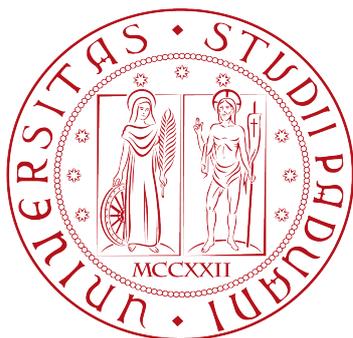


**Università degli studi di Padova**

Facoltà di Ingegneria



Tesi di Laurea

**DISPOSITIVI RIASSORBIBILI  
A RILASCIO CONTROLLATO DI ANESTETICO  
PER IL TRATTAMENTO DEL DOLORE POST-OPERATORIO**

Corso di Laurea Triennale in  
**INGEGNERIA BIOMEDICA**

Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione  
Dipartimento di Ingegneria Industriale

Laureanda: **Maria Laura Magrini**

Relatore: **Andrea Bagno**

28 Marzo 2013

A.A. 2012-2013

*A chi crede che anche piccoli passi  
possono portare lontano...*



# INDICE

<b>Abstract</b> .....	6
<b>Introduzione</b> .....	8
<b>CAPITOLO 1. Il problema</b> .....	10
1.1 Il dolore post-operatorio e il suo attuale trattamento.....	10
1.2 Problemi e complicazioni.....	11
<b>CAPITOLO 2. Dispositivi a rilascio controllato di farmaco: definizione e scopi</b> .....	15
<b>CAPITOLO 3. I materiali</b> .....	18
3.1 I polimeri biodegradabili.....	18
3.2 Polimeri per sistemi a rilascio controllato di farmaco.....	19
3.2.1 Acido poliglicolico (PGA).....	19
3.2.2 Acido polilattico (PLA).....	21
3.2.3 Acido poliattico-co-glicolico (PLGA).....	22
3.2.4 Policaprolattone (PCL).....	23
3.2.5 Altri polimeri.....	23
3.3 Metodi di produzione.....	24
3.4 Processi di biodegradazione dei polimeri.....	25
3.5 Biocompatibilità.....	29
<b>CAPITOLO 4. I formati</b> .....	32
4.1 Introduzione.....	32
4.2 Microcapsule e nanocapsule.....	32
4.3 Strutture multistrato.....	35
4.4 Matrici e carrier.....	37
<b>CAPITOLO 5. Farmaci e cinetica di rilascio</b> .....	39
5.1 Introduzione.....	39
5.2 Anestetici locali (AL) e loro caratteristiche.....	40

5.3 Cinetica di rilascio del farmaco.....	42
5.3.1 Il profilo di rilascio ideale.....	43
5.3.2 I meccanismi di rilascio.....	45
5.3.3 Fattori che influenzano la cinetica di rilascio.....	46
5.3.3.1 Fenomeni chimico-fisici.....	47
5.3.3.2 Proprietà chimico-fisiche del dispositivo.....	48
<b>CAPITOLO 6. Studi <i>in vivo</i>.....</b>	<b>53</b>
<b>Conclusioni.....</b>	<b>59</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>62</b>



## ABSTRACT

Attualmente il trattamento del dolore post-operatorio prevede tempi di degenza molto lunghi. Per gli interventi più invasivi si raggiungono soglie di dolore così elevate da rendere necessario, a seguito dell'operazione, il prolungamento del ricovero del paziente, che deve essere intubato e sedato e subire continue infusioni di anestetico attraverso cateteri e pompe. Questo tipo di somministrazione tuttavia è spesso causa di varie complicazioni quali infezioni o problemi relativi al posizionamento del catetere, che possono portare all'interruzione dell'effetto terapeutico. Un ulteriore problema consiste nel fatto che i farmaci utilizzati per l'anestesia locale presentano un picco di concentrazione iniziale molto alto: disperdendosi rapidamente nell'organismo, non hanno un effetto molto duraturo; sono dunque necessarie continue infusioni che determinano un livello molto alto di anestetico nel plasma con conseguenti effetti tossici. Una terapia del dolore di questo tipo richiede inoltre ingenti costi da parte delle strutture ospedaliere.

Per far fronte a questi problemi si studiano attualmente sistemi impiantabili e riassorbibili in grado di rilasciare l'anestetico solo localmente ed in maniera autonoma, e tali che l'effetto anestesilogico abbia la durata necessaria per limitare il dolore acuto post-operatorio. Con un tale trattamento diminuisce il rischio di infezioni, vengono ridotti gli effetti tossici dovuti ad alte dosi di farmaco e non risulta necessaria una procedura chirurgica per la rimozione del dispositivo. La soluzione che verrà esaminata in questa sede consiste nei sistemi a rilascio controllato di anestetico realizzati con polimeri biodegradabili: verranno analizzati i materiali, i formati e i meccanismi di rilascio di farmaco relativi agli studi più recenti, e citate alcune sperimentazioni *in vivo*.



## **INTRODUZIONE**

Il dolore svolge un'importante funzione biologica: serve a segnalare l'esistenza di un danno o un'anomalia presente nel nostro organismo. Esso è il frutto di una serie di fattori di tipo patologico, psicologico e genetico e necessita di una profonda conoscenza per essere adeguatamente trattato. Proprio per le sue molteplici e spesso incognite cause, il trattamento del dolore deve confrontarsi con numerosi problemi che limitano fortemente il suo controllo.

L'obiettivo della terapia post-operatoria è ridurre o eliminare il dolore acuto con il minor numero possibile di effetti collaterali e nel modo più efficiente dal punto di vista economico [1]. Vari metodi sono stati utilizzati nei passati decenni, tuttavia alcuni problemi risultano ancora irrisolti: la durata dei farmaci per anestesia resta limitata, gli effetti collaterali sono molto frequenti, inoltre la lunga degenza e le attuali tecniche per il trattamento del dolore portano a costi elevati per le strutture sanitarie. I più recenti studi in campo medico tentano di offrire una soluzione a questi problemi: i sistemi riassorbibili a rilascio controllato di farmaco sembrano essere i migliori candidati per un nuovo tipo di gestione del dolore post-operatorio.



## CAPITOLO 1. Il problema

### 1.1 Il dolore post-operatorio e il suo attuale trattamento

Attualmente il dolore viene trattato in base al tipo di operazione subita e alla conseguente soglia del dolore prevista. Secondo l'American Society of Anesthesiologists, il dolore acuto nel periodo post-operatorio è definito come “dolore presente nel paziente sottoposto a procedura chirurgica causato dalla malattia preesistente, dalla stessa procedura chirurgica o da entrambe” [2].

Nella gestione del dolore post-operatorio, fino ad oggi si sono seguite diverse strade a seconda del tipo di intervento subito, delle necessità del paziente e delle innovazioni attuate in campo medico. Normalmente gli anestetici vengono somministrati per via enterale, parenterale, peridurale, intratecale o transdermica [1]. Attualmente il metodo più avanzato ed ampiamente utilizzato per un intervento che comporta un dolore acuto post-operatorio prevede che il paziente rimanga sedato ed intubato e che gli venga somministrato anestetico locale tramite una pompa elastomerica che infonde il farmaco attraverso un catetere intratecale o epidurale. La pompa elastomerica (Figura 1.1) è un dispositivo monouso per l'infusione continua di farmaci in soluzione, a velocità costante e preimpostata. È costituita da un palloncino-serbatoio in materiale elastico che esercita sul fluido in esso contenuto una pressione costante; tale fluido viene spinto lungo una linea d'infusione sottocute, intorno ad un plesso, in un'articolazione o in epidurale [3].



**Figura 1.1.** Esempio di pompa elastomerica per l'infusione di anestetico (*Infusor® Baxter*).

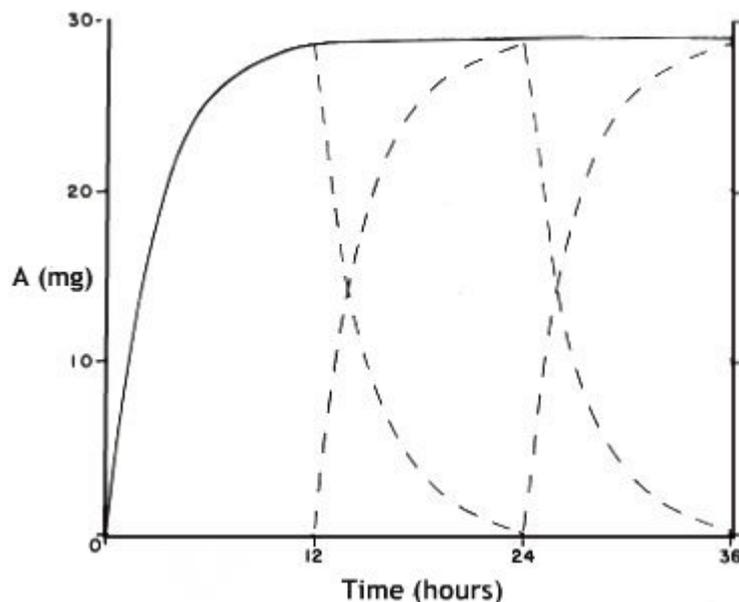
I cateteri posizionati per l'infusione continua possono prolungare la durata dell'effetto

del farmaco rispetto alle normali iniezioni. Tuttavia, possono essere difficili da posizionare, necessitano di un continuo monitoraggio, e lasciano aperta una via sulla cute che può essere causa di infezioni. Inoltre, nonostante le pompe richieste siano poco costose, è stato stimato che il loro utilizzo a lungo termine comporta alti costi [4]. Verranno elencate nel seguito alcune complicazioni di questo tipo di gestione.

## 1.2 Problemi e complicazioni

Nella scelta di un trattamento post-operatorio, devono essere considerati tutti i rischi che esso può comportare e rapportati adeguatamente con i benefici di cui potrebbe godere il paziente. Le normali tecniche di infusione di anestetico presentano molti fattori di rischio legati al tipo di trattamento seguito, al farmaco utilizzato e ad altre cause.

Uno dei problemi principali, comune ad ogni tipo di trattamento, consiste nel fatto che il farmaco somministrato al paziente presenta un picco di concentrazione iniziale molto alto (come si può osservare in Figura 1.2). La durata del suo effetto per una singola somministrazione resta perciò molto limitata, rendendo necessarie continue infusioni di farmaco per garantire l'anestesia. Questo comporta alte dosi di anestetico nel plasma, con conseguenti effetti tossici per il paziente.



**Figura 1.2.** Esempio di cinetica di rilascio con eliminazione veloce per infusione di farmaco ogni 12 ore. La linea continua indica il livello di farmaco nel plasma, quelle tratteggiate indicano le successive dosi somministrate. Si può notare il picco iniziale di concentrazione per ogni infusione.

Il dolore è oggi trattato utilizzando varie classi di farmaci: anti-infiammatori non steroidei (FANS), oppioidi, steroidi, anestetici locali e altri adiuvanti. Per il dolore acuto

post-operatorio il farmaco più ampiamente utilizzato è la morfina, un oppiaceo che garantisce un'emivita di 2-3 ore e un effetto di anestesia generale, non localizzata. Considerata anche la necessità, secondo le attuali tecniche, di alte dosi di farmaco, gli effetti collaterali associati ad esso non sono affatto trascurabili. I più importanti sono gli effetti respiratori quali ostruzione delle vie aeree, riduzione della frequenza respiratoria, cambiamenti della  $PO_2$ ,  $PCO_2$ , e della saturazione di ossigeno, che rendono necessaria la somministrazione di ossigeno postoperatoria con conseguenti ulteriori disagi per il paziente.

Un metodo molto usato oggi a seguito di interventi che prevedono un dolore acuto post-operatorio è l'anestesia tramite catetere e pompa intratecale. Questa terapia, essendo molto invasiva, presenta numerose possibili complicazioni associate alla stessa procedura con cui si esegue il trattamento. Un problema da considerare è la necessità di ricaricare il serbatoio contenente il farmaco: questa azione deve essere effettuata in condizioni totalmente asettiche poiché esiste il rischio che dei batteri si introducano nello spazio subaracnoideo, provocando una contaminazione del farmaco e portando ad infezioni del tessuto nervoso quali meningite [5]. Il tipo di infezione più comune si manifesta tuttavia all'entrata del catetere nella cute [6].

Adeguate precauzioni devono essere prese anche per evitare l'iniezione di aria nel serbatoio poiché piccoli volumi d'aria possono portare alla formazione di bolle all'interno del catetere interrompendo così il rilascio del farmaco da parte del dispositivo.

Un ulteriore rischio consiste in un'inavvertita iniezione di soluzione nei tessuti sottocutanei, che può portare ad overdose farmacologica e morte, in particolare se sono utilizzate alte dosi di bupivacaina (un anestetico locale). Un'overdose di anestetici locali infatti risulta molto più pericolosa rispetto ad una causata da farmaci oppiacei poiché può portare a crisi epilettica, collasso circolatorio o arresto cardiaco [5].

Possono verificarsi anche complicazioni di tipo meccanico: le più frequenti riguardano la connessione adattatore/connettore. Questo collegamento può interrompersi, o il catetere diventare più fragile nel tempo rompendosi in corrispondenza del connettore. Il secondo problema più comune è lo spostamento del catetere che può persino fuoriuscire dallo spazio epidurale o intratecale [6].

Da quanto detto si evince che il paziente che ha subito un intervento importante si trova a dover seguire un trattamento ancora invasivo e ad essere esposto a possibili infezioni e complicazioni legate alla procedura medica, oltre al rischio di effetti collaterali dovuti ai vari farmaci che gli vengono somministrati. Un decorso post-operatorio di questo tipo allunga la degenza in ospedale con conseguenti disagi per il paziente e aumento di costi per

la struttura sanitaria.

Da un punto di vista teorico, la soluzione ottimale per evitare overdose farmacologica sarebbe quella di somministrare un anestetico in grado di agire solo localmente e di rilasciare autonomamente il farmaco necessario in maniera controllata, senza picchi di concentrazione iniziale. La ricerca sta proseguendo oggi in questo senso: si studia la realizzazione di dispositivi a rilascio controllato di anestetico impiantabili e riassorbibili. Questi sarebbero in grado di ridurre il rischio di infezioni, gli effetti tossici e di evitare il ricorso ad una seconda procedura chirurgica per la loro estrazione grazie alla loro proprietà di riassorbibilità.



## CAPITOLO 2. Dispositivi a rilascio controllato di farmaco: definizione e scopi

Un CDDS (*Controlled Drug Delivery System*), o semplicemente DDS, è un sistema in grado di garantire un rilascio controllato di uno o più farmaci nell'organismo in modo temporale, spaziale o entrambi. Gli obiettivi di un tale dispositivo sono:

- mantenere il farmaco in azione nel corpo ad un livello predeterminato, minimizzando gli effetti collaterali associati alla cinetica di rilascio;
- localizzare il sito d'azione del farmaco attraverso il posizionamento di un sistema a rilascio controllato, adiacente o sovrastante il tessuto o l'organo leso;
- caratterizzare l'azione del farmaco utilizzando carrier o derivati chimici per indirizzarlo ad un particolare tipo di cellule [7].

Un DDS presenta inoltre il vantaggio di facilitare la diffusione del farmaco in aree interne del corpo e rende possibile la somministrazione *in vivo* di farmaci a breve durata. Una tale gestione del dolore riduce i costi della terapia e migliora la *compliance* del paziente, intesa come disponibilità ad accettare il trattamento e ad adeguarsi ad esso [1].

In relazione alla concentrazione di farmaco nel sangue che un DDS può garantire, si possono distinguere tre classi.

