

SVILUPPO DI GEL TERMOREVERSIBILI A BASE DI ACIDO IALURONICO RETICOLATO E POTENZIALI USI NEL TRATTAMENTO DI PATOLOGIE A CARICO DELLE MUCOSE

¹F. Ronchi, ¹N. Mangano, ¹D. Ruggeri, ¹C. Ronchi

DELIM

¹Delim Cosmetics & Pharma s.r.l.
Via Achille Grandi 29, 20055 Vimodrone (MI), Italia

Persona di contatto:
federica.ronchi@delim.it

01 PREMESSA

Polimeri, solubilizzati in veicolo acquoso, capaci di andare incontro a variazioni di viscosità a seguito di cambiamenti di temperatura, sono stati ampiamente studiati in campo biomedico, farmaceutico e cosmetico. In commercio, tra i numerosi polimeri in grado di transire da soluzioni acquose a *gel-in-situ*, troviamo i polossameri [1]. Commercializzati con i nomi: Pluronic®, Synperonic®, Kolliphor®, quest'ultimi sono copolimeri a blocchi di polietilene - polipropilene glicole, e vengono generalmente impiegati come tensioattivi non ionici [2]. Tuttavia, nonostante le eccellenti caratteristiche di termoreversibilità, le soluzioni a base di polossamero mostrano una limitata capacità mucoadesiva [3]. Eccipienti addizionali, con effetto mucoadesivo, possono essere: sodio alginato, idrossipropilmetil cellulosa (HPMC), gelatina (proteina ottenuta dall'idrolisi parziale del collagene), agarosio (estratto da alghe), chitosano o acido ialuronico (HA) [4]. In particolare, nell'ultima decade risulta essere di particolare interesse l'HA per via delle sue proprietà filmogene e mucoadesive, esistenti sia quando questo si presenta in forma lineare che in forma reticolata. Si è, infatti, trovato che gel termoreversibili, contenenti un polossamero in associazione ad un acido ialuronico ad alto peso molecolare, presentano ottime qualità mucoadesive, oltre ad avere proprietà idratanti e lenitive in caso di irritazione delle mucose.

03 MATERIALI E METODI: IVRT

I quattro gel termo-reversibili da caratterizzare in termini di IVRT sono costituiti come segue:

- Preparazione A**
0,5 g di caffeina, 10,0 g di Kolliphor® P338, 0,5 g di acido ialuronico lineare con PM di circa 1Mio Da, 49,0 g di acqua.
- Preparazione B**
0,5 g di caffeina, 10,0 g di Kolliphor® P338, 0,5 g di acido ialuronico reticolato con propilbisossiammina, 49,0 g di acqua.
- Preparazione C**
0,5 g di caffeina, 10,0 g di Kolliphor® P338, 49,5 g di acqua. Assenza di acido ialuronico.
- Preparazione D**
0,5 g di caffeina, 10,0 g di Kolliphor® P338, 0,5 g di acido ialuronico reticolato con pantenolo, 49,0 g di acqua.

Tabella 1. Set-up del metodo analitico

Apparecchio	HPLC: 1100 series, Agilent
Colonna	C18 (BDS Hypersil™, ThermoScientific, 15 cm x 4.0 mm; 5 µm)
Software	Openlab, Agilent
Fase Mobile	Metanolo, acqua, acido acetico glaciale (300:699:1)
Temperatura della colonna	30°C
Lunghezza d'onda	275 nm
Volume d'iniezione	5 µL
Flusso	0.8 mL/min
Tempo di corsa	5min

