionale delle ricerche (Cnr), Area della Ricerca di Roma I.

Dott.ssa Zeineb Aturki, Ricercatrice, *Istituto di Metodologie Chimiche (IMC)*, Consiglio Nazionale delle ricerche (Cnr), Area della Ricerca di Roma I.

Dott. Giovanni D'orazio, Ricercatore, *Istituto di Metodologie Chimiche (IMC)*, Consiglio Nazionale delle ricerche (Cnr), Area della Ricerca di Roma I.

Dott.ssa Anna Rocco, Ricercatrice, *Istituto di Metodologie Chimiche (IMC)*, Consiglio Nazionale delle ricerche (Cnr), Area della Ricerca di Roma I.

Dott.ssa Maria Rosaria Lauro, Ricercatrice, Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Catania.

Prof. Roberto Maffei, Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Milano.

Dott. Giangiacomo Beretta, Ricercatore, Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Milano.

Dott. Fabrizio Gelmini, Ricercatore, Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Milano.