- I classe: consente un rilascio costante in un periodo di tempo esteso ed è utilizzata quando è necessario un livello stabile di farmaco nel sangue. Un'importante sottoclasse è costituita dai dispositivi impiantabili che verranno discussi in seguito nel dettaglio;
- II classe: caratterizzata da un rilascio ciclico di farmaco, cioè a differenti livelli di concentrazione in relazione ai bisogni del paziente;
- III classe: raccoglie tutti quei dispositivi che garantiscono un rilascio di farmaco in risposta ad un “trigger” derivante dall'ambiente circostante come il pH, la temperatura o altri eventi esterni [1].

In questa sede si analizzeranno solo dispositivi della prima classe, più in particolare sistemi impiantabili e biorisorbibili.

Un DDS impiantabile deve essere realizzato con un *materiale* in grado di soddisfare alcuni requisiti fondamentali:

- compatibilità con l'ambiente biologico in modo da non provocare allergie, rigetti o formazioni carcinogene;
- reperibilità e disponibilità;

- economicità.

I *sistemi a rilascio controllato* derivanti da questo materiale devono essere:

- meno disagiati possibile per il paziente;
- capaci di contenere alti livelli di farmaco;
- pratici da impiantare, gestire e rimuovere;
- semplici da fabbricare;
- pratici da sterilizzare.

Generalmente, i DDS impiantabili possono consistere di una pompa o presentarsi in forma di impianto. Le pompe sono guidate meccanicamente o elettronicamente da macchinari che controllano il rilascio. Gli impianti, invece, sono dispositivi basati su un materiale capace di controllare autonomamente la cinetica di rilascio del farmaco contenuto. I materiali utilizzati per produrre i dispositivi impiantabili possono essere biodegradabili o non biodegradabili: in questa sede verranno esaminati solo quelli del primo tipo.



## CAPITOLO 3. I materiali

### 3.1 I polimeri biodegradabili

A partire dal 1970 l'approccio interdisciplinare tra scienze chimiche, biologiche e farmaceutiche ha portato all'introduzione di nuove applicazioni in campo medico grazie ad una maggior versatilità nel controllare lo stato fisico, forma, dimensioni e superficie dei polimeri. Queste nuove conoscenze hanno determinato una considerevole spinta innovativa nella progettazione e sviluppo di DDS: proprio in quegli anni è iniziato lo studio dei sistemi a rilascio controllato di farmaco riassorbibili, formati da polimeri biodegradabili. Un adeguato esame della struttura e delle proprietà di questo tipo di materiali ha portato alla messa a punto di metodi per la loro fabbricazione ed alla conseguente produzione di materiali - sintetici e non -, specifici per tipo di applicazione [8].

Un polimero è una sostanza composta dalla ripetizione di unità, dette monomeri, tenute insieme da legami covalenti e la sua macrostruttura può presentarsi in forma di catena lineare, ramificata o reticolata. Ha generalmente un elevato peso molecolare, da cui il nome di macromolecola. A seconda della composizione e disposizione dei monomeri nella catena si possono avere *omopolimeri* o *copolimeri*: i primi consistono nella ripetizione della stessa unità per tutta la lunghezza della catena, i secondi possono presentare una sequenza di due o più tipi di monomero in maniera più o meno disordinata. Un materiale polimerico deriva le sue proprietà chimiche, fisiche e meccaniche dalla composizione, dalla struttura e dal peso molecolare delle catene polimeriche di cui è composto [9]. I polimeri possono essere di origine naturale (come polisaccaridi, acidi nucleici o proteine) o sintetica (come polietilene (PE) e Teflon).

Tipicamente si definisce “degradabile” un polimero che si degrada durante la sua applicazione o immediatamente in seguito ad essa; al contrario un materiale “non degradabile” richiede un tempo molto più lungo per la degradazione rispetto alla durata della sua applicazione [10].

I polimeri biodegradabili offrono numerosi vantaggi:

- chimicamente, sono spesso inerti in ambiente biologico e garantiscono un grado minore di tossicità rispetto ai materiali non biodegradabili;
- si degradano spontaneamente all'interno del corpo consentendo così di essere facilmente assorbiti o eliminati, evitando il ricorso alla chirurgia per la loro rimozione e diminuendo di conseguenza il disagio per il paziente;
- possono essere progettati in modo da consentire un adeguato controllo sulla cinetica

di rilascio del farmaco.

Sebbene per i primi sistemi riassorbibili a rilascio controllato si siano utilizzati polimeri di origine naturale e semi-sintetica, i polimeri sintetici si sono dimostrati col tempo molto più adatti a questo tipo di applicazioni poiché essendo di produzione non naturale, è possibile esercitare un maggior controllo sul loro profilo di degradazione e sulle loro funzionalità. I poliesteri sono i materiali maggiormente studiati in questo campo a causa della presenza del legame estereo nel loro scheletro, che può essere idrolizzato in ambiente biologico. I più utilizzati sono: acido poliglicolico, acido polilattico e acido polilattico-co-glicolico [11].

### 3.2 Polimeri per sistemi a rilascio controllato di farmaco

In Tabella 3.1 sono indicati i principali polimeri biodegradabili utilizzati per la produzione di DDS; verranno descritti di seguito i più importanti.

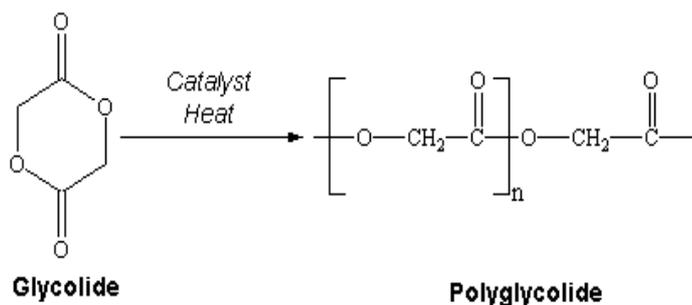
<b>Classificazione</b>	<b>Polimero</b>
<b><i>Polimeri naturali</i></b>	
Formati da proteine	Collagene, albumina, gelatina
Polisaccaridi	Agarosio, alginato, carragenina, acido ialuronico, destrano, chitosano, ciclodestrine
<b><i>Polimeri sintetici biodegradabili</i></b>	
Poliesteri	Acido polilattico, acido poliglicolico, poliidrossibutirrato, policaprolattone, acido polimalico, polidiossani
Polianidridi	Acido polisebacico, acido poliadipico, acido politereftalato e vari copolimeri
Poliammidi	Poliimmminocarbonati, poliamminoacidi
A base di fosforo	Polifosfati, polifosfonati, polifosfatasi
Altri	Policianoacrilati, poliuretani, poliortoesteri, poliidropropani, poliacetali

**Tabella 3.1.** *Polimeri biodegradabili utilizzati per DDS riassorbibili.*

#### 3.2.1 Acido poliglicolico (PGA)

L'acido poliglicolico (Figura 3.1) è stato il primo polimero biodegradabile sintetico utilizzato come DDS riassorbibile e impiantabile. Il suo utilizzo ha dato il via alla

progettazione di dispositivi che non necessitano di una procedura di espianto, al contrario dei sistemi basati su materiali non degradabili utilizzati in precedenza. La sua prima applicazione risale al 1962, come sutura biorassorbibile prodotta dall'American Cyanamide Company [11].



**Figura 3.1.** Acido glicolico e acido poliglicolico  $(\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2)_n$ .

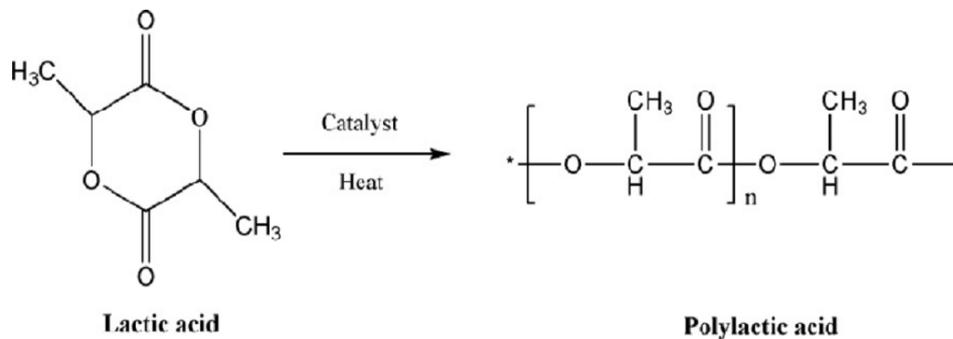
È un poliesteri alifatico ottenibile a basso costo ed in forma altamente cristallina (fino al 45-55% di cristallinità); ha un alto modulo elastico ed una bassa solubilità nei solventi organici. Come si può osservare dalla Tabella 3.2, la temperatura di transizione vetrosa è di 35-45°C, ed il punto di fusione è molto alto (più di 200°C). Perde la sua resistenza in 1-2 mesi degradandosi tramite idrolisi e subisce una perdita di massa entro 6-12 mesi. Inoltre grazie alla sua elevata cristallinità, presenta eccellenti proprietà meccaniche: utilizzato in un copolimero, rinforza la struttura del materiale più di qualsiasi altro polimero degradabile adoperato per applicazioni in campo medico [12].

Materials	Tg (°C)	Tm (°C)	Elastic Modulus (GPa)	Tensile Strength (MPa)	Tensile Elongation (%)	Degradation Time (months)
PLA	45-60	150-162	0.35-3.5	21-60	2.5-6	12-16
PLLA	55-65	170-200	2.7-4.14	15.5-150	3-10	> 24
PDLA	50-60	-----	1.0-3.45	27.6-50	2-10	6-12
PLA/PGA (50:50)	40-50	-----	1.0-4.34	41.4-55.2	2-10	3
PGA	35-45	220-233	6.0-7.0	60-99.7	1.5-20	6-12
PCL	-60 - -65	58-65	0.21-0.44	20.7-42	300-1000	> 24

**Tabella 3.2.** Alcune proprietà di PLA, PLLA, PDLA, PLGA, PGA e PCL.

### 3.2.2 Acido polilattico (PLA)

Negli ultimi quindici anni l'acido polilattico (PLA) si è affermato tra i polimeri biodegradabili maggiormente utilizzati per la produzione di impianti e dispositivi riassorbibili (Figura 3.2). Appartiene alla famiglia dei poliesteri alifatici e deriva dall'acido lattico (monomero), di origine naturale e prodotto dalla fermentazione batterica di carboidrati [13].



**Figura 3.2.** Acido lattico e acido polilattico ( $C_3H_4O_2$ )<sub>n</sub>.

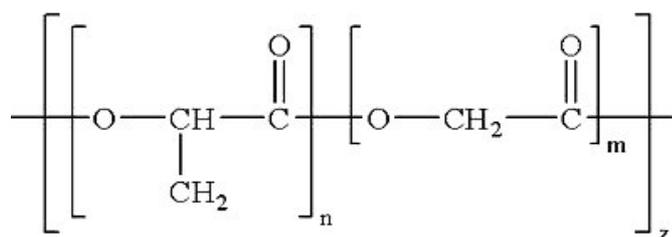
A differenza dell'acido glicolico, l'acido lattico è una molecola chirale e si presenta come enantiomero di tipo L o D. La polimerizzazione di questi monomeri porta alla formazione di polimeri semicristallini. Il polimero derivante dall'enantiomero di tipo L è il PLLA, avente un grado di cristallinità del 37%, dipendente dal peso molecolare e dal processo di produzione. Presenta una temperatura di transizione vetrosa di 55-65°C ed una temperatura di fusione di circa 175°C. Una caratteristica importante da considerare è il tempo molto lungo di degradazione, se paragonato con gli altri polimeri utilizzati come DDS riassorbibili: il PLLA impiega infatti più di un anno per degradarsi nel corpo attraverso il processo di idrolisi, e da 2 a 5 anni per essere totalmente espulso dall'organismo [14]. Questa proprietà deriva dall'elevata idrofobicità del polimero, ed è influenzata anche dal grado di porosità del materiale.

Il PDLLA (o più semplicemente PLA) deriva invece dalla polimerizzazione di una miscela di monomeri di tipo L e D; è totalmente amorfo, con una temperatura di transizione vetrosa di 45-60°C. A causa della sua natura non cristallina presenta un modulo elastico inferiore rispetto al PLLA, e per lo stesso motivo degrada più velocemente: in 1-2 mesi subisce una perdita della resistenza meccanica e in 12-16 mesi perde la massa [15]. A seconda delle specifiche applicazioni ed esigenze, si può scegliere di utilizzare PLLA o PDLLA; generalmente il polimero derivante da PDLLA non trova un grande utilizzo come DDS.

Il PLA può essere facilmente ottenuto in forma di fibre, film e fogli; è degradato a seguito di idrolisi dei legami esteri e non necessita di enzimi che catalizzino questa reazione. Proprio per questa ragione, in seguito alla fabbricazione, il polimero deve possedere un'adeguata stabilità termica per prevenire la degradazione spontanea e per mantenere le proprietà e il peso molecolare: esso infatti per temperature al di sopra dei 200°C si degrada per idrolisi, per scissione della catena principale a causa di ossidazione, e per reazioni intra o intermolecolari di trans-esterificazione. La degradazione del PLA dipende dal tempo, dalla temperatura, dalla presenza di impurità a basso peso molecolare e di catalizzatori [16].

### 3.2.3 Acido poliattico-co-glicolico (PLGA)

PLA e PGA si degradano spontaneamente in ambiente fisiologico, ma con tempi diversi: per esercitare un maggiore controllo sulla cinetica di degradazione del materiale si sono spesso accoppiati questi due polimeri, ottenendo così il copolimero più utilizzato come DDS: l'acido poliattico-co-glicolico (PLGA) (Figura 3.3). In esso il PLA è presente in uguale misura come enantiomero di tipo L o D [17].



**Figura 3.3.** Acido polilattico-co-glicolico:  $(\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2)_n (\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2)_m$ ,  $n:m=1:1$ .

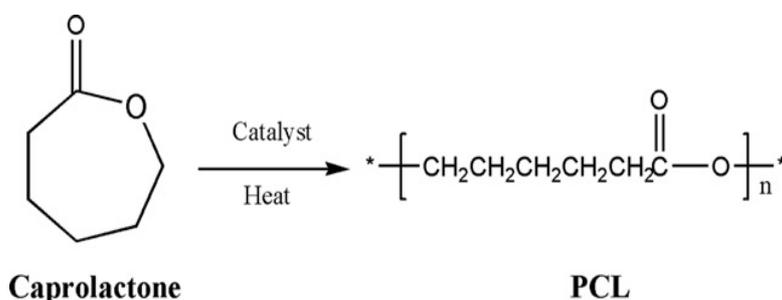
Il PLGA può essere prodotto in qualsiasi forma e dimensione ed è in grado di incapsulare molecole di ogni tipo. In ambiente acquoso si degrada per idrolisi dei legami esterei: la lunga catena polimerica si rompe in frammenti più corti, e la degradazione separa nuovamente acido lattico e glicolico che verranno poi metabolizzati dal fegato. Il tasso di degradazione è maggiore nel polimero avente un peso molecolare minore, e per una quantità maggiore di acido glicolico [18]: la presenza del gruppo metile nel PLA rende quest'ultimo più idrofobico del PGA, dunque il PLGA ricco di acido lattico è meno idrofilico, assorbe meno acqua e di conseguenza degrada più lentamente.

La resistenza meccanica, l'assorbimento di acqua, la capacità di subire idrolisi e la conseguente degradazione del polimero sono influenzate direttamente dal grado di cristallinità del PLGA, che è a sua volta dipendente dal tipo e dalle proporzioni dei singoli

monomeri nella catena polimerica. Per le specifiche applicazioni, le proprietà fisiche del PLGA dipendono da molti altri fattori come il peso molecolare, le dimensioni del dispositivo per il quale è stato progettato, forma e superficie dell'area esposta all'acqua e la temperatura alla quale è conservato [17].

