



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN: *SCIENZE DELLA NATURA E DELLE SUE RISORSE* - XXXVIII CICLO

DIRETTORE: PROF. MARCO CURINI

INDIRIZZO IN: *SCIENZA E TECNOLOGIA DEI MINERALI E DELLE ROCCE DI INTERESSE INDUSTRIALE*

COORDINATORE DI INDIRIZZO: PROF. GIACOMO OGGIANO

**ZEOLITI NATURALI IN FORMULAZIONI FARMACEUTICHE PER USO ORALE:
PREPARAZIONE, VALUTAZIONE E POSSIBILE IMPIEGO DI UN MATERIALE A BASE DI
CLINOPTILOLITE**

CANDIDATO: DOTT. MAURO FARINA

RELATORE: DOTT. GUIDO CERRI

CORRELATORI: DOTT.SSA GIOVANNA RASSU

DOTT. ANTONIO BRUNDU

PROF.SSA ELISABETTA GAVINI

INDICE

1. Abstract	5
2. Introduzione	6
2.1.1. Minerali in campo farmaceutico	6
2.1.2. Zeoliti in campo farmaceutico	9
2.2. <i>Helicobacter pylori</i>	13
2.3. Razionale e scopo del progetto	19
3. Materiali e metodi	21
3.1. Preparazione dei materiali	21
3.1.1. Litotipo di partenza	21
3.1.2. Arricchimento in clinoptilolite	22
3.1.3. Preparazione della clinoptilolite in forma sodica	23
3.2. Caratterizzazione dei materiali	25
3.2.1. Analisi XRD	25
3.2.2. Analisi termiche	25
3.2.3. Capacità di scambio cationico (CEC)	25
3.2.4. Analisi chimiche	26
3.2.5. Simulazione del processo digestivo - bioaccessibilità degli elementi, resistenza della clinoptilolite durante il transito nel tratto gastrointestinale e sua capacità di sottrarre NH_4^+	26
3.2.6. Qualità microbiologica: saggio di conta microbica	28
3.2.7. Processo di sterilizzazione e test di sterilità	28
3.2.8. Area superficiale specifica e porosità	29
3.2.9. Potenziale Zeta e Punto di carica zero	29
3.2.10. Osservazione al SEM	30
3.2.11. Caratterizzazione tecnologica specifica per applicazioni nel campo farmaceutico	30
3.2.11.1 Analisi dimensionale	30
3.2.11.2 Determinazione del “Volume vero” e della “densità vera” di FA-Na	33
3.2.11.3 Misura del volume e densità apparenti	32
3.2.11.4 Valutazione della scorrevolezza delle polveri	32
3.2.11.5 <i>Water Uptake</i>	33
3.2.11.6 Misura del pH di una data sospensione acquosa di FA-Na	34
3.2.12. Compattabilità della polvere, resistenza delle compresse e test di disaggregazione	34
3.3. Valutazione dell’attività antibatterica della clinoptilolite nei confronti del batterio <i>Helicobacter pylori</i>	36
3.3.1. Premesse	36
3.3.2. Preparazione delle altre forme cationiche di clinoptilolite	38
3.3.2.1 Preparazione della clinoptilolite in forma ammonio	38
3.3.2.2 Preparazione della clinoptilolite in forma argento	38
3.3.2.3 Preparazione della clinoptilolite in forma zinco	38
3.3.3. Test svolti sul ceppo di collezione di <i>H. pylori</i> (ATCC 43504)	39
3.3.3.1 Ceppo batterico, condizioni di crescita e di stoccaggio	39

3.3.3.2	Materiali testati	39
3.3.3.3	Valutazione della crescita del batterio in ambienti acidi	39
3.3.3.4	<i>Agar cup diffusion test</i>	39
3.3.3.5	Determinazione della MIC	40
3.3.3.6	Determinazione della MBC	41
3.3.3.7	<i>Viable Colony Count</i>	41
3.3.3.8	Studio su un possibile effetto sinergico della clinoptilolite con alcuni farmaci correntemente usati contro <i>l'Helicobacter pylori</i>	41
3.3.4	Test svolti su ceppi clinici di <i>H. pylori</i>	43
3.3.4.1	Ceppi batterici: isolamento, crescita e stoccaggio.	43
3.3.4.2	Materiali testati	43
3.3.4.3	<i>Agar cup diffusion test.</i>	43
3.3.4.4	Determinazione della MIC	44
3.3.4.5	Determinazione della MBC	44
3.3.4.6	Studio su un possibile effetto sinergico della clinoptilolite con alcuni farmaci correntemente usati contro <i>l'H. pylori</i>	44
3.4.	Studi Formulativi	46
3.4.1.	Premesse	46
3.4.2.	Amoxicillina triidrata	46
3.4.3.	Caratterizzazioni della AMX-TH	47
3.4.4.	Metodica HPLC per la quantificazione di amoxicillina triidrato in soluzione	47
3.4.5.	Determinazione della solubilità della AMX-TH in diversi solventi	48
3.4.6.	Studi di stabilità della AMX-TH	48
3.4.7.	Caricamento di AMX-TH sulla clinoptilolite	49
3.4.7.1	Adsorbimento	49
3.4.7.2	Evaporazione del solvente	50
3.4.7.3	<i>Sealing heating</i>	51
3.4.7.4	Miscela fisica.	5
3.4.8.	Valutazione della quantità di farmaco caricata nelle formulazioni	51
3.4.9.	Test di rilascio in-vitro	52
3.4.10.	Potenziale Z	53
3.4.11.	Studi di stabilità	53
4.	Risultati	55
4.1.	Caratterizzazione e valutazione del materiale preparato	55
4.1.1	Materiale arricchito in clinoptilolite (FA)	55
4.1.2	Materiale arricchito in clinoptilolite condotto in forma sodio (FA-Na)	57
4.1.3	Capacità di scambio cationico (CEC)	62
4.1.4	Simulazione processo digestivo: resistenza della clinoptilolite in ambiente gastro-intestinale.	63
4.1.5	Simulazione processo digestivo: <i>uptake</i> dello ione ammonio.	64
4.1.6	Simulazione processo digestivo: rilascio di elementi	65
4.1.7	Qualità microbiologica: saggio di conta microbica	69
4.1.8	Processo di sterilizzazione e test di sterilità	69
4.1.9	Area superficiale specifica e porosità	70
4.1.10	Potenziale Zeta.	71
4.1.11	Punto di carica zero.	71
4.1.12	Caratterizzazione tecnologica specifica per applicazioni nel campo farmaceutico	72
4.1.13	Compattabilità della polvere e resistenza delle compresse	75

4.2. Valutazione dell'attività antibatterica della clinoptilolite nei confronti di <i>H. pylori</i>	79
4.2.1. Preparazione delle altre forme cationiche di clinoptilolite	79
4.2.2. Test svolti sul ceppo di collezione di <i>H.pylori</i> (ATCC 43504)	80
4.2.2.1 Crescita del batterio in ambienti acidi.	80
4.2.2.2 Agar cup diffusion test	80
4.2.2.3 MIC e MBC	81
4.2.2.4 Viable colony count	82
4.2.2.5 Studio su un possibile effetto sinergico della clinoptilolite con alcuni farmaci correntemente usati contro l' <i>Helicobacter pylori</i>	83
4.2.3. Test svolti su ceppi clinici di <i>H. pylori</i>	86
4.2.3.1 Agar cup diffusion test, MIC e MBC.	86
4.2.3.2 Studio su un possibile effetto sinergico della clinoptilolite con alcuni farmaci correntemente usati contro l' <i>Helicobacter pylori</i> .	89
4.2.4. Discussione riassuntiva sui risultati dei test eseguiti	91
4.3. Studi Formulativi	92
4.3.1. Caratterizzazione dell'amoxicillina triidrata	92
4.3.2. Determinazione della solubilità dell'amoxicillina triidrata in diversi solventi	93
4.3.3. Studi di stabilità della AMX-TH	93
4.3.4. Caricamento di amoxicillina triidrato nella zeolite	95
4.3.5. Test di rilascio in-vitro	95
4.3.6. Potenziale Z	96
4.3.7. Studi di stabilità	97
5. Conclusioni	98
6. Ringraziamenti	100
7. Bibliografia	101

1. ABSTRACT

This work investigates the possible use of clinoptilolite in formulations to be used against *Helicobacter pylori*, a bacterium recognized responsible for up to 70% of gastric ulcers. To survive in gastric environment the bacterium hydrolyses the urea present in the gastric juices generating ammonia which increases the pH in the stomach as, due to H^+ presence, NH_3 is converted to NH_4^+ .

Starting from a zeolite-rich rock, a reproducible material that maximizes clinoptilolite properties and minimizes any kind of interference was prepared. Chemical and mineralogical composition, technological properties and microbiological quality of materials were determined. Tests were performed to evaluate the resistance and the oral bioaccessibility of contaminants in simulated gastrointestinal fluids. The recommendations and procedures of European Pharmacopoeia were taken as benchmark to the largest extent possible.

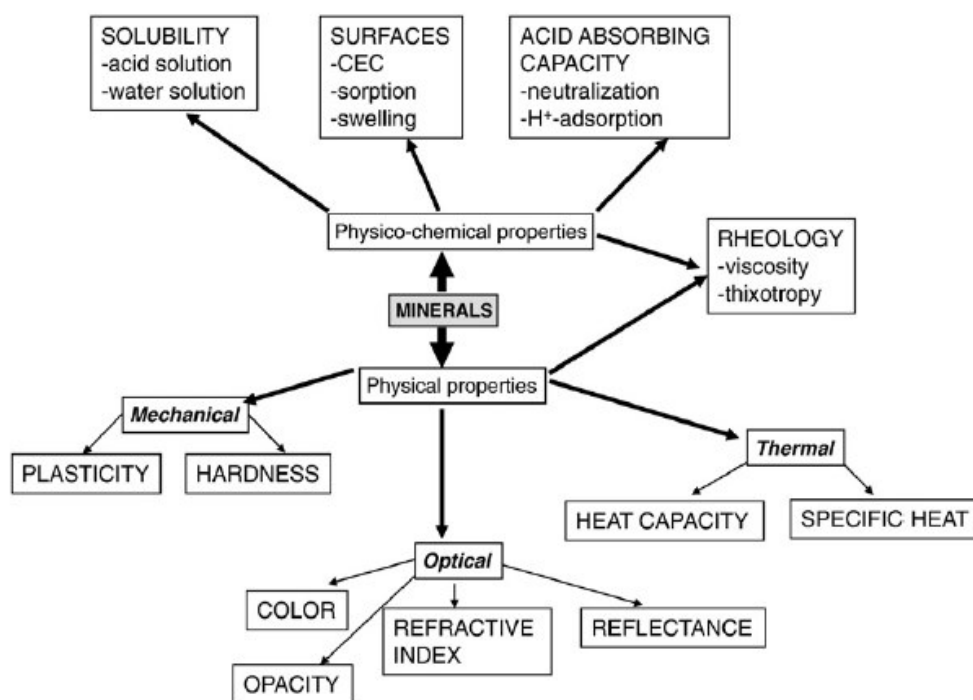
The material obtained was then prepared in different cation forms, and tested *in-vitro* against different strains (also clinical) of *H. pylori*, to evaluate if the clinoptilolites, due to the exchange capacity and selectivity toward ammonium, show antagonistic activity against *H. pylori* growth and infection. A set of antibiotics currently used in the eradication therapy of *H. pylori* were also considered. MIC and MBC of the antibiotics, of the forms of clinoptilolite prepared, and of combinations antibiotics+clinoptilolite were measured by using different methods.

2. INTRODUZIONE

2.1.1. Minerali in campo farmaceutico

I minerali sono da tempo utilizzati nell'industria farmaceutica sia come eccipienti che come principi attivi (*McGinity & O'Donnell, 1996; Carretero & Pozo, 2009, 2010*). Il loro impiego come eccipienti nelle preparazioni farmaceutiche e la loro attività terapeutica è legata a peculiari proprietà fisiche e chimico-fisiche (*Carretero & Pozo, 2009, 2010*), come schematizzato nella Figura 1.

Figura 1. Diagramma delle principali proprietà fisiche e fisico-chimiche di minerali argillosi e non-argillosi (*Carretero & Pozo, 2009*)



Nell'agire come principio attivo o come eccipiente risultano particolarmente utili caratteristiche quali alta capacità adsorbente, elevata area superficiale specifica, solubilità e la dispersibilità in acqua, nonché la reattività verso gli acidi. Inoltre, importanti proprietà per l'impiego come eccipienti sono la capacità di rigonfiamento (*swelling*), l'igroscopicità e l'untuosità (Tabella 1), mentre alcune attività terapeutiche sono legate all'alto indice di rifrazione, all'elevata capacità di ritenzione di calore, all'opacità, l'astringenza e l'alta riflettanza (*Carretero & Pozo, 2009, 2010*).

Tabella 1. Proprietà fisiche e fisico-chimiche di minerali impiegati come eccipienti (*Carretero & Pozo, 2009*)

Action	Mineral	Physical and physico-chemical properties
Lubricants	Talc	Low hardness, unctuousness
Desiccants	Anhydrite Periclase	Hygroscopic properties
Disintegrants	Smectites	Swelling capacity and reaction with acids (HCl) Quick dispersion in water
Diluents and binders	Palygorskite	Reaction with acids (HCl)
	Sepiolite	
	Calcite	Plastic deformation when moist
	Magnesite	
	Smectites	Alkaline pH
	Palygorskite	
	Sepiolite	
	Kaolinite	
	Talc	
	Gypsum	
Hydroxyapatite		
Periclase		
Calcite		
Magnesite		
Pigments and opacifiers	Rutile	Opaqueness
	Hematite	
	Magnetite	Colour
	Maghemite	
	Goethite	
	Zincite	
	Calcite	
Smectites	Thixotropic and colloidal properties	
Palygorskite		
Sepiolite		
Kaolinite		
Talc		
Emulsifying, thickening and anticaking agents	Halite	Influence on the viscosity of organic polymer dispersions
	Sylvite	
	Smectites	
	Palygorskite	
	Sepiolite	
Flavour correctors	Kaolinite	High sorption capacity
	Talc	
	Halite	
	Solubility in water	
	Solutions (0.9% w/v) with an osmotic pressure similar to that of the corporal liquids	
Isotonic agents	Smectites	High sorption capacity
	Palygorskite	
Carriers and releasers of active ingredients	Sepiolite	High specific surface area
	Kaolinite	
	Talc	
	Zeolites	
	Hydrotalcite (2)	

I minerali trovano impiego come eccipienti, lubrificanti, essiccanti, disgreganti, diluenti, leganti, pigmenti e opacizzanti, così come emulsionanti, agenti isotonici e correttori di aromi e, infine, come supporto (*carrier*) di farmaci (*Carretero & Pozo, 2009*). In particolare, i minerali possono fungere semplicemente da *carrier*, oppure agire anche come modulatori del rilascio del principio attivo (*Cornejo, 1990; Aguzzi et al., 2007*). Trovano impiego in questo contesto minerali

argillosi - sia veri e propri che s.l. - con elevata area superficiale specifica ed elevata capacità adsorbente quali smectiti, paligorskite, sepiolite, caolinite, talco e zeoliti. L'idrotalcite è stata proposta come *carrier* di farmaci antiinfiammatori, antitumorali e protettivi solari (Choy *et al.*, 2007; Del Hoyo, 2007; Rives *et al.*, 2014). Preparazioni farmaceutiche che impiegano minerali come *carrier*-modulatori possono essere somministrate per via orale, tuttavia alcuni farmaci (antibiotici, analgesici e antistaminici) adsorbiti su fillosilicati (per esempio, talco e caolinite) sono applicati anche per via topica (Carretero & Pozo, 2009).

Tabella 2. Minerali utilizzati come principi attivi in preparazioni farmaceutiche e cosmetiche (Carretero & Pozo, 2010)

Mineral	Chemical formulae	Method of administration	Therapeutic activity or cosmetic action
<i>Oxides</i>			
Rutile	TiO ₂	Topically	Dermatological protector, solar protector
Periclase	MgO	Orally	Antacid, osmotic oral laxative, mineral supplement
Zincite	ZnO	Topically	Antiseptic and disinfectant, dermatological protector, solar protector
<i>Carbonates</i>			
Calcite	CaCO ₃	Orally, topically	Antacid, antidiarrhoeaic, mineral supplement, abrasive and polishing agent in toothpaste
Magnesite	MgCO ₃	Orally	Antacid, osmotic oral laxative, mineral supplement
Hydrozincite	Zn ₅ (CO ₃) ₂ (OH) ₆	Topically	Dermatological protector
Smithsonite	ZnCO ₃	Topically	Dermatological protector
<i>Sulphates</i>			
Epsomite	MgSO ₄ ·7H ₂ O	Orally, topically	Osmotic oral laxative, mineral supplement, bathroom salts
Mirabilite	Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O	Orally, topically	Osmotic oral laxative, bathroom salts
Melanterite	FeSO ₄ ·7H ₂ O	Orally, topically	Antianemic, mineral supplement
Chalcanthite	CuSO ₄ ·5H ₂ O	Orally, topically	Direct emetic, antiseptic and disinfectant
Zincosite	ZnSO ₄	Orally, topically	Direct emetic, antiseptic and disinfectant
Goslarite	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Orally, topically	Direct emetic, antiseptic and disinfectant
Alum	KAl(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	Topically	Antiseptic and disinfectant, deodorant
<i>Chlorides</i>			
Halite	NaCl	Orally, parenterally, topically	Homeostatic, mineral supplement, decongestive eye drops, bathroom salts
Sylvite	KCl	Orally, parenterally, topically	Homeostatic, mineral supplement, bathroom salts
<i>Hydroxides</i>			
Brucite	Mg(OH) ₂	Orally	Antacid, osmotic oral laxative, mineral supplement
Gibbsite	Al(OH) ₃	Orally	Antacid, gastrointestinal protector, antidiarrhoeaic
Hydrotalcite	Mg ₆ Al ₂ (CO ₃)(OH) ₁₆ ·4H ₂ O	Orally	Antacid
<i>Others</i>			
Sulphur	S	Topically	Antiseptic and disinfectant, keratolytic reducer
Greenockite	CdS	Topically	Keratolytic reducer
Borax	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	Topically	Antiseptic and disinfectant
Hydroxyapatite	Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH)	Orally	Mineral supplement
Niter	KNO ₃	Topically	Anaesthetizer in toothpastes
<i>Phyllosilicates</i>			
Smectites	Montmorillonite: (Al _{1,67} Mg _{0,33})Si ₄ O ₁₀ (OH) ₂ M ⁺ _{0,33} Saponite: Mg ₃ (Si _{3,67} Al _{0,33})O ₁₀ (OH) ₂ M ⁺ _{0,33} Hectorite: (Mg _{2,67} Li _{0,33})Si ₄ O ₁₀ (OH) ₂ M ⁺ _{0,33}	Orally, topically	Antacid, gastrointestinal protector, antidiarrhoeaic, dermatological protector, cosmetic creams, powders and emulsions
Palygorskite	(Mg,Al,Fe ³⁺) ₅ (Si,Al) ₈ O ₂₀ (OH) ₂ (OH ₂) ₄ ·4H ₂ O	Orally, topically	Antacid, gastrointestinal protector, antidiarrhoeaic, cosmetic creams, powders and emulsions
Sepiolite	Mg ₈ Si ₁₂ O ₃₀ (OH) ₄ (OH ₂) ₄ ·8H ₂ O	Orally, topically	Antacid, gastrointestinal protector, antidiarrhoeaic, cosmetic creams, powders and emulsions
Kaolinite	Al ₂ Si ₂ O ₅ (OH) ₄	Orally, topically	Gastrointestinal protector, antidiarrhoeaic, dermatological protector, anti-inflammatory and local anesthetic, cosmetic creams, powders and emulsions
Talc	Mg ₃ Si ₄ O ₁₀ (OH) ₂	Topically	Dermatological protector, cosmetic creams, powders and emulsions
Mica	Muscovite: KAl ₂ (Si ₃ Al)O ₁₀ (OH) ₂	Topically	Cosmetic creams, powders and emulsions

Un ampio numero di minerali sono impiegati come ingredienti attivi in preparati farmaceutici e cosmetici (Tabella 2). Tali fasi possono essere somministrate oralmente come antiacidi, protettori gastrointestinali, antidiarroici e lassativi orali osmotici, emetici diretti, antianemici e integratori minerali; per via parenterale come antianemici e omeostatici. Possono anche essere usati topicamente come antisettici, disinfettanti, protettivi cutanei, antinfiammatori, anestetici locali, riduttori cheratolitici e colliri decongestionanti. In tutti i casi il LADME (Liberazione, Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo, Escrezione) dei minerali utilizzati è descritto. Nell'industria cosmetica, i minerali sono utilizzati nei protettivi solari, dentifrici, creme, polveri ed emulsioni, sali da bagno e deodoranti (Carretero & Pozo, 2010).

Nel campo farmaceutico la gran parte degli usi, effettivi o prospettati, di minerali è incentrata sulle argille (McGinity & O'Donnell, 1996; Carretero et al., 2006; Droy-Lafaix & Tateo, 2006; Choy et al., 2007; Williams et al., 2009; Carretero & Pozo, 2009, 2010; Williams & Hillier, 2014; Gaskell & Hamilton, 2014), in particolare nel *drug delivery* (Aguzzi et al., 2007; Viseras et al., 2010; Aguzzi, et al., 2010; Salcedo et al., 2012). Le argille sono ampiamente impiegate in campo farmaceutico sia come eccipienti sia come principi attivi (Williams et al., 2009; Carretero & Pozo, 2009; Williams & Hillier, 2014) e le monografie delle argille impiegate in campo farmaceutico sono riportate nelle principali farmacopee internazionali, come quella europea, americana e giapponese (López-Galindo et al., 2007; Rowe et al., 2009).

2.1.2. Zeoliti in campo farmaceutico

Le zeoliti, in alcune proprietà analoghe alle smectiti (Bish, 2006), stanno riscuotendo un crescente interesse in campo biomedico (Pavelic & Hadzija, 2003; Danilczuk et al., 2008), non solo perché molti processi biochimici sono correlati a processi di scambio ionico, adsorbimento e catalisi, ma anche perché le zeoliti - soprattutto quelle di sintesi - sono considerate un vettore di particolare interesse nel *drug delivery* (Amorim et al., 2014; Lulf et al. 2014; Titinchi et al., 2014; Lyubenova Yaneva et al., 2015; Mintova et al., 2015; Vilaca et al., 2015). Tuttavia, contrariamente alle argille, ad oggi né le zeoliti naturali né quelle sintetiche sono state prese in considerazione da monografie delle principali farmacopee internazionali.

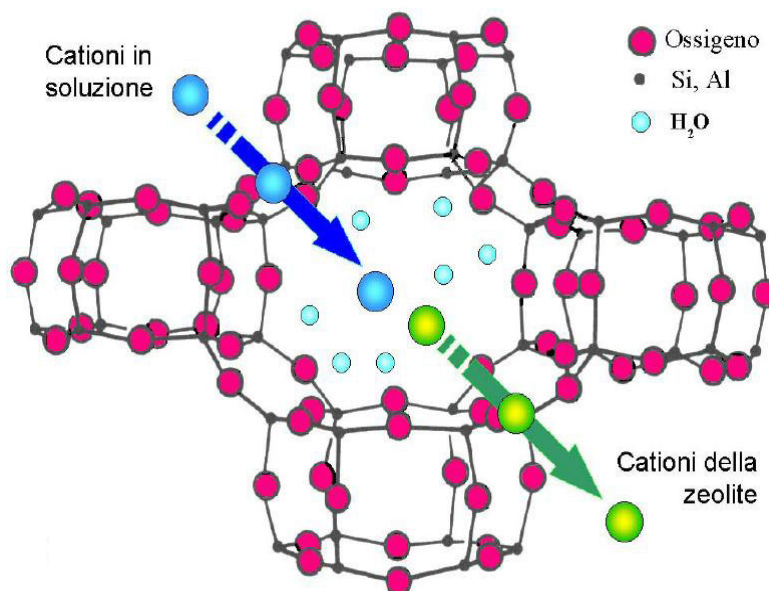
Le zeoliti naturali sono un gruppo di minerali costituito da più di 80 specie mineralogiche

diverse (Armbruster & Gunter, 2001). Chimicamente sono definibili, di norma, come alluminosilicati idrati di elementi alcalini e/o alcalino-terrosi (prevalentemente Na, K e Ca); strutturalmente sono tetrasilicati, in quanto originate dall'interconnessione tridimensionale di tetraedri [(Si,Al)O₄]. A differenza di altri tetrasilicati (ad es., dei feldspati), l'impalcatura tetraedrica delle zeoliti presenta ampie cavità interne comunicanti tra loro e con l'esterno mediante canali di dimensioni definite. Ai diversi tipi strutturali di zeolite corrispondono diverse forme e volumi delle cavità ("gabbie") e diverse forme e aperture dei canali (Tabella 3); gabbie e canali sono occupati da cationi e da molecole d'acqua, queste ultime in quantità dipendente dalla P_{H₂O} nell'ambiente. I cationi sono necessari per bilanciare il difetto di carica presente nell'impalcatura tetraedrica dovuto alla parziale sostituzione di Si⁴⁺ con Al³⁺ (e talvolta Fe³⁺). Essendo debolmente legati all'impalcatura tetraedrica, i cationi, muovendosi lungo i canali, possono essere ceduti per scambio ionico, purché sostituiti da altri cationi che complessivamente consentano di mantenere la neutralità di carica elettrica (Figura 2).

Tabella 3. Porosità totale e diametro dei pori di alcune zeoliti naturali (Aiello e Colella, 1996)

Tipo di zeolite	Formula tipo (riferita alla cella unitaria)	Porosità totale (%)	Diametro dei pori (Å)
Cabasite	Ca ₆ [Al ₁₂ Si ₂₄ O ₇₂]·40H ₂ O	47	3,8
Clinoptilolite	Na ₆ [Al ₆ Si ₃₀ O ₇₂]·24H ₂ O	34	3.0x7.6*
Erionite	(Na ₂ , K ₂ , Ca) _{3,5} K ₂ [Al ₉ Si ₂₇ O ₇₂]·27H ₂ O	35	3.6x5.1*
Mordenite	Na ₈ [Al ₈ Si ₄₀ O ₉₆]·24H ₂ O	28	6,5x7.0*
Phillipsite	K ₂ (Ca,Na ₂) ₂ [Al ₆ Si ₁₀ O ₃₂]·12H ₂ O	31	3,0x4,3*

Figura 2. Esempificazione del processo di scambio ionico nelle zeoliti (Passaglia, 2008).



La gran parte delle ricerche riguardanti il potenziale impiego di zeoliti naturali in campo farmaceutico è stata sviluppata sulla clinoptilolite, verosimilmente la zeolite più diffusa al mondo (Eyde e Holmes, 2006; Virta, 2015); in Italia, depositi di potenziale interesse economico sono presenti in Sardegna (Cerri et al., 2001; Cerri & Oggiano, 2002).

La struttura della clinoptilolite consta di due canali paralleli all'asse c (con apertura di 7.5×3.1 e 4.6×3.6 Å), e di altri due canali (entrambi 4.7×2.8 Å), paralleli a $[100]$ e $[102]$ (Armbruster, 2001). In campo biomedico questa zeolite è stata valutata come antiacido, antidiarroico, ipocolesterolemizzante, antidiabetico, antimicrobico, nelle terapie anticancro e nel *drug delivery* (Pavelic & Hadzija, 2003; Andronikashvili et al., 2009; Colella, 2011; Stylianou, 2012; Ferdov et al., 2013; Lyubenova Yaneva et al., 2015), e antidiarroici e antiacidi a base di clinoptilolite sono stati anche commercializzati (Rodríguez-Fuentes et al., 1997; 2006). Per la clinoptilolite, inoltre, sono state riportate proprietà cicatrizzanti (Mumpton, 2000), attività antivirale (Grce e Pavelic, 2005) e, recentemente, la capacità di legarsi con l'istamina (Selvam et al., 2014). Un litotipo sardo a clinoptilolite è stato usato per realizzare una formulazione, da impiegare nel trattamento dell'acne, capace di rilasciare simultaneamente ioni zinco ed un antibiotico (Cerri et al., 2004); il sistema, brevettato, ha mostrato notevole efficacia nei test in vitro (Bonferoni et al., 2007). Con lo stesso

litotipo è stato condotto uno studio preliminare per valutarne l'impiego come inibitore di proteasi per la somministrazione di farmaci peptidici, ottenendo risultati interessanti (Cerri et al., 2009, 2010). Clinoptiloliti modificate con tensioattivi sono state valutate come *carrier* per formulazioni a rilascio modificato del principio attivo (Rivera and Fariás, 2005; Krajišnik et al., 2013; Milić et al., 2014). Per la sua resistenza in ambiente acido e l'elevata selettività verso alcuni cationi, la clinoptilolite è stata usata come ingrediente nella preparazione di biscotti e cioccolata atti a depurare l'organismo dei bambini contaminati in seguito al disastro di Chernobyl (Armbruster, 2001). Beltcheva et al. (2012) hanno dimostrato che la somministrazione di clinoptilolite come integratore alimentare consente di disintossicare l'organismo di piccoli mammiferi contaminati da piombo. Un numero crescente di prodotti e brevetti indica - a volte con argomentazioni piuttosto vaghe - la clinoptilolite come un agente che, ingerito, è in grado di ridurre le sostanze tossiche nel corpo umano (Andronikashvili et al., 2009; Danz et al., 2009; Flowers et al., 2009; Selvam et al., 2014) e/o di alleviare i sintomi di irritazione gastrointestinale indotti da qualunque sostanza (Gast, 2014; Potgieter et al., 2014).