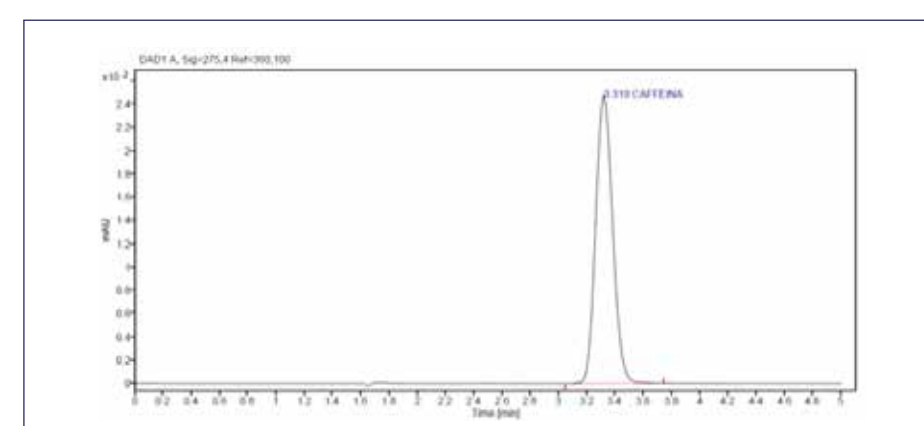


Figura 1. Profilo cromatografico della caffeina

Apparecchio	HDT 1000, Copley
Tipo di membrana	PES
Temperatura	37 ± 0.5°C misurati in ciascuna cella
Agitazione	450 rpm
Tempi di prelievo	0.25; 0.5; 1 ora
Dose	150 mg/1.77 cm2 >>> 84.75 mg/cm2

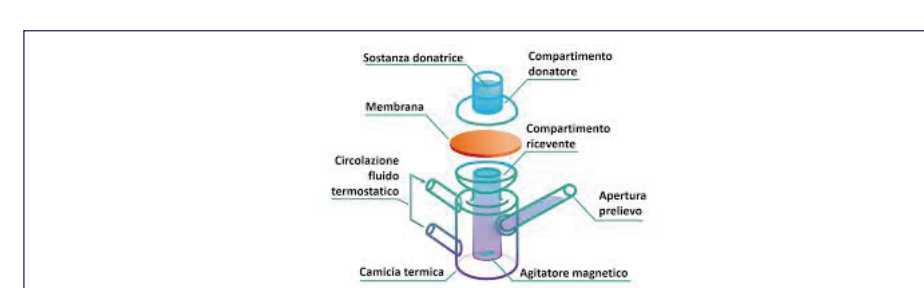


Figura 2. Cella di Franz

Sulla base dei risultati ottenuti da test preliminari di solubilità, il medium selezionato come ricevente è costituito da glicole esilenico: acqua 30:70 p/p, in quanto capace di rispettare le condizioni 3 volte- sink.

05 MATERIALI E METODI: SALIVA ARTIFICIALE

Una volta verificato il vantaggio dell'uso combinato di polossamero- acido ialuronico reticolato, è stato sviluppato un prototipo di saliva artificiale per il trattamento di patologie legate al cavo orale; una tra queste è la xerostomia o secchezza delle fauci. La saliva viene secreta a una velocità compresa tra 0,3 e 7,0 mL/min; tuttavia, in una persona sana, il flusso salivare può raggiungere una media di 1-1,5 L al giorno, ma durante il sonno il flusso può scendere fino a 0 mL/min [5]. Sia la quantità che la qualità dei componenti salivari dipendono dal ritmo circadiano, come pure dall'attività e dalla stimolazione delle varie ghiandole salivari, dall'età, sesso e gruppo sanguigno del paziente, nonché da stimoli fisiologici [6]. Una delle funzioni principali delle ghiandole salivari è quella di fornire un flusso continuo di saliva nella cavità orale per mantenere la mucosa in uno stato d'idratazione tale che sia meno suscettibile ad abrasione, facilitando la rimozione dei microrganismi, delle cellule epiteliali desquamate, dei leucociti e anche dei residui di cibo durante il processo della deglutizione [7]. Da sottolineare che il grado di idratazione individuale è il fattore più importante che interferisce con la secrezione salivare. Quando il contenuto di acqua corporea si riduce dell'8%, il flusso salivare diminuisce virtualmente fino allo zero. Durante la deidratazione, per conservare al loro interno l'acqua, le ghiandole salivari cessano di secernere saliva [8].

Esempio di saliva artificiale:

Componenti	% p/p
Polaxamer® P 338	15.0
Potassio Sorbato	0.2
Acido ialuronico reticolato (±1 Mio Dalton)	0.5
Acqua depurata	q.b. a 100

A questa struttura formulativa possono essere aggiunti principi attivi (es. clorexidina) o sostanze funzionali (es. aloe vera), qualora si volesse un'aggiuntiva azione antinfiammatoria, decongestionante o emolliente.