### 3.2.4 Policaprolattone (PCL)

Il policaprolattone (Figura 3.4) è un poliestere alifatico semicristallino sintetizzato con un processo di polimerizzazione tramite apertura dell'anello del caprolattone. È utilizzato in alcune applicazioni come DDS per le sue proprietà di biocompatibilità e di degradazione in ambiente fisiologico. Il PCL infatti, pur subendo un processo di idrolisi molto più lento rispetto a quello del PLA, viene degradato nell'organismo grazie all'azione di enzimi. Presenta un'elevata flessibilità e processabilità e può essere ottenuto sotto forma di fibre o film.



**Figura 3.4.** Caprolattone e policaprolattone.

Il PCL è quasi sempre utilizzato per formare copolimeri con PLA: l'alta resistenza e il basso punto di transizione vetrosa del policaprolattone conferiscono al materiale finale una maggior duttilità e robustezza [13].

### 3.2.5 Altri polimeri

Altre classi di polimeri utilizzati come DDS riassorbibili sono le polianidridi e i poliortoesteri.

Le polianidridi furono utilizzate per la prima volta nel 1996 per dispositivi a rilascio controllato di farmaco dalla Food and Drug Administration, che ne caratterizzò le proprietà di degradabilità e biocompatibilità attraverso vari studi *in vivo* e *in vitro* [19]. Le polianidridi derivano da monomeri contenenti il gruppo funzionale CO-O-CO. Sono tra i polimeri che subiscono il processo di degradazione idrolitica più veloce, a causa dei loro legami alifatici nella struttura di base estremamente reattivi in presenza di acqua. Una proprietà che le ha

rese adatte per la produzione di DDS è quella di subire un'erosione di tipo superficiale (illustrata in seguito), grazie al loro elevato grado di idrofobicità combinato con la tendenza ad un veloce processo di idrolisi [12].

I poliortoesteri furono sviluppati per la prima volta dall'ALZA (Alzamer®) come polimeri idrofobici in grado di subire erosione superficiale. La caratteristica principale che li ha resi adatti per la produzione di DDS è che il meccanismo di erosione, il tasso di degradazione, la sensibilità al pH e la temperatura di transizione vetrosa possono essere controllati utilizzando tipi diversi di glicoli [20].

Le applicazioni di polianidridi e poliortoesteri come dispositivi riassorbibili per il rilascio di farmaco restano però molto limitate se confrontate con quelle relative a PLA, PGA e ai loro copolimeri.

### **3.3 Metodi di produzione**

Esistono vari metodi di sintesi per polimeri citati: i prodotti rispettivamente ottenuti si differenziano per le loro proprietà fisiche e chimiche. Per ogni differente applicazione è dunque indispensabile considerare attentamente quale sia il metodo di produzione più adatto. PLA e PGA, i principali polimeri impiegati come DDS, possono essere prodotti attraverso metodi di sintesi analoghi. Le strade da seguire sono: polimerizzazione tramite condensazione diretta, polimerizzazione azeotropica ed apertura dell'anello del glicolide/lattide.

Il primo metodo è il più semplice e meno costoso, ma non il più efficiente a causa dell'impossibilità di ottenere polimero ad alto peso molecolare. La procedura è la seguente: il monomero è riscaldato a pressione atmosferica e mantenuto ad una temperatura di 175-185°C fino a che l'acqua non cessa di separarsi per distillazione. In seguito la pressione è ridotta a 150 mmHg, mantenendo inalterata la temperatura per circa 2 ore: si è formato così il polimero. Tuttavia a causa della difficoltà nel rimuovere totalmente le molecole d'acqua dal composto di base, estremamente viscoso, il prodotto risulta avere un basso peso molecolare e di conseguenza inferiori proprietà meccaniche.

Nel metodo azeotropico il problema della rimozione dell'acqua è risolto alterando l'equilibrio tra il monomero e il polimero in un solvente organico a basso punto di ebollizione: in questo modo l'acido di base è policondensato direttamente nel relativo composto ad alto peso molecolare. Questa tecnica utilizza un'intensa attività di catalisi, e l'acqua come prodotto di scarto è rimossa in condizioni azeotropiche (evapora dalla soluzione) [13].

Il metodo più utilizzato è la polimerizzazione tramite apertura dell'anello di glicolide/lattide, il diestere ciclico dell'anello del glicolide/lattide. Questa tecnica prevede di aggiungere al diestere un catalizzatore: mantenendo il tutto in atmosfera di azoto ad una temperatura di 195°C per 2 ore, ed alzando infine la temperatura a 230°C, dopo mezz'ora il processo risulta terminato e si è ottenuto il polimero ad alto peso molecolare [11]. Quest'ultimo metodo, brevettato da Cargill nel 1992, è tuttora il più diffuso [13].

### **3.4 Processi di biodegradazione dei polimeri**

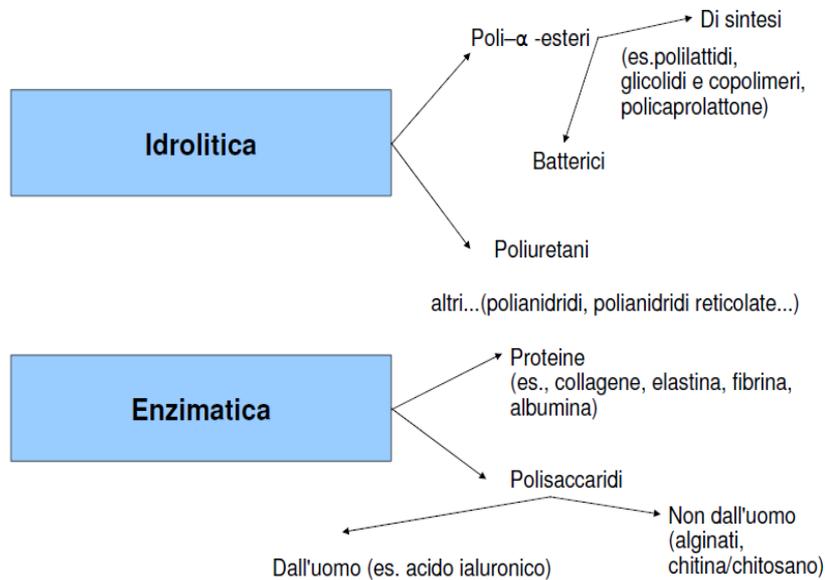
Una delle caratteristiche principali per un DDS riassorbibile è la capacità di degradarsi in ambiente fisiologico. Oltre alla considerazione delle proprietà del materiale scelto è dunque indispensabile non prescindere da una valutazione dell'ambiente in cui il dispositivo andrà ad operare: è proprio l'interazione tra questi due campi il fattore che determina il processo di degradazione del polimero.

Le proprietà che necessitano di essere valutate per un polimero utilizzato come DDS includono il peso molecolare, la sua capacità di adesione al tessuto interno del corpo, la solubilità basata sul meccanismo di rilascio e il suo sito d'azione. Le proprietà superficiali determinano anche la capacità di assorbimento dell'acqua da parte del materiale che porta al fenomeno di degradazione. Queste caratteristiche peculiari per tipo di polimero, possono essere ampliate e migliorate attraverso mezzi chimici, fisici e biologici [8].

È importante considerare dapprima la differenza tra due fenomeni importanti: la *degradazione* è un processo chimico che consiste nella scissione della catena polimerica per formare dapprima oligomeri e poi monomeri; il termine *erosione* invece indica un fenomeno fisico che consiste nella perdita di massa dovuta a monomeri e oligomeri che si staccano dal polimero, e dipendente dai processi di dissoluzione e diffusione di molecole d'acqua all'interno del materiale [21].

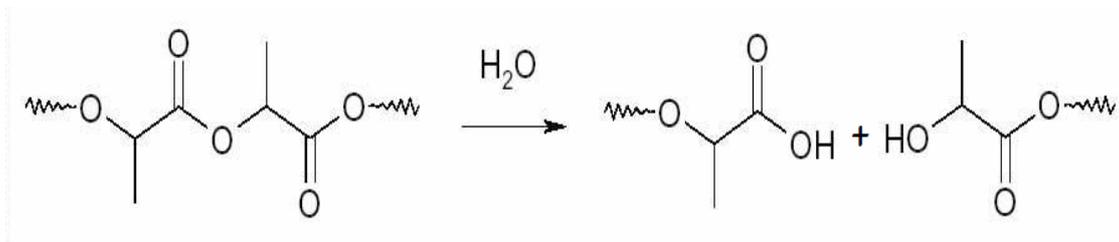
Il corpo umano è un ambiente acquoso altamente aggressivo, la cui temperatura è stabilizzata a 37°C ed il cui pH è mantenuto ad un valore medio pari a 7.4: in queste condizioni, a seconda della loro natura, i polimeri sono soggetti a due processi diversi: degradazione passiva tramite idrolisi, o attiva attraverso l'azione di enzimi. Quest'ultima opzione è l'unica disponibile per i polimeri di origine naturale presenti nel nostro organismo, come polisaccaridi e proteine mentre per quelli di origine sintetica la strada è principalmente quella dell'idrolisi, anche se in alcuni casi gli enzimi presenti nel nostro corpo possono fungere da catalizzatori per la reazione di degradazione [22].

In Figura 3.5 è rappresentato uno schema che indica la via di degradazione per alcuni tipi di polimeri: si può notare come la maggior parte dei polimeri utilizzati come DDS (PLA, PGA ecc.) subisca idrolisi.



**Figura 3.5.** Modi di biodegradazione dei polimeri.

L'idrolisi consiste nella scissione della catena polimerica dovuta alla rottura di alcuni legami per la presenza di molecole d'acqua; il processo avviene in due fasi: si inizia con la diffusione delle molecole di acqua all'interno del polimero, cui segue l'effettiva degradazione per scissione idrolitica. Durante questo processo il materiale subisce sostanziali riduzioni delle sue proprietà meccaniche e, a causa del processo di erosione, diminuiscono la sua massa ed il suo volume fino alla sua completa estinzione [21]. Un esempio è riportato in Figura 3.6.



**Figura 3.6.** Processo di idrolisi.

Il parametro più importante con il quale solitamente si misura il tasso di degradazione è la percentuale di peso molecolare perduto (weight loss, WL%), stimata dalla relazione:

$$WL\% = 100(W_0 - W_f) / W_f \quad [23]$$

dove  $W_0$  e  $W_f$  sono rispettivamente i pesi iniziali e finali del campione.

Ci sono vari fattori che influenzano la velocità della reazione di idrolisi: i più determinanti sono il tipo di legame chimico, il pH, la composizione del copolimero e la capacità di assorbimento di acqua da parte del polimero.

Il tipo di legame chimico è l'elemento che determina maggiormente la velocità di degradazione. Vi sono varie scale di reattività: anidridi e ortoesteri sono i più reattivi (vengono degradati più velocemente), seguiti da esteri e ammidi. Bisogna tuttavia tener conto del fatto che questi diversi livelli di reattività possono cambiare in modo sostanziale a causa di azioni di catalisi, alterazioni di altri componenti chimici in prossimità dei gruppi funzionali, o effetti sterici (intesi come fenomeni prodotti dalla repulsione elettrostatica tra le nubi elettroniche di più molecole vicine). L'influenza dell'effetto sterico può essere osservata nei poli-idrossiesteri: un esempio è la lentezza nella degradazione dell'acido polilattico, dovuta in parte anche al suo voluminoso gruppo alcolico che ostacola l'attacco dell'acqua.

Introducendo un secondo tipo di monomero nella catena polimerica possono cambiare molte proprietà del polimero di partenza: nei copolimeri di PLGA la riduzione del peso molecolare in seguito all'idrolisi è molto più veloce se nel materiale è presente un contenuto maggiore di acido glicolico [21].

Il grado di cristallinità è anch'esso un fattore cruciale poiché i domini cristallini, essendo meno permeabili alla penetrazione di acqua, rallentano il processo di idrolisi. [23] Tuttavia se si prende in considerazione la degradazione del PGA, altamente cristallino (45-55% di cristallinità), si nota che essa è più lenta di quella del PLA, che si presenta in forma amorfa: la degradazione più veloce del PGA dipende infatti in misura maggiore dalla sua struttura chimica piuttosto che dal grado di cristallinità. Questo indica che ogni singola proprietà non può essere considerata a sé stante poiché si potrebbe giungere a considerazioni errate, ma deve essere adeguatamente pesata in relazione a tutte le altre.

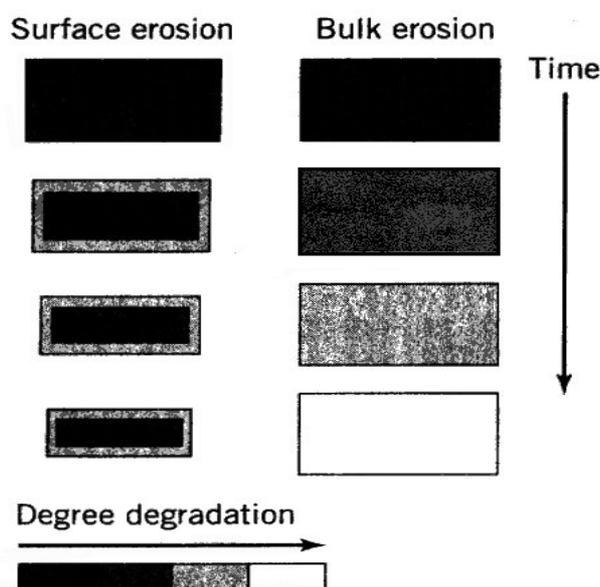
Nel caso di dispositivi a rilascio controllato di farmaco riassorbibili è indispensabile che il materiale polimerico che li compone abbia una cinetica di degradazione prestabilita, scelta per un particolare tipo di applicazione. I fattori che influenzano la degradazione, sopra elencati, sono dunque gli stessi sui quali si deve agire per modificare la velocità di reazione e portarla, per quanto possibile, a quella desiderata. Se ad esempio il polimero si degrada troppo lentamente, si può scegliere di aggiungere additivi che regolano il pH: per i DDS questi eccipienti possono essere i farmaci stessi, che vengono incorporati al materiale. Oltre a questo, si può agire alterando la struttura della catena polimerica, ad esempio attraverso

copolimerizzazione con acido lattico o glicolico che aumentano il tasso di degradazione [21].

Le proprietà strutturali della matrice polimerica quali morfologia, forma e dimensione dei pori sono altrettanto importanti poiché determinano i meccanismi di rilascio di farmaco all'esterno e di trasporto di acqua all'interno. Si può modificare la velocità di idrolisi anche rendendo la catena meno idrofobica o i gruppi esterni più idrofilici, aggiungendo gruppi idrolitici più reattivi, aumentando la porosità, diminuendo la cristallinità o riducendo le dimensioni del dispositivo [24].

I processi degradativi dei biomateriali variano anche in funzione della posizione dell'impianto all'interno dell'organismo, del tipo di tessuto con cui sono a contatto (da cui dipende l'eventuale risposta del sistema immunitario), dalle caratteristiche fisiche e chimiche del materiale e dalle condizioni generali dell'organismo ospite (età, stato di salute, farmaci assunti, ecc.) [10].

Il processo di degradazione è accompagnato dall'erosione del materiale, che provoca successive modifiche alla struttura fisica del dispositivo. Una conseguenza generale è la perdita di peso e di volume del materiale [23]. A seconda della struttura chimica dello "scheletro" del polimero, l'erosione può verificarsi per il consumo della superficie o dell'intero volume, come schematizzato in Figura 3.7.



**Figura 3.7.** Erosione superficiale e del volume.

L'erosione della superficie (*surface erosion*) si verifica quando il tasso di consumo di materiale superficiale è maggiore del tasso di permeabilità di acqua nell'intero volume.

L'erosione nell'intero volume (*bulk erosion*) avviene invece quando le molecole d'acqua si insinuano nel volume della matrice polimerica ad una velocità maggiore rispetto a quella di erosione superficiale, mettendo in atto un complesso fenomeno di erosione/degradazione nell'intero blocco di materiale. La maggior parte dei polimeri utilizzati per i DDS (PLA, PGA, PLGA, PCL) subiscono quest'ultimo tipo di processo, mentre poliortoesteri e polianidridi sono soggetti ad erosione superficiale [8].