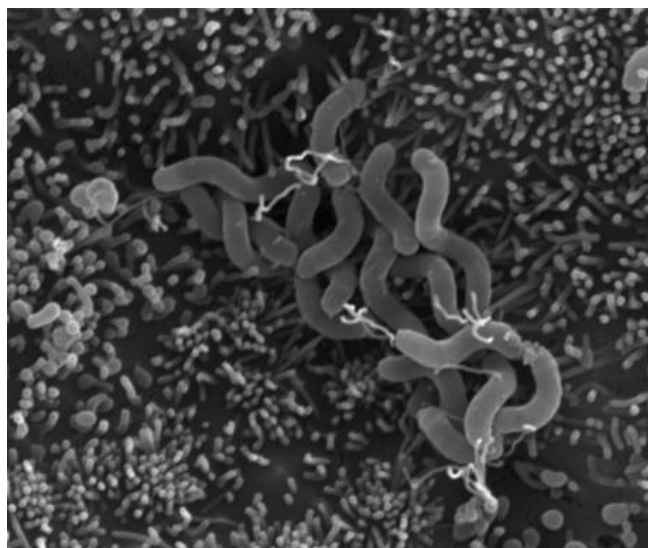
La clinoptilolite non è classificata come cancerogena per gli umani (IARC, 1997), e tests tossicologici su animali hanno mostrato che la sua ingestione è ben tollerata (Martin-Kleiner, 2001; Topashka-Ancheva et al., 2012). Tuttavia, l'origine naturale della clinoptilolite presuppone una composizione determinata dalle condizioni specifiche del deposito (Ferdov et al., 2013), di conseguenza una caratterizzazione chimica e mineralogica del materiale, eseguita con tecniche adeguate, è imperativa. Effetti biologici negativi possono sorgere a causa di un elevato contenuto di metalli pesanti in una roccia zeolitizzata (Grce & Pavelic, 2005). Minerali associati alla zeolite potrebbero interferire, sviluppare reazioni avverse, o semplicemente ridurre, per effetto di "diluizione", l'attività prevista della zeolite. Inoltre, dovrebbe essere considerata la possibile presenza di batteri, muffe e lieviti nel materiale, e la loro compatibilità con l'impiego proposto, dato che nelle principali farmacie sono previsti dei limiti alla contaminazione microbiologica a seconda del tipo di materiale, del tipo di contaminazione e della via di somministrazione. Si deve purtroppo notare come, in diversi studi che presentano possibili usi in campo biomedico delle zeoliti, la caratterizzazione del materiale sia inadeguata. Valgano come esempio i casi seguenti: i) spesso un materiale, utilizzato "as received", viene considerato come composto esclusivamente da zeolite, senza accertarne l'effettiva composizione mineralogica; ii) solo di rado viene determinato il contenuto di elementi minori potenzialmente dannosi per la salute. Infine, alcuni lavori che

mostrano risultati di esperimenti condotti su esseri umani non riportano alcun dato sulla clinoptilolite utilizzata (*Flowers et al., 2009; Potgieter et al., 2014*).

2.2. *Helicobacter pylori*

L'*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) è un batterio Gram-negativo, microaerofilo, flagellato, a forma di spirale (Figura 3). Il batterio è lungo da 2.5 a 5.0 μm e largo da 0.5 a 1.0 μm (*Dunn et al., 1997*).

Figura 3. Colonie di *H. pylori* nello stomaco (https://scopeblog.stanford.edu/2010/12/19/h_pylori_image).



L'infezione da *H. pylori* della mucosa gastrica colpisce circa il 50% della popolazione mondiale e si pensa che venga contratta nella prima infanzia per poi persistere come una infezione cronica per tutta la vita, se non specificatamente trattata (*Pounder, 1995*). *H. pylori* è spesso responsabile delle ulcere duodenali e gastriche ed è implicato in malattie quali gastriti, carcinoma gastrici, cancro colon-rettale, dispepsia non ulcerosa e malattie da reflusso gastroesofageo (*Velazquez and Feirtag, 1999*). Il cancro gastrico è la seconda causa di morte per cancro nel mondo. Questo batterio ha inoltre un ruolo importante nei MALTomi (forme di linfoma della zona marginale extranodale) e sono anche state studiate possibili associazioni con manifestazioni extra-intestinali quali patologie cardiovascolari, emicrania o fenomeno di Raynaud - una forma di vasospasmo - (*Mendall et al., 1994; Perna, 2007*); altri hanno suggerito che potrebbe essere

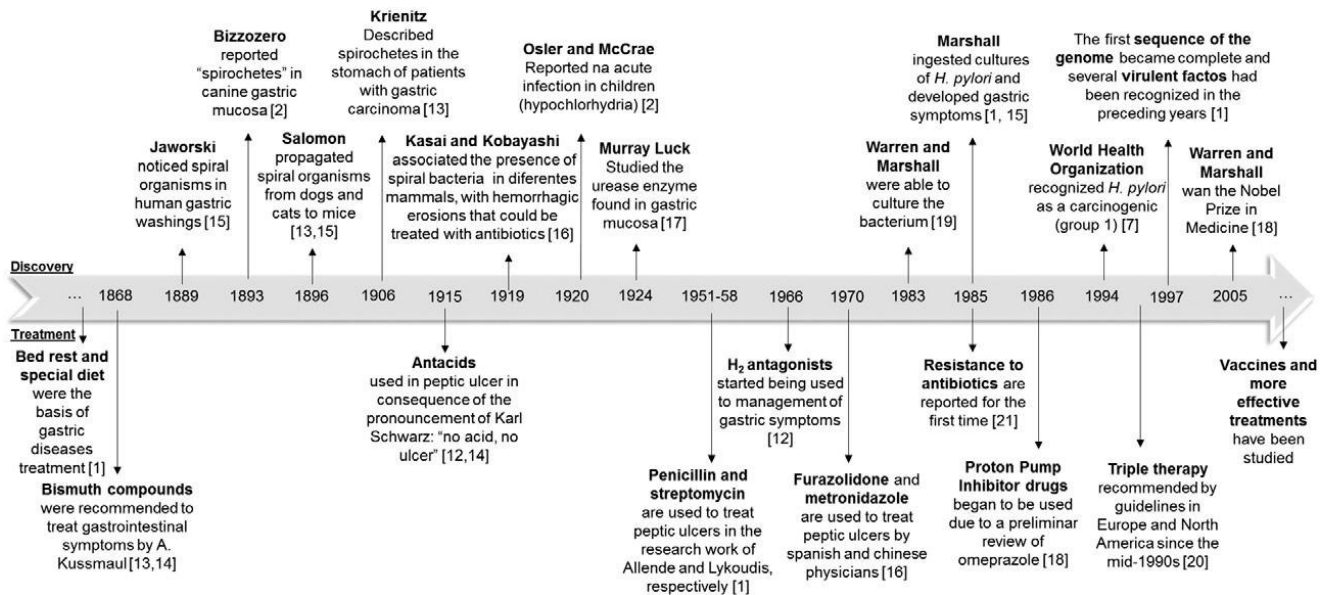
correlato a una crescita stentata durante l'infanzia (*Patel et al., 1994*).

Il batterio è stato classificato come agente cancerogeno di classe 1 nell'uomo dall'Agenzia internazionale sul cancro (*IARC, 1994*). Tuttavia, molti di coloro che sono infettati da *H. pylori* non mostrano alcun sintomo di malattia. Addirittura, alcuni studi affermano che nei bambini il batterio potrebbe comportare dei benefici al sistema immunitario e nei confronti di malattie allergiche come l'asma (*Hojsak & Kola, 2014*).

Già un secolo prima della scoperta di questo batterio, *Bizzozzero et al. (1893)*, avevano riportato la presenza di alcuni organismi nello stomaco umano ed animale, ma nessuno era mai riuscito ad isolarli (Figura 4). Fino agli anni 1960-70, medici e microbiologi ritenevano che lo stomaco fosse sterile e quindi tutte le testimonianze della presenza di spirochete nello stomaco erano state sottovalutate (*Marshall, 1988*). Così è stato necessario più di un secolo per avere la dimostrazione microbiologica dell'esistenza di batteri all'interno dello stomaco, quando due medici australiani, Robin J. Warren and Barry J. Marshall, dimenticarono piastre seminate con biopsie gastriche all'interno della stufa durante le festività pasquali; furono loro, nel 1983, a segnalare su "Lancet" la prima cultura dei batteri. Nel 1985 Marshall ingerì colture di *H. pylori* nel tentativo di soddisfare il postulato di Koch, promuovendo sintomi gastrici guariti dopo terapia con antibiotici e sali di bismuto. Nel 2005, a Warren e Marshall è stato assegnato il Premio Nobel per la Medicina (*Marshall & Warren, 1984; Dunn et al., 1997; Lopes et al., 2014*).

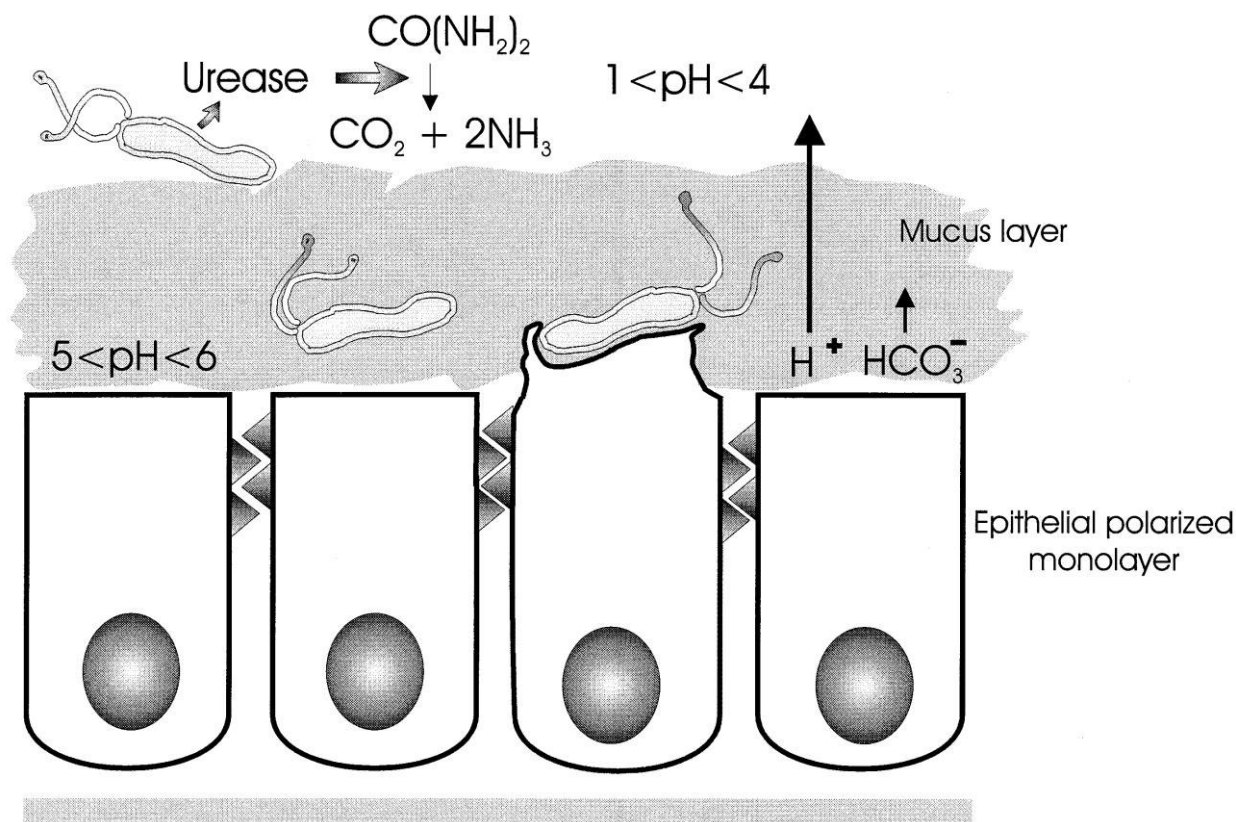
La scoperta dell'*H. pylori* ha totalmente modificato l'approccio patogenico alla patologia gastroduodenale. Le sequenze fisio-patologiche che si determinano in seguito all'infezione di questo microrganismo variano a seconda della sensibilità individuale, del genoma batterico e dei fattori ambientali.

Figura 4. Progressione nella scoperta e nel trattamento dell'*H. pylori* (Lopes et al., 2014).



Questo microrganismo è capace di invadere e colonizzare lo stomaco, principalmente la mucosa gastrica dell'antro e il canale pilorico, interagendo direttamente con le cellule epiteliali gastriche (De Luca & Iaquinto, 2004; Stewart & Ackroyd, 2011). Il batterio risiede nella mucosa gastrica o all'interfaccia con lo strato di muco (Hazell et al., 1986; Fedwick et al., 2005). Lo strato mucoso che permette allo stomaco di non essere attaccato dal pH acido fisiologicamente presente, viene penetrato dall'*H. pylori* grazie ai flagelli unipolari (da 4 a 6) che il microrganismo possiede, e alla sua azione mucolitica. I flagelli conferiscono motilità al batterio, caratteristica essenziale per la colonizzazione: infatti i mutanti aflagellati non presentano patogenicità. Una volta adeso all'epitelio, il microrganismo libera cataboliti e sostanze citotossiche in prossimità delle cellule gastriche innescando la risposta infiammatoria (Dunn et al., 1997; Perna, 2007). Il processo di colonizzazione del batterio è schematizzato in Figura 5.

Figura 5. Schema del processo di colonizzazione del batterio (Montecucco et al., 1999).



Sono stati descritti diversi fattori di virulenza di questo batterio, così come la capacità di secernere ureasi, enzima che idrolizza l'urea presente nei succhi gastrici generando ammonio e bicarbonato; ciò determina una riduzione dell'acidità gastrica (da 1.2 a 4.5-7.0) necessaria per la sopravvivenza del batterio (De Luca & Iaquinto, 2004; Stewart & Ackroyd, 2011).

L'ureasi nativa ha una massa molecolare di 540 kDa ed è costituita da 2 subunità (UreA e UreB) e da cinque proteine accessorie. La bassa costante di Michaelis ($K_m \approx 0.3 \text{ mM}$) consente a questo enzima di avere una attività catalitica efficiente anche a concentrazioni submillimolari di urea. L'ureasi è un fattore essenziale di virulenza e di colonizzazione per il batterio. I mutanti ureasi-negativi non sono in grado di colonizzare (Dunn et al., 1997). Esistono prove evidenti che l'ureasi è associata con la membrana esterna di *H. pylori*. Tuttavia, una certa attività ureasica si osserva anche all'interno del citoplasma (Bode et al., 1993; Phadnis et al., 1996). I cationi Mg^{2+} e Ca^{2+} sembrano avere una attività stabilizzante nell'associazione tra ureasi e superficie batterica, sebbene altri cationi possano inibire l'attività dell'enzima (Perez-Perez et al., 1994). Anche il nichel

ha una funzione importante nella espressione dell'attività ureasica dato che i siti attivi della ureasi contengono lo ione Ni^{2+} (Labigne et al., 1991; Boer et al., 2014). Una proteina di trasporto ad alta affinità verso il nichel (NixA), ossia in grado di veicolare Ni^{2+} anche quando la concentrazione del catione è molto bassa, è necessaria per la piena attività dell'*H. pylori* (Bauerfeind et al., 1984; Mobley et al., 1995). Quando vi è una diminuzione del pH intragastrico, una proteina codificata dal gene UreI presente sulla membrana determina un maggior ingresso di urea all'interno del citoplasma. L' NH_3 prodotta è quindi trasferita nel periplasma batterico e all'esterno della membrana batterica con formazione di ioni ammonio. L'ammoniaca, oltre a far innalzare il pH in prossimità del microorganismo, ha un effetto inibitorio sulle attività proteolitiche dei lisosomi e impedisce il flusso di protoni dalle cellule ossintiche verso il lume. Inoltre l'aumento della concentrazione di ioni ammonio ha un effetto tossico sulle cellule epiteliali e sul muco (Dunn et al., 1997). Per questi motivi l'ureasi sembra funzionare sia come fattore fondamentale di colonizzazione sia come fattore di virulenza (Smoot et al., 1990). La sintesi di questo enzima rappresenta circa il 15% di tutta la sintesi proteica del batterio e da conto del suo ruolo fondamentale per la sopravvivenza e colonizzazione dell'ambiente gastrico (Perna, 2007).

I fattori di virulenza del batterio sono molteplici. Vi è una proteina prodotta dal batterio, con un forte effetto citopatico, in grado di vacuolizzare in vitro le cellule. Questa, chiamata vacA (vacuolizing-associated gene A) ha un ruolo fondamentale nell'attività citotossica del batterio. Lo ione ammonio generato dalla ureasi giocherebbe un ruolo fondamentale nel processo di formazione dei vacuoli. In presenza di ammonio, il processo di vacuolizzazione è più veloce e i vacuoli sono più grandi rispetto a quelli generati dalla tossina da sola o indotta da ammoniaca. Questo mostra una sinergia tra l'attività enzimatica dell'ureasi e la tossina vacA (Cover et al., 1992; Ricci et al., 1997). Da notare che questa proteina viene attivata quando il pH è inferiore a 5.5 (De bernard et al., 1995; Montecucco et al., 1999). Oltre ad avere una attività vacuolizzante, queste tossine sarebbero in grado di incrementare la permeabilità delle cellule epiteliali fornendo al batterio una serie di nutrienti, tra i quali Ni^{2+} e Fe^{3+} , fondamentali per la crescita e sopravvivenza del batterio (Montecucco et al., 1999); inoltre determinerebbero una degradazione dello strato di muco generando ulteriori nutrienti per il batterio.

Una proteina, chiamata HPNAP (*H. pylori* Neutrophil activation protein), è capace di attivare i neutrofili e generare una risposta infiammatoria. Inoltre, questa proteina, a supporto della tossina VacA sopracitata, determinerebbe un aumento del flusso di nutrienti dall'epitelio gastrico

(Blaser, 1993; Montecucco et al., 1999). All'interno del cromosoma batterico è stata individuata una regione che codifica circa 40 proteine chiamata cagPAI (cytotoxin associated pathogenicity island). La presenza di tale isola sembra essere un fattore importante di virulenza. Uno dei geni presenti all'interno di tale isola è il gene cagA. La proteina cagA (cytotoxin associated gene A) è un antigene di 128 kDa con forte potere immunogeno, per cui i soggetti infetti da ceppi cagA positivi sviluppano una risposta anticorpale più velocemente. Numerosi studi portano a concludere che nei paesi sviluppati l'ulcera duodenale, l'atrofia e il carcinoma gastrico sono più comuni nei pazienti infetti da ceppi cagA positivi (Chan & Leung, 2002; Perna, 2007). Le proteine adesive, hanno un ruolo fondamentale nel processo di colonizzazione poiché consentono l'adesione del batterio alle cellule epiteliali gastriche (Montecucco et al., 1999).

Per la diagnosi dell'infezione da *H. pylori* sono state messe a punto diverse metodiche. I test disponibili possono essere invasivi e non invasivi (Braden, 2012). I primi richiedono l'esame endoscopico e il prelievo di campioni biotici (per esempio: *Rapid urease test*; colture cellulari). I metodi non invasivi (per esempio: sierologia; *Urea breath test*; ricerca dell'antigene del batterio nelle feci) non richiedono endoscopia. Le metodiche attualmente disponibili hanno dimostrato di avere una buona affidabilità anche se è ormai chiaro che nessun singolo esame è ottimale e solo una combinazione dei diversi test è in grado di garantire un'adeguata accuratezza diagnostica. La scelta dipende spesso dalle informazioni cliniche a disposizione e dalla disponibilità e costi dei test (Dunn et al., 1999).

Il trattamento di prima linea per l'eradicazione di *H. pylori* è una combinazione di tre farmaci per una/due settimane che comprende l'assunzione due volte al giorno di un inibitore di pompa protonica e due antibiotici (claritromicina e amoxicillina o metronidazolo) (Bien et al., 2014); tale terapia è efficace nel 80-90% dei casi. Le più comuni ragioni di fallimento sono i) l'antibiotico resistenza verso claritromicina e metronidazolo, ii) scarsa stabilità dei farmaci nell'ambiente gastrico, iii) scarsa capacità di permeazione dell'antibiotico attraverso lo strato di muco, iv) la scarsa *compliance* dei pazienti al trattamento (Endo et al., 2001, 2002; Graham & Fischbach, 2010; Bien et al., 2014; Shiota & Yamaoka, 2014). A questi fattori si aggiunge il ridotto tempo di residenza del farmaco nel sito di assorbimento legato allo svuotamento gastrico. Diversi approcci formulativi sono stati studiati al fine di ovviare a queste limitazioni; al fine di incrementare la permanenza del farmaco nello stomaco, sono state progettate diverse forme di dosaggio gastro-ritentive quali sistemi flottanti, mucoadesivi o capaci di interagire con specifici siti della superficie

batterica (*Bardonnnet et al., 2006*). Micro e nanoparticelle sono state proposte per incrementare la permeazione dei farmaci, per il rilascio sito-specifico nello stomaco di farmaci e avere un contatto diretto con il batterio (*Bardonnnet et al., 2006; Lin et al., 2009; Lopes et al., 2014*).

2.3. Razionale e scopo del progetto

Il presente studio - sviluppato nell'ambito del progetto PRIN 2010MKHT9B_008 - mira a sviluppare sistemi basati su zeoliti naturali come eccipienti e/o principi attivi da utilizzare per via orale, in particolare nelle infezioni gastriche.

Il nesso tra l'*Helicobacter pylori* e la clinoptilolite è individuabile nella attività enzimatica dell'ureasi e nella capacità di scambio cationico della zeolite. Come già esposto l'ureasi è un fattore essenziale di virulenza e di colonizzazione per il batterio ed ha la funzione di idrolizzare l'urea in ammoniaca e bicarbonato. L' NH_3 fa innalzare il pH in prossimità del microorganismo e, assieme allo ione ammonio, ha un effetto tossico sulle cellule epiteliali e sul muco. Inoltre, lo ione ammonio avrebbe un ruolo fondamentale nel processo di vacuolizzazione indotto dalla tossina vacA. L'elevata selettività della clinoptilolite verso lo ione ammonio e la sua resistenza in ambienti acidi, costituiscono presupposti favorevoli rispetto al suo impiego per il trattamento di infezioni gastriche indotte da *H. pylori*. La sottrazione dello ione ammonio dal microambiente del batterio da parte della clinoptilolite potrebbe determinare un ambiente sfavorevole per la replicazione e/o sopravvivenza del batterio e inoltre potrebbe comportare una riduzione della sua patogenicità. La clinoptilolite, sottraendo NH_4^+ dal microambiente del batterio mediante scambio cationico, dovrà rilasciare altro/i catione/i. Il tipo di catione rilasciato in cambio dello ione ammonio potrebbe assumere un ruolo importante, dato che alcuni cationi possono avere attività antibatterica nei confronti del batterio *H. pylori* (*Perez-Perez et al., 1994*). Il rilascio sito-specifico di cationi aventi attività antimicrobica potrebbe costituire un altro meccanismo con cui la clinoptilolite potrebbe esplicare un'attività antibatterica.

La prima fase della ricerca ha riguardato la preparazione e la caratterizzazione mineralogica, chimica, microbiologica e tecnologica di un materiale a base di clinoptilolite impiegabile per la somministrazione orale per l'uomo. Lo scopo era ottenere, partendo da una roccia ricca di clinoptilolite, un materiale riproducibile che massimizzasse le proprietà della zeolite e minimizzasse qualsiasi possibile interferenza (chimica, mineralogica e microbiologica). Nella valutazione del

materiale, le raccomandazioni e le procedure delle farmacopee europea (*Ph. Eur.*) e statunitense (*USP - United States Pharmacopeia*) sono state prese come riferimento il più possibile.

Il materiale ottenuto è stato poi condotto in alcune forme cationiche ed utilizzato per test microbiologici *in-vitro* miranti a valutarne l'attività antibatterica nei confronti di ceppi, sia di riferimento che clinici, di *H. pylori*. Ulteriori test sono stati poi eseguiti per valutare l'eventuale esistenza di una sinergia fra una serie di antibiotici correntemente impiegati nella terapia per l'eradicazione dell'*H. pylori* e le forme di clinoptiloite preparate.

3. MATERIALI E METODI

Se non diversamente specificato, si intende che le attività sono state svolte presso i laboratori dei due Dipartimenti dell'Università degli Studi di Sassari coinvolti nello sviluppo della ricerca, rispettivamente il *Dipartimento di Scienze della Natura e del Territorio* ed il *Dipartimento di Chimica e Farmacia*.

3.1. Preparazione dei materiali

3.1.1. Litotipo di partenza

La roccia utilizzata nell'ambito del presente lavoro è stata campionata in Sardegna, in provincia di Sassari, lungo la valle del fiume Tirso, in località *Bortivuile* (coordinate DMS: 40°25'8.548"N; 9°4'15.035"E). Si tratta di una epiclastite cineritica di ambiente fluvio-lacustre, di età oligo-aquitaniense, zeolitizzata a clinoptilolite. Sul litotipo e la zeolite in essa contenuta sono già disponibili dati derivanti da precedenti lavori, alcuni finalizzati a testarne possibili impieghi in campo farmaceutico (campione denominato "LacBen": *Cerri et al., 2004; Bonferoni et al., 2007*). Da tali ricerche derivano la composizione mineralogica, in Tabella 4, determinata mediante analisi quantitativa in diffrazione ai Raggi X (metodo RIR), l'analisi chimica della roccia totale, riportata nelle Tabelle 5 e 6 (analisi in ICP-MS/OES), e la formula della clinoptilolite: $(\text{Na}_{0.50}\text{K}_{0.86}\text{Ca}_{1.57}\text{Mg}_{0.70})(\text{Al}_{6.31}\text{Si}_{29.73}\text{O}_{72}) \cdot 22.14\text{H}_2\text{O}$ (rapporto Si/Al = 4.71).

Tabella 4. Composizione mineralogica del litotipo (*Cerri et al., 2004*).

Minerale	Quantità (wt. %)
Clinoptilolite	66 (±4)
Feldspati	18 (±2)
Opale-CT	13 (±1)
Quarzo	3 (±1)
Biotite	Tracce
Smectiti	Tracce
Totale	100 (±5)

Tabella 5. Composizione chimica del litotipo - elementi maggiori (Cerri et al., 2004).

SiO ₂	TiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	MnO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	P ₂ O ₅	L.o.I.	Totale
63.30	0.26	13.05	1.64	<0.03	1.40	2.69	1.76	1.64	0.08	14.05	99.87

Tabella 6. Composizione chimica del litotipo - elementi in tracce (Cerri et al., 2004).

Elemento	ppm	Elemento	ppm	Elemento	ppm
As	1.7	Ge	0.24	Sn	2.1
Ba	499	Hf	4.9	Sr	340.2
Be	2.7	Ho	0.6	Ta	1.0
Bi	0.13	In	< 0.1	Tb	0.4
Cd	<0.3	La	25.6	Th	15.5
Ce	46.9	Lu	0.3	Tm	0.3
Co	0.98	Mo	0.4	U	4.2
Cr	<5	Nb	9.5	V	21
Cs	3.05	Nd	18.1	W	0.2
Cu	14.6	Ni	< 5	Y	15.0
Dy	2.9	Pb	23.4	Yb	1.7
Er	1.6	Pr	5.3	Zn	34.6
Eu	0.52	Rb	70.1	Zr	165
Ga	13.5	Sb	0.3		
Gd	2.7	Sm	3.4		

3.1.2. Arricchimento in clinoptilolite

La roccia è stata ripulita dalle patine di alterazione superficiale e da porzioni in cui erano concentrati evidenti frammenti litici e/o patine di ossidi. Successivamente, la parte selezionata è stata frantumata in un mulino con mascelle in acciaio, ottenendo un granulato di pezzatura inferiore a 2.5 cm. Tale materiale è stato poi sottoposto ad un processo di comminuzione autogena

impiegando un mulino planetario *Retsch* con giare in agata privato delle masse battenti (200g di granulato per giara; 15 min a 70 RPM), allo scopo di ottenere prevalentemente un'abrasione dei microcristalli di clinoptilolite (meno duri e più piccoli rispetto ai cristalli di quarzo e feldspato coesistenti) piuttosto che una riduzione di granulometria di tutte le fasi presenti nella roccia. La polvere ottenuta è stata vagliata per 15 minuti in un vibrovaglio automatico *Controls D407*. La frazione passante al setaccio da 125 μm è stata poi sottoposta a sedimentazione frazionata usando aliquote di 11 g di polvere per volta. Queste sono state poste in un beaker di plastica successivamente riempito con 500 ml di acqua deionizzata, e quindi sottoposte ad attacco ultrasonico per circa 5 minuti (vasca ad ultrasuoni Sonorex super RK 106) allo scopo di disgregare ulteriormente il materiale cercando di ottenere particelle monominerali. La sospensione risultante è stata versata in un beaker da due litri mentre il sedimentato è stato miscelato con nuova acqua deionizzata e sottoposto ad un altro attacco ultrasonico. Dopo quattro processi di sonicazione, gli eluati raccolti nel beaker da due litri (lama d'acqua alta 16 cm) sono stati mescolati e poi lasciati sedimentare per 100 ore. Trascorso tale tempo è stato recuperato il sedimentato e su questo si è eseguita una seconda sedimentazione frazionata, da un minuto, usando un beaker da 500 ml riempito con 400 ml di acqua deionizzata (lama d'acqua alta 8 cm). Lo scopo delle due sedimentazioni frazionate è, rispettivamente, quello di eliminare la frazione prevalentemente argillosa (primo passaggio), e quella più grossolana nella quale si concentrano i granuli di feldspati e quarzo residui (secondo passaggio). Il surnatante dell'ultima sedimentazione è stato recuperato per evaporazione dell'acqua in stufa ventilata.

Sono stati preparati circa 175 g di arricchito, divisi in otto lotti. La composizione mineralogica di ciascun lotto è stata determinata mediante analisi in diffrazione X su polveri (cfr. paragrafo 3.2.1). I lotti omogenei sono stati poi uniti fra loro utilizzando un miscelatore (miscelatore a V- ARTHA AISI 304, velocità costante di 18 rpm). Il materiale risultante (denominato FA) è stato nuovamente analizzato in diffrazione X, ed impiegato per le fasi successive della ricerca.