02 SCOPO

Lo scopo del seguente studio è quello di dimostrare che la presenza dell'acido ialuronico associato al polossamero è in grado di controllare il rilascio di principi attivi o di sostanze funzionali contenuti nel gel stesso. Inoltre, la presenza di un acido ialuronico reticolato è in grado di rallentare ulteriormente il rilascio di questi principi attivi / sostanze funzionali, rispetto ad un avente catene lineari, a parità di quantità totale rilasciata nel tempo. Lo studio effettuato prevede un in-vitro-release-test di una sostanza "tracciante" come la caffeina, solubilizzata e messa in associazione a un polossamero (Kolliphor® P338) e a diversi tipi di acido ialuronico lineare e reticolato. Il profilo di rilascio viene poi comparato con una soluzione in cui l'acido ialuronico non è incluso. Successivamente, l'associazione di polossamero a differenti tipi di acido ialuronico reticolato è stata studiata per il trattamento di mucose irritate, infiammate, lesionate, come nel caso di xerostomia, vaginite, ragadi anali, cistite interstiziale, ecc. Si descrive, infine, un prototipo di saliva artificiale quale esempio di questa tecnologia termoreversibile e mucoadesiva.

04 RISULTATI: IVRT

La preparazione C che non contiene alcun acido ialuronico è quella che trattiene meno la caffeina, la quale viene rilasciata più velocemente.

La preparazione B contenente acido ialuronico reticolato con propilbisossiammina ha un'efficienza di ritenzione leggermente superiore a quella della preparazione A contenente acido ialuronico lineare (-3%), al termine della prima ora.

La preparazione D contenente acido ialuronico reticolato con pantenolo in un'ora rilascia quantità di caffeina decisamente inferiori rispetto alle altre formulazioni (circa -20% della formulazione priva di acido ialuronico; - 9% della formulazione contenente acido ialuronico lineare).

La quantità totale di caffeina rilasciata da tutte e quattro le formulazioni si eguaglia, raggiungendo circa il 100% della quantità teorica, dopo quattro ore dall'inizio del test.