Un'erosione di tipo superficiale sarebbe idealmente migliore per DDS riassorbibili, poiché essa è direttamente proporzionale all'area esterna del dispositivo: variando adeguatamente le dimensioni dell'impianto, un fenomeno di questo tipo potrebbe assicurare una cinetica di rilascio di farmaco più facilmente riproducibile. Dispositivi che subiscono erosione dell'intero nucleo, invece, vanno incontro a fenomeni molto meno prevedibili [25]. Tuttavia, l'uso di nano e microparticelle con un'area superficiale molto estesa possono presentare fenomeni di erosione molto simili a quella superficiale. Inoltre, questo processo può essere modificato con l'aggiunta di monomeri idrofobici all'interno del polimero, che rallentano l'entrata di molecole d'acqua nel volume del materiale [8].

Per copolimeri di PLGA è stato sperimentato che la massima velocità di erosione si ha quando PLA e PGA sono presenti in uguali proporzioni; gli omopolimeri rispettivi, invece, vengono erosi più lentamente. Gli effetti di questo fenomeno sono generalmente attribuiti alla bassa cristallinità del copolimero [25].

### **3.5 Biocompatibilità**

Un *biomateriale* può essere definito come “un materiale progettato per un uso prolungato a contatto con il sistema biologico, in grado di minimizzare le eventuali reazioni avverse da parte dell'organismo”. Il requisito essenziale per qualificare un biomateriale come tale è dunque la *biocompatibilità*, definita come “la capacità di un materiale di determinare, da parte di un sistema vivente, una reazione non dannosa alla sua presenza in una specifica applicazione” [9].

Per un dispositivo impiantabile polimerico come può essere un DDS, progettato per restare a lungo a contatto con i tessuti biologici è dunque necessaria un'attenta valutazione delle proprietà del materiale e delle interazioni con l'ambiente biologico: importante è considerare che la biocompatibilità non è una proprietà intrinseca del materiale, ma dipende dalle condizioni biologiche ed ambientali che esistono in relazione alla specifica interazione farmaco-polimero-tessuto [17].

I fattori essenziali da valutare nella determinazione della biocompatibilità con i tessuti

sono: composizione chimica del materiale, peso molecolare, solubilità, forma e struttura dell'impianto, idrofobicità e idrofilicità, energia superficiale, meccanismi di degradazione ed erosione, grado di scivolosità, ruvidità e capacità di assorbimento dell'acqua, in aggiunta all'influenza delle caratteristiche fisiche del materiale come durabilità, permeabilità e degradabilità [8]. Le proprietà fisiche, chimiche e meccaniche di un polimero biodegradabile inoltre cambiano con il tempo a causa del fenomeno di degradazione e durante le varie fasi del processo possono variare i livelli di biocompatibilità.

Importante è non prescindere da una valutazione di tipo funzionale: un biomateriale, oltre a non essere tossico deve essere in grado di agire nel modo voluto per la sua precisa applicazione. Si possono dunque riassumere le caratteristiche che deve possedere un biomateriale riassorbibile ed impiantabile:

- il materiale, a seguito dell'impianto, deve minimizzare nell'organismo effetti tossici diversi dalle reazioni infiammatorie fisiologiche;
- il materiale deve possedere adeguate proprietà meccaniche per la sua specifica applicazione e le variazioni di queste proprietà con la degradazione devono essere compatibili con il processo di guarigione;
- il materiale deve avere una durata di applicazione in accordo con i bisogni del paziente;
- i prodotti della degradazione devono essere non tossici e in grado di venire metabolizzati ed espulsi dall'organismo;
- il materiale deve avere un'adeguata permeabilità e processabilità per la sua specifica applicazione [22].

La proprietà di biodegradabilità va dunque rivista in un'ottica più specifica per un campo applicativo: un materiale biodegradabile è definito come in grado di subire una progressiva demolizione in seguito a specifiche azioni da parte dell'organismo, tuttavia non è contenuto in questa definizione il concetto di biocompatibilità; per tenerne conto è più corretto parlare di materiali *bioriasorbibili*, ovvero capaci di venire degradati dall'organismo senza che quest'ultimo subisca reazioni indesiderate o effetti tossici. Da quanto detto infatti si evince che il concetto di bioriasorbibilità implica quello di biodegradabilità ma non viceversa [9].



## CAPITOLO 4. I formati

### 4.1 Introduzione

Un DDS riassorbibile può essere realizzato in vari formati:

- microparticelle e nanoparticelle;
- strutture multistrato (o “a sandwich”);
- matrici e carrier;
- tessuti misti.

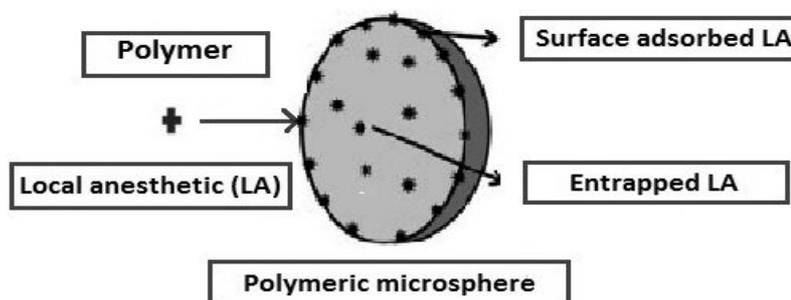
A seconda del formato, il dispositivo viene iniettato o impiantato nell'organismo. La soluzione più indicata è rappresentata dai DDS iniettabili, che non rendono necessarie procedure chirurgiche invasive. Tuttavia questo metodo di somministrazione non è sempre possibile: formulazioni con alto contenuto di farmaco potrebbero essere troppo viscosi per l'iniezione, di conseguenza dispositivi con dosi elevate vengono generalmente impiantati [26].

### 4.2 Microcapsule e nanocapsule

Il termine microcapsule (o nanocapsule, a seconda del loro ordine di grandezza), indica particelle sferiche di dimensioni che variano tra i 50 nm e i 2 mm, in polimero biodegradabile, che contengono un farmaco e fungono da veicolo per lo stesso all'interno dell'organismo. Generalmente i termini “microsfere” e “microparticelle” vengono utilizzati come sinonimi.

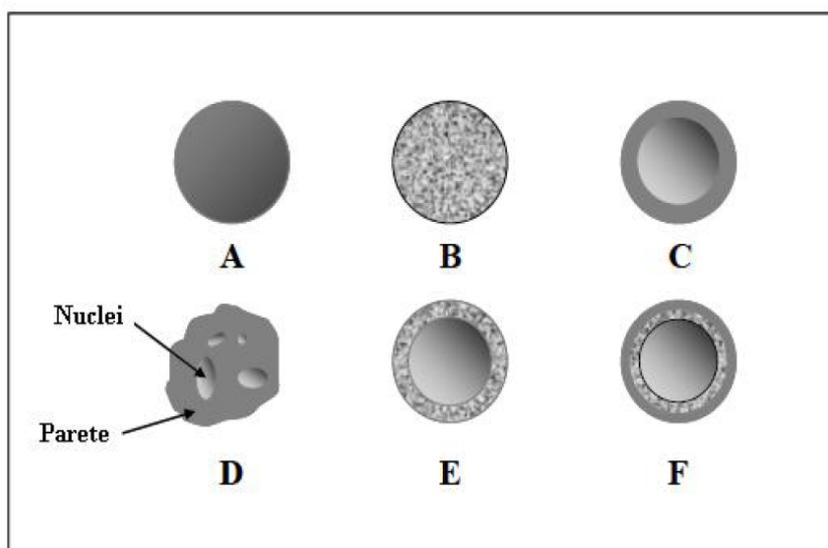
Furono sviluppate attorno al 1970 ed utilizzate per la prima volta come *carrier* per vaccini e farmaci nelle terapie oncologiche. In quest'ultimo caso, la scelta di tale particolare formato era dovuta alla necessità di focalizzare l'azione farmacologica nella regione colpita dal tumore [27]. Microsfere e nanosfere possiedono infatti un notevole vantaggio rispetto ad altri tipi di formati: essendo possibile iniettarle direttamente *in situ*, la loro introduzione nell'organismo non necessita di una procedura chirurgica invasiva [4]. Per questa loro peculiare caratteristica, esse hanno trovato un'importante applicazione come contenitori di anestetici locali. Gli studi compiuti su microsfere per il rilascio di anestetici locali sono stati effettuati per la maggior parte su dispositivi in PLGA, a motivo delle sue note proprietà di biocompatibilità e di controllo della cinetica di degradazione. È stato inoltre dimostrato che microsfere in PLGA hanno il vantaggio di sopravvivere alla degradazione nel loro sito d'azione per un periodo di tempo prolungato e di allungare così la durata dell'effetto

terapeutico: il farmaco contenuto al loro interno, diffondendosi attraverso il polimero, viene infatti rilasciato più lentamente rispetto ad un normale metodo di somministrazione [28]. In Figura 4.1 è rappresentata una particella polimerica contenente anestetico locale (AL).



**Figura 4.1.** *Microsfera polimerica.*

Le microsfere si presentano in due formati principali: come miscele omogenee di farmaco e polimero o come contenitori di farmaco solo nella loro parte più interna, come mostrato in Figura 4.2.



**Figura 4.2.** *Struttura delle microparticelle: A) Microsfera omogenea tipo gel; B) Microcapsula monolitica (tipo matrice); C) Microcapsula mononucleata; D) Microcapsula polinucleata; E) Microcapsula double core; F) Microcapsula a doppia parete.*

Nel primo tipo (Figura 4.2-A, B), l'agente attivo è fisicamente mescolato con il polimero e definitivamente imprigionato in esso per compressione o per fusione-solidificazione. Con la graduale rimozione delle molecole di farmaco dalla superficie del monolita, si creano degli spazi vuoti attraverso i quali l'acqua si insinua, portandosi sempre più all'interno della matrice polimerica, liberando gradualmente le molecole di farmaco situate più all'interno del

dispositivo e dissolvendo infine lo scheletro polimerico. Il secondo tipo di microparticella, denominato *reservoir system*, può presentarsi con un solo nucleo (Figura 4.2-C) o più nuclei (Figura 4.2-D); è caratterizzato dalla presenza del farmaco dissolto o disperso omogeneamente in una matrice circondata da una membrana che controlla la velocità di rilascio del principio attivo. Sebbene i sistemi *reservoir* siano in grado di assicurare cinetiche di rilascio costanti allo stato d'equilibrio, inizialmente possono manifestare velocità di rilascio molto maggiori rispetto a quelle del comportamento a regime. Un sistema *reservoir* che è caricato del farmaco ed usato immediatamente dopo, necessita di qualche tempo per raggiungere un gradiente di concentrazione entro la membrana; invece in un sistema lasciato a riposo per un certo periodo di tempo prima dell'uso, il farmaco satura tutta la membrana e quindi, al momento del suo impianto, una certa quantità di principio attivo si libera ad una velocità iniziale molto alta rispetto a quella mantenuta a regime, portando al fenomeno del picco di concentrazione iniziale denominato *burst effect* [29].

Il processo più utilizzato per incapsulare un farmaco all'interno di microsfele è l'evaporazione di solvente da emulsione. Questa tecnica si basa sull'evaporazione, sotto continua agitazione, della fase interna (solvente organico volatile) di un'emulsione *oil-in-water* (O/W) [27]. In uno studio su microsfele in PLGA preparate con questo metodo, è stato osservato che il controllo della temperatura presente durante il processo può cambiare la microstruttura delle particelle, riducendo la presenza sfavorevole del picco di concentrazione iniziale (*initial burst*). Alte temperature tendono infatti ad accelerare la loro formazione, ottenendo come prodotti finali microsfele con una superficie molto rugosa (dunque un'area superficiale più ampia): questo provoca l'aumento del numero di molecole di farmaco in superficie e di conseguenza una loro maggiore velocità di diffusione nella fase iniziale. Al contrario microsfele prodotte a temperature più basse si formano più lentamente, sono più lisce dunque consentono minor accumulo di molecole di farmaco in superficie, riducendo l'entità del *burst* [29].

Altri studi riguardano invece nanoparticelle (aventi diametro di 80-150 nm) di copolimeri bioriassorbibili, primo fra tutti il PLGA. Per evitare il loro attacco da parte dei macrofagi presenti nell'organismo, con conseguente degradazione della struttura e rilascio del farmaco in maniera troppo veloce, una soluzione testata consiste nel rivestire le particelle con uno strato di 5-10 nm di spessore di un copolimero contenente ossido di polipropilene e polietilene (PPO-PEO). Questo rivestimento si lega alla nanosfera grazie all'interazione idrofobica tra le catene di PPO, mentre il PEO forma una barriera che evita l'assorbimento di alcune proteine del plasma da parte della particella. Le nanosfele ricoperte in questo modo

non vengono riconosciute come corpi estranei dai macrofagi e non vengono attaccati da questi: dissolvendosi solo tramite idrolisi, subiscono un processo di degradazione più lento [27].

Micro e nanoparticelle costituiscono il formato di dispositivo più studiato per il rilascio controllato di farmaco in un sito predefinito, tuttavia non è ancora stato formulato un modello completo per la descrizione del meccanismo di rilascio, a causa della complessità del fenomeno e delle numerose variabili in gioco. Gli studi compiuti in questo campo tentano dunque di analizzare ogni variabile singolarmente e l'influenza che essa esercita sul dispositivo.

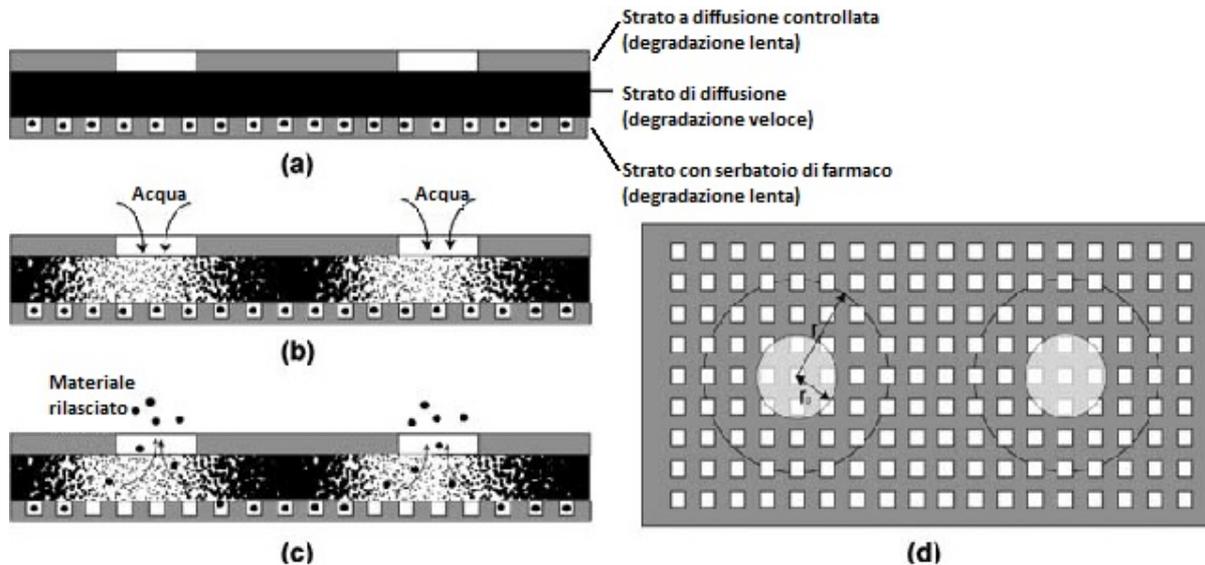
### **4.3 Strutture multistrato**

Un particolare formato di DDS è rappresentato da una struttura multistrato composta da polimeri biodegradabili. I vari strati di materiale si differenziano per composizione chimica, porosità, geometria ed altri parametri: la sovrapposizione di strutture diverse permette di controllare più facilmente la cinetica di rilascio dei farmaci contenuti nel dispositivo.