3.1.3. Preparazione della clinoptilolite in forma sodica.

Nella fase successiva è stata preparata la forma sodica della clinoptilolite mediante un processo di scambio ionico. Questo ha lo scopo di: 1) omogeneizzare il materiale dal punto di vista della composizione chimica, rendendolo inoltre più facilmente riproducibile; 2) ridurre tracce di

metalli pesanti eventualmente presenti come cationi scambiabili nella zeolite; 3) ottimizzare la capacità di scambio cationico della zeolite, dato che ai fini dell'applicazione in studio si intende sfruttare tale proprietà. La polvere arricchita in clinoptilolite è stata posta a contatto (solido/liquido= 50 g/l) con una soluzione 1 M di NaCl (VWR; *Ph. Eur. grade*; purezza 99.9 %). Sono stati eseguiti 11 cicli di scambio, i primi due della durata di 1 h ciascuno, i successivi di 2 h, ad una temperatura di 65 °C mantenuta costante con un bagno termoregolato; un'ancoretta magnetica rivestita in teflon ed un agitatore hanno garantito la continua miscelazione del materiale. Al termine di ogni ciclo di scambio, liquido e solido sono stati separati per centrifugazione (Hettich Rotina 320). Dopo l'ultimo scambio, il materiale è stato lavato 12 volte con acqua deionizzata, fino a quando non si è verificata l'assenza di cloruri negli eluati dei risciacqui mediante il test con AgNO₃. Il materiale è stato essiccato in stufa ventilata a 40 °C e posto a reidratare per 24 h al 50% di umidità relativa in un essiccatore contenente una soluzione satura di Ca(NO₃)₂.

Il materiale così realizzato è stato denominato FA-Na.

3.2 Caratterizzazioni

3.2.1. Analisi XRD

Le analisi mineralogiche sono state eseguite usando un diffrattometro Bruker D2-Phaser e le seguenti condizioni operative: radiazione $\text{CuK}\alpha$, 30 kV, 10 mA, Ni-filter, LynxEye (PSD) detector con un angolo di apertura di 5° , 2θ range $5.8-70^\circ$, step size 0.020° , time per step 2 s, spinner 15 rpm. Per il riconoscimento delle fasi minerali si sono usati il software Bruker Eva 14.2 accoppiato ed il database PDF-2. La composizione mineralogica quantitativa è stata determinata con il metodo Rietveld (software: Bruker Topas 4.2; strutture: AMCSD) utilizzando i diffrattogrammi di campioni micronizzati (in un mulino McCrone) previa miscelazione con uno standard interno (20% di $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ Buheler micropolish II).

Per confrontare fra loro materiali sottoposti a diversi tests, spesso sono state eseguite analisi diffrattometriche utilizzando anche un diffrattometro Siemens D5000 e le seguenti condizioni operative: radiazione $\text{CuK}\alpha$, 40 kV, 30 mA, monocromatore in grafite sul fascio secondario, detector puntuale, 2θ range $2-70^\circ$, step size 0.020° , time per step 10 s. I diffrattogrammi dei vari materiali sono stati confrontati fra loro solo a parità di condizioni di acquisizione.

3.2.2. Analisi termiche

Analisi termogravimetriche e termodifferenziali (TG-DTG-DTA) sono state effettuate usando un termoanalizzatore simultaneo TA-Instrument Q600. Aliquote di circa 20 mg di campione sono state riscaldate fino a 900°C ($10^\circ\text{C}/\text{min}$; crogioli in allumina; Al_2O_3 come reference); sono state eseguite analisi sia in aria statica che con flusso d'aria di 100 ml/min. I risultati sono stati elaborati utilizzando il software TA-Universal Analysis.

3.2.3. Capacità di scambio cationico (CEC)

Questa determinazione è stata eseguita presso l'*Institute for Technology of Nuclear and Other Mineral Raw Materials* (ITNMS) di Belgrado, Serbia, nel corso di una permanenza bimestrale (giugno-luglio 2014) finanziata dal progetto ULISSE (Fondo Sociale Europeo).

Per la determinazione della capacità di scambio cationico (CEC), FA-Na è stato disperso (solido/liquido: 50g/l) in una soluzione 0.5 M di NH_4Cl (Sigma-Aldrich; purezza $\geq 99.5\%$). Sono stati eseguiti 5 cicli di scambio (i primi due da 30 min., il terzo da 1 h e gli ultimi due da 2 h) ad una

temperatura di 65 °C tenuta costante con un bagno termoregolato e sotto agitazione. Le quantità dei cationi rilasciati negli eluati dei cicli di scambio (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}) sono state determinate mediante spettrofotometria in assorbimento atomico (AAS; Analytic Jena Spekol 300). La capacità di scambio cationico è stata calcolata sommando le quantità dei cationi rilasciati, tenuto conto delle quantità presenti nel bianco.

3.2.4 Analisi chimiche

La composizione chimica dei campioni è stata determinata in un laboratorio certificato (Actlabs, Ancaster – ON, Canada) dove i materiali sono stati preparati mediante procedura standard (polverizzati mediante mulino ad elementi in acciaio dolce). Gli elementi maggiori sono stati determinati mediante ICP-OES (Induced Coupled Plasma – Optical Emission Spectroscopy) dopo fusione con litio metaborato/tetraborato e digestione in HNO_3 . Il ferro è stato determinato mediante titolazione. Gli elementi in tracce, tranne quando specificato, sono stati determinati mediante ICP-OES e ICP-MS (ICP-Mass Spectrometry) dopo totale digestione dei campioni in quattro acidi (HCl , HNO_3 , HClO_4 , e HF). Gli elementi Au, Br, Cl e Ir sono stati determinati mediante INAA (Instrumental Neutron Activation Analysis). Il fluoro (F) è stato analizzato mediante ISE (Ion-Selective Electrode) dopo fusione. La quantità di azoto presente è stata determinata tramite il metodo TKN (Total Kjeldahl Nitrogen). Il carbonio (carbonio totale e carbonio organico) è stato analizzato mediante spettroscopia infrarossa (IR). Dato che il laboratorio ActLabs avverte che la digestione totale potrebbe non essere molto efficace per la dissoluzione di fasi contenenti As, Ce, Cr, Eu, Hf, La, Lu, Nd, Sb, Sc, Sm, Ta, Tb, U, e Yb, questi elementi sono stati determinati anche mediante INAA. Per verificare la possibile contaminazione causata da mezzi di macinazione differenti, i metalli pesanti sono stati determinati mediante ICP-OES e ICP-MS anche su due campioni di FA-Na pulverizzati nei nostri laboratori utilizzando un mortaio in agata e un Retsch MM400 dotato di elementi macinanti in zirconia (ZrO_2).

3.2.5. Simulazione del processo digestivo - bioaccessibilità degli elementi, resistenza della clinoptilolite durante il transito nel tratto gastrointestinale e sua capacità di sottrarre NH_4^+

Sono stati eseguiti dei test usando le procedure descritte dalla farmacopea europea (*Ph. Eur.* 8.0) per simulare il transito del campione FA-Na nel tratto gastrico (test 1 e test *AGJ*) e gastro-intestinale (test 2). Il test 3, invece, simula il microambiente del batterio *H. pylori* nello stomaco. I

test 1 e 2 sono stati condotti al fine di valutare la bioaccessibilità orale degli elementi (in particolare, metalli pesanti) rilasciati da FA-Na durante il transito nel tratto gastrointestinale, mentre la resistenza della struttura della clinoptilolite è stata verificata, oltre che al termine dei test 1 e 2, anche dopo il test *AGJ*. Il test 3 è stato effettuato per valutare la capacità della zeolite di sottrarre ioni ammonio in un mezzo simulante l'ambiente gastrico in presenza di *Helicobacter Pylori*.

I test sono stati eseguiti mediante un apparato dissolutore semiautomatico dotato di un sistema di agitazione a paletta rivestita in teflon (conforme alle specifiche della *Ph. Eur.* 8.0). Il mezzo di dissoluzione è stato versato nel vessel ed equilibrato a 37 ± 0.5 °C; il vessel è stato coperto e l'agitazione tenuta a 100 rpm. Poiché si è inteso arrivare a poter rilevare concentrazioni dell'ordine dei ppb, si sono adottate tutte le accortezze atte ad evitare contaminazione da parte del personale, dell'ambiente, dei materiali e delle strumentazioni. Tutte le soluzioni sono state preparate usando acqua Milli-Q. È stato eseguito un bianco al fine di valutare eventuali impurità provenienti dai solventi, dai contenitori o strumenti. In pratica, i bianchi dei test non sono semplicemente le tre soluzioni base, ma, proprio per tener conto di eventuali rilasci da parte della strumentazione, le tre soluzioni sottoposte all'intero iter della prova, ma in assenza di zeolite.

Descrizione dei test

Test 1. 0.75 g di FA-Na sono stati versati in 750 ml di una soluzione di HCl 0.1 M (pH=0.94), tenuta sotto agitazione per 120 min.

Test 2. La prima fase ha ricalcato il Test 1; successivamente, sono stati aggiunti 250 ml di una soluzione di Na₃PO₄ 0.2 M, ottenendo un pH finale di 6.8. Il tutto è stato agitato per ulteriori 240 minuti.

Test *AGJ*. Stessa procedura del Test 1, ma usando come mezzo dissolutore succo gastrico simulato (preparato secondo *Ph. Eur.* 8.0) contenente pepsina.

Test 3. 0.75 g di FA-Na sono stati versati in 750 ml di una soluzione a pH 4, tenuta sotto agitazione per 120 min. La soluzione è stata preparata a partire da una soluzione di HCl 1 M, per aggiunta di NH₃.

Al termine dei test, gli eluati e la polvere sono stati separati per centrifugazione. Gli eluati sono stati analizzati, così come i bianchi, mediante ICP-MS/OES presso i laboratori Actlabs (Ontario, Canada); i risultati delle analisi del test 2 sono stati riportati ad un rapporto solido/liquido di 1 g/l. Durante i test il pH è stato monitorato al fine di valutare se la clinoptilolite avesse determinato, in quelle condizioni, variazioni del pH. Le polveri, previo lavaggio con acqua deionizzata, sono

state analizzate in diffrazione X.

3.2.6. Qualità microbiologica: saggio di conta microbica

Il test è stato effettuato come descritto dalla *Ph. Eur.* 8.0. Il campione FA-Na è stato disperso in acqua peptonata (1g in 19 ml; diluizione di 10^{-1}). Sono state preparate altre diluizioni di 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} prelevando volumi precisi della sospensione di partenza e diluendo con acqua peptonata. Come terreni di coltura sono stati impiegati il tryptone soya agar (Oxoid) per la conta dei microrganismi aerobi totali (CMAT) e il sabouraud dextrose agar (oxide) per la conta dei funghi e di lieviti totali (CFLT). I terreni sono stati sterilizzati e tenuti a circa 45°C; 1 ml di ciascuna dispersione zeolite/acqua peptonata è stato disposto in piastra sterilizzata e successivamente sono stati aggiunti 20 ml di terreno per ciascuna piastra. Le piastre sono state leggermente agitate, quindi lasciate raffreddare e incubate. Le piastre con il terreno sabouraud dextrose agar sono state incubate a 20°C per 7 giorni mentre le piastre di tryptone soya agar sono state incubate a 37 °C per 5 giorni. Tutti i test sono stati svolti in triplicato. Le colonie sono state contate e moltiplicate per il fattore di diluizione. I valori sono stati mediati e i risultati sono espressi come numero di UFC (unità formanti colonia) per grammo di campione.

3.2.7. Processo di sterilizzazione e test di sterilità

È stata effettuata una prova di sterilizzazione del campione FA-Na mediante il metodo della sterilizzazione con calore a secco descritto nella *Ph. Eur.* 8.0. Il materiale è stato riscaldato a 160 °C per 3 h (le condizioni minime di riferimento descritte nella farmacopea sono 160 °C per 2 ore). La sterilizzazione è stata effettuata in una stufa a ventilazione forzata (Termaks). Il materiale sterilizzato è stato analizzato in diffrazione ai raggi X per verificare che il processo di sterilizzazione non compromettesse la struttura della zeolite

Al fine di verificare l'efficacia del processo di sterilizzazione, il materiale sterilizzato è stato sottoposto al saggio di sterilità previsto dalla *Ph. Eur.* 8.0. In particolare la zeolite sterilizzata è stata sottoposta al saggio di sterilità per inoculazione diretta del terreno di coltura. Sono stati preparati 100 ml di tryptone soya broth (Oxoid) e di thioglycollate medium USP (Oxoid). A questi è stato aggiunto il campione FA-Na sterilizzato, alla concentrazione di 4 g/l. Le sospensioni ottenute sono state incubate per 14 giorni e dopo tale periodo 1 ml è stato prelevato e inoculato nello stesso

terreno fresco e incubato per altri 5 giorni. Il materiale sterilizzato soddisfa il test di sterilità se non si osserva crescita microbica durante il periodo di incubazione.

3.2.8. Area superficiale specifica e porosità

Queste analisi sono state eseguite presso l'*Institute of Chemistry, Technology and Metallurgy* dell'Università di Belgrado, Serbia, nel corso di una permanenza bimestrale (giugno-luglio 2014) finanziata dal progetto ULISSE (Fondo Sociale Europeo).

La caratterizzazione delle proprietà in termini di area superficiale specifica e porosità è stata realizzata mediante misure di adsorbimento di gas. Questa metodologia è specificatamente applicata al calcolo dell'area superficiale, del volume poroso, della distribuzione e della dimensione dei pori (PSD) di materiali porosi. Le isoterme di adsorbimento-desorbimento dei campioni sono state ottenute mediante adsorbimento di azoto a 77 K usando un apparecchio Sorptomatic 1990 Thermo Finnigan. Prima dell'analisi, le polveri del campione FA-Na sono state degassate sotto vuoto per quattro ore a temperatura ambiente, quindi 383 K per 24 h. Le isoterme di adsorbimento ottenute sono state analizzate mediante il Software ADP Version 5.13 Thermo Electron. I valori del volume totale dei pori (V_{tot}) e l'area specifica (S_{BET}) dei campioni sono state determinate, rispettivamente, applicando la regola di Gurevitsch alla pressione relativa $p/p_0 = 0.98$ e mediante il metodo di Brunauer, Emmett, Teller (BET) considerando la parte lineare della isoterma di adsorbimento. Il volume dei micropori (V_{mic}) è stato calcolato applicando l'equazione di Dubinin–Radushkevich. Il volume dei mesopori (V_{meso}) è stato determinato con il metodo di Dollimore e Heal (DH).

3.2.9. Potenziale Zeta e Punto di carica zero

Queste analisi sono state eseguite presso la *Faculty of Pharmacy* dell'Università di Belgrado, Serbia, nel corso di una permanenza bimestrale (giugno-luglio 2014) finanziata dal progetto ULISSE (Fondo Sociale Europeo).

Il Potenziale Zeta (PZ) dei campioni è stato misurato usando un apparecchio Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd, UK). Sospensioni acquose del campione FA-Na (0.5 mg/ml) sono state disperse usando un bagno ad ultrasuoni. Il PZ è stato misurato su tale sospensione e il valore finale rappresenta la media di sei determinazioni. Il PZ è stato misurato sia per sospensioni in acqua distillata (pH 6.05) sia per sospensioni in soluzioni acquose di HCl a differenti valori di pH.

Il punto di carica zero (pH_{pzc}) è stato determinato usando come elettrolita soluzioni di KNO_3 a diversa concentrazione: 0.001, 0.01 e 0.1 mol/L (*Milonjic et al., 1975; Gulicovski et al., 2008*). I pH iniziali (pH_i) di tali soluzioni sono stati corretti mediante piccole aggiunte di idrossido di potassio 0.1 mol/L o di acido nitrico 0.1 mol/L per ottenere, per ogni concentrazione di elettrolita, diverse soluzioni con pH da 2 a 12. A ciascuna soluzione iniziale (25ml) sono stati aggiunti 0.05 g di materiale ed i contenitori messi in agitazione per 24 ore a temperatura ambiente. Successivamente le sospensioni sono state centrifugate a 10000 rpm per 10 minuti ed i pH finali (pH_f) degli eluati sono stati misurati, previa separazione del solido.

3.2.10. Osservazione al SEM

Le osservazioni in microscopia elettronica a scansione sono state eseguite, sia su campioni del litotipo di partenza che sui materiali da esso preparati, utilizzando un microscopio Zeiss EVO LS10. Piccola quantità di campione sono state disposte su dischetti biadesivi in carbonio precedentemente posti su portacampioni (*stub*) di alluminio; la conduttività elettrica è stata ulteriormente perfezionata utilizzando della colla d'argento. Gli *stub* sono stati poi inseriti in un metallizzatore ad oro (Agar Scientific sputter coater B7341). I campioni così preparati sono stati osservati al SEM in condizioni di alto (potenziale di accelerazione di 20 kV). Le osservazioni sono state condotte utilizzando sia gli elettroni secondari (*SE*) che quelli retrodiffusi (*BSE*).

3.2.11. Caratterizzazione tecnologica specifica per applicazioni nel campo farmaceutico

Le polveri ottenute sono state caratterizzate dal punto di vista delle proprietà fondamentali e derivate, utili per la loro applicazione in campo farmaceutico secondo i saggi della *Ph. Eur.* 8.0 e della USP 32.

3.2.11.1 Analisi dimensionale

L'analisi dimensionale delle polveri è stata effettuata in diffrazione laser impiegando un apparecchio Coulter LS 100Q Laser Sizer (lunghezza d'onda di 750 nm); lo strumento è in grado di analizzare particelle di dimensioni comprese tra 0.4 e 1000 μm . Quantità pari a 10 mg di polvere sono state sospese in 5 ml di acqua MilliQ mediante sonicazione per 5 minuti e agitazione magnetica per un'ora. Aliquote della sospensione sono state poste nella cella porta campione posta lungo il cammino del raggio laser, contenente 13 ml di soluzione acquosa al 40% di saccarosio

tenuta sotto blanda agitazione magnetica. Le determinazioni sono state condotte in triplicato ed i risultati sono espressi, in micron, come diametro equivalente volume/superficie (d_{vs}) e diametro modale (d_m). La distribuzione dimensionale è stata espressa mediante curve ottenute plottando la percentuale in volume di particelle in funzione del diametro, riportato in scala logaritmica. L'uniformità della distribuzione granulometrica è stata valutata in termini di SPAN Index, calcolato mediante la seguente equazione:

$$\text{SPAN Index} = (d_{90} - d_{10}) / d_{50}$$

dove d_{10} , d_{50} e d_{90} rappresentano le dimensioni per cui il 10, il 50 e il 90% in volume delle particelle sono più piccole del rispettivo diametro. E' da notare che lo SPAN Index si riduce all'aumentare dell'uniformità della distribuzione granulometrica di una polvere (per una polvere perfettamente uniforme sarebbe pari a zero).

3.2.11.2 Determinazione del "Volume vero" e della "densità vera" di FA-Na

La "densità vera" (o assoluta) di una polvere è il rapporto fra la sua massa ed il suo "volume vero", ossia il volume totale a meno del volume dei pori aperti (che possono essere presenti all'interno di una particella) e del volume degli spazi interparticellari. La densità vera di FA-Na è stata misurata utilizzando un picnometro ad elio AccuPyc 1340 (Figura 6), in grado di misurare con precisione il volume vero e quindi, nota la massa, di calcolare la densità vera. In un apposito contenitore è stata pesata la quantità di polvere necessaria al suo riempimento che è stato, poi, inserito all'interno dello strumento. L'analisi è stata effettuata in triplicato e i risultati sono espressi come volume vero (V_v , cm^3) e densità vera (ρ_v , g/cm^3).

Figura 6. Picnometro ad elio AccuPyc 1340 utilizzato per la misura della densità vera delle polveri.



3.2.11.3 Misura del volume e densità apparenti

La densità apparente è la densità che si ottiene dal rapporto tra la massa di un campione di polvere ed il suo volume totale. Si possono misurare diverse densità apparenti a seconda di come si impacca la polvere: se il campione di polvere viene semplicemente versato in un contenitore graduato, si ottiene la densità al versamento (o *bulk*); se lo stesso è, poi, sottoposto ad un numero noto di colpi di assestamento, si ottiene il volume allo scuotimento (o *bulk tapped*).

Una quantità predeterminata di polvere di FA-Na (55g) è stata introdotta all'interno di un cilindro di plastica da 100 ml; una volta registrato il volume al versamento (V_b), il cilindro è stato sottoposto a 50, 250, 500 e 1250 colpi standardizzati al termine dei quali sono stati misurati i rispettivi volumi all'impaccamento, V_{50} , V_{250} , V_{500} e V_{1250} (cm^3). Le determinazioni sono state effettuate in triplicato. Impiegando i dati ottenuti, sono state calcolate sia la capacità di impaccamento della polvere che le rispettive densità apparenti (ρ_b , ρ_{250} , ρ_{1250} g/cm^3).

3.2.11.4 Valutazione della scorrevolezza delle polveri

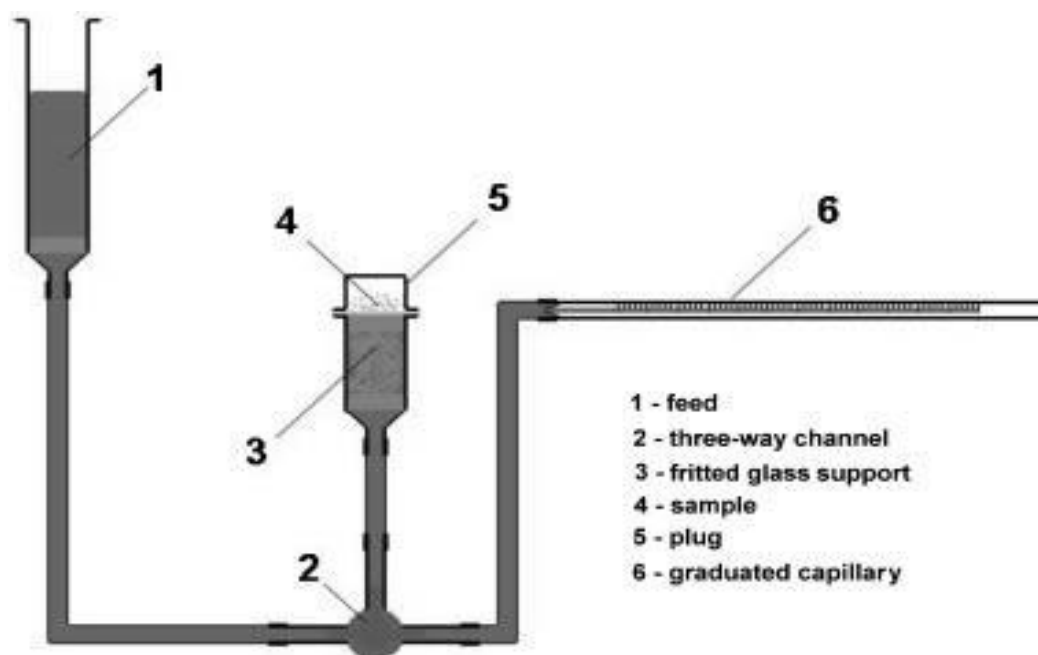
Le caratteristiche di scorrimento delle polveri sono state determinate secondo la *Ph. Eur.* 8.0 con a) il metodo dinamico, b) calcolando l'indice di comprimibilità e c) l'indice di *Hausner*. Il metodo dinamico prevede la misurazione della velocità di scorrimento della polvere attraverso un orifizio. Una quantità predeterminata di polvere (100 g) è stata introdotta nell'imbutto per scorrimento senza essere compattata. Dopo aver aperto l'orifizio inferiore, è stato misurato il tempo necessario perché l'intero campione defluisse dall'imbutto. L'imbutto utilizzato (Flowability Tester

BEP2, Copley Scientific, UK) risponde alle specifiche della *Ph. Eur.* 8.0. La determinazione dell'indice di comprimibilità e dell'indice di Hausner è un metodo semplice, rapido e molto popolare per la previsione delle caratteristiche di scorrimento delle polveri. L'indice di Hausner (HI) si calcola dal rapporto tra la densità *tapped* (V_{1250}) e quella *bulk* (V_b). Maggiore è il valore di HI, minore è la scorrevolezza. L'indice di comprimibilità $IC = 100 \times [(V_b - V_{1250}) / V_b]$, è uno strumento di misura indiretta di un insieme di proprietà quali densità *bulk*, dimensioni e morfologia, area superficiale, umidità, coesione e, conseguentemente, della scorrevolezza delle polveri. I dati ottenuti sono stati confrontati con la scala di attitudine allo scorrimento riportata nella *Ph. Eur.* 8.0.

3.2.11.5 Water Uptake

La capacità della polvere di assorbire acqua (*water uptake*) è stata valutata mediante l'apparato di Enslin - modificato come descritto in *Rassu et al.* (2009) - mostrato in Figura 7. Dieci milligrammi di polvere sono stati disposti in modo uniforme su un filtro di cellulosa pre-saturato (diametro = 1 cm), disposto su un supporto di vetro poroso e connesso ad un capillare graduato (precisione: 1/1000 ml a 20°C). La polvere richiama l'acqua per capillarità e la quantità di acqua assorbita viene misurata dal capillare. Per prevenire l'evaporazione il supporto di vetro viene coperto con del parafilm. L'acqua assorbita è stata misurata a tempi prestabiliti (15, 30, 60, 120, 180, 300 s). Il test è stato eseguito a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e ad una umidità relativa compresa fra 30 e 53%.

Figura 7. Apparato di Enslin modificato usato per determinare il 'water uptake'. Il supporto di vetro poroso (3) e il capillare graduato (6) sono allineati e connessi mediante un rubinetto a tre vie (*Rassu et al.*, 2009)



3.2.11.6 Misura del pH di una data sospensione acquosa di FA-Na

Il pH di una sospensione acquosa di FA-Na è stato misurato eseguendo il test secondo quanto prescritto dalla USP 32 (2009) per le sospensioni argillose. Quattro 4 g di polvere sono stati sospesi in 200 ml di acqua milliQ e il pH è stato misurato dopo 2 minuti di agitazione.

3.2.12. Compattabilità della polvere, resistenza delle compresse e test di disaggregazione

Sono state eseguite compressioni dirette della polvere utilizzando una pressa idraulica e una matrice avente diametro di 13 mm collegata con una pompa meccanica da vuoto. Come lubrificante è stato utilizzato il magnesio stearato. Per ogni prova di compressione sono stati pesati circa 500 mg di materiale.

Sulla polvere FA-Na, preventivamente equilibrata al 50 % di umidità relativa, sono state eseguite diverse compressioni dirette variando la forza di compressione (4.9; 9.8; 19.6; 49.02 kN), il tempo di compressione (30, 120 secondi) e il tempo di applicazione del vuoto (0, 30, 120, 300 secondi), per verificare come questi parametri possano influire sul processo di compressione. Al fine di valutare l'influenza del contenuto di umidità, sono state eseguite delle compressioni su polveri di FA-Na preventivamente disidratate (120°C per 24 h) utilizzando gli stessi parametri di compressione.

Le compresse ottenute sono state misurate con un calibro per determinarne il volume (V_c). La porosità (P) di ciascuna compressa è stata calcolata come segue $P = 100 \times [(V_c - (wt/\rho_v))/V_c]$, dove wt è il peso della compresse e ρ_v è la densità vera della polvere. La resistenza alla rottura R_r delle compresse è stata misurata con l'apparecchio di Monsanto. La resistenza alla trazione R_t è stata calcolata come $R_t = 2000 \times R_r / (\pi \times h \times d)$ dove h e d sono lo spessore e il diametro della compressa, rispettivamente (*Rassu et al., 2009*).

La disaggregazione delle compresse è stata valutata mediante un test non ufficiale: le compresse sono state versate in un becker contenente 50 ml di acqua a temperatura ambiente ed è stato misurato il tempo necessario alla loro disaggregazione.

3.3. Valutazione dell'attività antibatterica della clinoptilolite nei confronti del batterio *Helicobacter pylori*

3.3.1. Premesse

Il presupposto del progetto è che la clinoptilolite possa determinare condizioni sfavorevoli alla replicazione e/o sopravvivenza del batterio sottraendo ammonio dal suo microambiente. Poiché il processo di scambio ionico deve essere elettricamente neutro, la clinoptilolite - preparata in forma sodio - rilascerà ioni Na^+ pari al numero di NH_4^+ sottratti.

In base al presupposto del progetto, una clinoptilolite in forma ammonio non dovrebbe avere nessuna attività antibatterica nei confronti dell' *H. pylori*, poiché - essendone già "satura" - non potrebbe sottrarre NH_4^+ . Per verificare la validità dell'ipotesi progettuale si è deciso di preparare anche del materiale a base di NH_4^+ -clinoptilolite (FA- NH_4), da impiegare per un controllo incrociato. Inoltre, per stabilire se una eventuale attività antibatterica della Na-clinoptilolite sia determinata dal sodio rilasciato piuttosto che dalla sottrazione di ammonio, si sono previsti anche test miranti a verificare l'eventuale attività antibatterica di Na^+ ; questi test sono stati effettuati usando soluzioni di NaCl contenenti sodio in quantità pari a quella presente nella Na-clinoptilolite usata nei test omologhi. Poiché ioni Cl^- sono normalmente presenti nei succhi gastrici (che contengono acido cloridrico), non vi è motivo di ritenere che tale anione possa inficiare la significatività dei test.