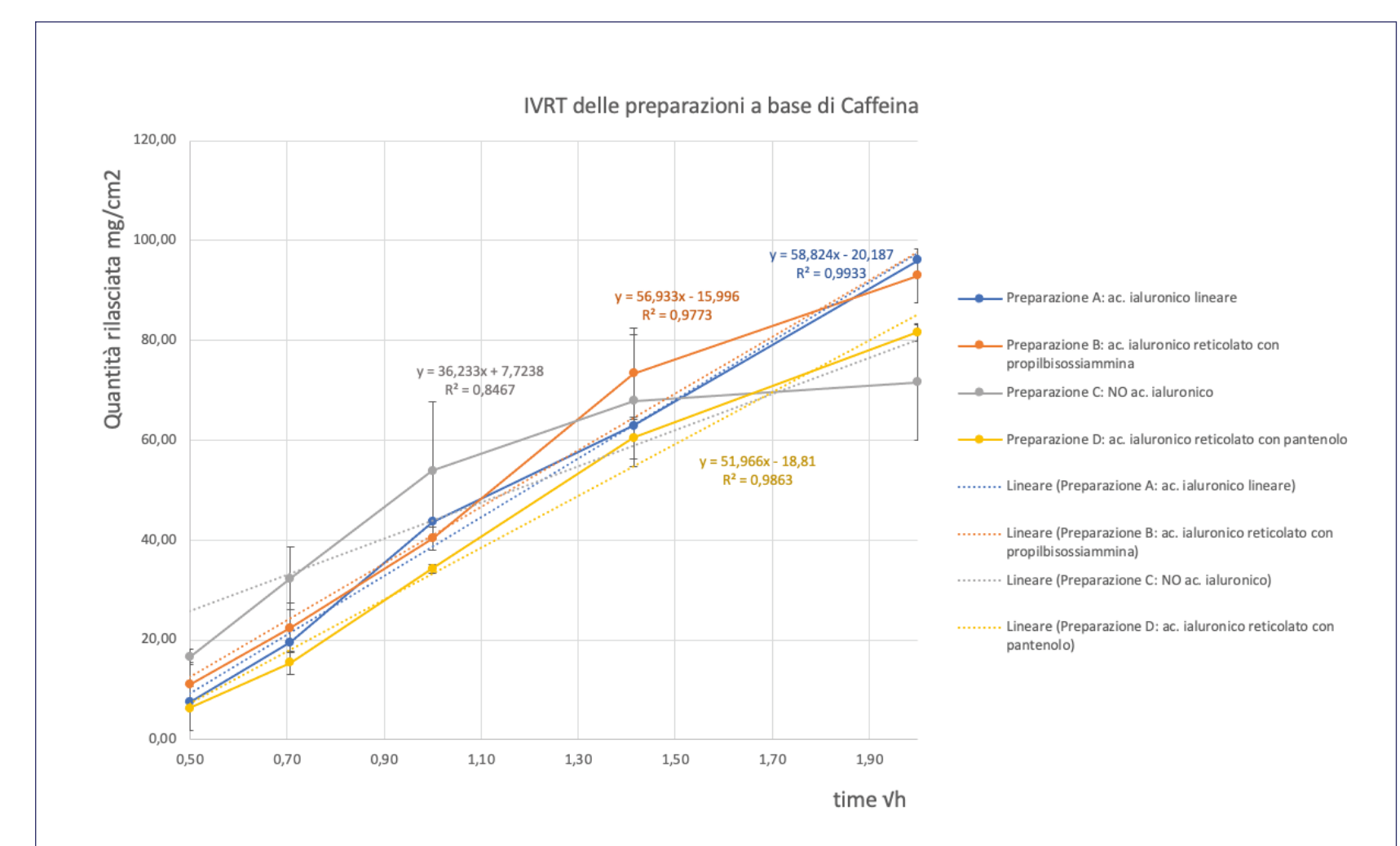


Figura 3. Profilo di rilascio della caffeina dai 4 gel termoreversibili

Questo test conferma, quindi, la capacità dell'associazione polossamero-acido ialuronico di rallentare il rilascio della caffeina dalla formulazione; l'effetto 'tardivo' viene poi esaltato nel caso in cui l'acido ialuronico utilizzato sia nella forma reticolata.

06 RISULTATI: SALIVA ARTIFICIALE

La resistenza di un materiale a fluire viene misurata attraverso la viscosità. Quest'ultima viene influenzata da differenti fattori, come ad esempio: dimensione delle molecole, forze intermolecolari, composizione chimica e struttura fisica del corpo. Inoltre, la viscosità è strettamente dipendente dalla temperatura. Il prototipo della saliva viene analizzato in termini di viscosità sia a 25°C che a 37°C a conferma del cambiamento di stato da soluzione a gel.

Un'altra analisi volta a dimostrare il cambiamento di stato della preparazione da soluzione a gel è "l'oscillatory ramp temperature", la quale permette l'identificazione del punto di cross-over. Il punto di cross-over è la temperatura alla quale il modulo viscoso G', inizialmente predominante, viene eguagliato dal modulo elastico G". Analizzando la formulazione, la temperatura di cross-over è risultata pari a 34°C, dimostrando che l'aumento di viscosità avviene sicuramente alla temperatura riscontrata nelle mucose (circa 37°C).