Questo tipo di DDS è stato studiato come matrice polimerica impiantabile in una determinata regione del corpo e in grado di rilasciare anestetico. Tuttavia ha trovato un'altra importante applicazione come alternativa alle normali medicazioni per le ferite della cute, primi fra tutti i casi di profonda ustione. In queste condizioni il rischio di infezioni per il paziente risulta molto alto ed è dunque necessaria un'azione concentrata e massiccia di farmaci nel sito della lesione.

La medicazione riveste un ruolo fondamentale nella prevenzione delle infezioni: un candidato ideale dovrebbe essere in grado di imitare la struttura e le funzioni della cute assicurando una regolazione dell'attività cellulare che porti alla guarigione del tessuto, di spedire una sufficiente concentrazione di antibiotici per eliminare l'infezione, e di inviare anestetici in grado di diminuire il dolore che in questi casi raggiunge soglie elevatissime. Inoltre è indispensabile che sia biocompatibile, biodegradabile e biorisorbibile, in modo da non rendere necessari, per il cambio della medicazione, ulteriori interventi che porterebbero ad un maggior rischio di infezioni. Vari studi sono stati compiuti in questo senso, portando alla produzione di sistemi in grado di rilasciare farmaci autonomamente. Alcuni esempi sono doppie membrane di chitosano, strati sovrapposti di PLGA aventi porosità diverse, una struttura a sandwich in nanofibre biodegradabili contenenti collagene negli strati superficiali, e antibiotici ed anestetici all'interno [30].

Un esempio di struttura a sandwich preposta invece all'impianto è un dispositivo in PLGA, formato dalla sovrapposizione di tre strati diversi, illustrato in Figura 4.3 (a): si può osservare la presenza di un serbatoio per il farmaco, uno strato di diffusione intermedio ed uno di diffusione controllata attraverso micro-orifizi.



**Figura 4.3.** Configurazione del dispositivo e meccanismi di rilascio del farmaco: (a) stato iniziale, (b) degradazione dello strato di diffusione a causa dell'ingresso di acqua nei micro-orifizi dello strato di diffusione controllata, (c) le molecole di farmaco contenute nel serbatoio iniziano a diffondersi al di fuori del dispositivo attraverso gli altri due strati; (d) visione del dispositivo dall'alto.

Tutti gli strati sono composti da polimero biodegradabile, ma lo strato di diffusione intermedio è formato da un polimero a degradazione più veloce rispetto agli altri due: in questo modo gli strati esterni mantengono la loro integrità strutturale, mentre quello intermedio di diffusione crea delle vie per la fuoriuscita del farmaco contenuto nel dispositivo. Lo strato che funge da serbatoio ha una struttura ad array di micro-cavità contenenti il farmaco. Questo strato, come si nota in Figura 4.3 (a), è ricoperto da quello a degradazione veloce che a sua volta è sovrastato dallo strato a degradazione controllata, con una struttura a micro-orifizi che controlla la quantità di acqua che entra, e quella di materiale che esce dal dispositivo. Quando questo sistema è impiantato in ambiente biologico, i fluidi corporei attraversano il primo strato attraverso i micro-orifizi ed iniziano a degradare quello intermedio, arrivando a liberare le molecole di farmaco contenute nelle micro-cavità dell'array, che fuoriescono così dal dispositivo [31].

Le strutture a sandwich risultano molto efficaci per il controllo della cinetica di rilascio, tuttavia gli studi compiuti su tali dispositivi risultano numericamente molto inferiori

rispetto a quelli effettuati su microparticelle, a causa delle lunghe tempistiche e dei metodi molto complessi necessari per la loro produzione.

#### **4.4 Matrici e carrier**

Un altro formato di dispositivo per anestesia locale è costituito da matrici e carrier, ovvero impasti di polimeri e farmaci. I materiali utilizzati sono generalmente poliesteri e acidi grassi, derivanti da elementi naturalmente presenti nell'organismo quali acido ricinoleico e acido lattico; spesso vengono utilizzate polianidridi, per la loro cinetica di degradazione conosciuta e il conseguente meccanismo di rilascio più prevedibile [32].

Questo tipo di dispositivo può presentarsi in forma di carrier iniettabile o di matrice solida impiantabile generalmente sottocute. Il primo tipo è utilizzato soprattutto nella chirurgia dentale, con la funzione di anestetizzare localmente una particolare zona [4].

Questo formato è caratterizzato da un metodo di produzione molto semplice, poiché il polimero e l'anestetico locale sono combinati formando una miscela. Durante la preparazione, avviene un processo spontaneo secondo il quale il farmaco resta all'interno, mentre la parte polimerica rimane all'esterno del composto. Quando il dispositivo viene introdotto nel suo sito d'azione, il polimero si degrada e l'anestetico inizia a diffondersi nell'ambiente circostante; il profilo di rilascio dipende dall'idrofobicità del polimero e del farmaco stesso. Se il polimero è molto idrofobico, il rilascio è molto lento: bisogna accertarsi però che questo meccanismo non sia troppo lento, e che sia in grado di soddisfare l'effetto terapeutico desiderato [32].

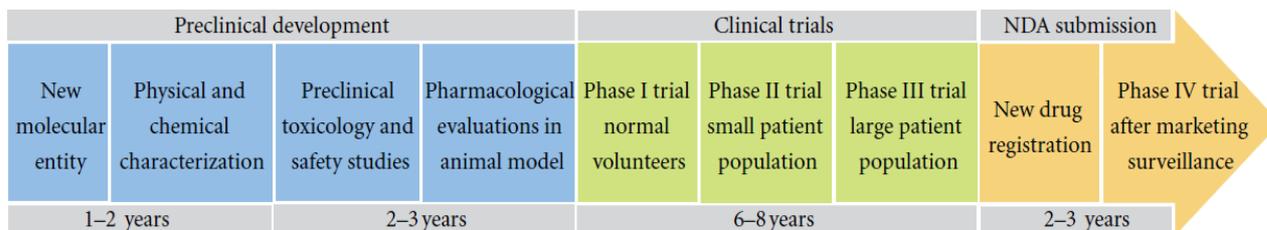


## CAPITOLO 5. Farmaci e cinetica di rilascio

### 5.1 Introduzione

Gli anestetici locali per il trattamento del dolore post-operatorio, quali bupivacaina o lidocaina, sono poco utilizzati a causa dei rischi associati al loro utilizzo ed alla difficoltà di ottenere un effetto anestesilogico sufficiente a coprire l'entità del dolore con basse dosi di farmaco. Secondo i normali metodi di somministrazione di tali farmaci, non si riesce infatti a raggiungere un effetto anestesilogico di lunga durata poiché il picco iniziale di concentrazione porta alla necessità di limitare le dosi di anestetico, che risulta altamente tossico se somministrato in grande quantità.

La scoperta e lo sviluppo di nuovi farmaci per il trattamento del dolore è un processo lungo e costoso: ogni singolo farmaco richiede in media 14 anni per essere approvato, ed è stato stimato che nel 2013, per tutti quelli che raggiungono il terzo ed ultimo stadio della sperimentazione (consistente in test clinici su volontari) il costo totale dovrebbe attestarsi a circa 1,9 miliardi di dollari. In aggiunta, il numero di farmaci che effettivamente superano la sperimentazione è una parte minima di quelli che vengono testati, raggiungendo il totale di meno di 32 nuove molecole all'anno, negli ultimi 10 anni. In Figura 5.1 sono rappresentati gli step richiesti dalla Food and Drug Administration (FDA) per l'approvazione di un nuovo farmaco e per la sua introduzione nel mercato.



**Figura 5.1.** Descrizione schematica degli stadi richiesti dalla FDA per la commercializzazione di un nuovo farmaco.

Le lunghe tempistiche necessarie per lo sviluppo di nuovi farmaci e gli alti costi connessi rendono necessaria la ricerca di nuove strategie terapeutiche, che consentano di utilizzare in maniera più efficiente i farmaci che sono già disponibili [33]. Una soluzione consiste nei sistemi a rilascio controllato: incapsulando un anestetico locale in un DDS riassorbibile il picco di concentrazione iniziale può essere evitato, assicurando una durata maggiore dell'effetto di anestesia con dosi non eccessive di farmaco, senza perciò incorrere nei rischi connessi alla tossicità [4].

## 5.2 Anestetici locali (AL) e loro caratteristiche

Nella scelta di un farmaco per il trattamento del dolore, si cerca quello che si avvicina maggiormente alle condizioni di idealità; l'anestetico locale ideale dovrebbe comprendere le seguenti caratteristiche:

- garantire un effetto anestesiológico tale da coprire la durata del dolore;
- non dar luogo a fenomeni di irritazione locale, avere una basso potenziale allergico e bassa tossicità;
- godere di un'alta efficacia terapeutica;
- garantire il blocco sensoriale nel sito della lesione;
- non dar luogo a blocco motorio [34].

Gli anestetici locali (AL) utilizzati nel periodo post-operatorio agiscono bloccando la conduzione dell'impulso nervoso che proviene dal sito della lesione, a seguito di un'operazione chirurgica. Sono per la maggior parte di origine sintetica, ed hanno tutti la stessa struttura di base:

- un anello di benzene (idrofobico);
- una catena intermedia costituita da un legame ammidico [-NH-CO-] o estereo [-O-CO-];
- un gruppo amminico (idrofilico).

A seconda della catena intermedia essi vengono suddivisi in amidici ed esterei. I primi sono i più comunemente utilizzati a motivo della loro maggiore durata d'azione (derivante da una degradazione epatica molto lenta) e della bassa probabilità di dar luogo a fenomeni di allergia, più comuni negli esterei [4].

Gli AL maggiormente utilizzati sono: bupivacaina, lidocaina, ropivacaina, levobupivacaina. Come si può osservare in Tabella 5.1, ogni anestetico necessita di un certo tempo di attesa prima di dare inizio alla sua azione (*onset of action*), ha la sua specifica potenza in termini di blocco sensoriale fornito, e la sua precisa durata d'azione.

Sito del blocco periferico	Anestetico locale	Volume e dose	Onset (min)	Durata d'azione (min)
Nervo sciatico	Levobupivacaina	20 ml 0.5%	15	1275
	Ropivacaina	20 ml 0.5%	15	945
	Bupivacaina	30 ml 0.5%	37	880
Sopraclavicolare	Levobupivacaina	0.4 ml/Kg 0.5%	7	892
	Bupivacaina	0.4 ml/Kg 0.5%	8	896
Interscalenico	Bupivacaina	20 ml 0.5%	28	654
	Ropivacaina	20 ml 0.5%	8	660
Plesso ascellare- brachiale	Bupivacaina	45 ml 0.5%	Non riportato	1068
	Ropivacaina	45 ml 0.5%	Non riportato	900
	Levobupivacaina	45 ml 0.5%	Non riportato	1026

**Tabella 5.1.** *Onset e durata d'azione di alcuni AL in relazione al sito del blocco periferico.*

Queste proprietà derivano dalle caratteristiche chimiche del farmaco quali la presenza dell'anello aromatico e la lunghezza della catena di idrocarburi, la quale determina a sua volta la liposolubilità e di conseguenza la potenza dello stesso.

L'*onset* di un AL è determinato dalla concentrazione di molecole presenti nello stato non ionizzato, che a sua volta dipende dalla dose somministrata, dal pKa del farmaco e dal pH del tessuto (il pKa è definito come il pH al quale il 50% di un AL è presente in forma ionizzata ed il 50% in quella non ionizzata). Più il pKa è vicino al pH fisiologico, più breve è la durata dell'*onset* [35].

A motivo della sua elevata potenza e relativamente lunga durata d'azione, l'anestetico amidico più utilizzato è la bupivacaina, una miscela racemica dei due stereoisomeri di tipo R e S. Questo tipo di composizione comporta tuttavia un aumento della tossicità dell'enantiomero S. L'uso di ropivacaina (enantiomero S omologo alla bupivacaina) o di levobupivacaina (enantiomero S della bupivacaina), può ridurre il rischio di tossicità cardiovascolare e del sistema nervoso centrale (SNC) [36]. In Tabella 5.2 è mostrata una scala qualitativa della tossicità dei più comuni AL.

Scala di cardiotoxicità degli AL		
Prilocaina	Bassa tossicità	
Lidocaina	↓	
Mepivacaina		
Ropivacaina		
Levopupivacaina		
Bupivacaina		
R-bupivacaina		
Etidocaina		
Tetracaina		Alta tossicità

**Tabella 5.2.** Scala di cardiotoxicità degli AL.

La tossicità degli AL è un problema tuttora sotto indagine. Secondo l'American Society of Anesthesiologist, analizzando il database dei reclami dal 1980 al 2000, il problema più frequente riguarda morte o lesione neurologica a seguito della somministrazione di AL [37]. Il pericolo di questi farmaci deriva infatti da errati modi di somministrazione: piccole dosi di AL agiscono producendo un blocco reversibile nella trasmissione dell'impulso al nervo periferico, bloccando la depolarizzazione della membrana di quest'ultimo; dosi più massicce invece hanno un effetto stabilizzante sulla membrana nervosa, generando fenomeni in grado di provocare danni al SNC o al cuore [38]. In sintesi un sovradosaggio, un'iniezione intravascolare (venosa o arteriosa) o un assorbimento troppo rapido dell'anestetico nel sito di iniezione, sono le cause che possono portare a depressione e arresto del sistema cardiocircolatorio, a convulsioni e coma [39].

Risulta chiaro dunque come sia necessario prestare enorme attenzione alla modalità di somministrazione del farmaco: se è contenuto in un DDS, bisogna studiare attentamente la sua cinetica di rilascio per evitare effetti tossici per il paziente, anche molto gravi.

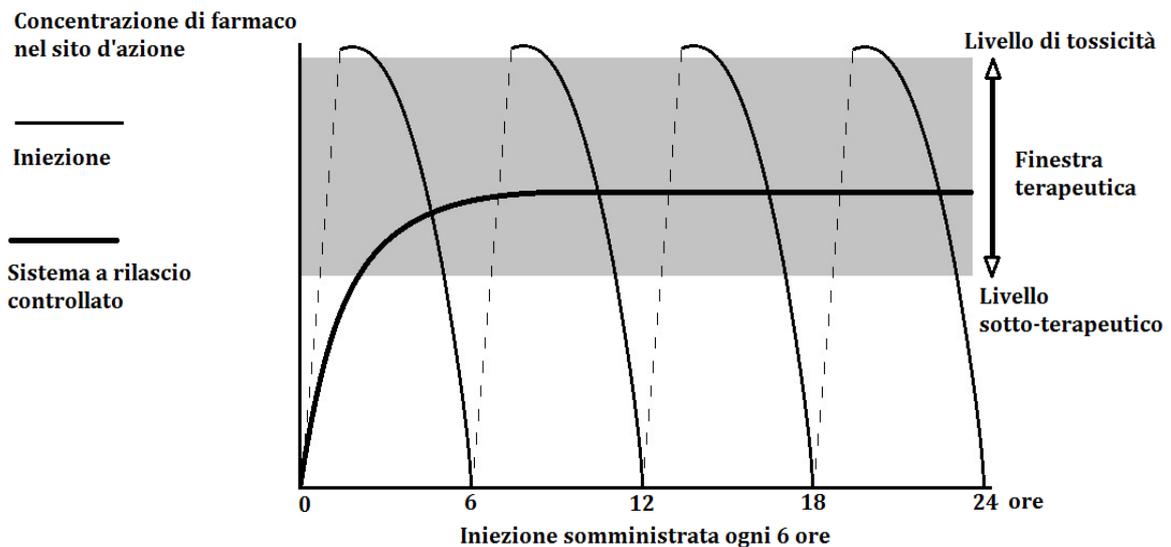
### 5.3 Cinetica di rilascio del farmaco

Con l'espressione "cinetica di rilascio" si indica il *modo* in cui un farmaco fuoriesce dal dispositivo in cui è incapsulato: un'analisi completa di questo processo risulta molto complessa a causa delle numerose variabili che lo influenzano. Verranno descritti di seguito il profilo di rilascio ideale per un farmaco contenuto in un DDS, i meccanismi ed i fattori

principali che influenzano il rilascio di farmaco in ambiente fisiologico considerando dispositivi in PLGA.