Le proprietà antimicrobiche di zeoliti in forma zinco e argento sono documentate (*Tanimoto & Nakajima, 1996*); test *in-vitro* hanno dimostrato la superiore efficacia di sistemi Zn-clinoptilolite+antibiotico, rispetto al solo antibiotico, nei confronti del *Propionibacterium acnes* (*Bonferoni et al., 2007*). Lo zinco è un nutriente essenziale per l'organismo umano e possiede numerosi ruoli strutturali e biochimici (*Lowe et al., 2009*); inoltre, numerosi studi ne descrivono l'attività antibatterica (*Sirelkhatim et al., 2015*). Complessi dello zinco sono stati valutati come farmaci da impiegare nelle ulcere gastriche (*Matsukura and Tanaka, 2000*) ed è stata osservata la capacità inibitoria dell'attività ureasica del batterio *H.pylori* da parte dello zinco (*Zhong-Lu et al., 2011; Perez-Perez et al., 1994*). L'argento è ampiamente impiegato in dispositivi medici e cosmetici in virtù del suo ampio spettro antibatterico (*Lansdown, 2010; Park et al., 2009*). L'attività antibatterica dell'argento nei confronti di *H. pylori* è documentata da diversi studi (*Muhammad et al., 2014; Lopes et al., 2014*). Per tali ragioni si è deciso di estendere la sperimentazione anche a

materiali costituiti da Ag- e Zn-clinoptilolite, i quali svilupperebbero una duplice azione: sottrazione di ammonio e rilascio di cationi con potenziale azione antibatterica. Tali materiali, denominati rispettivamente FA-Ag e FA-Zn, sono stati preparati (così come FA-NH₄) per scambio cationico a partire da FA-Na. L'impiego di clinoptilolite in forme cationiche diverse può dare informazioni utili per capire se un'eventuale attività antibatterica sia dovuta solo alla sottrazione di ammonio dal microambiente o dipenda anche dal tipo di catione ceduto.

Nella prima parte degli studi microbiologici è stato impiegato un ceppo batterico da collezione. Successivamente la sperimentazione è stata estesa a ceppi clinici, data l'ampia variabilità della resistenza agli antibiotici da parte di differenti ceppi clinici (*Graham & Fischbach, 2010; Bien et al., 2014; Shiota & Yamaoka, 2014*). Avvantaggiandosi della partnership fra l'Università di Sassari e l'Università di Hue, in Vietnam, si è scelto di svolgere questa seconda fase di esperimenti presso il "Carlo Urbani Center" (Dipartimento di Microbiologia, Università di Medicina e Farmacia di Hue, Vietnam), utilizzando ceppi clinici locali nel corso di esperimenti condotti in collaborazione con personale di documentata esperienza sull'argomento. Gli studi microbiologici condotti sono, pertanto, così suddivisi:

1. test svolti sul ceppo di riferimento (o "di collezione") di *H. pylori* (ATCC 43504);
2. test svolti su ceppi clinici di *H. pylori*.

3.3.2. Preparazione delle altre forme cationiche di clinoptilolite

3.3.2.1 Preparazione della clinoptilolite in forma ammonio

Un'aliquota di FA-Na è stata posta in una soluzione 0.5 M di NH_4Cl (Sigma-Aldrich; grade $\geq 99.5\%$) con rapporto solido/liquido 30 g/l. Sono stati eseguiti 5 cicli di scambio (i primi due da 30 min., il terzo da 1 h e gli ultimi due da 2 h) a 65 °C; la torbida è stata continuamente dispersa tramite un'ancoretta magnetica rivestita in teflon. Al termine di ogni ciclo di scambio liquido e solido sono stati separati per centrifugazione. Dopo l'ultimo scambio il materiale è stato lavato 15 volte con acqua deionizzata e quindi essiccato in stufa ventilata a 40 °C. Le polveri sono state reidratate per 24 h al 50% di umidità relativa, ponendole a temperatura ambiente in un essiccatore contenente una soluzione satura di $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Il materiale realizzato è stato denominato FA- NH_4 .

3.3.2.2 Preparazione della clinoptilolite in forma argento

Un'aliquota di FA-Na è stata posta in una soluzione 0.5 M di AgNO_3 (VWR, *Ph. Eur.* grade $>99\%$) con rapporto s/l = 30 g/l. Si sono eseguiti 7 cicli di scambio (i primi due da 1 h, gli altri da 2 h) a 65 °C; la torbida è stata continuamente dispersa. Al termine di ogni ciclo di scambio liquido e solido sono stati separati per centrifugazione. Dopo l'ultimo scambio il materiale è stato lavato con acqua deionizzata a 65 °C fino a quando non si è riscontrata l'assenza di argento nell'acqua dei risciacqui, testata con NaCl. Le polveri sono state essiccate a 40 °C e poi reidratate 24 h (50% U.R.). Il materiale realizzato è stato denominato FA-Ag.

3.3.2.3 Preparazione della clinoptilolite in forma zinco

Un'aliquota di FA-Na è stata posta in una soluzione 0.5 M di $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (VWR, *Ph. Eur.* grade $>99\%$) con rapporto s/l = 30 g/l. si sono eseguiti 10 cicli di scambio (i primi due da 1 h, gli altri da 2 h) a 65 °C; la torbida è stata continuamente dispersa. Al termine di ogni ciclo di scambio, liquido e solido sono stati separati per centrifugazione. Dopo l'ultimo scambio, il materiale è stato lavato 14 volte con acqua deionizzata a 65 °C. Le polveri sono state essiccate e poi reidratate. Il materiale realizzato è stato denominato FA-Zn.

3.3.3. Test svolti sul ceppo di collezione di *H. pylori* (ATCC 43504)

3.3.3.1 Ceppo batterico, condizioni di crescita e di stoccaggio

L'attività antibatterica in vitro dei materiali a base di clinoptilolite è stata testata nei confronti del ceppo di riferimento di *H. pylori* ATCC 43504 (Sigma-Aldrich). La crescita del batterio è avvenuta in piastre contenenti Columbia Blood Agar o Muller Hinton Agar, supplementati con il 5% di sangue defibrinato di cavallo, in ambiente microaerobico (85% N₂, 5% O₂, e 10% CO₂ - gas mixture, CampyGen, Oxoid), a 37°C per 3-4 giorni (*Megraud and Lehours, 2007*). Il batterio è stato poi stoccato a -80 °C in siero di cavallo con DMSO (Dimethyl sulfoxide C₂H₆OS) o glicerolo al 20%.

3.3.3.2 Materiali testati

Sono state testate le quattro forme cationiche preparate: FA-Na; FA-NH₄; FA-Ag; FA-Zn. Inoltre sono stati testati i seguenti antibiotici: Amoxicillina tri-idrata (AMX), Levofloxacina (LEV) e Metronidazolo (MT). Gli *strip MIC evaluator* e i dischi per antibiogramma dei farmaci sono stati acquistati dalla Oxoid. L'Amoxicillina tri-idrata (in polvere - purezza 99%) è stata acquistata dalla Sigma-Aldrich.

3.3.3.3 Valutazione della crescita del batterio in ambienti acidi

Al fine di valutare se, in condizioni che simulano più compiutamente l'ambiente gastrico, potesse cambiare la sensibilità del batterio nei confronti dei materiali testati, alcuni test sono stati svolti in terreni a pH acidi. È stata preventivamente valutata la capacità del batterio di crescere in piastre contenenti Muller Hinton Agar supplementato con il 5% di sangue defibrinato di cavallo (MHAS) con l'aggiunta di HCl, onde condurre test ai seguenti pH: 5, 4, 3 e 2; tali test sono stati eseguiti sia assenza che in presenza di urea (600 mg/l). È stata inoltre valutata la capacità del batterio di crescere in terreni a pH 7 (senza l'aggiunta di HCl) con l'aggiunta di urea (quest'ultima sempre con concentrazione di 600 mg/l).

3.3.3.4 Agar cup diffusion test

Questa metodica è stata impiegata come test preliminare di screening (*Lawal et al., 2014*;

Saengmee-Anupharb et al., 2013) per osservare la sensibilità dell'*H. pylori* alle diverse forme cationiche della clinoptilolite. Sospensione del batterio in soluzione salina (4 McF – unità McFarland) sono state distribuite, mediante tampone sterile, su tutta la superficie di piastre contenenti 20 ml di MHAS. Successivamente sulle piastre sono stati realizzati quattro piccoli fori ad uguale distanza impiegando come stampo dei puntali sterili presi dal verso opposto (diametro 6 mm). In tali fori sono stati versati 50 microlitri (1.25 mg) di una sospensione di zeolite in acqua (25 g/L). Trascorsi 20 minuti, necessari per far assorbire la sospensione, le piastre vengono capovolte e incubate per tre giorni. Al termine del periodo di incubazione si osserva l'eventuale presenza di aloni di inibizione intorno ai fori nei quali è stata introdotta la sospensione di zeolite. Se presente, lo spessore dell'alone di inibizione (dal limite del foro al limite dell'alone) viene misurato mediante un calibro.

Al fine di discriminare se una eventuale attività antibatterica della Na-clinoptilolite fosse determinata dalla sottrazione di NH_4^+ o, piuttosto, dal rilascio di Na^+ (o da una combinazione di entrambi i fattori), un test è stato effettuato nelle stesse condizioni sopra descritte, ma inserendo nei fori soluzioni di NaCl a concentrazioni crescenti, aventi un quantitativo di ioni sodio uguale o superiore a quello rilasciabile dalle quantità di FA-Na usate nei test (calcolato sulla base dell'analisi chimica di FA-Na).

3.3.3.5 Determinazione della MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

Sono state determinate le MIC dei materiali a base di clinoptilolite mediante il test di diluizione in agar con qualche modifica alle condizioni raccomandate da *Megraud e Lehours (2007)*. Sono state preparate piastre contenenti i materiali da testare a concentrazioni da 0.125 a 15 mg/ml. La zeolite viene incorporata nel terreno MHAS prelevando volumi precisi da una sospensione di zeolite in acqua (25 g/l) e miscelandoli con il terreno, ancora liquido, direttamente nella piastra. Per concentrazioni superiori a 2 mg/ml, la zeolite viene aggiunta direttamente come polvere sulle piastre contenenti 20 ml di terreno ancora liquido. Le piastre vengono miscelate e fatte solidificare. Si prepara una sospensione standard del batterio (McF 4) e si eseguono degli spot (3 μl) di tale sospensione sulle piastre. Per confronto vengono preparate e incubate piastre contenenti lo stesso terreno di coltura senza zeolite (il cosiddetto "controllo"). Le piastre vengono incubate per 3 giorni. Al termine del periodo di incubazione si osserva la crescita visiva del batterio e la MIC viene definita come la più bassa concentrazione che inibisce totalmente la crescita del batterio.

Le MIC di FA-Na e FA-NH₄ sono state determinate anche in terreni a pH 5 e 4.

3.3.3.6 Determinazione della MBC (Minimum Bactericidal Concentration)

In provette contenenti 10 ml di terreno Muller Hinton Broth (MHB), supplementato con sangue defibrinato di cavallo al 5% (MHBS) e Amfotericina B (un antimicotico - *Amphotericin B solubilized*, AMRESCO) alla concentrazione di 2.5 mg/l, sono state aggiunte quantità di FA-Na fino ad ottenere concentrazioni da 0.5 a 8 mg/ml. Volume pari a 100 microlitri di una sospensione 4 McF sono stati aggiunti a ciascuna provetta. Dopo tre giorni di incubazione, 50 microlitri di ciascun terreno sono stati trasferiti e dispersi in piastre di MHAS. Si valuta la crescita visiva dopo 3 giorni di incubazione e la MBC viene definita come la più bassa concentrazione che inibisce totalmente la crescita del batterio nelle piastre di MHAS. Il test è stato svolto in duplicato.

3.3.3.7 Viable Colony Count

La capacità della zeolite FA-Na di inibire la crescita del batterio è stata inoltre valutata mediante il test *Viable Colony Count*. A provette contenenti 9.9 ml di terreno MHBS sono state aggiunte quantità di FA-Na fino ad ottenere concentrazioni da 0.5 a 8 mg/ml. Un volume pari a 100 microlitri di una sospensione 4 McF è stato aggiunto a ciascuna provetta. Dopo due giorni di incubazione sono state preparate delle diluizioni del terreno (10^{-2} - 10^{-6}) e 100 microlitri di ciascuna diluizione sono stati dispersi in piastre contenenti MHAS. Le piastre di agar sono state incubate per tre giorni a 37 °C in ambiente microaerobico. Al termine del periodo di incubazione è stata eseguita la conta delle colonie. Sono state prese in considerazione le piastre contenenti un numero di colonie minimo di 30 e massimo di 300. I risultati sono stati espressi come percentuale di inibizione della crescita del batterio rispetto al controllo. Il test è stato effettuato in duplicato.

3.3.3.8 Studio su un possibile effetto sinergico della clinoptilolite con alcuni farmaci correntemente usati contro l'*Helicobacter pylori*

È stata determinata la sensibilità del batterio agli antibiotici Amoxicillina triidrata (AMX), Metronidazolo (MT) e Levofloxacin (LEV) impiegando MHAS come terreno. Uno screening preliminare è stato fatto mediante antibiogramma. Sono stati impiegati dischi di AMX da 2 µg, MT da 5 µg e LEV da 5 µg (Oxoid). Sono state determinate le MIC dei tre farmaci mediante gli *strip MIC evaluator* (Oxoid). La MIC della Amoxicillina è stata determinata anche mediante diluizione

in agar.

Sono stati poi eseguiti dei test al fine di osservare la possibile sinergia tra i farmaci e la zeolite FA-Na. In particolare, sono stati misurati gli aloni di inibizione dei dischi di antibiotici e determinate le MIC con gli *strip MIC evaluator* in terreni contenenti: 1) FA-Na con concentrazione da $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ MIC_{FA-Na} precedentemente determinata (cfr. paragrafo 3.3.3.5); 2) FA-NH₄ con concentrazione da $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ MIC_{FA-NH_4} precedentemente determinata (cfr. paragrafo 3.3.3.5). I valori acquisiti sono stati confrontati con quelli ottenuti nelle stesse condizioni in terreni non contenenti zeolite. I test sono stati svolti in duplicato.

3.3.4 Test svolti su ceppi clinici di *H. pylori*

Queste analisi sono state eseguite presso il *Department of Microbiology, Hue University of Medicine and Pharmacy*, di Hue in Vietnam, nel corso di una permanenza trimestrale (maggio-luglio 2015) finanziata dal progetto ULISSE (Fondo Sociale Europeo).

Complessivamente sono stati presi in considerazione otto ceppi clinici di *H. pylori*, ma solo su alcuni di essi si sono eseguiti tutti i test di seguito descritti.

3.3.4.1 Ceppi batterici: isolamento, crescita e stoccaggio.

I ceppi clinici sono stati isolati presso il Dipartimento di Gastroenterologia dell'ospedale Universitario di Hue, in Vietnam. I ceppi batterici provengono da biopsie del tessuto gastrico e/o duodenale di pazienti infetti da *H. pylori*. Per ogni paziente vengono prelevate due biopsie. Su una biopsia viene eseguito il test (*Rapid urease test*) per verificare la presenza del batterio. Un'altra biopsia viene immersa in 2 ml di una soluzione salina fisiologica. Successivamente tale biopsia viene trasferita in vials sterili contenenti poche gocce di soluzione salina. Il tutto viene 'omogeneizzato' manualmente mediante una ansa sterile tagliata in punta. Tale sospensione viene quindi usata per inoculare il batterio in piastre contenenti Columbia Blood Agar supplementato con sangue di pecora al 5% e con '*Helicobacter pylori selective supplement*' (Oxoid). Le piastre vengono incubate in ambiente microbiotico (85% N₂, 5% O₂, e 10% CO₂ - gas mixture, CampyGen, Oxoid) per 3 giorni a 37°C (*Megraud and Lehours, 2007*). Il batterio è stato successivamente stoccato a -80 °C in Brain Heart Infusion (BHI) Broth con glicerolo al 10%.

3.3.4.2 Materiali testati

Sono state testate quattro differenti forme di clinoptilolite: FA-Na; FA-NH₄; FA-Zn; FA-Ag. Inoltre sono stati testati i farmaci Amoxicillina triidrata (AMX), Levofloxacina (LEV), Metronidazolo (MT) e Claritromicina (CLA). Gli *strip MIC evaluator* e i dischi per antibiogramma dei farmaci sono stati acquistati dalla Oxoid. Gli e-test della Claritromicina sono stati acquistati dalla Biomereux.

3.3.4.3 Agar cup diffusion test.

Questa metodica è stata impiegata come test preliminare di screening (*Sirikamon et al., 2013; Temitope et al., 2014*) per osservare la sensibilità dell'*H. pylori* alle diverse forme di

clinoptilolite preparate. La metodica è la stessa precedentemente descritta, a meno dei seguenti aspetti: 1) è stato impiegato sangue di pecora al posto di quello di cavallo; 2) nei fori eseguiti sulle piastre sono stati versati 60 microlitri di una sospensione di zeolite in acqua distillata (solido/liquido = 50 g/L), corrispondenti a 3 mg di polvere a base di clinoptilolite per foro.

Questo test è stato anche eseguito in piastre contenenti MHASs (analogo a MHAS ma con sangue di pecora al posto di sangue di cavallo), HCl 1M (pH 5) e urea (600mg/L).

3.3.4.4 Determinazione della MIC

Le MIC delle diverse forme di clinoptilolite sono state determinate mediante il metodo di *diluizione in agar* descritto precedentemente. Come unica differenza è stato impiegato sangue di pecora al posto del sangue di cavallo.

3.3.4.5 Determinazione della MBC

Sui tre ceppi clinici (denominati *HP-B*, *HP-C* e *HP-H*) è stata determinata la MBC della clinoptilolite in forma zinco (FA-Zn). A 5 ml di terreno Muller Hinton Broth (MHB) + sangue di pecora al 5% (MHBSs) è stata aggiunto FA-Zn andando ad ottenere concentrazioni da 1 a 8 mg/ml. Volumi pari a 50 microlitri di una sospensione 4 McF sono stati aggiunti a ciascuna provetta. Dopo tre giorni di incubazione, 50 microlitri di ciascun terreno sono stati trasferiti e dispersi in piastre di MHASs. Si è valutata la crescita visiva dopo 3 giorni di incubazione e la MBC viene assunta come la più bassa concentrazione che inibisce totalmente la crescita del batterio nelle piastre di MHASs. Il test è stato svolto in duplicato.

3.3.4.6 Studio su un possibile effetto sinergico della clinoptilolite con alcuni farmaci correntemente usati contro l'*Helicobacter pylori*.

È stata determinata la sensibilità di alcuni ceppi clinici di *H. pylori* nei confronti di Amoxicillina tri-idrata (AMX), Metronidazolo (MT), Levofloxacina (LEV) e Claritromicina (CLA), impiegando MHASs come terreno. Uno screening preliminare della sensibilità dei batteri ai farmaci è stato fatto mediante antibiogramma. Sono stati impiegati dischi di AMX da 2 µg, MT da 5 µg, LEV da 5 µg e CLA da 15 µg (Oxoid). Sono state determinate le MIC dei farmaci mediante gli *strip MIC evaluator* (AMX, LEVO e MT) e mediante *e-test* (CLA). Successivamente si sono eseguiti dei test al fine di osservare la possibile sinergia tra i farmaci ed i campioni FA-Na e FA-Zn. In

particolare, sono stati misurati gli aloni di inibizione dei dischi di antibiotici e determinate le MIC in terreni contenenti: 1) FA-Na con concentrazione $\approx \frac{1}{3} \text{MIC}_{\text{FA-Na}}$ precedentemente determinata (cfr. paragrafo 3.3.4.4); 2) FA-Zn con concentrazione $\approx \frac{1}{3} \text{MIC}_{\text{FA-Zn}}$ precedentemente determinata (cfr. paragrafo 3.3.4.4). I valori acquisiti sono stati confrontati con quelli ottenuti nelle stesse condizioni in terreni non contenenti zeolite.

3.4. Studi formulativi

3.4.1. Premesse

Sono stati svolti studi utili a preparare formulazioni nelle quali FA-Na fungesse da *carrier* per amoxicillina triidrata poiché tale coppia di componenti ha mostrato una certa sinergia, emersa dai risultati delle analisi descritte nei paragrafi precedenti.

Il razionale di questi studi formulativi sta nel vantaggio che si potrebbe conseguire realizzando un prodotto a duplice azione contenente sia l'antibiotico, atto all'eradicazione del batterio, che la Na-clinoptilolite, potenzialmente in grado di creare condizioni sfavorevoli al batterio sottraendo NH_4^+ . Inoltre, anche in termini di semplificazione della somministrazione si avrebbero dei vantaggi.

Innanzitutto sono state determinate la solubilità e la stabilità della amoxicillina triidrata (AMX-TH) in vari solventi, anche quelli simulanti il tratto gastrointestinale. Si sono provate diverse metodiche di caricamento dell'amoxicillina sul materiale a base di Na-clinoptilolite (FA-Na), al fine di osservare eventuali interazioni chimico-fisiche tra il farmaco ed il supporto minerale che potessero comportare rilasci modificati dell'antibiotico. Infine, sono stati effettuati studi di stabilità per osservare la compatibilità chimico-fisica dei sistemi clinoptilolite-amoxicillina.

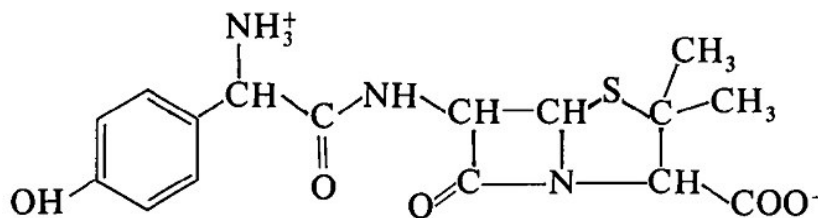
3.4.2. Amoxicillina triidrata

L'amoxicillina è una penicillina semisintetica ad ampio spettro. La forma triidrata viene somministrata per via orale mentre il suo sale sodico viene impiegato per via parenterale (*Singh et al., 2010*). L'amoxicillina triidrata (AMX-TH) è largamente usata nelle terapie standard per l'eradicazione dell'*H. pylori* (*Webster, 1997; Graham & Fischbach, 2010; Bien et al., 2014; Shiota & Yamaoka, 2014*).

La struttura della amoxicillina triidrata è stata determinata da *Boles (1978)*. Questa molecola cristallizza nel sistema ortorombico, gruppo spaziale $P2_12_12_1$; la cella elementare presenta le seguenti dimensioni: $a = 15.622$, $b = 18.785$ e $c = 6.645 \text{ \AA}$.

Gli studi formulativi sono stati condotti impiegando amoxicillina triidrata ($\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - peso molecolare = 419.45) acquistata dalla Cruciani prodotti Crual (Lotto 223/L61001).

Figura 8. Struttura della amoxicillina triidrata (Boles, 1978)



3.4.3. Caratterizzazioni della AMX-TH

Sulla amoxicillina triidrata sono state effettuate analisi XRD e osservazioni al SEM. Per i dettagli si rimanda ai paragrafi precedenti.

3.4.4. Metodica HPLC per la quantificazione di amoxicillina triidrato in soluzione

La quantificazione di AMX-TH in soluzione è stata ottenuta utilizzando un rapido e sensibile metodo cromatografico HPLC opportunamente modificato (Pei *et al.*, 2011). Le analisi cromatografiche sono state eseguite con un HPLC VarianProStar 210, equipaggiato di detector a fotodiodi in serie (DAD) e di autocampionatore con un loop di iniezione da 100 ml max. La separazione cromatografica è stata eseguita su una colonna BDS ThermoHypersil C18, 150 mm x 4.6 mm I.D., di dimensioni particellari di 5 µm (Alltech, Milano, Italia). La fase mobile consiste di una miscela binaria in rapporto 5:95 (v/v) di acetonitrile e una soluzione di fosfato monobasico di potassio 30 mM regolato a pH 4 con acido fosforico 1M. La fase mobile, prima dell'uso, è stata filtrata con filtri di acetato di cellulosa da 0.45 µm (Sartorius, Goettingen, Germany). La fase mobile è stata pompata isocraticamente con un flusso di 1.0 ml/min a temperatura ambiente. Il volume di iniezione è stato di 20 µl e il tempo di analisi di 4 min per campione. L'acquisizione e la manipolazione delle aree dei picchi, alla lunghezza d'onda di 210 nm, è stata effettuata con il software Varian workstation version 6.2. La concentrazione dell'analita è stata calcolata mediante proporzione matematica con i valori mediati delle soluzioni standard.

Preparazione degli standard - Per la determinazione della concentrazione della AMX-TH in vari solventi è stata costruita una retta di calibrazione; sono state preparate e analizzate in HPLC cinque soluzioni standard del farmaco in acqua MilliQ aventi concentrazioni di 5, 10, 25, 50 e 100 mg/L. Ricavate le aree dei picchi delle soluzioni standard, è stata elaborata la retta di calibrazione.

3.4.5. Determinazione della solubilità della AMX-TH in diversi solventi

La solubilità della AMX-TH è stata determinata in vari solventi organici e acquosi, quali etanolo, acetone, tampone USP pH 1.2, tampone USP pH 6.8, acqua MilliQ, succo gastrico simulato *Ph. Eur.* 8.0, tampone pH 4 (ottenuto dal tampone USP pH 1.2 per aggiunta di NH₃ sotto agitazione fino a pH 4). Sono state preparate soluzioni sature del farmaco nelle soluzioni acquose sopraindicate a 20°C; il corpo di fondo è stato eliminato per filtrazione e la soluzione, previa diluizione con lo stesso solvente, è stata analizzata in HPLC.

Per quanto riguarda i solventi organici, etanolo e acetone, la metodica è stata leggermente modificata per evitare l'interferenza di assorbimento degli stessi a 210 nm. Dopo aver preparato le soluzioni sature del farmaco nei due solventi, sono stati prelevati 0.25 ml di soluzione e diluiti di 40 volte con tampone USP pH 6.8 in un matraccio da 10 ml. Le soluzioni così ottenute sono state iniettate in HPLC. Dai valori di area, per interpolazione alla retta di calibrazione precedentemente elaborata e, tenendo conto dei fattori di diluizione, sono state calcolate le solubilità di AMX-TH nei vari solventi.

3.4.6. Studi di stabilità della AMX-TH

La stabilità della AMX-TH in soluzione è stata valutata in diversi solventi e a diverse temperature (4 °C, 20 °C e 38 °C). I solventi utilizzati sono gli stessi nei quali è stata determinata la solubilità ovvero etanolo, acetone, tampone USP pH 1.2, tampone USP pH 6.8, acqua milliQ, succo gastrico simulato *Ph. Eur.* 8.0 e tampone pH 4.

La metodica è diversa per solventi organici ed acquosi. Per quanto riguarda i solventi acquosi, sono state preparate soluzioni concentrate 2000 mg/L di AMX-TH in ciascun tampone. Da queste soluzioni, sono stati prelevati 250 µl e portati a volume in matraccio da 10 ml con i rispettivi solventi. Le soluzioni ottenute sono state conservate a 4 °C, a 20°C e a 38 °C. Ad intervalli di tempo regolari (15, 30, 60, 120, 180 min e 24 h), 20 µl di soluzione sono stati iniettati in HPLC, secondo la metodica precedentemente descritta. Le soluzioni di AMX-TH in etanolo e acetone sono state preparate a concentrazioni di 500 mg/L. Queste soluzioni sono state conservate alle temperature di 4 °C, 20 °C e 38 °C. Campioni di 250 µl sono stati prelevati da ciascuna soluzione secondo gli stessi intervalli di tempo e diluiti di 40 volte, in matraccio da 10 ml, con il tampone USP pH 6.8, quindi

analizzati in HPLC. Le analisi sono state svolte in triplicato e i dati ottenuti riportati come grafici della stabilità percentuale di AMX-TH in funzione del tempo.

3.4.7. Caricamento di AMX-TH sulla clinoptilolite

Considerate le dimensioni della cella elementare della amoxicillina triidrata (vedi paragrafo 3.4.2.) e le aperture dei canali presenti nella struttura della clinoptilolite (vedi paragrafo 2.1.2.), non è possibile che l'intera molecola di antibiotico sia ospitata all'interno della zeolite; semmai solo parti del farmaco potrebbero, ipoteticamente, avere questa possibilità. Pertanto, come già espresso dal titolo del presente paragrafo, l'antibiotico potrà essere caricato *sulla* superficie esterna dei cristalli di clinoptilolite.

Per il caricamento sono stati applicati differenti metodi: adsorbimento; evaporazione del solvente; sealing heating; miscela fisica.

3.4.7.1 Adsorbimento

FA-Na è stato sospeso in una soluzione satura di AMX-TH in tampone pH 4.0 o etanolo per 24 h e 48 h. Il tampone pH 4 è stato preparato a partire da un tampone USP pH 5.8 per aggiunta di H₃PO₄ fino al pH desiderato. In dettaglio, sono state preparate quattro soluzioni sature, contenenti ciascuna 0.1 g di AMX-TH, due in etanolo e due in tampone pH 4. A ciascuna delle quattro soluzioni sono stati addizionati 0.2 g di FA-Na. Le sospensioni sono state mantenute sotto blanda agitazione magnetica per 1 h a 20 °C, e per 24 h o 48 h in camera fredda a 6 °C, condizioni utili per favorire il processo di adsorbimento del farmaco sulla superficie della zeolite ed al contempo evitare la degradazione termica del principio attivo. Le condizioni operative e i relativi campioni ottenuti sono riassunti in Tabella 7.

Al termine delle 24 h per A e B, e delle 48 h per C e D, i campioni sono stati recuperati e portati a temperatura ambiente; si presentavano come sospensioni bianche opalescenti con un corpo di fondo. Le sospensioni sono state filtrate su filtro di cellulosa rigenerata da 45 µm ottenendo una soluzione limpida. Il materiale è stato essiccato e recuperato dai filtri, poi conservato in vial chiusi in essiccatore. Dal surnatante sono stati prelevati 500 µl e diluiti di 40 (A e C) e 20 (B e D) volte con il tampone pH 4; tali aliquote sono state quindi analizzati in HPLC per verificare la quantità di farmaco non adsorbita.