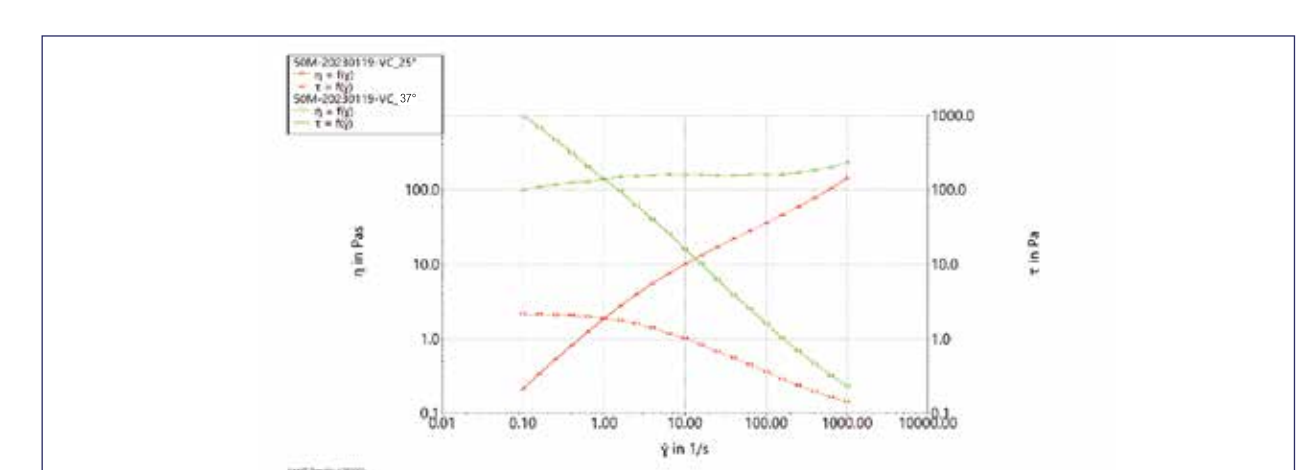


Figura 4. Viscosità della saliva artificiale a 25°C e 37°C

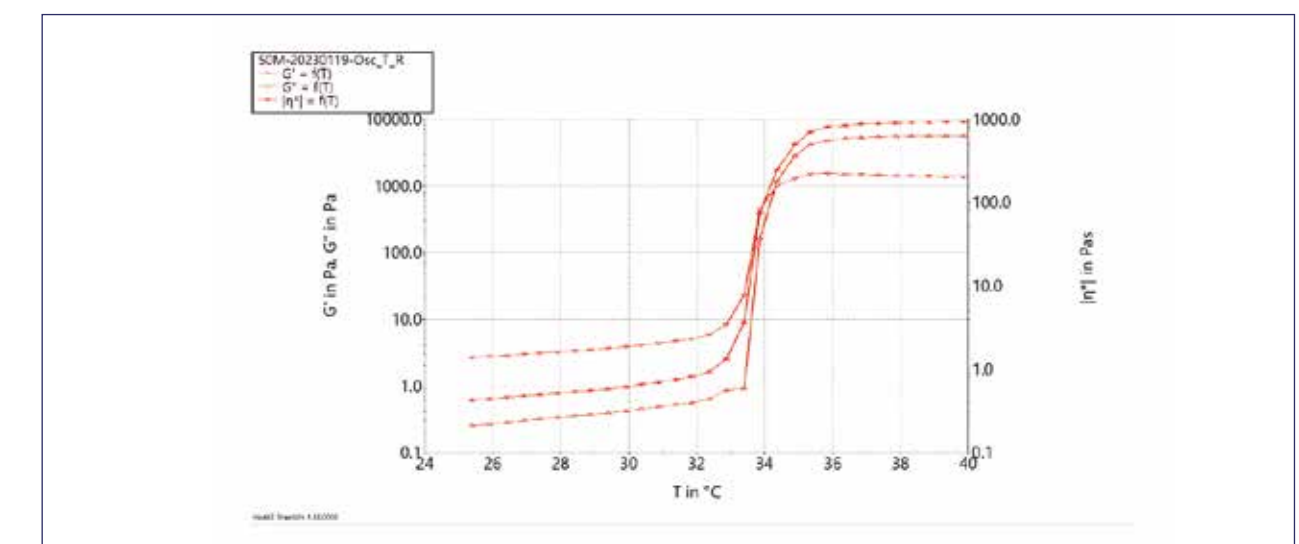


Figura 5. Oscillatory ramp temperature della saliva artificiale

07 CONCLUSIONI

Dai dati esposti, l'associazione polossamero- acido ialuronico reticolato risulta promettente per il trattamento di patologie locali a carico delle mucose. La piattaforma termoreversibile-mucoadesiva può essere quindi sfruttata per trattamento di altre patologie quali vaginite, ragadi anali, cistite interstiziale, ecc.

Bibliografia:

- [1] B. Jeong et al., Thermosensitive sol- gel reversible hydrogels, *Advanced Drug Delivery Review* 64 (2012), 154-162.
- [2] P. Alexandridis and T.A. Hatton, Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling, *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 96 (1995) 1-46.
- [3] Y. Yuan et al., Thermosensitive and mucoadhesive in situ gel based on poloxamer as new carrier for rectal administration of Nimesulide, *International Journal of Pharmaceutics* 430(2012) 114-119.
- [4] K.Y. Cho et al., Release of ciprofloxacin from poloxamer-graft-hyaluronic acid hydrogels in vitro, *International Journal of Pharmaceutics* 260 (2003) 83-91.
- [5] Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 2001; 85: 162-9.
- [6] Ship JA, Fox PC, Baum BJ. How much saliva is enough - normal function defined. *J Am Dent Assoc* 1991; 122:63-9.
- [7] Dawes C. Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol* 1972; 220:529-45.
- [8] Ramasubbu N, Thomas LM, Bhandary KK, Levine MJ. Structural characteristics of human salivary statherin: a model for boundary lubrication at the enamel surface. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4:363-70.