### 5.3.1 Il profilo di rilascio ideale

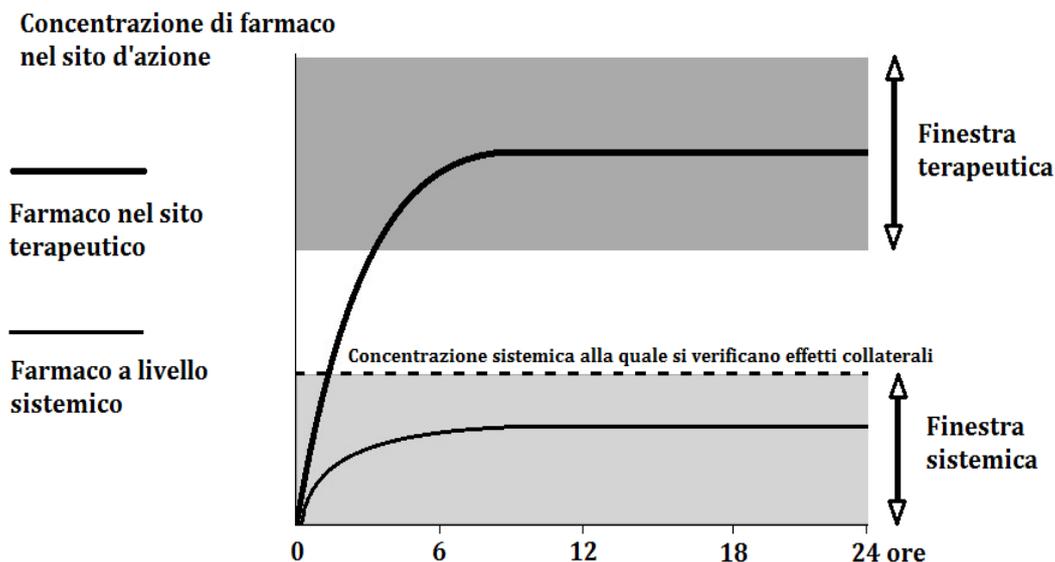
Lo scopo di un DDS per il trattamento del dolore post-operatorio è inviare una precisa quantità di farmaco al sito prescelto, per un certo periodo di tempo. La determinazione di tali parametri varia per tipo di dispositivo e di anestetico, tuttavia è necessario che essi soddisfino alcune condizioni di base che risultano fondamentali per l'efficacia del trattamento. Innanzitutto deve essere assicurata la presenza della concentrazione minima di farmaco tale da garantire l'effetto anestesiológico e, in secondo luogo, tale concentrazione non deve superare la soglia oltre la quale si verificano effetti tossici per l'organismo. In queste condizioni il profilo ottimale sarebbe una cinetica di rilascio costante allo stato di equilibrio, e contenuta nella fascia terapeutica (l'intervallo dei valori di concentrazione del farmaco entro il quale vengono prodotti effetti benefici e non tossici): un simile profilo è illustrato in Figura 5.2, e paragonato con un metodo di infusione continua (4 iniezioni intervallate di 6 ore).



**Figura 5.2.** Concentrazione di farmaco nel sito terapeutico d'azione a seguito di una somministrazione per infusione continua (linea sottile) e per rilascio controllato da DDS (linea spessa).

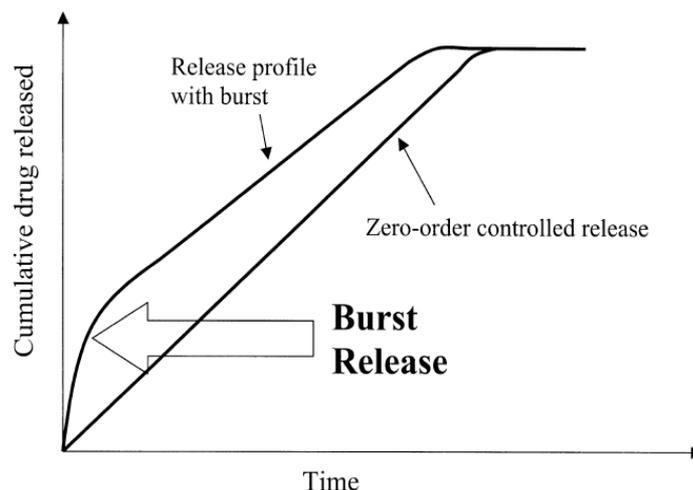
Si osserva che la concentrazione può fluttuare ampiamente nell'arco delle 24 ore quando il trattamento è gestito attraverso infusione continua, e si nota inoltre che per alcune porzioni temporali la concentrazione è al di fuori della fascia terapeutica; con il DDS invece, per la maggior parte del tempo la concentrazione si mantiene all'interno di tale fascia. Un DDS ha

come scopo quello di ottenere il massimo beneficio dalla dose di farmaco rilasciata, eliminando non solo gli effetti tossici nel sito d'azione, ma anche quelli collaterali a livello sistemico (Figura 5.3) [40].



**Figura 5.3.** Rilascio costante di farmaco da un DDS. Linea spessa: concentrazione di farmaco nel sito terapeutico d'azione; linea sottile: concentrazione di farmaco a livello sistemico.

Sono state considerate fin qui soltanto le condizioni che un DDS deve soddisfare al raggiungimento del suo stato di equilibrio, ovvero una cinetica di rilascio il più possibile costante. È bene però non tralasciare la presenza del fenomeno già citato del *burst* iniziale: nella maggior parte dei dispositivi è stato osservato che subito dopo il loro posizionamento nel sito d'azione, una grande quantità di farmaco viene rilasciata prima del raggiungimento di uno stato di equilibrio: questo fenomeno porta ad una diminuzione della durata dell'effetto terapeutico del dispositivo, ed è quindi desiderabile eliminarlo. Un profilo iniziale ideale sarebbe una cinetica di ordine zero (lineare), come mostrato in Figura 5.4.



**Figura 5.4.** Cinetica di rilascio di ordine zero e profilo con burst iniziale.

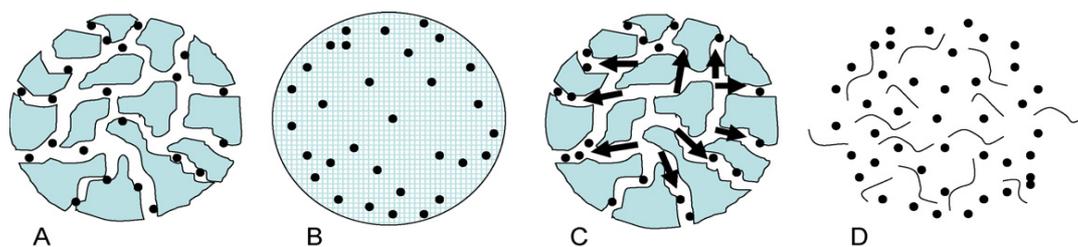
Alcuni metodi per evitare o ridurre il *burst* iniziale consistono nell'inserire il farmaco subito prima dell'utilizzo del dispositivo *in vivo*, nell'applicare un doppio rivestimento superficiale con strati soggetti a diverse velocità di erosione, o attuare alcune modifiche della superficie del rivestimento interno che contiene il farmaco (nel caso ad esempio di microsferi nucleate) [29].

### 5.3.2 I meccanismi di rilascio

In prima analisi si può affermare che il meccanismo di rilascio di farmaco è inizialmente controllato da un processo di diffusione e, in seguito, dalla degradazione/erosione del dispositivo. Analizzando più in dettaglio il fenomeno è stato osservato che le molecole di farmaco possono essere rilasciate dal dispositivo in tre soli modi:

1. trasporto attraverso i pori del materiale;
2. trasporto attraverso il polimero;
3. rilascio dovuto alla dissoluzione del dispositivo.

In Figura 5.5 sono illustrati schematicamente questi processi.



**Figura 5.5.** Il meccanismo di rilascio: (A) diffusione attraverso i pori, (B) diffusione attraverso il polimero, (C) pompa osmotica e (D) erosione.

Considerando dispositivi in PLGA, il primo tipo di trasporto è il più comune, poiché le molecole di farmaco utilizzate sono generalmente troppo grandi per riuscire ad infiltrarsi nella fitta trama del polimero. Questo processo avviene in genere per la presenza di un gradiente di concentrazione tra interno ed esterno del dispositivo, dunque per diffusione. Inoltre, il PLGA assorbe una grande quantità di acqua acquisendo una mobilità nelle catene polimeriche: in questo modo tende a gonfiarsi e, secondo un meccanismo di pompa osmotica, a generare una pressione che aumenta la velocità di fuoriuscita di farmaco attraverso i pori [41]. Il trasporto attraverso il polimero si verifica per molecole idrofobiche molto piccole: è stato osservato ad esempio che la ropivacaina, molecola di piccole dimensioni e molto idrofobica, è totalmente rilasciata *in vivo* da microsfele in PLGA dopo 8 ore, ovvero prima dell'inizio del processo di erosione del polimero [42]. Nella terza via di rilascio il farmaco inizia a fuoriuscire dal dispositivo in maniera passiva, a causa al fenomeno di erosione del polimero. In questo caso però si verifica comunque un aumento della velocità di trasporto poiché l'erosione crea nuovi pori attraverso i quali il farmaco si diffonde nell'ambiente esterno. In Tabella 5.3 sono elencati i principali meccanismi che causano il rilascio di farmaco.

<b>Meccanismo o processo</b>
Dissoluzione del farmaco (in combinazione con la diffusione)
Diffusione attraverso i pori del materiale
Diffusione attraverso la matrice polimerica
Idrolisi
Erosione
Pompa osmotica
Assorbimento di acqua/rigonfiamento
Interazioni polimero-farmaco
Interazioni tra farmaci diversi
Chiusura dei pori
Degradazione eterogenea (come conseguenza dell'autocatalisi)
Formazione di crepe o deformazione
Collasso della struttura polimerica

**Tabella 5.3.** *Meccanismi e processi che determinano il rilascio di farmaco.*

### **5.3.3 Fattori che influenzano la cinetica di rilascio**

Essendo il meccanismo di rilascio di farmaco un fattore essenziale per l'efficienza di un DDS, è necessario valutare in quale modo sia possibile controllarlo: è indispensabile dunque conoscere da quali fenomeni è influenzato e in quale modo è possibile agire sul dispositivo al fine di ottenere il profilo ottimale.

### 5.3.3.1 Fenomeni chimico-fisici

Dalle sperimentazioni compiute *in vivo* si è osservato che non appena il dispositivo viene posto nel sito d'azione ha inizio un assorbimento di acqua da parte del polimero, molto più rapido rispetto al processo di rilascio di farmaco. L'assorbimento di acqua induce idrolisi e formazione di nuovi pori: questi inizialmente sono troppo piccoli per permettere la diffusione di farmaco, ma con l'aumentare del loro numero e delle loro dimensioni, si forma una rete porosa che permette il passaggio delle molecole di farmaco e la loro diffusione verso l'ambiente esterno [43].

L'idrolisi rompe i legami esterei e fa diminuire il peso molecolare: in questo processo si generano acidi che catalizzano la reazione, causando degradazione più veloce al centro del sistema rispetto alla superficie. Il polimero diventa gradualmente meno idrofobico, il suo peso molecolare diminuisce e al raggiungimento dei 1100 Da gli oligomeri diventano idrosolubili [44]. Si verifica di pari passo il processo di erosione, ovvero la perdita di materiale polimerico che, insieme alla dissoluzione dei prodotti della degradazione, contribuisce alla creazione di nuovi pori. I piccoli pori formati in seguito all'assorbimento dell'acqua o all'erosione crescono e si uniscono a quelli circostanti, formandone di più grandi: questo fenomeno è collegato alla mobilità delle catene polimeriche, che dipende dalla temperatura di transizione vetrosa del polimero (Tg). Le molecole di farmaco fuoriescono dal dispositivo attraverso i pori, fino al loro completo esaurimento; infine lo scheletro polimerico si dissolve totalmente.

Il fenomeno di rilascio non può essere attribuito ad un solo fattore, ma deriva sempre da più eventi tra loro collegati. Si può in certi casi individuare un meccanismo dominante, rappresentato dall'erosione nel caso di dispositivi in PLGA con basso peso molecolare; anche il meccanismo dominante tuttavia può variare nel tempo [45].

In Tabella 5.4 sono indicati i processi che influenzano la cinetica di rilascio, e i loro effetti.

Processo	Possibile effetto	Effetto sulla cinetica di rilascio
Idrolisi	Autocatalisi	Aumenta
	Erosione e formazione di pori	Aumenta
	Effetto plastico degli oligomeri	Aumenta
	Cristallizzazione degli oligomeri	Diminuisce
	Mobilità delle catene polimeriche e chiusura dei pori	Diminuisce
	Interazioni tra farmaci e tra polimero e farmaco	Diminuisce
Erosione	Formazione di pori	Aumenta
	Perdita dell'effetto di autocatalisi da parte dei prodotti acidi della degradazione	Diminuisce
Assorbimento di acqua	Idrolisi	Aumenta
	Formazione di pori	Aumenta
	Aumento del pH	Diminuisce
	Mobilità delle catene polimeriche e chiusura dei pori	Diminuisce
Collasso della struttura polimerica	Crepe e nuove superfici	Aumenta
	Diminuzione della porosità	Diminuisce

**Tabella 5.4.** *Processi chimico-fisici e relativi effetti sulla cinetica di rilascio.*

### 5.3.3.2 Proprietà chimico-fisiche del dispositivo

Per ottenere la cinetica di rilascio desiderata, generalmente possono essere modificati vari parametri quali il peso molecolare del PLGA, le proporzioni in esso di PLA e PGA, la porosità o la dimensione del dispositivo. In Tabella 5.5 sono elencate le proprietà del polimero e del dispositivo che influiscono sul profilo di rilascio: verranno analizzate di seguito quelle più significative.

#### Proprietà del DDS e dell'ambiente circostante che influenzano la cinetica di rilascio

Il polimero	Condizioni <i>in vitro</i>
Peso molecolare	Temperatura
Rapporto L:G	Rivestimento superficiale
Gruppo di chiusura	pH
Semi-cristallinità	Osmolarità
Farmaco incapsulato	Condizioni <i>in vivo</i>
Caratteristiche del farmaco	Enzimi
Quantità e locazione	Lipidi
Agenti plasticizzanti	Risposta immunitaria
Il DDS	
Dimensioni	
Porosità	
Densità	
Forma	

**Tabella 5.5.** *Proprietà del DDS e dell'ambiente circostante che influenzano la cinetica di rilascio.*

1) *Le proprietà del polimero.* La scelta delle proprietà del materiale è lo strumento più importante per il controllo della cinetica di rilascio. Considerando PLGA, si predilige

generalmente un polimero con basso peso molecolare, inferiore ai 50 kDa e molto raramente sopra i 150 kDa; è utilizzato talvolta anche PLGA di peso inferiore ai 10 kDa. In esso il rapporto L:G varia da 50:50 a 100:0. Le catene polimeriche possono inoltre terminare con un gruppo estereo idrofilico. Copolimeri in PLGA con basso peso molecolare, basso rapporto L:G e senza gruppo finale idrofilico sono meno idrofobici rispetto a quelli che non godono di tali caratteristiche, hanno una maggior tendenza ad assorbire acqua, e maggior velocità di erosione. La quantità di acqua assorbita e la durata del rilascio del farmaco sono fortemente dipendenti da queste proprietà [41].