Tabella 7. Condizioni di caricamento di AMX-TH per adsorbimento

Formulazione	Mezzo	Rapporto Zeolite/farmaco	I step		II step	
			°C	h	°C	h
A	pH 4	2/1	20	1	6	24
B	EtOH	2/1	20	1	6	24
C	pH 4	2/1	20	1	6	48
D	EtOH	2/1	20	1	6	48

3.4.7.2 Evaporazione del solvente

Questo metodo consiste nell'evaporare il solvente di una soluzione satura di AMX-TH in presenza di FA-Na. In particolare si preparano due soluzioni sature di AMX-TH in etanolo e in tampone pH 4. La soluzione di etanolo contiene 0.1 g di AMX-TH e 87 ml di etanolo, quella in tampone invece contiene 0.1 g di AMX-TH e 36 ml di tampone. Ad entrambe le soluzioni, sono stati aggiunti 0.2 g di zeolite e la sospensione è tenuta sotto agitazione magnetica per 1 h a temperatura ambiente. In seguito, i campioni E ed F sono stati essiccati in evaporatore rotante (*rotavapor*) sotto vuoto. Le temperature di evaporazione sono state di circa 60-70 °C per E, e 45 °C per F. Le condizioni del test sono riassunte in tabella 8. Le polveri rimaste nel pallone sono state recuperate e analizzate in diffrattometria X. Per confronto, è stato sottoposto allo stesso trattamento di F il farmaco tal quale; il relativo campione è stato denominato AMX F.

Tabella 8. Condizioni di caricamento di AMX-TH per evaporazione del solvente

Campione	Mezzo	Rapporto Zeolite/farmaco	I step: agitazione magnetica		II step: rotavapor
			°C	Tempo	°C
E	pH 4	2/1	20°C	1 h	60-70 °C
F	EtOH	2/1	20°C	1 h	45 °C

3.4.7.3 Sealing heating.

Questa tecnica viene spesso utilizzata nella preparazione di complessi solidi di farmaci con β -ciclodestrine. Si sfrutta la pressione esercitata da un solvente che evapora in un sistema chiuso per formare complessi farmaco-carrier (Kenjirou *et al.*, 2010). Si sono preparate in mortaio due miscele contenenti due parti di FA-Na e una di farmaco. Una volta eseguita la miscelazione in mortaio, è stato aggiunto un solvente al fine di umettare la miscela per formare un impasto. In particolare i solventi impiegati sono stati acqua (formulazione H) e etanolo (formulazione I). I due ‘impasti’ sono stati trasferiti in due flaconcini, isolati con del parafilm, e messi in una stufa a 30 °C per 4 giorni. Trascorsi i quattro giorni le polveri sono state essiccate trasferendo i flaconcini aperti in una pistola essiccante (Buchi TO-50) a 30 °C e applicando il vuoto con una pompa meccanica.

3.4.7.4 Miscela fisica.

Consiste nella semplice miscelazione in mortaio del materiale FA-Na con il farmaco (rapporto zeolite/farmaco = 2/1).

3.4.8. Valutazione della quantità di farmaco caricata nelle formulazioni

La determinazione della quantità percentuale di AMX-TH effettivamente caricata sulla zeolite è stata effettuata sospendendo 15 mg di ciascuna formulazione in acqua MilliQ, sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente. Il surnatante è stato filtrato su filtri per siringa in cellulosa rigenerata, quindi analizzato in HPLC o in spettrofotometro. Ciascuna analisi è stata effettuata in triplicato.

I risultati sono espressi in termine di contenuto effettivo percentuale (o *drug content*, DC) di farmaco nella formulazione, e di efficacia di caricamento (EC), calcolati applicando le seguenti

formule:

$$DC(\%) = \frac{c.r. (g)}{c.t. (g)} \times DCT (\%)$$

$$EC(\%) = \frac{DC (\%)}{DCT (\%)} \times 100$$

dove:

c.r. è il contenuto reale di AMX-TH nella formulazione;

c.t. i grammi di farmaco teoricamente presenti;

DCT è il drug content percentuale teorico.

3.4.9. Test di rilascio in-vitro

Il test di rilascio in-vitro è stato effettuato secondo la metodica riportata nella *Ph. Eur.* 8.0, nel saggio di dissoluzione di forme farmaceutiche solide; nello specifico, è stato utilizzato un dissolutore semiautomatico a sei vessel dotato di un sistema di agitazione a paletta (Figura 9). La temperatura del bagno d'acqua è stato impostato a 37 °C e la velocità di rotazione delle aste agitanti a 100 rpm.

Il test di rilascio è stato effettuato sulle formulazioni F, H, I e sulla miscela fisica. Inoltre, per confronto, il test è stato effettuato su AMX F e AMX-TH tal quale. Quale mezzo di dissoluzione è stato impiegato un tampone USP pH 1.2.

Una quantità di formulazione contenente circa 0.1 g di AMX-TH è stata inserita all'interno del vessel contenente 500 ml di mezzo di dissoluzione. I prelievi di campioni di mezzo di dissoluzione (1 ml) sono stati effettuati ad intervalli di tempo prestabiliti (5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min), centrifugati (13000 rpm per 5min) e analizzati in HPLC. Il liquido prelevato è stato ripristinato con del liquido fresco termostato a 37 °C, che è stato previamente utilizzato per risospingere l'eventuale precipitato formatosi in seguito a centrifugazione dei campioni. Le condizioni *sink* sono state rispettate per tutta la durata del test.

Figura 9. Dissolutore analogo a quello impiegato per i test di dissoluzione in vitro.



3.4.10. Potenziale Z

È stato misurato il Potenziale Zeta di alcune formulazioni farmaco+zeolite con la stessa procedura precedentemente descritta (paragrafo 3.2.9). Il fine è quello di osservare se ci sono variazioni del potenziale Z di FA-Na riconducibili a interazioni con il farmaco. Pertanto, i valori di potenziale Z delle formulazioni farmaco+zeolite sono stati confrontati con quelli della zeolite da sola.

3.4.11. Studi di stabilità

Nel combinare *carrier* minerali e farmaci molto spesso non si considera la possibilità che il minerale possa indurre, o accelerare, una degradazione del farmaco. Questo aspetto dovrebbe essere ancora più rilevante quando il minerale in questione contiene molecole di H₂O, come molte argille e le zeoliti, oppure, pur non contenendone, manifesta una forte affinità verso l'acqua, come ad esempio la caolinite. L'acqua, infatti, può determinare la degradazione di alcuni farmaci e, in ogni caso, gioca un ruolo importante nella stabilità degli antibiotici facenti parte delle penicilline, come l'amoxicillina (*Bird, 1994*).

La stabilità della AMX-TH pura e della amoxicillina nella miscela fisica [$\frac{1}{3}$ AMX-TH + $\frac{2}{3}$ FA-Na] è stata valutata, a $21 \pm 3^\circ\text{C}$, a diverse umidità relative (20 ± 3 , 52 ± 3 , $80 \pm 5\%$) lungo un arco temporale di 18 mesi. Durante questo periodo sia la AMX-TH pura che la miscela fisica sono stati periodicamente monitorati mediante analisi ai raggi X (analisi non distruttiva, pertanto il materiale poteva essere stoccato nuovamente alle condizioni previste dalla prova). La degradazione del farmaco, invece, è stata quantificata mediante analisi in HPLC (analisi distruttiva), verificando la quantità di amoxicillina ancora presente nei campioni stoccati alle diverse umidità relative; queste

analisi sono state eseguite dopo 12 e 18 mesi, pertanto ogni campione di AMX-TH pura e di miscela fisica è stato preparato in duplicato per ciascun valore di umidità relativa considerato.

Tre essiccatori, aventi sul fondo soluzioni sature rispettivamente di i) CH_3COOK ii) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e iii) NH_4Cl , sono stati usati per ottenere microambienti aventi le seguenti umidità relative a circa 20°C (Winston, 1960): $20 \pm 3\%$; $52 \pm 3\%$; $80 \pm 5\%$. I valori di temperatura e umidità relativa sono stati monitorati durante i 18 mesi disponendo un *data logger* di temperatura e umidità relativa (EBI20-TH1) all'interno di ciascun essiccatore.

Per valutare la degradazione della AMX-TH pura è stata preparata una soluzione 1 mg/ml (pesando 10 mg in 10 ml) in tampone fosfato pH 6.8. Tale soluzione è stata diluita 25 volte con lo stesso tampone (concentrazione finale di circa $40 \mu\text{g/ml}$) e quindi analizzata.

Per valutare la degradazione di AMX-TH nella miscela fisica è stata preparata una sospensione contenente circa 1 mg/ml di AMX-TH (pesando 30 mg di miscela in 10 ml) in tampone fosfato pH 6.8. Tale sospensione è stata diluita 25 volte con lo stesso solvente (concentrazione finale di circa $40 \mu\text{g/ml}$), filtrata con filtri di acetato di cellulosa da $0.45 \mu\text{m}$ (oppure centrifugata), quindi analizzata in HPLC.

4. RISULTATI

4.1. Caratterizzazione e valutazione del materiale preparato

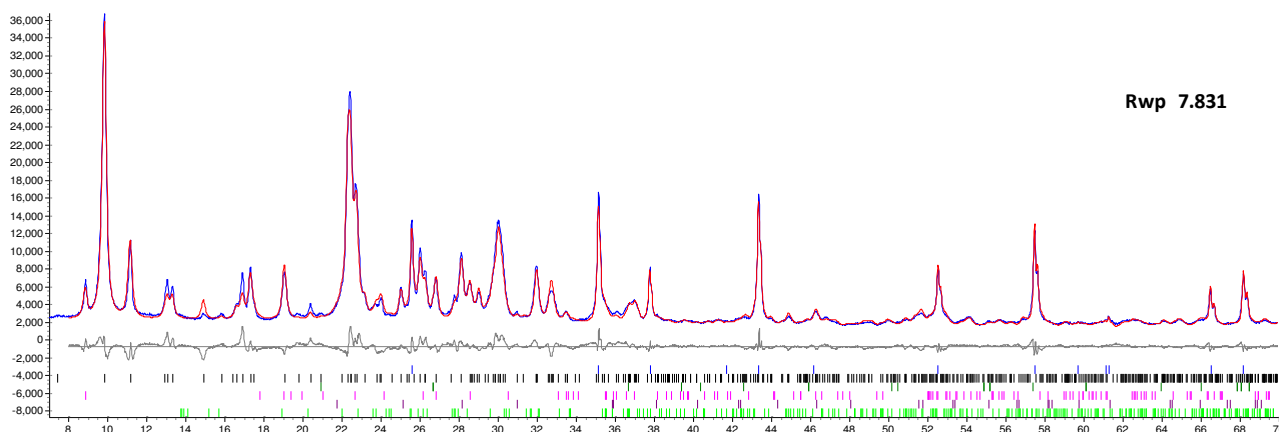
4.1.1 Materiale arricchito in clinoptilolite (FA)

Gli otto lotti preparati di materiale arricchito in zeolite, hanno evidenziato un tenore in clinoptilolite da 89.2 ± 2.0 a $91.7 \pm 2.0\%$. Sette lotti hanno evidenziato una composizione ancora più omogenea, con contenuto in clinoptilolite da 90.3 ± 2.0 a $91.7 \pm 2.0\%$. Questi sette lotti sono stati miscelati (ottenendo circa 150 g di polvere); la composizione mineralogica del materiale dopo miscelazione è riportata in tabella 9, derivante dal raffinamento Rietveld in Figura 10.

Tabella 9. Composizione mineralogica del campione FA (polvere arricchita in zeolite)

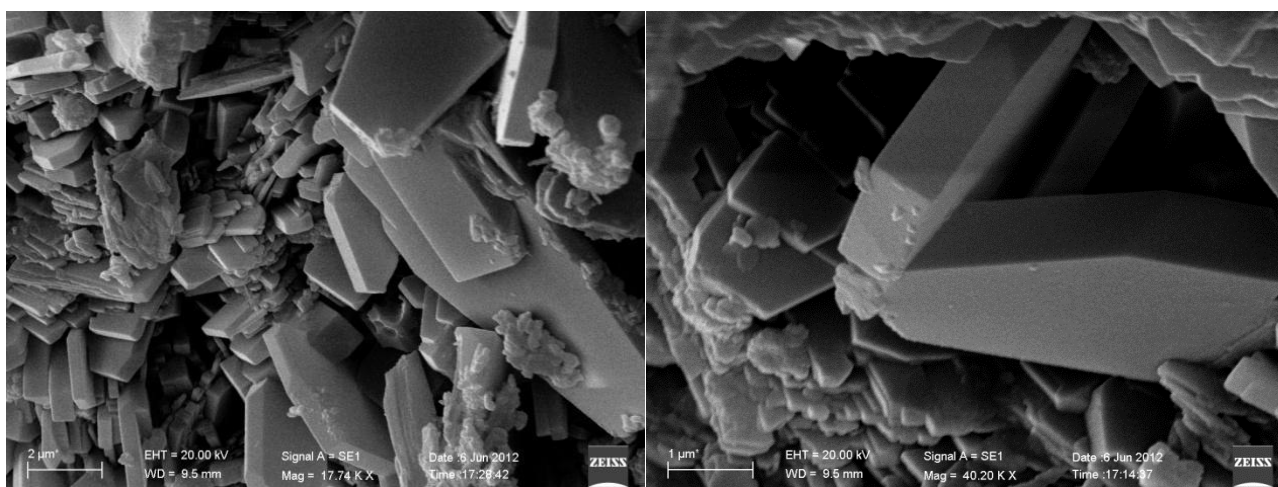
	Clinoptilolite	Quartz	Biotite	Feldspars	Opal-CT	Amorphous
Content	90.2	0.4	1.2	3.2	1.2	3.8
e.s.d.	± 2.0	± 0.1	± 0.2	± 0.3	± 0.2	± 1.0

Figura 10. Raffinamento Rietveld del campione FA (polvere arricchita in zeolite)



Il processo di arricchimento ha mostrato riproducibilità ed efficacia, portando il contenuto di clinoptilolite da $\approx 66\%$ documentato per il litotipo di partenza (tabella 5) a 90% . Da notare che il contenuto di clinoptilolite è più elevato di altre formulazioni farmaceutiche a base di zeoliti già presenti in commercio (*Rodríguez-Fuentes et al., 1997; 2006*) o in via di sviluppo (*Danz et al., 2009; Selvam et al., 2014*). Il metodo di arricchimento, inoltre, è poco costoso e non prevede l'impiego di sostanze dannose per la salute, ovviamente vietate in campo farmaceutico. Concettualmente la metodica di arricchimento è analoga a quella industrialmente impiegata per le argille (*Harvey and Lagaly, 2006*). Riguardo le fasi diverse dalla zeolite ($\leq 10\%$), risultano quantitativamente inferiori a quelle presenti in una smectite italiana attualmente impiegata come principio attivo in farmaci per disturbi gastro-intestinali (*Mascolo et al., 2004*), o contenute in altri farmaci a base di clinoptilolite (*Rodríguez-Fuentes et al., 1997; 2006; Danz et al., 2009; Selvam et al., 2014*). Il basso contenuto di quarzo, l'assenza di mordenite (considerata citotossica - *Adamis et al., 2000*) e di erionite (considerata cancerogena - *IARC, 2012*) rende il materiale maggiormente sicuro, anche in casi di inalazione accidentale delle polveri. Peraltro, fasi fibrose non sono state notate neanche durante le osservazioni eseguite al SEM su campioni di roccia tal quale, caratterizzata dalla diffusa presenza di cristalli di clinoptilolite aventi habitus tabulare e dimensioni inferiori a $10 \mu\text{m}$ (Figura 11). Queste morfologie non si sono preservate nel materiale FA (immagini non riportate), probabilmente a causa dello stress meccanico subito dal materiale durante i processi di arricchimento.

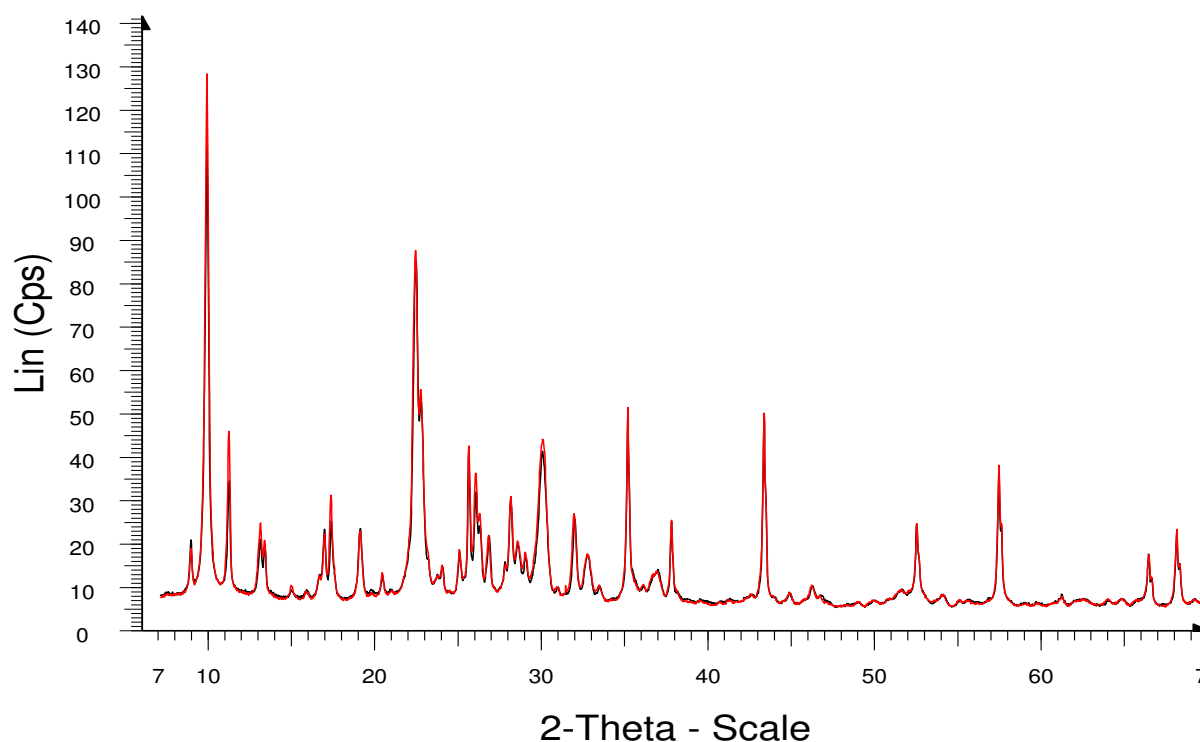
Figura 11. Immagine al SEM della roccia utilizzata in questo studio



4.1.2 Materiale arricchito in clinoptilolite condotto in forma sodio (FA-Na)

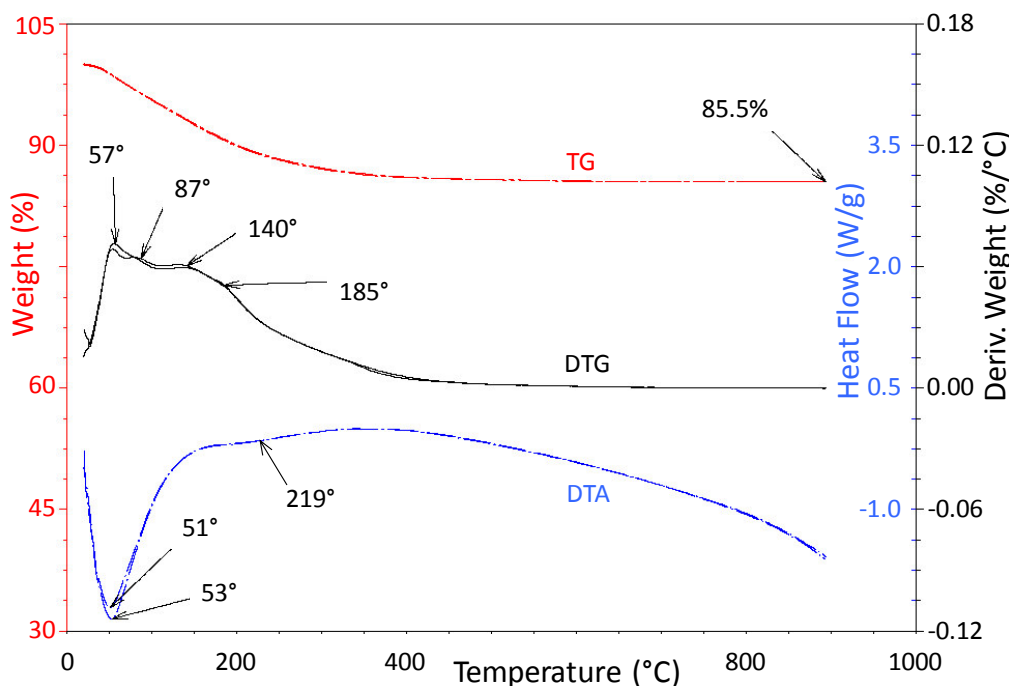
La forma sodio FA-Na è stata preparata per diversi motivi. Innanzitutto, il sodio è un elemento essenziale e ben tollerato dall'organismo umano (Gomes & Silva, 2007). La preparazione di una forma monocationica della clinoptilolite rende il materiale maggiormente omogeneo e più facilmente riproducibile. Da considerare, inoltre, che con la preparazione della forma sodica è possibile anche ridurre tracce di metalli pesanti eventualmente presenti come cationi scambiabili nella zeolite. Infine, poiché nell'applicazione in studio si intende sfruttare la CEC della clinoptilolite, un pre-condizionamento in forma sodica è in grado di migliorare le prestazioni in termini di scambio ionico (Semmens & Seyfarth, 1978), ed il processo si svolge più efficacemente in un sistema in cui la zeolite è in forma monocationica piuttosto che multicationica. Nella Figura 12 sono riportati i diffrattogrammi del materiale arricchito (FA) e dello stesso condotto in forma sodica (FA-Na). Rispetto al materiale di partenza, il passaggio alla Na-form determina un aumento dell'intensità del picco relativo al piano reticolare (020) della clinoptilolite (2θ circa 9.7°) dovuto al diverso *scattering* dei cationi presenti nel sistema dei canali della zeolite.

Figura 12. Diffrattogrammi, normalizzati rispetto ai picchi del corindone, di FA (nero) e FA-Na (rosso).



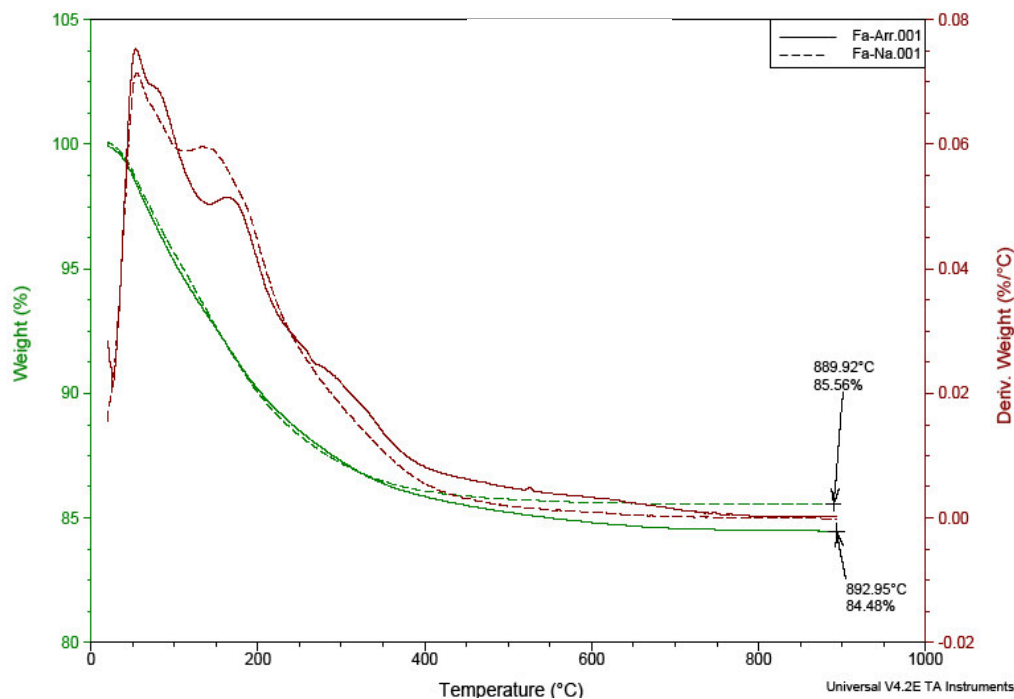
I risultati dell'analisi termica del campione FA-Na sono riassunti nella Figura 13. Le curve TG, DTG e DTA del materiale in forma sodica sono in buon accordo con i dati di letteratura riportati da *Sternik et al. (2011)* per una Na-clinoptilolite.

Figura. 13. TG-DTG-DTA di FA-Na (analisi in duplicato).



Confrontando le curve TG e DTG del materiale in forma monocationica (FA-Na) con quello in forma policationica (FA) in Figura 14, si nota la perdita di peso superiore del secondo materiale (15.52 contro 14.44%) ed il diverso andamento della DTG, espressione di un percorso di disidratazione differente. Ciò dipende dalla diversa popolazione cationica nella zeolite e, soprattutto, dalla differente capacità di idratazione dei cationi presenti. In particolare nella clinoptilolite tal quale la presenza di cationi bivalenti determina un contenuto d'acqua superiore rispetto alla Na-clinoptilolite, e la perdita dell'acqua coordinata da tali cationi avviene con una progressione differente (*Langella et al., 2003*).

Figura 14. TG e DTG del campione FA (linea continua) e di FA-Na (linea tratteggiata).



Esaminando le analisi chimiche riportate nelle tabelle 10a-b si nota come i processi di arricchimento e di scambio cationico abbiano determinato delle variazioni nel chimismo del materiale. In particolare, in seguito allo scambio cationico si è avuto, naturalmente, un aumento di sodio a fronte di una riduzione di K, Ca e Mg, mentre la riduzione del contenuto di ferro è, verosimilmente, più in relazione con il processo di arricchimento.

Tabella 10a-b. Composizione chimica di FA-Na confrontata alla roccia di partenza (campione *LacBen*, da *Cerri et al., 2004* – valori tra parentesi); analisi in ICP-MS, tranne: ^c(ICP-OES), ^d(INAA), ^e(IR), ^f(ISE), ^g(TKN) e ^h(Titolazione).

10a) Elementi maggiori (%)

	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	MnO	MgO	CaO	Na ₂ O	K ₂ O	TiO ₂	P ₂ O ₅	LOI	TOT
FA-Na	65.26	12.11	0.50	<0.01	0.51	0.35	5.85	0.43	0.18	0.05	14.76	100.01
LacBen	(63.30)	(13.05)	(1.64)	(<0.03)	(1.40)	(2.69)	(1.76)	(1.64)	(0.26)	(0.08)	(14.05)	(99.87)

10b) Elementi in tracce, in ppm, ad eccezione di: ^a(%) e ^b(ppb).

Ag	0.18	(-)	Cr	8.2	(<5)	In	<0.1	(<0.1)	Rb	23.2	(70.1)	Tl	<0.05	(-)
As	1.5	(1.7)	Cs	0.89	(3.05)	Ir^d	<5 ^b	(-)	Re	0.005	(-)	Tm	0.2	(0.3)
Au^d	<5 ^b	(-)	Cu	8.7	(14.6)	La	16.1	(25.6)	S^c	0.005 ^a	(-)	U	2.2	(4.2)
Ba	410	(499)	Dy	2	(2.9)	Li	3.1	(-)	Sb	0.2	(0.3)	V	12	(21)
Be	1.8	(2.7)	Er	1.2	(1.6)	Lu	0.2	(0.3)	Sc^c	3	(-)	W	0.2	(0.2)
Bi	0.11	(0.13)	Eu	0.30	(0.52)	Mn	48	(-)	Se	0.7	(-)	Y	12.9	(15.0)
Br^d	<1	(-)	F^f	<0.01 ^a	(-)	Mo	0.3	(0.4)	Sm	2.1	(3.4)	Yb	1.2	(1.7)
C_{tot}^e	<0.01 ^a	(-)	Ga	8.4	(13.5)	N^g	<0.1 ^a	(-)	Sn	1	(2.1)	Zn	19.6	(34.6)
C_{org}^e	<0.05 ^a	(-)	Gd	2.1	(2.7)	Nb	5.3	(9.5)	Sr	54.1	(340.2)	Zr	126	(165)
Cd	<0.1	(<0.3)	Ge	<0.1	(0.24)	Nd	11.3	(18.1)	Ta	0.6	(1.0)	FeO^h	<0.1 ^a	(-)
Ce	29.4	(46.9)	Hf	4.2	(4.9)	Ni	3.2	(<5)	Tb	0.3	(0.4)			
Cl^d	0.02 ^a	(-)	Hg	<10 ^b	(-)	Pb	14.3	(23.4)	Te	<0.1	(-)			
Co	0.8	(0.98)	Ho	0.4	(0.6)	Pr	3.2	(5.3)	Th	10.5	(15.5)			

Nella tabella 10b si può osservare come i processi di arricchimento e scambio cationico determinino, inoltre, una riduzione degli elementi in tracce (in particolare Ba, Cs, Cu, Pb, Rb, Sr, Th, U, V e Zn). Per esempio il piombo passa da 23 ppm nel campione LacBen a 14-10 ppm (a seconda della tecnica analitica utilizzata per determinarlo) nel campione in Na-form. I contenuti di C (totale e organico), Cl, F, Hg, N e Fe²⁺ risultano sotto i limiti di rilevabilità. La tabella 10b

include il contenuto di elementi che sono considerati tossici o potenzialmente dannosi per la salute umana (López-Galindo *et al.*, 2007); sfortunatamente, fra i prodotti farmaceutici a base di zeolite, solo quelli cubani riportano i contenuti di alcuni di questi elementi (Rodríguez-Fuentes *et al.*, 1997; 2006; Selvam *et al.*, 2014). Comparando FA-Na con i dati recentemente riportati da Selvam *et al.* (2014) per un materiale cubano a base di clinoptilolite-mordenite, FA-Na mostra un più basso contenuto di Ba, Cu, Mn, S e Zn e valori più elevati di Pb e Cr; per quanto riguarda gli elementi maggiori, c'è una marcata differenza nel contenuto di ferro, più basso in FA-Na (0.5 contro 1.8-2%); la differenza nel contenuto di elementi alcalini e alcalino-terrosi è dovuta principalmente al processo di scambio cationico, infatti il materiale cubano non è stato oggetto di processi di scambio.

Al fine di valutare l'idoneità di FA-Na alla somministrazione orale, può essere utile confrontare la sua composizione chimica con quella di una formulazione farmaceutica in commercio composta all'80% da smectite e dal 20% di vanillina, riportata da Mascolo *et al.* (1999): sostanzialmente FA-Na mostra un contenuto di elementi potenzialmente pericolosi comparabile con quello di tale formulazione.

Le zeoliti non sono incluse nelle monografie delle principali farmacopee internazionali, tuttavia, in ragione delle analogie esistenti fra le loro proprietà e quelle delle smectiti (Bish, 2006), si possono prendere come riferimento monografie sostanzialmente riferite a queste ultime. Per quanto attiene i materiali oggetto del presente studio, si osserva che il contenuto di metalli pesanti, abbastanza basso già nella roccia di partenza, si riduce nel campione in Na-form e diventa inferiore ai limiti previsti dalle principali farmacopee per alcune argille utilizzabili per uso orale. Per esempio, nella monografia 'bentonite' (denominazione commerciale di un materiale essenzialmente costituito da montmorillonite) della Ph. Eur. 8.0 (2014) il limite previsto per i metalli pesanti è di 50 ppm; nella USP 32 (2009) il limite per il piombo è di 45 ppm nella monografia 'bentonite' e di 15 ppm nella monografia 'purified bentonite'. In poche parole, il materiale FA-Na soddisfa i requisiti più restrittivi previsti dalle farmacopee internazionali per la 'bentonite': As \leq 2 ppm (JP, 2011 – "bentonite"); Pb \leq 15 ppm (USP, 2009b – "purified bentonite"). Si deve sottolineare che le tecniche qui usate per la determinazione del piombo e dei metalli pesanti in generale, sono sicuramente più accurate del metodo colorimetrico ancora previsto nelle monografie della bentonite delle farmacopee sopracitate, metodica da considerare qualitativa piuttosto che quantitativa (Grindstaff & Schroeder, 2011). In sostanza, le tecniche analitiche impiegate per analizzare FA-NA sono in linea con quelle raccomandate dalla monografia USP<233> "Elemental impurities-

procedures" (USP, 2013), che diventerà effettiva nel dicembre 2015 (USP, 2015).

Le analisi chimiche degli elementi che sono state eseguite sia in ICP-MS che mediante INAA hanno fornito risultati sovrapponibili. Anche la macinazione di FA-Na in mortaio d'agata o con elementi in zirconia non ha determinato differenze sui risultati delle analisi chimiche, mentre la macinazione con acciaio dolce ha introdotto una contaminazione, a volte abbastanza rilevante, per alcuni elementi, quelli mostrati in tabella 11.

Tabella 11. Contaminazione indotta dalla macinazione con acciaio dolce (ppm; da confrontare con i valori in Tab 10b)

Co	Cr	Cu	Mn	Mo	Ni	Ta	W	Zr
76.8	42.2	12.2	58	2.4	123	1.9	10.9	151

4.1.3 Capacità di scambio cationico (CEC).

La capacità di scambio cationico del materiale è molto importante e nella gran parte dei casi l'impiego delle zeoliti in campo biomedico si basa su questa proprietà, dato che molti processi biochimici sono correlati a fenomeni di scambio ionico. La CEC del campione FA-Na è risultata essere 234 meq/100g. L'elevata CEC del materiale è dovuta all'alto contenuto in clinoptilolite e al pretrattamento in forma sodica, che migliora la resa negli scambi successivi (*Semmens and Seyfarth, 1978*). Come è possibile notare nella tabella 12, e come era logico attendersi, negli eluati dei cicli di scambio si nota una importante cessione di sodio, circa il 93% della CEC totale, a conferma del fatto che è stata ottenuta una forma quasi monocationica della clinoptilolite. La cessione degli altri elementi risulta essere molto inferiore. Osservando la quantità di sodio ceduto nel corso dei vari cicli di scambio, possiamo notare che lo scambio $\text{Na}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$ è avvenuto principalmente durante il primo ciclo di scambio (il sodio ceduto corrisponde a ca. il 75% della CEC di FA-Na).

Tabella 12. Risultati delle analisi degli eluati dei cicli di scambio espressi in meq/100g

Cicli di scambio

	1	2	3	4	5	TOT
	(meq/100g)	(meq/100g)	(meq/100g)	(meq/100g)	(meq/100g)	(meq/100g)
Na	172.52	24.40	9.39	5.64	6.29	218.24
Ca	1.75	0.41	0.12	0.16	-0.18	2.26
K	2.15	0.68	0.26	0.10	0.06	3.25
Mg	2.63	2.13	1.71	2.31	1.48	10.26

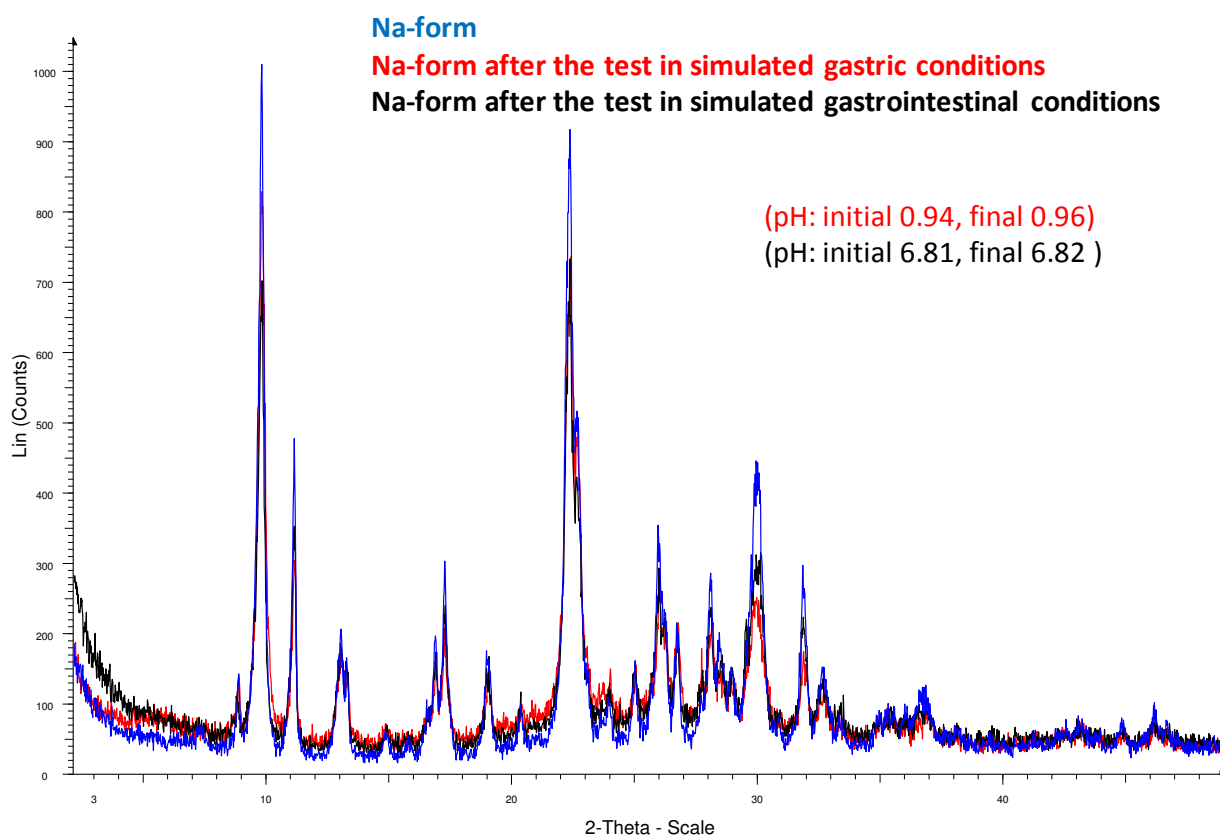
4.1.4 Simulazione processo digestivo: resistenza della clinoptilolite in ambiente gastro-intestinale.

Affinché la zeolite, una volta somministrata per via orale, possa esplicare la sua capacità di scambiare cationi, la resistenza nell'ambiente gastro-intestinale è fondamentale. Il rapporto Si/Al influenza la resistenza agli acidi delle zeoliti (Danilczuk *et al.*, 2008), e la clinoptilolite è generalmente riconosciuta come acido-resistente, sebbene un *leaching* acido possa determinare de-alluminazione e perdita parziale di cristallinità (Garcia-Basabe *et al.*, 2010). D'altra parte il rapporto Si/Al nella serie heulandite-clinoptilolite varia da 2.6 a 5.7 (Bish & Boak, 2001), ciò implica resistenze che possono essere molto diverse nell'ambito della stessa tipologia strutturale.

I diffrattogrammi delle polveri di FA-Na analizzate dopo i test di simulazione di transito nello stomaco (test 1) e nell'intero tratto gastrointestinale (test 2), sono riportati nella Figura 15, e confrontati con il diffrattogramma del materiale prima del test. Si osservano differenze nelle intensità dei picchi fondamentalmente attribuibili a fenomeni di scambio cationico avvenuti durante le prove, tuttavia un lieve incremento del *background* indica una limitata amorfizzazione della clinoptilolite. Il diffrattogramma della polvere testata a pH gastrico in presenza di pepsina (test AGJ) non è riportato in quanto sovrapponibile a quello del test 1, a confermare che la presenza di enzimi non sembra incrementare la digestione di silicati (Tateo *et al.*, 2001).

In sostanza, i risultati confermano la buona resistenza in ambiente gastro-intestinale, e in presenza o meno di enzimi gastrici, della clinoptilolite presente in FA-Na (il cui rapporto Si/Al è pari a 4.71 - Cerri *et al.*, 2001).

Figura 15. Diffratogrammi di FA-Na prima (blu), e dopo i test 1 (rosso) e 2 (nero)

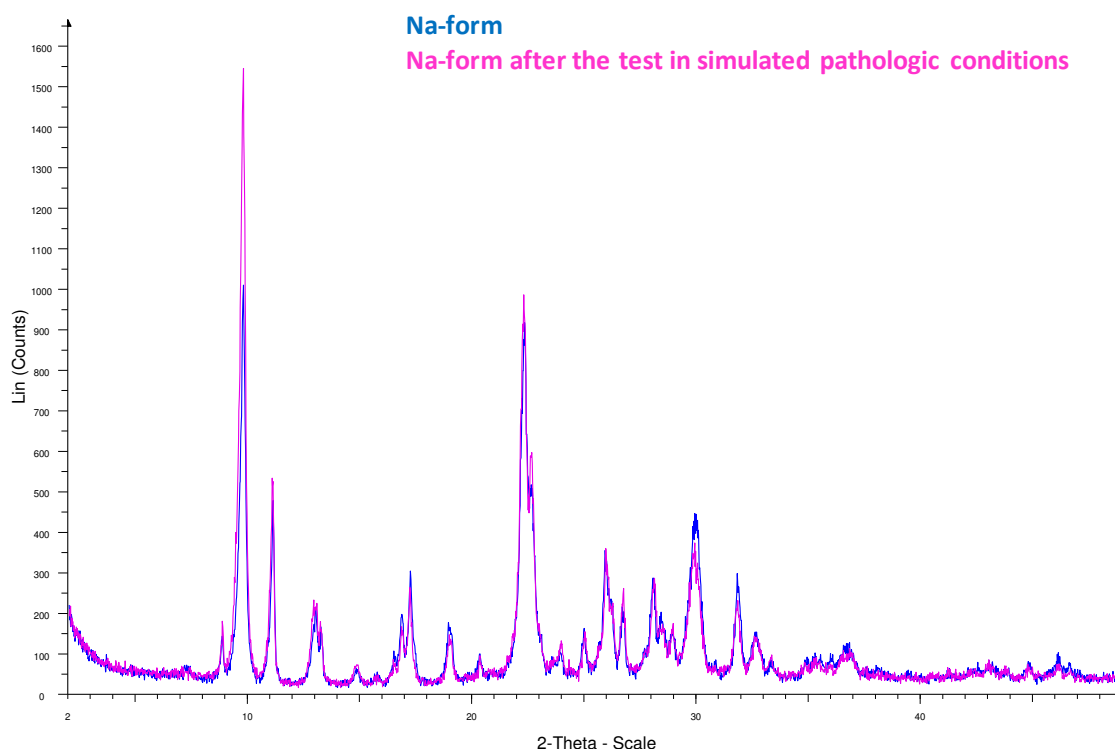


4.1.5 Simulazione processo digestivo: uptake dello ione ammonio.

Il test 3 è stato realizzato per valutare la capacità di FA-Na di sottrarre ammonio nel mezzo che simula l'ambiente gastrico in presenza del batterio *Helicobacter pylori*. Il confronto fra i diffratogrammi dei materiali prima e dopo la prova (Figura 16) evidenzia la maggiore intensità dei picchi del materiale sottoposto al test 3, evidentemente in virtù di uno scambio $\text{Na}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$.

La quantità di ammonio entrata nella zeolite è stata valutata in modo indiretto misurando le quantità di Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} rilasciati in soluzione. Dai risultati delle analisi in ICP-MS si evince che, nelle condizioni testate, la quantità di ammonio scambiata è di 1.75 meq/g, quindi è stato sfruttato circa il 75% della CEC del materiale; il 96.6% di NH_4^+ entrato nella clinoptilolite è stato scambiato con Na^+ , a confermare la selettività della clinoptilolite verso lo ione ammonio (Pabalan & Bertetti, 2001).

Figura 16. Diffrattoigrammi di FA-Na prima (blu) e dopo il test 3 (viola)



4.1.6 Simulazione processo digestivo: rilascio di elementi

Nello stilare una serie di criteri per la valutazione di argille da utilizzare in campo farmaceutico, Adamis e Williams raccomandano la determinazione del contenuto totale, della mobilità e della biodisponibilità degli elementi potenzialmente dannosi per la salute umana (Adamis & Williams, 2005). Sarebbe ragionevole estendere l'applicazione di tali criteri anche alle zeoliti impiegabili per scopi medici. Va considerato che anche un basso contenuto di questi elementi è in grado di determinarne un aumento della loro concentrazione in alcuni organi (Mascolo et al., 2004). La frazione di contaminante che viene rilasciata da una fase minerale nei succhi gastro-intestinali è definita come frazione bioaccessibile (Ruby et al., 1999). Questa frazione è considerata come la massima quantità di contaminante disponibile per l'assorbimento intestinale. L'estrazione *in-vitro* degli elementi in liquidi che simulano i succhi gastrici e intestinali, ossia la bioaccessibilità orale, è importante per la valutazione del rischio chimico per gli esseri umani, e diverse procedure sono state sviluppate nel tentativo di mimare gli effetti del processo di digestione (Abrahams, 2012; Intawongse e Dean, 2006; Oomen et al., 2002).

Il rilascio di elementi da FA-Na durante il transito - simulato secondo *Ph. Eur.* 8.0 - in ambiente gastrico (Test 1) e gastrointestinale (Test 2), è riportato nella tabella 13. Come prevedibile, l'elemento che viene maggiormente rilasciato è il sodio (38 ppm, cioè 87.6% della quantità di sodio in 1 g di FA-Na), sostanzialmente per via dello scambio $\text{Na}^+ \leftrightarrow \text{H}_3\text{O}^+$, mentre il rilascio di Ca, Mg e K è stato molto basso in entrambi i test. La concentrazione di Al misurata dopo il Test 1 è coerente con una parziale de-alluminazione della clinoptilolite a pH 1 (*Garcia-Basabe et al.*, 2010); tuttavia, quando il pH è aumentato nella simulazione del passaggio nell'intestino (test 2), si è registrata una precipitazione della maggior parte dell'alluminio precedentemente in soluzione. Un comportamento simile è stato notato per il ferro, mentre le quantità di Si e Mn aumentano leggermente dal test 1 al test 2. Queste tendenze sono giustificate dalla variazione della solubilità della silice e degli idrossidi di Al^{3+} , Fe^{3+} e Mn^{2+} al variare del pH (*Fornaseri*, 1989). Si deve sottolineare che, durante il test 1, né lo scambio $\text{Na}^+ \leftrightarrow \text{H}_3\text{O}^+$ né la debole de-alluminazione della zeolite hanno influenzato il pH, rimasto sostanzialmente costante: valore iniziale 0.94, finale 0.96.

I test eseguiti hanno dimostrato che la bioaccessibilità orale degli elementi in tracce contenuti in FA-Na è estremamente bassa (Tabella 13). I valori sono sempre al di sotto dei limiti di rilevazione per Ag, Be, Bi, Cu, Hf, Hg, A, Li, Mo, Ni, S, Sn, Te, Tl, W e Zn. Inoltre, i valori di Cr, Ge, Ho, Lu, Nb, Sb, Ta, Tm, V e Zr sono vicini, o al di sotto, del limite di rilevazione. La bioaccessibilità del piombo è risultata essere più influenzata dal pH di quella dell'arsenico. Infatti, quando l'ambiente acido dello stomaco è stato neutralizzato (test 2), il Pb è stato in gran parte rimosso dalla soluzione probabilmente a causa di fenomeni di precipitazione e di adsorbimento, mentre per l'As questo non accade (*Intawongse & Dean*, 2006). Un comportamento simile è stato notato per il bario, che è stato inizialmente rilasciato dalla zeolite in ambiente acido (110 ppb nel test 1), e poi rimosso in seguito al cambiamento del pH (<20 ppb nel test 2). La CEC della clinoptilolite può contribuire alla variazione della bioaccessibilità di alcuni elementi lungo il tratto gastrointestinale, come osservato da *Danz et al.* (2009) per il piombo ed il mercurio.

Il capitolo <232> "Elemental Impurities- Limits" della USP che entrerà in vigore nel dicembre 2015, contiene un elenco con i limiti della massima quantità giornalmente assumibile (per via orale, parenterale, ecc.) di determinati elementi dannosi per la salute. Come già commentato precedentemente, le analisi chimiche di FA-Na evidenziano contenuti piuttosto bassi di metalli pesanti, confrontabili con quelli di argille utilizzate in formulazioni somministrabili per via orale (per le quali esistono monografie in diverse farmacopee). Dai risultati dei test di bioaccessibilità

orale, si evince che la quantità di metalli pesanti rilasciata da FA-Na è estremamente bassa. Considerando una persona di circa 50 Kg ed i limiti previsti dalla monografia USP 232 (*permissible daily exposure*), la massima bioaccessibilità orale di ogni singolo elemento rilasciata da 1 g di FA-Na risulta essere da 3 (per il Pb) a 6 (per Cr e V) ordini di grandezza inferiori ai limiti previsti. Inoltre, se si considerano le dosi di riferimento per la esposizione cronica per via orale indicata nel database IRIS (*US Environmental Protection Agency, 2015*), per individui del peso corporeo di 80 kg, le quantità degli elementi rilasciati da 1 g di FA-Na sono di almeno due ordini di grandezza inferiori ai limiti riportati.

In conclusione, i test di bioaccessibilità effettuati suggeriscono che la già scarsa quantità di elementi potenzialmente dannosi per la salute presente nel materiale verrebbe rilasciata in quantità trascurabili e tollerabili durante il transito nell'apparato digerente, non rappresentando pertanto una minaccia per la salute umana. È da sottolineare, comunque, che ulteriori studi, per esempio *ex-vivo* o *in-vivo*, sono fondamentali per poter meglio simulare le condizioni gastro-intestinali e i processi di assorbimento. Questi sarebbero necessari qualora si dovesse stabilire inequivocabilmente la non pericolosità di un materiale, quindi prima di passare alla all'uomo.

Tabella 13. Elementi rilasciati in mezzi che simulano l'ambiente gastrico (test 1) e gastrointestinale (test 2). Valori in ppb. Analisi in ICP-MS, tranne ^a(ICP-OES). [#]Non determinato perché Na₃PO₄ era parte del mezzo.

Element	Test 1	Test 2	Element	Test 1	Test 2	Element	Test 1	Test 2
Na ^a	38.0·10 ³	n. d. [#]	Er	0.29	0.03	Sc	<10	19
Al ^a	9.2·10 ³	0.4·10 ³	Eu	0.09	<0.01	Se	2.4	<0.2
Si ^a	3.1·10 ³	3.4·10 ³	Ga	0.8	1.4	Sm	1.26	<0.01
K ^a	1.0·10 ³	1.8·10 ³	Gd	1.16	0.01	Sn	<1	<1
Mg ^a	0.7·10 ³	1.0·10 ³	Ge	<0.1	0.1	Sr	6.75	<0.04
Ca ^a	0.4·10 ³	0.3·10 ³	Hf	<0.01	<0.01	Ta	<0.01	0.01
Fe ^a	2.2·10 ²	0.5·10 ²	Hg	<2	<2	Tb	0.14	<0.01
P ^a	1.4·10 ²	n. d. [#]	Ho	0.12	<0.1	Te	<1	<1
S ^a	<1·10 ³	<1·10 ³	In	<0.1	<0.1	Th	0.59	0.07
Ag	<2	<2	La	7.46	0.14	Ti	7.0	4.3
As	0.06	0.06	Li	<10	<10	Tl	<0.01	<0.01
Ba ^a	110	<20	Lu	0.03	<0.01	Tm	0.04	<0.01
Be	<1	<1	Mn	1.9	3.0	U	0.08	0.06
Bi	<3	<3	Mo	<1	<1	V	0.1	<0.1
Cd	<0.1	0.3	Nb	<0.05	0.09	W	<0.2	<0.2
Ce	13.86	0.16	Nd	5.827	0.042	Y	3.44	0.15
Co	<0.05	0.21	Ni	<3	<3	Yb	0.23	0.03
Cr	5	<5	Pb	3.8	0.3	Zn	<5	<5
Cs	0.06	0.18	Pr	1.57	0.03	Zr	<0.1	0.1
Cu	<2	<2	Rb	3.96	5.70			
Dy	0.62	0.01	Sb	0.05	<0.01			

4.1.7 Qualità microbiologica: saggio di conta microbica.

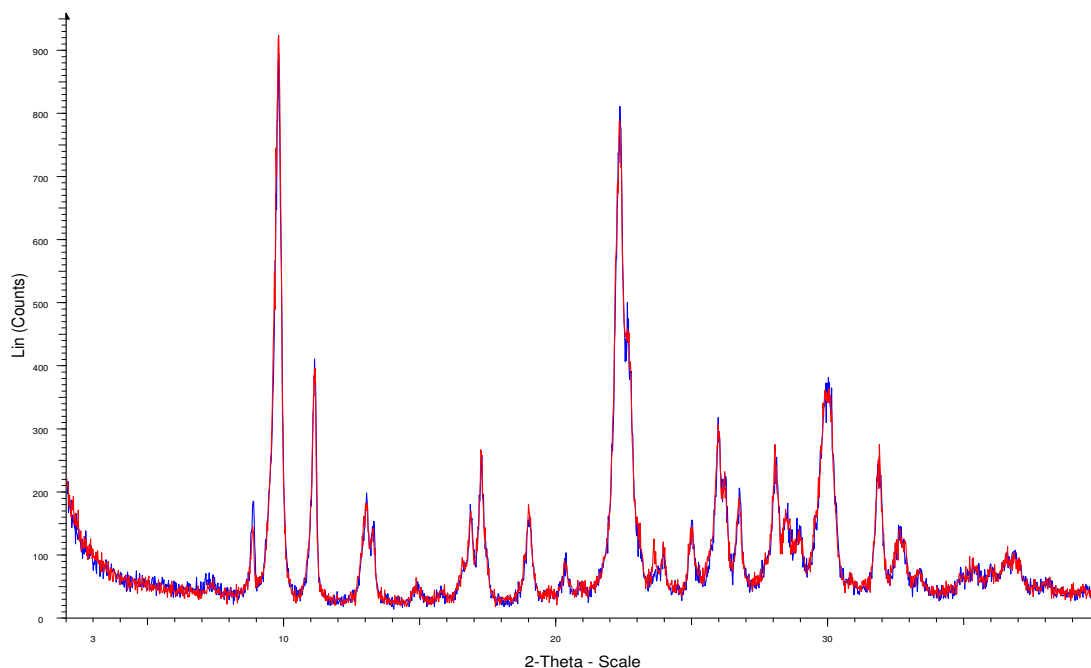
Il materiale FA-Na soddisfa i criteri di accettazione per la qualità microbiologica delle Forme Farmaceutiche non sterili previsti dalla farmacopea europea e italiana. Il numero di microrganismi aerobi totali (CMAT) e di lieviti/funghi totali (CFLT) è, in entrambi i casi, inferiore a 10^1 UFC/g e quindi al di sotto dei limiti previsti per le preparazioni non acquose per uso orale.

4.1.8 Processo di sterilizzazione e test di sterilità.

Il materiale FA-Na è stato sottoposto a un processo di sterilizzazione a calore a secco (160°C per 3 h) come descritto nella *Ph. Eur.* 8.0, peraltro un metodo standard per la sterilizzazione delle argille (López-Galindo *et al.*, 2007). Le analisi ai raggi X, in Figura 17, mostrano che il materiale non ha subito modificazioni strutturali significative dopo il processo di sterilizzazione confermando la resistenza al calore di questa clinoptilolite in forma sodica (Langella *et al.*, 2003).

Nel test di sterilità, eseguito secondo *Ph. Eur.* 8.0, non si è osservata alcuna crescita microbica, pertanto il materiale sottoposto al processo ha soddisfatto il saggio di sterilità.

Figura 17. Diffratogrammi della zeolite FA-Na prima (blu) e dopo (rosso) il processo di sterilizzazione



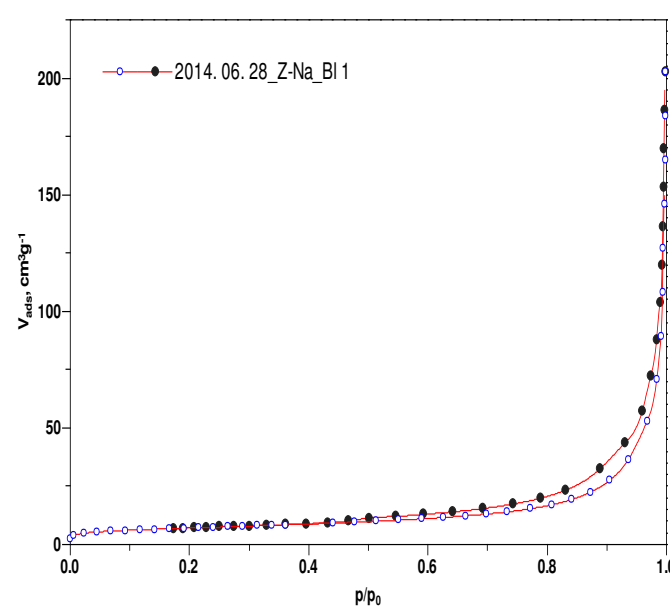
4.1.9 Area superficiale specifica e porosità.

In figura 18 è raffigurata l'isoterma di adsorbimento/desorbimento di azoto del campione FA-Na. I valori di area superficiale specifica e porosità di FA-Na e sono riportati in tabella 14. I risultati sono simili a quelli riportati da *Kragovic et al. (2013)* per un materiale ricco in clinoptilolite finemente polverizzato. L'area superficiale specifica di FA-Na è $25.2 \text{ m}^2/\text{g}$, un valore intermedio rispetto a quelle misurate in altre polveri arricchite in clinoptilolite (*Vujakovic et al, 2000*; *Garcia-Basabe et al., 2010*).

Tabella 14. Area superficiale specifica e porosità di FA-Na

S_{BET} (m^2/g)	V_{tot} (cm^3/g)	V_{meso} (cm^3/g)	V_{mic} (cm^3/g)
25.2 ± 0.1	0.132 ± 0.001	0.079 ± 0.001	0.010 ± 0.001

Figura 18. Isotherme di adsorbimento e desorbimento in azoto del campione FA-Na.



4.1.10 Potenziale Zeta.

Il Potenziale Zeta (PZ) di FA-Na in acqua a $\text{pH} \approx 6$ è di circa -50 mV (tabella 15). Il PZ è stato misurato anche in soluzioni di HCl a diversi pH. Si nota che, per valori di pH inferiori a 4, il PZ varia con il pH. In particolare al ridursi del pH il valore del PZ si sposta verso valori più vicini

alla neutralità elettrica. Questo, probabilmente, è dovuto alla neutralizzazione delle cariche negative presenti sulla superficie esterna delle particelle di clinoptilolite da parte dei protoni in soluzione, che vengono adsorbiti sulla superficie della zeolite. Naturalmente è verosimile che avvengano anche, almeno in parte e soprattutto per i pH più bassi, dei fenomeni di scambio fra i cationi presenti nella clinoptilolite e gli ioni H_3O^+ .