2) *Le dimensioni.* Se si considerano microparticelle di PLGA, la loro dimensione risulta il parametro più facilmente controllabile in fase di produzione del dispositivo; tuttavia non bisogna tralasciare il fatto che esso influisce anche sul processo di degradazione del polimero [29]. Uno studio compiuto sull'influenza della dimensione di particelle di PLGA sulla cinetica di rilascio del farmaco ha dimostrato che durante la fase di degradazione il peso molecolare del polimero diminuisce molto più rapidamente nelle particelle di dimensioni maggiori rispetto a quelle di grandezza inferiore. Questo fatto può essere spiegato con la presenza di fenomeni di autocatalisi: il PLGA è un poliestere che si degrada tramite idrolisi in monomeri e oligomeri acidi. A causa del gradiente di concentrazione con l'ambiente esterno, questi ultimi si diffondono al di fuori del sistema, mentre le basi presenti nel circostante fluido (ad esempio ioni idrossido) si diffondono all'interno del dispositivo. Se quest'ultimo processo di diffusione è lento rispetto alla generazione di acidi, come accade nelle particelle di dimensioni maggiori, il valore del pH al centro del sistema polimerico diminuisce drasticamente. Poiché l'idrolisi degli esteri è catalizzata da acidi, questo fenomeno porta ad un'accelerata degradazione del polimero per autocatalisi, e di conseguenza ad un'accelerata diffusione e rilascio di farmaco. Al contrario, se i processi diffusionali sono veloci rispetto alla generazione di acidi, questi ultimi vengono rapidamente neutralizzati nel volume delle microparticelle o nei fluidi circostanti, annullando così gli effetti di autocatalisi [46].

3) *La porosità.* Un ulteriore importante fattore è la porosità del materiale. Il rilascio di farmaco è determinato in misura molto grande dalla formazione di pori durante l'erosione del polimero, tuttavia aumentando la porosità della struttura polimerica di base, è possibile accelerare il processo. Utilizzando adeguate tecniche di preparazione, quali metodi di estrazione/evaporazione di solventi acqua-olio-acqua (W/O/W), si ottiene un PLGA molto poroso [47]. Il coefficiente di diffusione per farmaci contenuti in DDS di PLGA resta costante in dispositivi di piccole dimensioni e molto porosi, formati da polimero con alto

peso molecolare, idrofobico e poco tendente al rigonfiamento. I processi che portano alla formazione di pori, come l'erosione o il rigonfiamento di acqua, hanno effetti maggiori su dispositivi in PLGA con basso peso molecolare e meno idrofobici, e su particelle di grandi dimensioni o non porose [48].

4) *Il farmaco*. Il farmaco contenuto nel dispositivo può influenzare la cinetica di rilascio in vari modi; in particolare può essere in grado di:

- aumentare o inibire l'assorbimento di acqua e il processo di idrolisi, a causa di una aumentata idrofobicità/idrofilicità, o per la presenza di sostanze attive sulla superficie del sistema;
- aumentare o diminuire la velocità di idrolisi a causa della presenza di acidi che influiscono come catalizzatori, o di basi che neutralizzano l'effetto di autocatalisi;
- rendere il polimero più plastico;
- rendere più cristalline alcune parti del polimero.

È importante valutare inoltre la quantità di farmaco contenuto nel dispositivo e, a seconda del formato di DDS, il sito in cui va posto all'interno del dispositivo [41].

Considerando microparticelle caricate con AL, in generale quelle di dimensioni maggiori permettono di ottenere una durata maggiore dell'effetto anestesiológico a causa di un carico abbondante di farmaco; tuttavia, microsfele più piccole presentano un legame più stretto con il farmaco, consentendo un rilascio più lento dello stesso. Bisogna tener presente però che le piccole microsfele presentano un *burst* iniziale molto alto, che risulta sfavorevole [49].

Il farmaco contenuto nel sistema inoltre potrebbe modificare a sua volta altre variabili: per microsfele contenenti lidocaina ad esempio, la cinetica di rilascio è influenzata non solo dalla dimensione del dispositivo, ma in grande misura anche dalla sua forma [4].

Microsfele in PLA o PLGA sono state caricate con anestetici locali quali bupivacaina, etidocaina, mepivacaina e lidovacaina: è stato dimostrato che l'efficienza nell'incapsulare un farmaco in un matrice di PLGA è fortemente dipendente dalla idrofobicità del farmaco, e raggiunge il massimo per bupivacaina e etidocaina, che sono idrofobiche. È stato inoltre verificato che è possibile controllare la cinetica di rilascio attraverso l'aggiunta di desametasone [50].

Da quanto esposto si comprende come nella scelta delle caratteristiche di un dispositivo risulti necessario trovare un compromesso tra i vari fattori che influenzano il

rilascio di farmaco, e come sia indispensabile avere una conoscenza il più possibile approfondita di tali fenomeni per assicurare non solo la funzionalità terapeutica del DDS, ma anche la sua massima biocompatibilità.

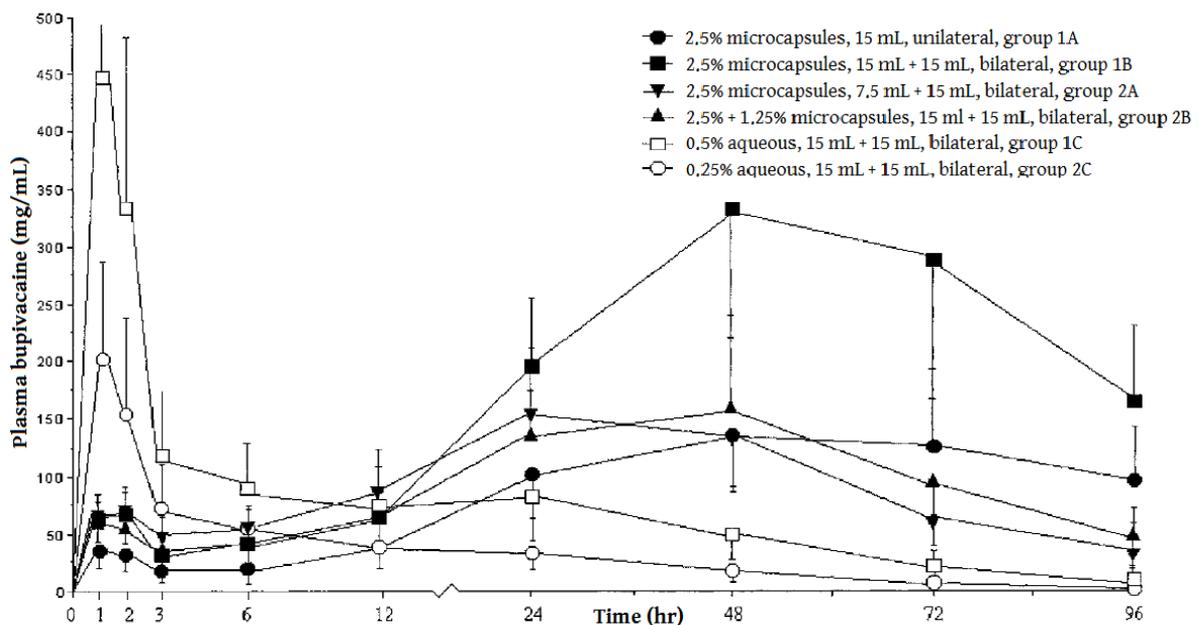


## CAPITOLO 6. Studi *in vivo*

Vengono riportati di seguito alcuni studi *in vivo* riguardanti i formati di dispositivo per il rilascio controllato locale di anestetico descritti nei Capitoli precedenti.

1) *Un modello di farmacocinetica relativa a microsfeere contenenti bupivacaina, testate su volontari.*

In uno studio risalente al 2003 effettuato su 28 volontari, è stato tracciato il profilo di rilascio di bupivacaina, rilevato tramite microdialisi (tecnica che consente di analizzare la concentrazione di un farmaco nel suo sito d'iniezione). Alcuni soggetti hanno ricevuto il farmaco in una soluzione acquosa, altri in microcapsule in PLGA contenenti desametasone. È stata poi monitorata la concentrazione di bupivacaina nel plasma durante le 96 ore successive all'iniezione, ottenendo il profilo che si può osservare in Figura 6.1.



**Figura 6.1.** Andamento temporale della concentrazione di bupivacaina nel plasma nelle 96 ore successive all'iniezione. I simboli pieni rappresentano l'anestetico rilasciato da microcapsule, quelli vuoti indicano la soluzione acquosa di farmaco. Le concentrazioni sono espresse come media e deviazione standard.

Tutti i soggetti che hanno ricevuto bupivacaina in soluzione acquosa hanno percepito un effetto di anestesia nei primi 30 minuti successivi all'iniezione: tramite questo metodo di somministrazione, la diffusione del farmaco nel plasma è risultata molto rapida, come evidenziato dal picco di concentrazione iniziale, che raggiunge il massimo in meno di un'ora,

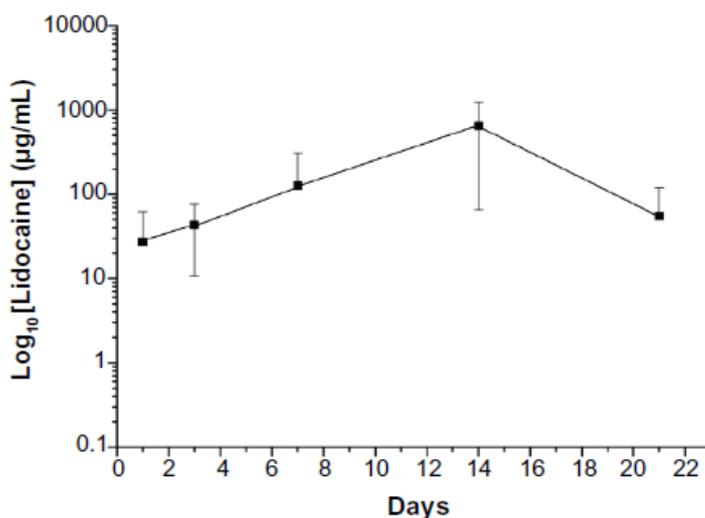
scendendo poi rapidamente nelle successive 3-6 ore. Al contrario, la bupivacaina presente nelle microcapsule si è diffusa molto più lentamente nella circolazione sistemica, raggiungendo il livello massimo di concentrazione tra le 30 e le 60 ore successive all'iniezione. È stato infatti rilevato un *onset* minore per la bupivacaina acquosa ( $41 \pm 16$  minuti) rispetto a quella contenuta nelle microcapsule ( $743 \pm 874$  minuti) e, in accordo a questo, la durata dell'anestesia è risultata maggiore per i soggetti riceventi microcapsule ( $3.4 \pm 0.8$  giorni contro  $0.9 \pm 0.5$  giorni della bupivacaina acquosa). Nel 78% dei volontari con microsfele è stata percepita anestesia fino a 96 ore dopo l'iniezione; tra questi, l'unico effetto collaterale registrato è stato un leggero prurito, rilevato nel 56% dei casi. Con tale studio è stato dimostrato che microsfele contenenti bupivacaina costituiscono un metodo efficace per garantire un effetto anestesilogico prolungato, senza effetti collaterali [51].

## 2) *Struttura a sandwich in nanofibre biodegradabili in grado di fungere da medicazione per le ferite.*

Questo studio è stato praticato nel 2012, per testare l'efficacia *in vitro* e *in vivo* di una struttura multistrato contenente un anestetico (lidocaina) ed antibiotici (vancomicina e gentamicina), in grado di fungere da medicazione per le ferite della cute, particolarmente esposte al rischio di infezioni. Il dispositivo, avente gli strati esterni in PLGA e collagene, e quello interno in PLGA e farmaci, è stato realizzato tramite la tecnica dell'*elettrospinning*. Dopo lo studio della cinetica di rilascio *in vitro*, è stato effettuato un esperimento su ferite infettate da batteri in 3 gruppi di ratti: al primo gruppo è stato applicato il dispositivo descritto, in grado di rilasciare farmaci (DEM, *drug-eluting-membrane*), al secondo una struttura polimerica biodegradabile non contenente farmaci (NDEM, *non-drug-eluting-membrane*), al terzo una garza sterile. Gli animali che hanno ricevuto la normale medicazione sono deceduti entro la prima settimana successiva al bendaggio; per quelli che hanno subito l'applicazione della struttura multistrato è stato invece studiato lo stato della ferita nelle tre settimane successive all'innesto, ed analizzata la cinetica di rilascio dei farmaci della struttura DEM.

Si è osservato che nei primi 6-7 giorni, per gli animali che hanno ricevuto le strutture polimeriche lo stato del tessuto lesa è risultato simile; alla seconda settimana le ferite con il dispositivo NDEM hanno presentato tessuto necrotico e il loro stato è peggiorato nei giorni successivi, mentre per le lesioni con medicazioni DEM si è rilevata formazione di nuovo tessuto. Dall'analisi della cinetica di rilascio si è osservato che il DDS è stato in grado di rilasciare farmaci in maniera prolungata, combattendo l'infezione e favorendo la guarigione.

In Figura 6.2 è rappresentato il profilo di rilascio della lidocaina: si può osservare come la sua concentrazione si sia mantenuta non nulla per più di tre settimane.



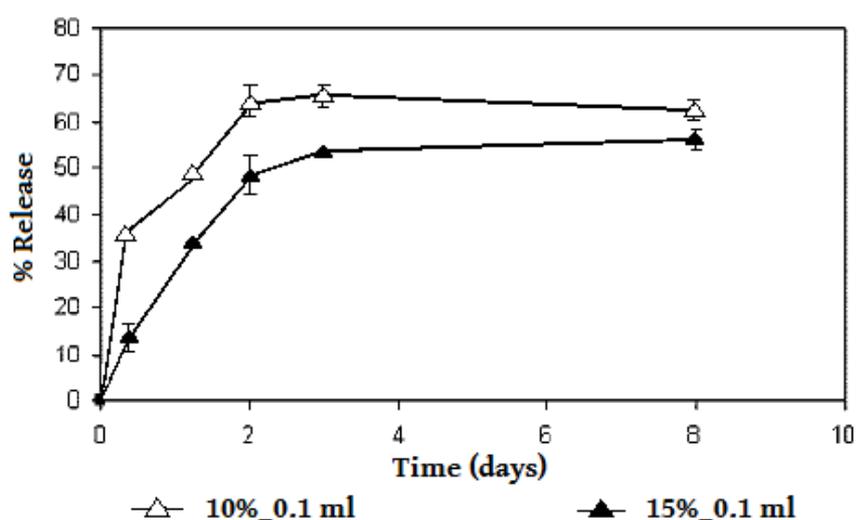
**Figura 6.2.** Rilascio in vivo di lidocaina dal dispositivo multistrato.

Il DDS ha avuto un'efficacia maggiore nel ricostruire tessuto sano, mantenendo il livello di concentrazione dei farmaci entro la fascia terapeutica. In aggiunta, l'esame istologico del tessuto lesso ha confermato la bioattività del dispositivo cioè la sua capacità di favorire la formazione di nuovo tessuto, soprattutto nella prima fase del processo di guarigione [30].

### 3) Matrice formata da un copolimero di PLGA e olio di castoreo in grado di rilasciare in vivo bupivacaina: studio sulla diminuzione del burst iniziale.