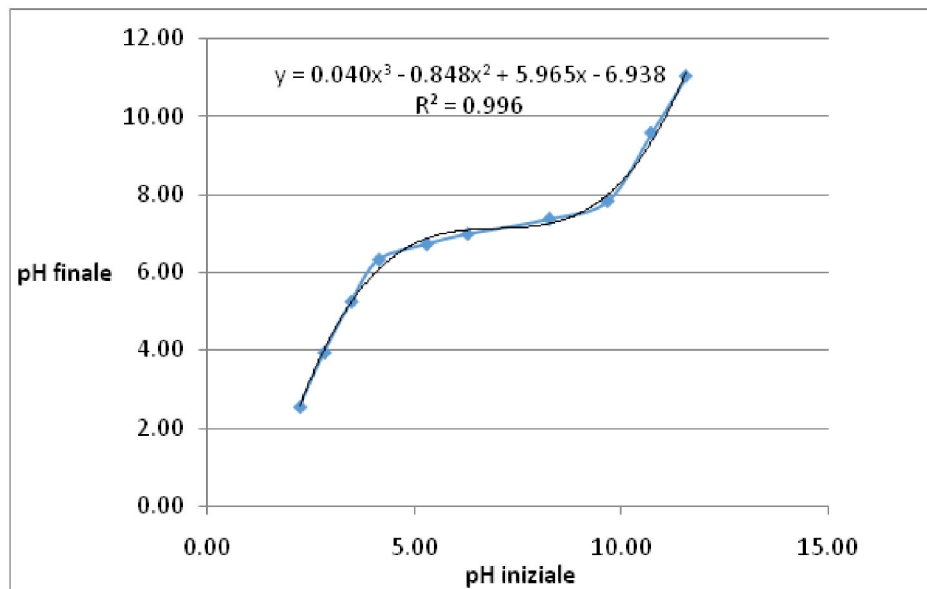
Tabella 15. Determinazioni del Potenziale Zeta di FA-Na

Medium	pH	Zeta potential (mV)	e.s.d.
Water	6.05±0.01	-53	±1
HCl 0.0001 M	4.03±0.01	-51	±2
HCl 0.001 M	2.91±0.01	-31	±1
HCl 0.01 M	1.86±0.01	-21	±1
HCl 0.1 M	0.86±0.01	-11	±1

4.1.11 Punto di carica zero.

Il punto di carica zero (pH_{pzc}) è un'importante caratteristica dei minerali e di solito viene usato per definire la carica di superficie di una fase solida sospesa in una soluzione di un elettrolita. Il pH_{pzc} del campione FA-Na, individuabile dal flesso della curva in figura 19, risulta pari a 6.98 ed è simile per tutte e tre le concentrazioni di elettrolita testate, indicando che il pH_{pzc} è indipendente dalla forza ionica KNO_3 , l'elettrolita usato (*Dakovic et al., 2010*). Nella figura 19, che rappresenta la media delle tre curve alle diverse concentrazioni di elettrolita, si nota che nel range di pH da ~5.5 a ~9.5 i valori del pH finale sono indipendenti da quelli del pH iniziale. Infatti, in questo range, il materiale si comporta come tampone anfotero, adsorbendo ioni H^+ e OH^- al variare del pH. Il range di pH dove la clinoptilolite in Na-form si comporta da tampone è visibile graficamente dal plateau della curva nella figura 19 (*Dakovic et al., 2010*). Le misure confermano che in mezzi fortemente acidi la zeolite non è in grado di variare il pH, come effettivamente riscontrato (vedi paragrafo 4.1.6) durante l'esecuzione del test simulante l'ambiente gastrico.

Figura 19. $\text{pH}_{\text{finale}}/\text{pH}_{\text{iniziale}}$ di una sospensione di FA-Na.

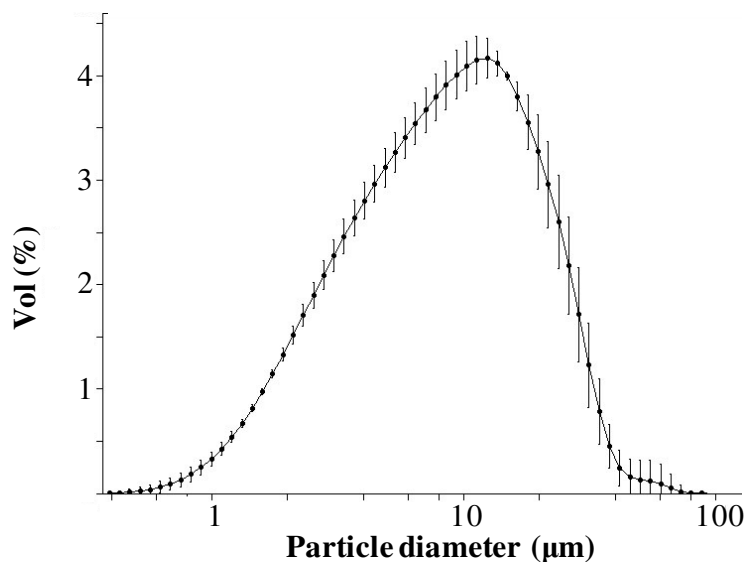


4.1.12 Caratterizzazione tecnologica specifica per applicazioni nel campo farmaceutico

Le dimensioni delle particelle e la distribuzione dimensionale di una polvere sono molto importanti, oltre che da un punto di vista prettamente tecnologico, anche perché in esperimenti condotti su topi, *Martin-Kleiner et al. (2001)* correlano l'intensità dell'irritazione e dell'infiammazione intestinale alle diverse dimensioni della polvere a base di clinoptilolite somministrata per via orale. Ciò sottolinea l'importanza di preparare polveri ingeribili massimizzando il contenuto di clinoptilolite - un minerale di bassa durezza (3.5-4), facilmente sfaldabile e di forma lamellare - e riducendo al minimo la percentuale di feldspati e di altri polimorfi della silice, più duri (6-7) della clinoptilolite.

La curva di distribuzione dimensionale di FA-Na (Figura 20) è unimodale, con particelle di diametro compreso tra 0.4 e 80 μm ; lo *SPAN Index* è pari a 1.99. Il d_{vs} (diametro equivalente volume/superficie) e il d_{m} (diametro modale) calcolati sull'intera curva sono rispettivamente di 5.32 ± 0.08 e 10.83 ± 0.35 μm . FA-Na soddisfa il requisito stabilito dalla *Ph Eur* 8.0 per la bentonite, vale a dire, il 99.5% delle particelle deve essere ≤ 75 μm . Prodotti a base di clinoptilolite attualmente in commercio e impiegati per uso orale riportano dimensioni di circa 40 μm (*Selvam et al., 2014*).

Figura 20. Curva di distribuzione dimensionale di FA-Na.



La densità vera di FA-Na è di circa 2.180, un valore in linea con quelli misurati su cristalli puri di Na-clinoptilolite ($2.16 \pm 0.02 \text{ g/cm}^3$ - Wise *et al.*, 1969).

I risultati della determinazione dei volumi e densità apparenti e densità vera sono riportati in Tabella 16. La densità apparente del materiale aumenta da 0.56 a 0.98 g/cm^3 dopo impaccamento (1250 colpi).

Tabella 16. Volume e densità apparenti (al versamento V_b e ρ_b , dopo n colpi V_n e ρ_n) e densità vera (Dv) di FA-Na

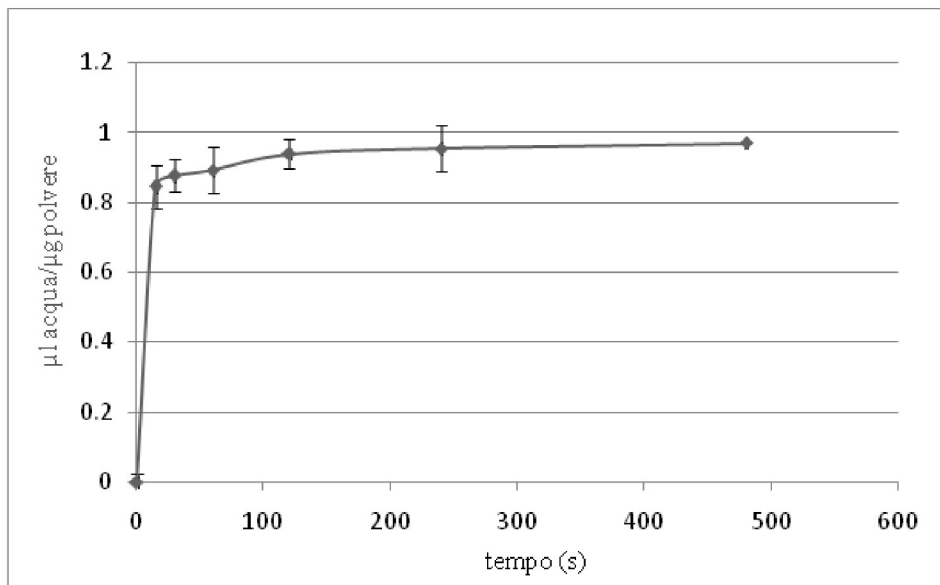
Sample	Valori
V_b (ml)	99.5 ± 0.5
V_{10} (ml)	89 ± 1.4
V_{50} (ml)	80.5 ± 2
V_{250} (ml)	67.5 ± 2
V_{500} (ml)	61 ± 1.4
V_{1250} (ml)	56.5 ± 0.5
ρ_b (g/cm ³)	0.56 ± 0.01
ρ_{1250} (g/cm ³)	0.98 ± 0.02
D_v (g/cm ³)	2.18 ± 0.01

Le caratteristiche di scorrimento della polvere sono state determinate secondo *Ph Eur* 8.0 con a) il metodo dinamico, b) calcolando l'indice di *Hausner*, e c) di comprimibilità.

FA-Na mostra scarsa propensione a fluire attraverso l'orifizio dell'imbutto di scorrimento; la velocità nulla è dovuta probabilmente all'elevata igroscopicità del materiale, all'alta superficie specifica ed alla forma lamellare dei cristalli, caratteristiche simili a quelle della "bentonite" che, infatti, nella farmacopee internazionali è classificata come un materiale "non scorrevole" (*Palmieri, 2009*). L'indice di *Hausner* e l'indice di comprimibilità del materiale sono rispettivamente 1.76 ± 0.01 e 43.00 ± 0.31 . Confrontando i valori ottenuti con le tabelle riportate nella *Ph Eur* 8.0, il materiale in esame è classificabile, per capacità di scorrimento, al limite tra "scadente" ed "estremamente scadente".

Il test di assorbimento d'acqua (*Water uptake*) consente di ottenere informazioni riguardo il comportamento di FA-Na quando, in seguito ad ingestione, viene in contatto con i fluidi gastrointestinali. La capacità del materiale di assorbire acqua nel tempo è rappresentata in Figura 21. Il campione mostra un rapido assorbimento di acqua nei primi 15-30 secondi. La quantità totale di acqua adsorbita è circa pari al suo peso (1 μ l di acqua adsorbita per 1 mg di polvere).

Figura 21. Water uptake di FA-Na



Il pH di una sospensione acquosa di FA-Na (determinato come prescritto dalla USP 32 per le sospensioni di argilla in acqua) ha mostrato una variazione da 6.85 ± 0.01 a 8.53 ± 0.04 (tabella 17), un fenomeno imputabile allo scambio cationico tra gli ioni H_3O^+ in soluzione e gli Na^+ della zeolite (Coella, 2011). In effetti, il pH di partenza è all'interno del *range* in cui la clinoptilolite si comporta come tampone anfotero, come rilevato durante la determinazione del pH_{pzc} (cfr. paragrafo 4.1.11).

Tabella 17. Misura del pH di una sospensione di FA-Na in acqua (4g/l).

Test	pH iniziale	pH finale
a	6.85	8.50
b	6.85	8.57
c	6.86	8.55

4.1.13 Compattabilità della polvere e resistenza delle compresse

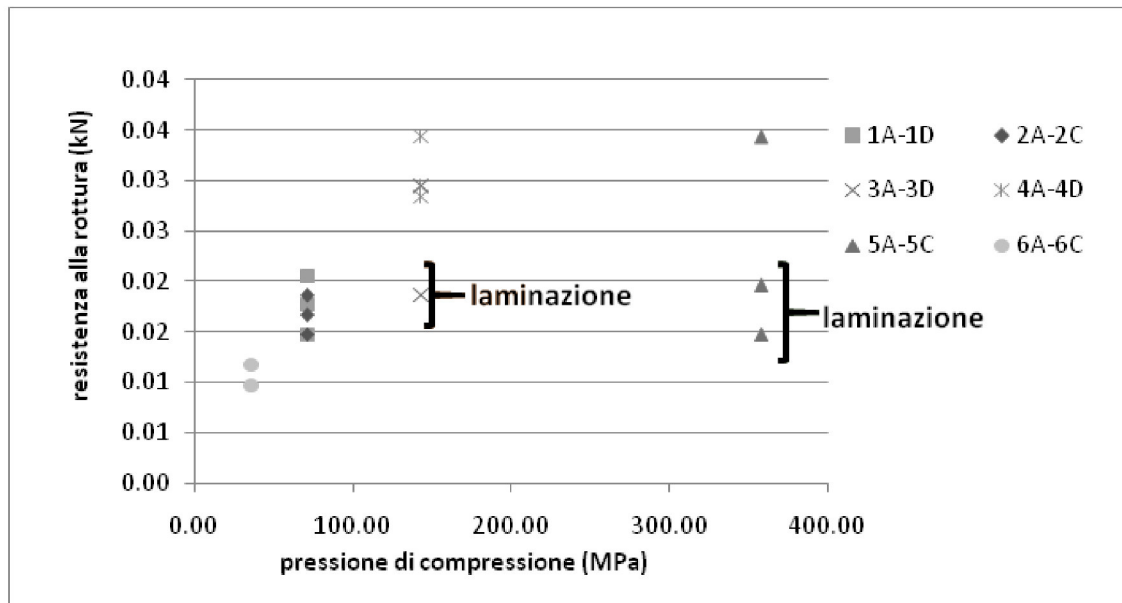
Le prove riguardanti la compressione della polvere FA-Na in diverse condizioni hanno portato a degli importanti indizi sull'influenza di alcuni parametri nel processo di compattazione. Nella tabella 18 sono riassunti i parametri utilizzati durante i test di compressione.

Tabella 18. Condizioni di compressione (diametro matrice = 13 mm).

Comprese	Forzadi compressione (kN)	Temposi compressione (s)
1A-1D	9.8	30
2A-2C	9.8	120
3A-3D	19.6	30
4A-4D	19.6	120
5A-5C	49.0	30
6A-6C	4.9	120

Le compresse ottenute con una forza di compressione di 4.9 e 9.8 kN (ca. 500 e 1000 kg) non mostrano laminazione. Al contrario, per forze di compressione ≥ 19.6 kN (ca. 2000 kg) le compresse tendono a laminare. La forza di compressione e il tempo di compressione influenzano la resistenza alla rottura della compressa; in particolare all'aumentare della forza e del tempo di compressione, aumentano sia la resistenza alla rottura (Figura 22) che la resistenza alla trazione delle compresse. Al contrario, il tempo di applicazione del vuoto non sembra influenzare in modo significativo le caratteristiche meccaniche delle compresse.

Figura 22. Relazione fra resistenza alla rottura delle compresse e pressione di compressione

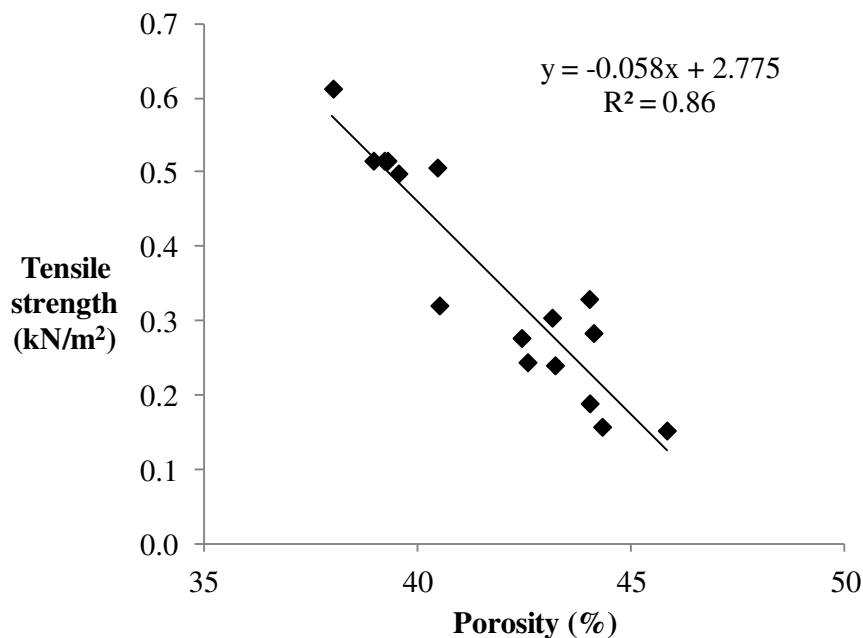


La porosità delle compresse può influenzare la diffusione del principio attivo così come la resistenza meccanica di una compressa, che ha un ruolo cruciale durante lo stoccaggio del prodotto. La porosità è influenzata dalle caratteristiche del materiale (per esempio la capacità di deformazione e di frammentazione) ma, per la stessa polvere, le condizioni di preparazione (per esempio la pressione di compressione) delle compresse diventano più importanti (K.-E. Peiponen et al., 2013). Come prevedibile, all'aumentare della forza di compressione il volume delle compresse di FA-Na, e di conseguenza la loro porosità, diminuisce (tabella 19). Nella Figura 23 si osserva come la porosità delle compresse sia in relazione inversa con la resistenza alla trazione.

Tabella 19. Variazione del volume e della porosità delle compresse di FA-Na in funzione della forza di compressione.

Forza di compressione (kN)	Vc (cm ³)	Porosità (%)
4.9	0.42	44.7
9.8	0.40	43.4
19.6	0.38	39.4
49.02	0.34	32.2

Figura 23. Relazione tra resistenza alla trazione e porosità.



Tutte le compresse ottenute si disgregano molto velocemente in acqua (10-15 s), accompagnate da liberazione di bolle d'aria. Le compresse ottenute con una forza di compressione pari a 49.0 kN (5000 kg) si disgregano molto difficilmente e solo dopo sollecitazione meccanica.

Le compresse preparate con polveri di FA-Na preventivamente disidratate sono risultate essere molto fragili e facilmente sfaldabili. Questo sta a indicare come l'acqua abbia un ruolo fondamentale nel conferire resistenza meccanica alle polveri compattate, probabilmente in virtù della sua tensione superficiale.

4.2. Valutazione dell'attività antibatterica della clinoptilolite nei confronti del batterio *H. pylori*

4.2.1. Preparazione delle altre forme cationiche di clinoptilolite

Clinoptilolite in forma ammonio (FA-NH₄)

Per valutare la qualità della forma ammonio ottenuta sono stati analizzati gli eluati dei cicli di scambio. La quantità di ammonio scambiato è stata valutata in modo indiretto misurando, negli eluati, la quantità di sodio ceduto, oltre ai rilasci residui di potassio, calcio e magnesio ancora presenti nella zeolite. Osservando la quantità di sodio ceduto nel corso dei vari cicli di scambio, possiamo notare che lo scambio $\text{Na}^+ \leftrightarrow \text{NH}_4^+$ è avvenuto principalmente durante il primo ciclo di scambio (il sodio ceduto è di un ordine di grandezza superiore a quello rilasciato nel secondo ciclo). Sommando tutti i rilasci dei cationi (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}) i milliequivalenti di ammonio entrati in 100 g di zeolite arrivano a 234, il che significa che si è ottenuta una clinoptilolite completamente in forma ammonio.

Clinoptilolite in forma argento (FA-Ag) e zinco (FA-Zn)

Le analisi chimiche di FA-Ag e FA-Zn sono riportate nella tabella 20. Entambe le forme mostrano composizioni chimiche compatibili con quelle di materiali essenzialmente costituiti, rispettivamente, da Ag- e Zn-clinoptilolite.

Tabella 20. Analisi chimiche di FA-Ag e FA-Zn (sotto - espresse in termini di ossidi di Ag e Zn)

	Zn %	Ag ppm	SiO ₂ %	Al ₂ O ₃ %	Fe ₂ O ₃ (T) %	MnO %	MgO %	CaO %	Na ₂ O %	K ₂ O %	TiO ₂ %	P ₂ O ₅ %	LOI %	Total %
FA-Ag	-	248000	50.50	9.27	0.44	0.045	0.20	0.21	0.12	0.23	0.132	0.04	12.11	73.30
FA-Zn	6.88	-	62.03	11.93	0.66	0.007	0.32	0.31	0.25	0.37	0.179	0.04	16.04	92.13

	ZnO %	Ag ₂ O %	SiO ₂ %	Al ₂ O ₃ %	Fe ₂ O ₃ (T) %	MnO %	MgO %	CaO %	Na ₂ O %	K ₂ O %	TiO ₂ %	P ₂ O ₅ %	LOI %	Total %
FA-Ag	-	26.64	50.50	9.27	0.44	0.045	0.20	0.21	0.12	0.23	0.132	0.04	12.11	99.94
FA-Zn	8.56	-	62.03	11.93	0.66	0.007	0.32	0.31	0.25	0.37	0.179	0.04	16.04	100.70

4.2.2. Test svolti sul ceppo di collezione di *H.pylori* (ATCC 43504).

4.2.2.1 Crescita del batterio in ambienti acidi.

In accordo con i dati riportati in letteratura (*Clyne et al. 1995*), il batterio è stato in grado di crescere in terreni supplementati con HCl solo in presenza di urea e a valori di pH superiori a 3. Sempre in accordo ai dati di letteratura, il batterio non è cresciuto a pH 7 con aggiunta di urea a 600 mg/l probabilmente a causa dell'aumento del pH del terreno (*Megraud & Lehours, 2007*).

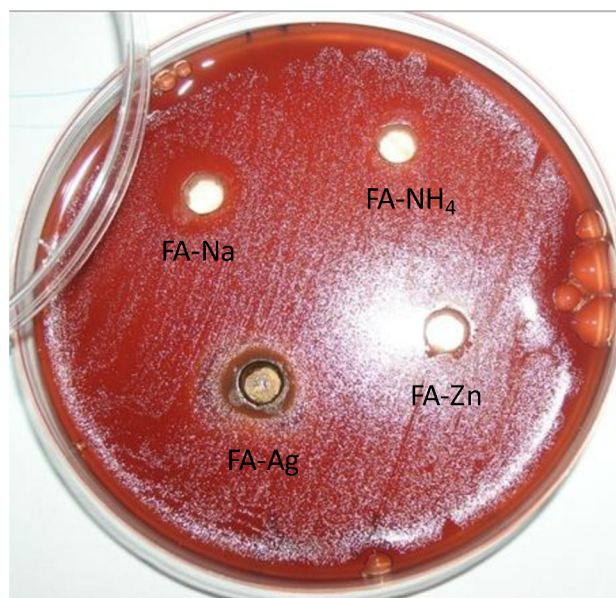
4.2.2.2 Agar cup diffusion test.

Intorno ai fori nei quali erano state versate sospensioni di FA-Na, FA-Ag e FA-Zn (Figura 24) si è osservato un alone di inibizione della crescita del batterio. In particolare la forma sodio ha mostrato un alone di inibizione maggiore (circa 4 mm di spessore), a seguire la forma argento (circa 3 mm di spessore) e infine la forma zinco (circa 1.5 mm). Come ci si attendeva, la forma ammonio non ha mostrato alcun alone di inibizione.

Le soluzioni di NaCl non hanno mostrato aloni di inibizione a nessuna concentrazione, ciò dimostra che l'alone di inibizione indotto dalla clinoptilolite FA-Na è determinato dalla sottrazione di ammonio, non dal rilascio di ioni Na^+ . Per quanto concerne le forme zinco e argento, l'azione potrebbe essere duplice: sottrazione di ioni ammonio e azione antibatterica del catione rilasciato.

Le differenze nell'estensione degli aloni di inibizione osservate per FA-Na, Fa-Ag e Fa-Zn potrebbero dipendere da una diversa mobilità del catione nel mezzo di coltura. Inoltre, in particolare per ciò che concerne la forma argento, si potrebbero sovrapporre reazioni con formazione di composti dell'elemento (si noti l'alone più scuro ai bordi del foro: Ag_2O ?) che potrebbero ripercuotersi sia sulla mobilità dell'elemento che sulla sua capacità antibatterica.

Figura 24. Agar cup diffusion test sul ceppo batterico *H. pylori* ATCC 43504



4.2.2.3 MIC e MBC

Le MIC dei materiali (tabella 21) sono state determinate entro un range di concentrazione delle sospensioni da 0.125 a 15 mg/ml. Dai risultati ottenuti, le clinoptilolite in forma sodio presentano la stessa MIC, pari a 0.5 mg/ml. A seguire la clinoptilolite FA-Zn, con una MIC di 4 mg/ml. La clinoptilolite in forma ammonio conferma di non avere una attività antibatterica, infatti alla concentrazione massima testata non ha inibito la crescita del batterio.

Tabella 21. MIC dei materiali (determinate mediante diluizione in agar)

Sample	MIC (mg/ml)
FA-Na	0.5
FA-Ag	0.5
FA-Zn	4
FA-NH ₄	-

Sono state determinate anche le MIC a pH 4 e 5 per FA-Na e FA-NH₄. Al variare del pH le MIC sono rimaste identiche. Dai risultati ottenuti si evince che la sensibilità del batterio ai materiali

testati non varia al variare del pH dell'ambiente circostante.

Confrontando le MIC agli aloni di inibizione del test precedente, si nota come, nonostante la forma sodio abbia mostrato un alone di inibizione più ampio della forma argento, le MIC dei due materiali siano uguali. Questo rafforza le ipotesi già espresse (paragrafo 4.2.2.2) riguardo il possibile ruolo giocato i) dalla diversa mobilità dei cationi nel mezzo, ii) da reazioni con formazione di composti dell'elemento.

È stato eseguito il test per determinare la MBC della clinoptilolite in forma sodio, partendo da concentrazioni di FA-Na pari alla MIC fino ad arrivare a concentrazioni 16 volte superiori alla MIC: in tale *range* il materiale non ha mostrato attività battericida.

4.2.2.4 Viable colony count

I risultati del test sono espressi nella Figura 25 come percentuale di inibizione della crescita del microorganismo rispetto al controllo. Come si può notare, all'aumentare della concentrazione della clinoptilolite in forma sodio (FA-Na) diminuisce il numero di colonie di *H. pylori* (Figura 26). Alla concentrazione minima testata, pari alla MIC, si ha avuto una inibizione del 13.1 ± 1.6 %; alla massima concentrazione di FA-Na testata, pari a 16 volte la MIC, si è osservato una inibizione della crescita del batterio del 87.4 ± 0.9 %.

Figura 25. Attività antibatterica del materiale a base di Na-clinoptilolite (FA-Na) nei confronti del batterio *H. pylori* (ATCC 43504) determinata con il test *viable colony count*.

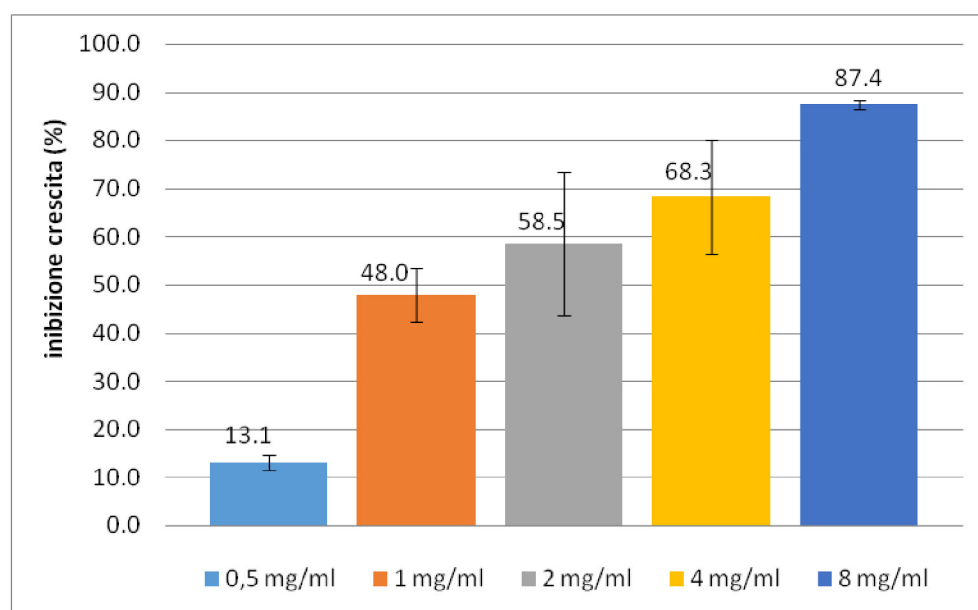
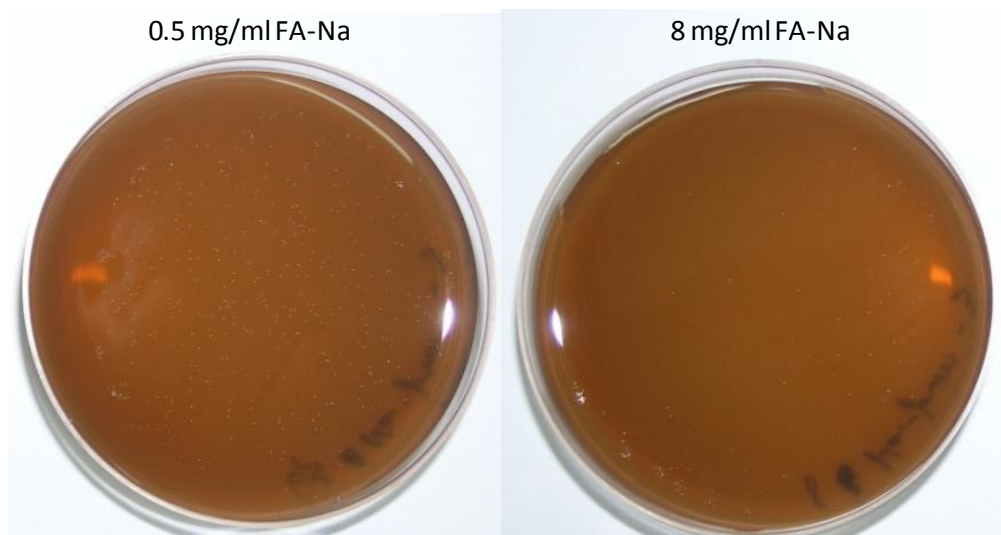


Figura 26. Piastre ottenute durante il test *viable colony count* a concentrazioni di 0.5 e 8 mg/ml di FA-Na. Si nota la riduzione del numero di colonie di *H. pylori* (ATCC 43504) all'aumentare delle concentrazioni di Na-clinoptilolite.