In uno studio *in vivo* risalente al 2007 era stato dimostrato che tramite l'iniezione di una matrice polimerica biodegradabile contenente il 10% di bupivacaina era possibile ottenere un effetto anestesologico prolungato. Il dispositivo testato era risultato in grado di assicurare blocco motorio per 24 ore e blocco sensoriale per 48 ore, a seguito della iniezione nel nervo sciatico di un ratto [52]. Tuttavia dall'analisi del profilo di rilascio di bupivacaina *in vitro*, si era osservata la presenza di un livello di concentrazione potenzialmente tossico, a causa di un *burst* iniziale molto alto: nelle prime 6 ore successive all'iniezione, era stato già rilasciato il 35% del farmaco. Inoltre, l'anestetico fuoriuscito dal dispositivo nelle prime ore era stato metabolizzato ed escreto senza essere utilizzato: la durata dell'effetto farmacologico risultava di conseguenza ridotta rispetto alla potenziale durata terapeutica della dose presente. Partendo da questi risultati, in un successivo esperimento è stata introdotta nello stesso dispositivo una dose maggiore di farmaco (15% di bupivacaina), con lo scopo di ridurre il picco di concentrazione iniziale prolungando così la durata dell'effetto terapeutico.

Precedenti studi avevano dimostrato che una quantità maggiore di farmaco miscelata al polimero aumenta la densità del materiale riducendo la dispersione dell'anestetico nella matrice. Un carico maggiore contribuisce inoltre ad aumentare la dimensione dei blocchi di farmaco nel dispositivo, prolungando la loro permanenza all'interno della matrice e rallentando la loro dissoluzione; in aggiunta, tali aggregazioni di anestetico formano delle aree idrofobiche che riducono l'assorbimento di acqua. Questa combinazione di dissoluzione rallentata e di lento assorbimento d'acqua è in grado di determinare una minor velocità di diffusione del farmaco. Di conseguenza, nell'esperimento il carico di anestetico è stato aumentato al 15%: una formulazione al 20% sarebbe stata ancora più efficace, tuttavia sarebbe risultata troppo viscosa per essere introdotta nell'organismo tramite iniezione. La matrice con il 15% di bupivacaina è stata iniettata nel nervo sciatico di topi, misurando la cinetica di rilascio del farmaco, il blocco motorio e gli eventuali effetti tossici. Il 60% di anestetico è stato rilasciato *in vitro* in una settimana e non è stato osservato alcun fenomeno di *burst* iniziale, come si può osservare in Figura 6.3 nella quale sono paragonati i profili di rilascio dei due tipi di dispositivo: si può notare la presenza di una concentrazione iniziale maggiore per la formulazione al 10%.



**Figura 6.3.** Profilo di rilascio *in vitro* di bupivacaina (10% e 15%) da una matrice in copolimero di PLGA e olio di castoreo (3:7).

Il DDS con il 15% di bupivacaina è stato in grado di assicurare blocco motorio per 64 ore e blocco sensoriale per 96 ore; lievi infiammazioni sono state notate nel nervo sciatico mentre l'analisi degli organi interni non ha rilevato la presenza di effetti tossici. Questo dispositivo si è rivelato dunque un buon metodo per il prolungamento dell'anestesia, ed ha dimostrato che

la scelta della dose adeguata di farmaco è indispensabile per l'efficacia della terapia: la sfida successiva consiste nell'individuare la giusta dose per l'uomo, eliminando anche il blocco motorio [53].



## CONCLUSIONI

Dagli studi eseguiti è stato dimostrato che la somministrazione di farmaci tramite DDS riassorbibili è un metodo efficace per il trattamento del dolore post-operatorio, in grado di eliminare molti problemi associati alla normale terapia del dolore. Attraverso tali dispositivi è possibile prolungare la durata dell'anestesia, ridurre il rischio di infezioni e la presenza di gravi effetti collaterali per l'organismo, aumentare il comfort del paziente e diminuire i costi della terapia, favorendo una degenza post-operatoria più breve, senza la necessità di continui monitoraggi e assistenza medica.

In questa sede sono stati analizzati soltanto i dispositivi polimerici biorassorbibili; esistono tuttavia altri metodi di gestione del dolore post-operatorio: sono oggi allo studio tecniche di anestesia transcutanee ed altri tipi di dispositivo a rilascio controllato di farmaco. Alcuni esempi consistono in sistemi capaci di ionoforesi, elettroporazione e fonoforesi per il rilascio di farmaco via transdermica, dispositivi intranasali, intra-articolari ed intravescicolari [54,55].

I primi studi su DDS riassorbibili sono iniziati attorno al 1970, con sperimentazioni su microparticelle per la cura del dolore in pazienti oncologici. La ricerca è proseguita lentamente fino agli anni '90, periodo dopo il quale il numero di studi è aumentato progressivamente fino ad oggi, consentendo l'acquisizione di numerose conoscenze che hanno dimostrato l'efficacia di tali dispositivi. Nonostante il grande numero di sperimentazioni *in vivo* e *in vitro* condotte su DDS riassorbibili, i test clinici restano tuttora molto pochi: di conseguenza, per la diversità tra l'ambiente fisiologico dell'uomo e quello degli animali oggetto delle sperimentazioni, molti parametri riguardanti il comportamento di tali sistemi nel corpo umano restano tuttora sconosciuti. A causa della novità del trattamento esistono infatti alcune difficoltà tecniche nell'applicare tali dispositivi, e in aggiunta l'ancoraggio a pratiche ormai consolidate, anche se problematiche, porta alla mancanza di cooperazione interdisciplinare nell'affrontare tali problemi, ritardando l'applicazione di nuovi sistemi che possono portare a soluzioni efficienti. Di conseguenza, nonostante i risultati promettenti ottenuti, tali dispositivi non sono ancora entrati nella normale pratica clinica [4].

Per dare un seguito ai molti anni di sperimentazioni e giungere ad esiti concreti ed applicabili, è necessario dunque utilizzare i risultati ottenuti continuando ad investire sulla ricerca e sulle conoscenze acquisite. L'interconnessione di più discipline si è dimostrato un requisito fondamentale per risolvere problemi che in un singolo campo non riescono a trovare soluzione: in questo caso, l'ingegneria applicata alla chimica ed alla medicina si è

rivelata in grado di fornire risposte concrete. La ricerca, che per sua natura indaga percorsi sconosciuti, conferma anche in questo caso come non sia il "protagonismo" di una singola disciplina ad aprire nuovi orizzonti di conoscenza, ma un accurato lavoro multidisciplinare che, attingendo dai risultati raggiunti, favorisce il progresso scientifico.



## BIBLIOGRAFIA

- [1] M Al Malian, C Becchi, S Boncinelli, N Ashammakhi. Novel drug delivery systems in pain therapy. *Minerva Anestesiologica* 2007; 73:173-9.
- [2] An Updated Report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Acute Pain Management. Practice Guidelines for Acute Pain Management in the Perioperative Setting. *Anesthesiology* 2012; 116:248-73.
- [3] Biblioteca Medica, Servizio sanitario regionale Emilia Romagna. La terapia del dolore. Dal sito: [www.biblioteca.asmn.re.it](http://www.biblioteca.asmn.re.it)
- [4] CF Weiniger, L Golovenevski, A J Domb, D Ickowicz. Extended release formulation for local anesthetic agents. *Anaesthesia* 2012; 67: 906-916.
- [5] JM Hitt, OA De Leon Casasola. Complications of intrathecal drug delivery systems. *Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management* 2011; 15:162-6.
- [6] SL Du Pen. Implantable Spinal Catheter and Drug Delivery Systems: Complications. *Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management* 1998; 2:152-160.
- [7] JR Robinson, VHL Lee. Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences* 1987; 29:1-97.
- [8] O Pillai, R Panchagula. Polymers in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology* 2001; 5:447-451.
- [9] C Di Bello. *Biomateriali*, Patron Editore, Bologna 2004.
- [10] E Salernitano. Biomateriali polimerici. Magazine online: *NT Nuovi Tessili* 2002. Dal sito: [www.technica.net/NT/Applicazioni/biomaterialipolimerici.html](http://www.technica.net/NT/Applicazioni/biomaterialipolimerici.html)
- [11] V Singh, M Tiwari. Structure-Processing-Property Relationship of Poly(Glycolic Acid) for Drug Delivery Systems: Synthesis and Catalysis. *International Journal of Polymer Science* 2010; 2010:1-23.
- [12] S Lakshmi, CT Laurencin. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 2007; 32:762-798.
- [13] L Jiang, J Zhang. In: Biodegradable and Biobased Polymers. *Applied plastics engineering handbook* 2011; 145-159.
- [14] JC Middleton, AJ Tipton. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 2000; 21:2335-46.
- [15] PB Maurus, CC Kaeding. Bioabsorbable implant material review. *Oper Tech Sport Med* 2004; 12:158-60.
- [16] D Garlotta. A literature review of poly(lactic acid). *Journal of Polymers and the*

*Environment* 2001; 9(2):63-84.

[17] H K Makadia, SJ Siegel. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers* 2011; 3:1377-1397.

[18] L Tin Sin, AR Rahmat, WAWA Rahman. PLA and Copolymers for Biomedical Applications. In: *Overview of Poly(lactic acid)* 2012; 37-45.

[19] DS Katti, S Lakshmi, R Langer, CT Laurencin. Toxicity, biodegradation and elimination of polyanhydrides. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54:933-61.

[20] J Heller, J Barr, SY Ng, KS Abdellauoi, R Gurny. Poly(ortho esters): synthesis, characterization, properties and uses. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54:1015-39.

[21] A Gopferich. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 1996; 17:103-114.

[22] SN Lakshmi, CT Laurencin. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 2007; 32:762-798.

[23] AC Vieira, JC Vieira, RM Guedes, AT Marques. Experimental degradation characterization of PLA-PCL, PGA-PCL, PDO and PGA fibres. In: International Committee on Composite Materials (ICCM). Edinburgh, 27-31 July 2009.

[24] Biodegradable polymers: Chemistry, Degradation and Applications. Da: Department of Bioengineering, University of Utah: [www.bioen.utah.edu](http://www.bioen.utah.edu).

[25] J A Tamada, R Langer. Erosion Kinetics of hidrolitically degradable polymers. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1993; 20:552-556.

[26] M Sokolsky-Papkov, L Golovanevski, AJ Domb, CF Weiniger. Prolonged local anesthetic action through slow release from poly (lactic acid co castor oil). *Pharmaceutical Research* 2009; 26: 32-9.

[27] MNVR Kumar. Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices. *J Pharm Pharmaceutic Sci* 2000; 3(2):234-258.

[28] J Siepmann, N Faisant, J Richard, J Akiki, JP Benoit. Effect of the size of biodegradable microparticles on drug release: experiment and theory. *Journal of Controlled Release* 2004; 96:123- 134.

[29] X Huang, CS Brazel. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 2001 ; 73:121-136.

[30] DWC Chen, JY Liao, SJ Liu, EC Chang. Novel biodegradable sandwich- structure nanofibrous drug-eluting membranes for repair of infected wounds: an in vitro and in vivo study. *International Journal of Nanomedicine* 2012; 7:763-771.

[31] WH Ryu, M Vyakarnam, RS Greco, FB Prinz, RJ Fasching. Fabrication of multi-layered

biodegradable drug delivery device based on micro-structuring of PLGA polymers. *Biomed Microdevices* 2007; 9:845-853.

[32] M Maniar, A Domb, A Haffer, J Shah. Controlled release of a local anesthetic from fatty acid dimer based polyanhydride. *Journal of Controlled Release* 1994; 30: 233-9.

[33] C Vilos, LA Velasquez. Therapeutic Strategies Based on Polymeric Microparticles. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*; Volume 2012, Article ID 672760, 9 pages.

[34] PJ Kuzma, MD Kline, MD Calkins, PS Staats. Progress in the development of ultra-long-acting local anesthetics. *Regional Anesthesia* 1997; 22:543-51.

[35] M Columb, K MacLennan. Local anaesthetic agents. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine* 2007; 8: 159-62.

[36] JM Thomas, SA Schug. Recent advances in the pharmacokinetics of local anaesthetics. Long-acting amide enantiomers and continuous infusions. *Clinical Pharmacokinetics* 1999; 36: 67-83.

[37] LA Lee, KL Posner, FW Cheney, RA Caplan, KB Domino. Complications associated with eye blocks and peripheral nerve blocks: an american society of anesthesiologists closed claims analysis. *Reg Anesth Pain Med* 2008; 33(5):416-22.

[38] SA Grant, KC Nielsen, RA Greengrass, SM Steele, SM Klein. Continuous peripheral nerve block for ambulatory surgery. *Regional Anesthesia and Pain Medicine* 2001; 26:209-14.

[39] H Burkbiwa, DA Conn. Toxicity from local anesthetic drugs. *Pharmacology* 1999; 10:article 8.

[40] KE Uhrich, SM Cannizzaro, RS Langer, KM Shakesheff. Polymeric Systems for Controlled Drug Release. *Chem. Rev.* 1999; 99:3181-3198.

[41] S Fredenberg, M Wahlgren, M Reslow, A Axelsson. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems-A review. *International Journal of Pharmaceutics* 2011; 415: 34-52.

[42] M Ratajczak-Emselme, JP Estebe, G Dollo, F Chevanne, D Bec, JM Malinovsky, C Ecoffey, PL Corre. Epidural, intrathecal and plasma pharmacokinetics study of epidural ropivacaine in PLGA-microspheres in sheep model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2009; 72:54-61.

[43] A Mochizuki, T Niikawa, I Omura, S Yamashita. Controlled Release of argatroban from PLA film-effect of hydroxyesters as additives on enhancement of drug release. *J. Appl. Polym. Sci.* 2008; 108:3353-3360.

[44] TG Park. Degradation of poly(D,L-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight.

*J. Control. Release* 1994; 30:161-173.

[45] C Wiscke, SP Schwendeman. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int. J. Pharm.* 2008; 364:298-327.

[46] M Dunne, OI Corrigan, Z Ramtoola, Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles, *Biomaterials* 2000; 21: 1659-1668.

[47] D Klose, F Siepmann, K Elkharraz, S Krenzlin, J Siepmann. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 2006; 314:198-206.

[48] HK Kim, TG Park. Comparative study of sustained release of human growth hormone from semi-crystalline poly(L-lactic acid) and amorphous poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: morphological effect on protein release. *J. Control. Release* 2008; 98:15-125.

[49] MV Bernardo, MD Blanco, R Olmo, JM T. Delivery of bupivacaine included in poly(acrylamide-comonomethyl itaconate) hydrogels as a function of the pH swelling medium. *Journal of Applied Polymer Science* 2002; 86:327-34.

[50] P Le Corre, JH Ryttings, V Gajan, F Chevanne, R Le Verge. *In vitro* controlled release kinetics of local anaesthetics from poly(D, L-lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Microencapsulation* 1997; 14:243-255.

[51] DJ Kopacz, CM Bernards, HW Allen, C Landau, P Nandy, D Wu, PG Lacouture. A Model to Evaluate the Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Variables of Extended-Release Products Using *In Vivo* Tissue Microdialysis in Humans: Bupivacaine-Loaded Microcapsules. *Anesth Analg* 2003; 97:124 -31.

[52] A Shikanov, AJ Domb, CF Weiniger. Long acting local anesthetic-polymer formulation to prolong the effect of analgesia. *Journal of Controlled Release* 2007; 117:97-103.

[53] M Sokolsky-Papkov, L Golovanevski, AJ Domb, CF Weiniger. Poly(DL:Lactic Acid-Castor Oil) 3:7-Bupivacaine Formulation: Reducing Burst Effect Prolongs Efficacy *In Vivo*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2010; 99:2732-2738.

[54] ER Viscusi. Patient-Controlled Drug Delivery for Acute Postoperative Pain Management: A Review of Current and Emerging Technologies. *Reg Anesth Pain Med* 2008; 33:146-158.

[55] EA Shipton. Advances in delivery systems and routes for local anaesthetics. *Trends in Anaesthesia and Critical Care* 2012; 2:228-233.