4.2.2.5 Studio su un possibile effetto sinergico della zeolite FA-Na con i farmaci correntemente usati contro l'*Helicobacter pylori*

Uno screening iniziale della sensibilità del batterio nei confronti dei farmaci è stata eseguita mediante antibiogramma. Il batterio ha mostrato una elevata sensibilità nei confronti della amoxicillina (AMX – in dischi 2 µg, Oxoid) con un alone di inibizione maggiore di 80 mm. L'antibiogramma per l'AMX è stato inoltre eseguito con dischi non commerciali. Dischi di carta sterili di diametro 9 mm sono stati impregnati di una soluzione di amoxicillina triidrata per un quantitativo pari a 0.5 mg. Con questi dischi si è ottenuto un alone di inibizione di circa 50 mm di diametro. La levofloxacina (LEV – in dischi 5 µg, Oxoid) ha mostrato un alone di inibizione di circa 50 mm. Il batterio invece non è risultato sensibile al metronidazolo (MT – in dischi 5 µg, Oxoid), che non ha determinato alcun alone di inibizione.

È stata valutata la MIC dei tre antibiotici mediante gli *strip MIC evaluator*. La MIC del MT è risultata essere superiore al limite massimo degli strip (> a 256 µg/ml). La MIC della LEV è di 0.06 µg/ml. La MIC della AMX è inferiore a 0.015 µg/ml, limite inferiore degli strip. Per questo motivo, la MIC della AMX è stata valutata mediante 'diluizione in agar'. L'amoxicillina triidrata

(*Carlo Erba*) è stata incorporata in piastre di MHAS per ottenere concentrazioni da 0.004 a 0.3 µg/ml. La MIC determinata mediante questo metodo risulta 0.017 µg/ml. Le MIC di tutti e tre i farmaci sono state valutate anche in terreni a pH 4 e 5. La MIC della AMX è aumentata a 0.031 µg/ml a pH 4 mentre non è variata a pH 5. Per la LEV e MT non sono state osservate variazioni delle MIC a pH acidi. I risultati sono riassunti nella tabella 22.

Tabella 22. MIC e aloni di inibizione. MIC determinate mediante *strip MIC evaluator* (Oxoid) per LEV e MT, e tramite diluizione in agar per AMX; aloni di inibizione determinati con dischi di AMX da 2 µg (Oxoid) e da 0.5 µg (preparati in laboratorio), dischi di MT da 5 µg e di LEV da 5 µg (Oxoid).

Farmaco	MIC - pH 7 (µg/ml)	MIC - pH 5 (µg/ml)	MIC - pH 4 (µg/ml)	Diametro aloni di inibizione (mm)
Amoxicillina	0.017	0.017	0.031	>70 (dischi Oxoid 2 µg) 53 (dischi 0.5 µg)
Levofloxacina	0.6	0.6	0.6	55
Metronidazolo	> 256	> 256	> 256	0

La possibile sinergia tra farmaci e Na-clinoptilolite è stata valutata determinando la MIC dei farmaci e gli aloni di inibizione dei dischi di antibiotici in terreni contenenti e non contenenti FA-Na a una concentrazione pari a 1/2 e 1/4 della MIC (0.25 e 0.125 mg/ml rispettivamente). Per confronto, i test sono stati svolti anche in terreni contenenti NH₄-clinoptilolite.

Le MIC della LEV determinate con gli *strip MIC evaluator*, così come gli aloni di inibizione dei dischi di LEV, non sono variate in presenza di FA-Na e FA-NH₄, nemmeno al variare del pH. In altri termini, non si è osservato un effetto sinergico della Na-clinoptilolite con la LEV. Parimenti, il batterio non ha variato la sensibilità al MT in presenza delle forme di clinoptilolite testate: la MIC rimane maggiore a 256 µg/ml e non si sono osservati aloni di inibizione nell'intorno dei dischi di MT in terreni contenenti FA-Na.

Nel caso della AMX, gli aloni di inibizione (dischi da 0.5 µg) hanno mostrato un incremento del diametro in terreni contenenti Na-clinoptilolite (tabella 23). Nelle stesse condizioni, non è stata invece osservata nessuna variazione degli aloni di inibizione in terreni contenenti NH₄-clinoptilolite. In media, a concentrazioni di 0.125 mg/ml di FA-Na, gli aloni di inibizione dei dischi di AMX sono

incrementati del $24.6 \pm 0.5\%$. Alla concentrazione di 0.25 mg/ml la crescita del batterio è stata praticamente inibita, segno evidente che il diametro dell'alone di inibizione è maggiore del diametro della piastra.

Tabella 23. Aumento % del diametro degli aloni di inibizione dei dischi di AMX (0.5 μg) in terreni contenenti FA-Na (0.125 e 0.25 mg/ml) a pH 7 rispetto agli aloni di inibizione negli stessi terreni non contenenti zeolite.

Farmaco	FA-Na (mg/ml)	% aumento alone di inibizione		
		Test 1	Test 2	Media
AMX	0.125	24.3 ± 3.2	25.0 ± 2.1	24.6 ± 0.5
AMX	0.25	$>73.0 \pm 0.7$	$>73.1 \pm 0.7$	$>73.1 \pm 0.0$

4.2.3. Test svolti su ceppi clinici di *H. pylori*

4.2.3.1 *Agar cup diffusion test, MIC e MBC.*

Nel test *Agar cup diffusion* (Figura 27) sono stati osservati aloni di inibizione solamente per i campioni FA-Zn e FA-Ag (tabella 24), mentre la clinoptilolite, quando in forma ammonio o sodio, non ha mostrato attività antibatterica mediante questo metodo sui ceppi clinici presi in esame.

Figura 27. Agar cup diffusion test dei campioni FA-Na, FA-NH₄⁺, FA-Ag e FA-Zn. Ceppo *HP-E*.

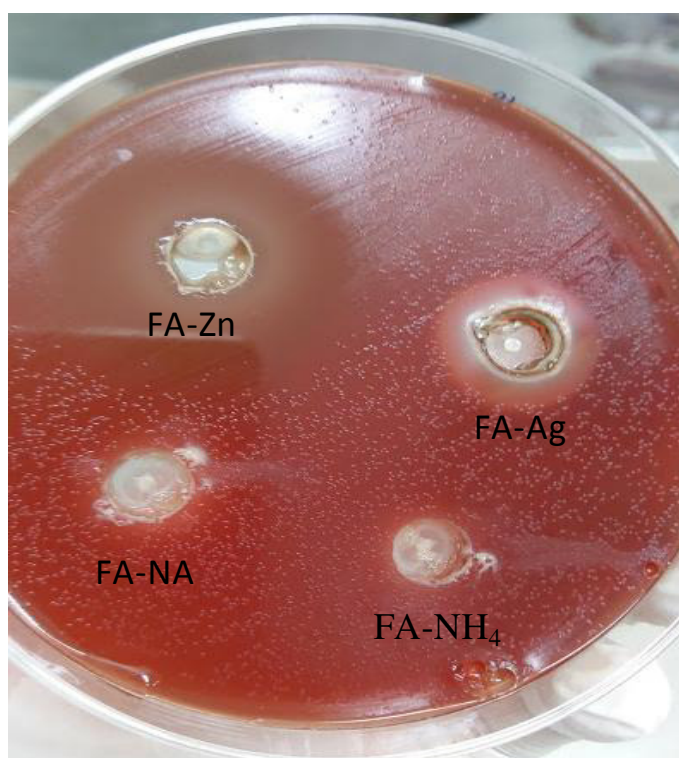


Tabella 24. Aloni di inibizione dei campioni FA-Ag e FA-Zn in MHASs (pH 7 e 5) mediante il test *Agar cup diffusion*. I terreni a pH 5 sono stati supplementari con HCl 1M e urea (600 mg/ml).

	Zona di inibizione (mm)			
	pH 7		pH 5	
Ceppo	FA-Ag	FA-ZN	FA-Ag	FA-ZN
HP-A	5.3	6.1	3.2	3.9
HP-B	5.5	6.5	3.0	3.8
HP-C	5.0	4.6	3.0	4.1
HP-D	5.8	7.5	2.0	4.0
HP-E	4.7	10.0	2.5	7.0
HP-F	4.3	6.5	4.0	5.0
HP-G	4.0	3.0	3.0	3.0
HP-H	4.0	5.8	4.0	6.5
Media	4.9±0.7	6.4±1.8	3.1±0.7	4.6±1.4

Mediamente, l'alone di inibizione della clinoptilolite FA-Zn è più ampio di quello della clinoptilolite FA-Ag. Al contrario, le MIC della forma argento sono più basse rispetto alla forma Zn (tabella 25), e uguali per tutti i batteri testati (0.25 mg/ml). Questo aspetto, analogo a quanto osservato sul ceppo da collezione, richiama ancora una volta le ipotesi già espresse (paragrafi 4.2.2.2-3) riguardo il possibile ruolo giocato i) dalla diversa mobilità dei cationi nel mezzo, ii) da reazioni con formazione di composti dell'elemento. In altre parole sembra probabile che la forma argento possa avere un'attività antibatterica superiore alla forma zinco, ma sia penalizzata da una minore mobilità dell'elemento e/o da una sua tendenza a reagire formando composti che ne riducono l'azione antibatterica.

La MIC della FA-Zn è di 1 mg/ml per 2 ceppi e di 2 mg/ml per altri 6 ceppi. L'assenza di alone di inibizione - nell'*Agar cup diffusion test* - da parte della zeolite FA-Na è verosimilmente dovuta alla MIC molto alta che questo materiale ha evidenziato quando testato su ceppi clinici di *H. pylori*, infatti la clinoptilolite in forma sodio ha inibito totalmente la crescita del batterio solo a 16 mg/ml. La zeolite in forma ammonio, invece, non ha inibito la crescita del batterio neanche alla concentrazione massima testata (16 mg/ml), confermando così la validità del presupposto su cui si basa il progetto di ricerca.

Tabella 25. MIC delle zeoliti testate. La zeolite FA-NH₄ non ha inibito la crescita batterica neanche alla massima concentrazione testata.

Ceppo	MIC (mg/ml)			
	FA-Na	FA-NH ₄	FA-Ag	FA-ZN
HP-A	16	-	0.25	2
HP-B	16	-	0.25	2
HP-C	16	-	0.25	2
HP-D	16	-	0.25	2
HP-E	16	-	0.25	1
HP-F	16	-	0.25	2
HP-G	16	-	0.25	2
HP-H	16	-	0.25	1

Il test *Agar cup diffusion* è stato eseguito inoltre in MHASs supplementato con HCl (pH 5) e urea (600 mg/ml). L'obiettivo di questo test era verificare se in queste condizioni cambia la sensibilità del batterio nei confronti delle diverse forme cationiche della zeolite. Anche in queste condizioni non sono stati osservati aloni di inibizione per le forme sodio e ammonio. I campioni FA-Zn e FA-Ag hanno mostrato aloni di inibizione di ampiezza inferiore a quelli ottenuti in terreni senza HCl e urea. In particolare, gli aloni di inibizione si sono ridotti mediamente del $38.0 \pm 1.3\%$ e del $27.4 \pm 1.2\%$ per i campioni FA-Ag e FA-Zn, rispettivamente. La riduzione dell'alone di inibizione in terreni supplementati con HCl e urea potrebbe essere conseguenza della variazione di uno o più parametri. Per esempio, la sensibilità del batterio ai materiali testati, la capacità di scambio cationico della clinoptilolite e la mobilità dei cationi possono variare in funzione del pH e della composizione del terreno di cultura. E' inoltre possibile che tali condizioni siano di per sé più favorevoli alla proliferazione del batterio,

Sui ceppi *HP-B*, *HP-C* e *HP-H* è stata determinata la MBC della zeolite FA-Zn. Per tutti e tre i ceppi batterici la MBC è risultata 4 mg/ml.

4.2.3.2 Studio su un possibile effetto sinergico della clinoptilolite con alcuni farmaci correntemente usati contro *L'Helicobacter pylori*.

La sensibilità dei batteri ai farmaci è stata inizialmente valutata mediante antibiogramma (tabella 26). Dei tre ceppi testati, tutti si mostrano sensibili alla AMX e tutti resistenti al MT. Due ceppi su tre si mostrano sensibili alla LEV e alla CLA.

Tabella 26. Aloni di inibizione di AMX, MT, LEV e CLA. Sono stati determinati con dischi di AMX da 2 µg, MT da 5 µg, LEV da 5 µg e CLA da 15 µg.

	Aloni di inibizione (mm)		
	<i>HP-B</i>	<i>HP-C</i>	<i>HP-H</i>
AMX	19	16	16
MT	0	0	0
LEV	0	15	17
CLA	0	14	12

È stata determinata la MIC dei farmaci mediante gli *strip MIC evaluator* (tabella 27).

Tabella 27. MIC di AMX, MT, LEV e CLA determinate mediante *strip MIC evaluator* (Oxoid). La MIC della CLA è stata determinata solo sul ceppo *HP-B*.

	MIC (µg/ml)		
	<i>HP-B</i>	<i>HP-C</i>	<i>HP-H</i>
AMX	0.12	0.25	0.5
MT	>256	>256	>256
LEV	>32	8	24
CLA	>256	-	-

La possibile sinergia tra gli antibiotici ed i campioni FA-Na e FA-Zn è stata valutata determinando la MIC dei farmaci e gli aloni di inibizione dei dischi di antibiotici in terreni senza e con FA-Na e FA-Zn ad una concentrazione pari a circa 1/3 della loro MIC precedentemente misurata ($MIC_{FA-Na} = 5 \text{ mg/ml}$ e $MIC_{FA-Zn} = 0.5 \text{ mg/ml}$). Non è stata osservata una significativa sinergia tra la Na-clinoptilolite ed i farmaci testati. D'altra parte, non si è nemmeno rilevato un antagonismo tra i farmaci e le forme di clinoptilolite testate.

Una significativa sinergia, invece, è stata osservata tra il campione FA-Zn e i farmaci CLA e LEV. In presenza di Zn-clinoptilolite gli aloni di inibizione dei dischi di antibiotici aumentano in modo significativo e le MIC si riducono (tabelle 28 e 29). E' da sottolineare, in particolare, che il ceppo *HP-B* in presenza di FA-Zn passa da 'non sensibile' a 'sensibile' nei confronti della claritromicina.

Tabella 28. MIC degli antibiotici misurate in terreni contenenti FA-Zn confrontate con quelle dei terreni senza zeolite.

	MIC ($\mu\text{g/ml}$) senza zeolite		MIC ($\mu\text{g/ml}$) con 0.5 mg/ml di FA-Zn	
	LEVO	CLA	LEVO	CLA
<i>HP-B</i>	>32	>256	>32	56
<i>HP-C</i>	8		1	
<i>HP-H</i>	24		8	

Tabella 29. Aloni di inibizione indotti dai dischi di antibiotici in terreni contenenti FA-Zn confrontati con quelli misurati in condizioni analoghe, ma in assenza zeolite.

	Aloni di inibizione (mm) senza zeolite		Aloni di inibizione (mm) con 0.5 mg/ml FA-Zn	
	LEVO	CLA	LEVO	CLA
<i>HP-B</i>	0	0	0	15
<i>HP-C</i>	15	14	>20	>20
<i>HP-H</i>	17	12	>20	>20

4.2.4. Discussione riassuntiva sui risultati dei test eseguiti

I risultati ottenuti dai test microbiologici effettuati sia sul ceppo di riferimento che sui ceppi clinici, confermano i presupposti del progetto di ricerca. La clinoptilolite in forma sodio (campione FA-Na) possiede una attività antibatterica nei confronti dell'*H. pylori*. Questa attività antibatterica è attribuibile alla sottrazione di ammonio dall'ambiente in cui prolifera il batterio. Questa tesi è confermata dal fatto che la stessa clinoptilolite portata in forma ammonio (campione FA-NH), non mostra alcuna attività antibatterica, neanche a concentrazioni relativamente elevate. Inoltre è stato escluso che l'attività antibatterica della Na-clinoptilolite sia dovuta al rilascio di ioni sodio piuttosto che dalla sottrazione di ammonio, dato che soluzioni di NaCl, a parità di presenza di Na⁺, non hanno mostrato capacità di inibire la crescita del batterio.

I ceppi clinici hanno mostrato una sensibilità diversa rispetto a quella del ceppo di collezione, mostrandosi meno sensibili alla Na-clinoptilolite (MIC 16 mg/ml) rispetto al ceppo di riferimento (MIC 0.5 mg/ml). D'altra parte anche le MIC degli antibiotici sono risultate più elevate nei ceppi clinici rispetto a quello di collezione.

Anche le forme argento e zinco di clinoptilolite (campioni FA-Ag e FA-Zn) hanno mostrato di possedere attività antibatterica. Contrariamente a FA-Na, i campioni FA-Zn e FA-Ag mostrano attività antibatterica simile sia per i ceppi clinici che per il ceppo di riferimento.

Nel complesso l'efficacia dell'attività antibatterica varia in funzione del ceppo batterico e del catione che viene ceduto dalla zeolite in cambio dell'ammonio. Mentre per il ceppo di riferimento la sottrazione di ammonio sembra essere il meccanismo d'azione principale per l'inibizione della crescita batterica, per i ceppi clinici testati la tipologia del catione rilasciato dalla clinoptilolite pare giocare un ruolo più importante rispetto alla sottrazione di ammonio.

Gli studi di sinergia hanno innanzitutto rivelato che non ci sono incompatibilità tra la clinoptilolite e gli antibiotici. Al contrario, gli studi effettuati con il ceppo di collezione, hanno dimostrato che c'è una sinergia tra la Na-clinoptilolite e l'amoxicillina triidrata. Nei test sui ceppi clinici, invece, è stata osservata una sinergia tra la clinoptilolite preparata nella forma zinco e gli antibiotici claritromicina e levofloxacina.

4.3. STUDI FORMULATIVI

4.3.1. Caratterizzazione dell'amoxicillina triidrata

Il diffrattogramma dell'amoxicillina triidrata utilizzata nello studio (Figura 28) mostra un pattern in accordo con i dati di letteratura (*Bird, 1994*). Le osservazioni al SEM rivelano cristalli allungati, con dimensioni variabili, che possono raggiungere i 120 μm (Figura 29).

Figura 28. Diffrattogramma di AMX-TH.

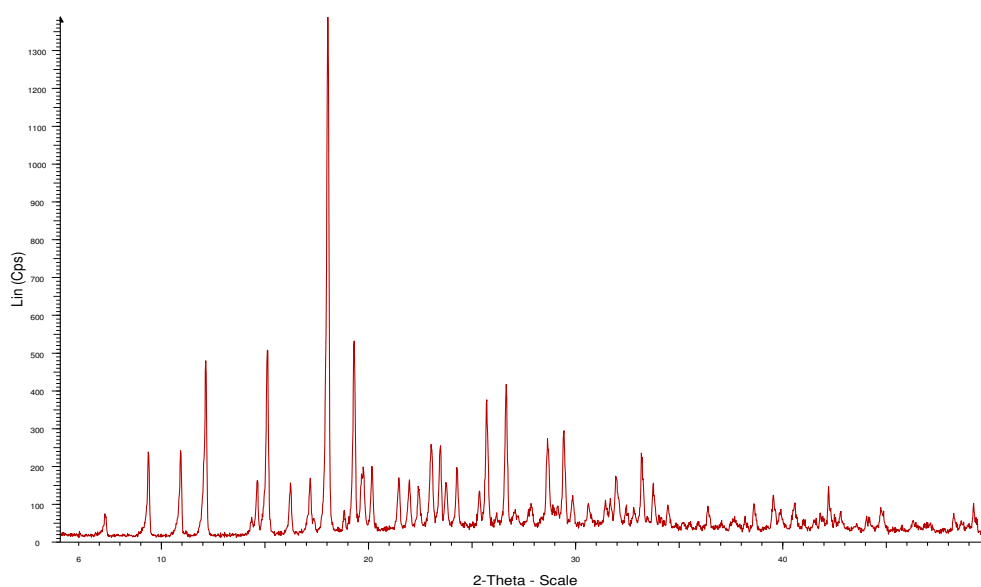
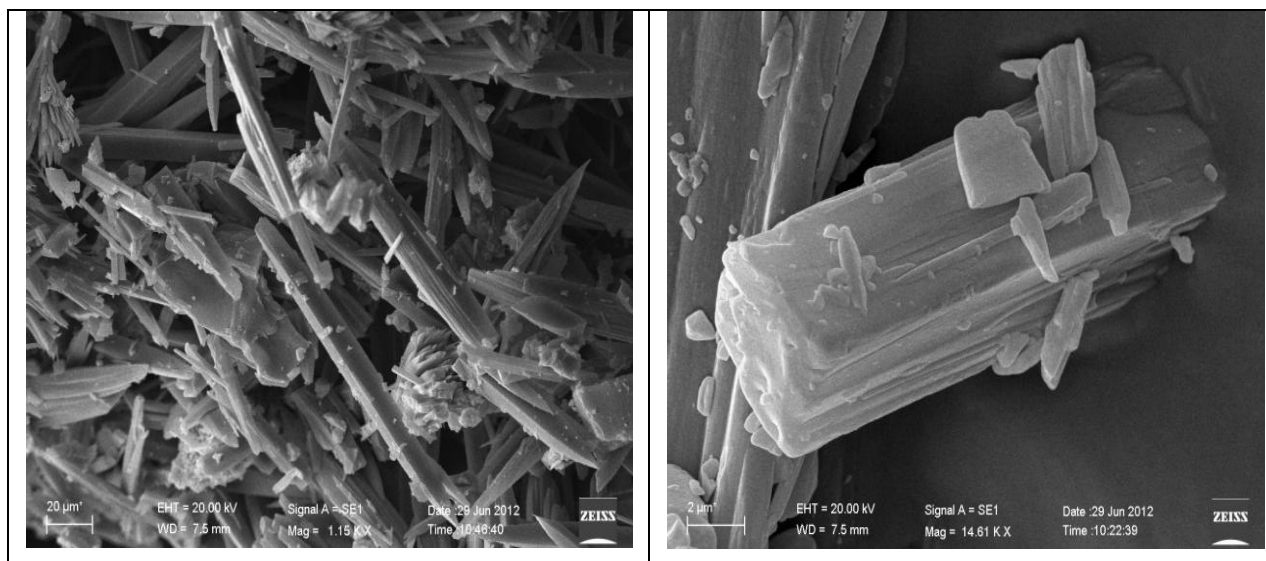


Figura 29. Immagini al SEM di AMX-TH



4.3.2. Determinazione della solubilità dell'amoxicillina triidrata in diversi solventi

La solubilità di AMX-TH è stata determinata in diversi solventi quali etanolo, acetone, tampone USP pH 1.2, tampone USP pH 6.8, acqua MilliQ, succo gastrico simulato FUI XII, tampone pH 4 (ottenuto dal tampone USP pH 1.2 per aggiunta di NH₃ sotto agitazione fino a pH 4). risultati sono riportati in tabella 30. Secondo le indicazioni sull'espressione della solubilità riportate nella FUI XII (Farmacopea Ufficiale Italiana, XII ed.), AMX-TH è un farmaco poco solubile in acqua e in etanolo e molto poco in acetone. La sua solubilità nei mezzi acquosi è fortemente legata al pH del mezzo: è elevata a pH acidi e diminuisce all'aumentare del pH.

Tabella 30. Solubilità di AMX-TH a 20 °C in diversi solventi

Solvente	Solubilità (g/L)	Indicazione FUI XII
pH 1.2	24.45	moderatamente solubile
pH 4.0	2.74	poco solubile
pH 6.8	2.91	poco solubile
Succo gastrico artificiale	22.00	moderatamente solubile
Acqua	2.41	poco solubile
Acetone	0.72	molto poco solubile
Etanolo	1.15	poco solubile

4.3.3. Studi di stabilità della AMX-TH

La stabilità di AMX-TH è stata valutata in etanolo, acetone, tampone USP pH 1.2, tampone USP pH 6.8, acqua MilliQ, succo gastrico simulato FUI XII e tampone pH 4 a tre diverse temperature (4, 20 e 38 °C). Come si evince dai grafici riportati in Figura 30, la stabilità nei solventi acquosi è fortemente legata al pH: è massima a pH 4.0 e 6.8 indipendentemente dalla temperatura per i primi 180 min, mentre nei mezzi acidi si osserva una perdita significativa: del 10% a 20 °C e del 30% a 38 °C.

Dopo 24 ore la degradazione del farmaco in soluzione acquosa diventa importante nelle varie soluzioni acquose (tabella 31), principalmente a 38 °C e in tutti i mezzi eccetto in tampone a pH 4.

Per quanto concerne i solventi organici, AMX-TH si degrada rapidamente in acetone con una perdita percentuale del 60% dopo 30 min dalla preparazione della soluzione, mentre è stabile se solubilizzata in etanolo per oltre 24 h.

Figura 30. Perdita percentuale di AMX-TH nei vari solventi acquosi testati in funzione del tempo fino a 180 minuti.

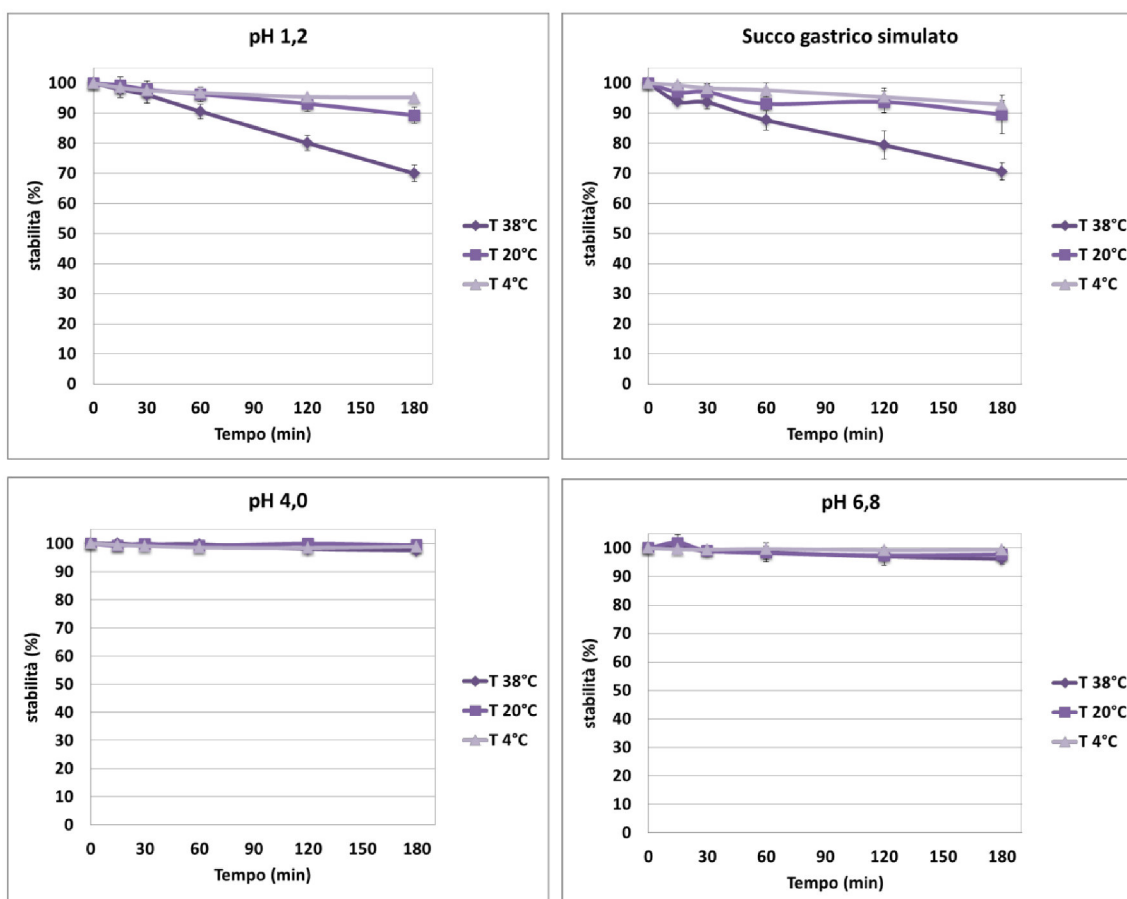


Tabella 31. Perdita percentuale di AMX-TH dopo 24 h in diversi tamponi a diverse temperature

Tempeatura (°C)	pH 1.2	Succo gastrico simulato	pH 4.0	pH 6.8
20°C	57.4 ± 0.8	45.2 ± 6.2	0.9 ± 0.2	2.0 ± 1.1
38°C	94.3 ± 0.6	92.6 ± 2.4	3.3 ± 4.9	17.3 ± 4.3
4°C	22.3 ± 9.4	33.5 ± 2.1	0.4 ± 0.5	1.7 ± 1.0

4.3.4. Caricamento di amoxicillina triidrato nella zeolite

Come anticipato nel paragrafo 3.4.7, date le dimensioni della molecola della amoxicillina triidrato e le aperture dei canali della clinoptilolite, non è possibile che l'intera molecola di antibiotico sia ospitata all'interno della zeolite. Ciò non è da considerarsi negativamente, infatti nell'applicazione in studio non si è alla ricerca di un rilascio ritardato o prolungato del farmaco.

Il metodo dell'adsorbimento non risulta essere una tecnica efficace al caricamento di amoxicillina sulla zeolite, almeno nelle condizioni utilizzate. L'adsorbimento in soluzione acquosa, tuttavia, sembra essere tempo dipendente: l'efficacia di caricamento passa, infatti, da 0.8% dopo 24 h a 2.6% alle 48 h. L'effetto del tempo non sembra altrettanto rilevante in etanolo, dove l'efficacia di caricamento passa da 4.74% dopo 24 h a 5.05 % alle 48 h.

Gli altri metodi testati hanno consentito di raggiungere il massimo del contenuto in farmaco, eccetto che nella formulazione E (56.20 %) a causa della degradazione del farmaco verificatasi in queste condizioni. Da sottolineare, inoltre, che tale formulazione è risultata composta da AMX-TH, clinoptilolite e dai sali (in particolare archerite $(K,NH_4)H_2PO_4$) che cristallizzano per evaporazione del tampone utilizzato, come verificato mediante le analisi in diffrattometria X eseguite sulle formulazioni.

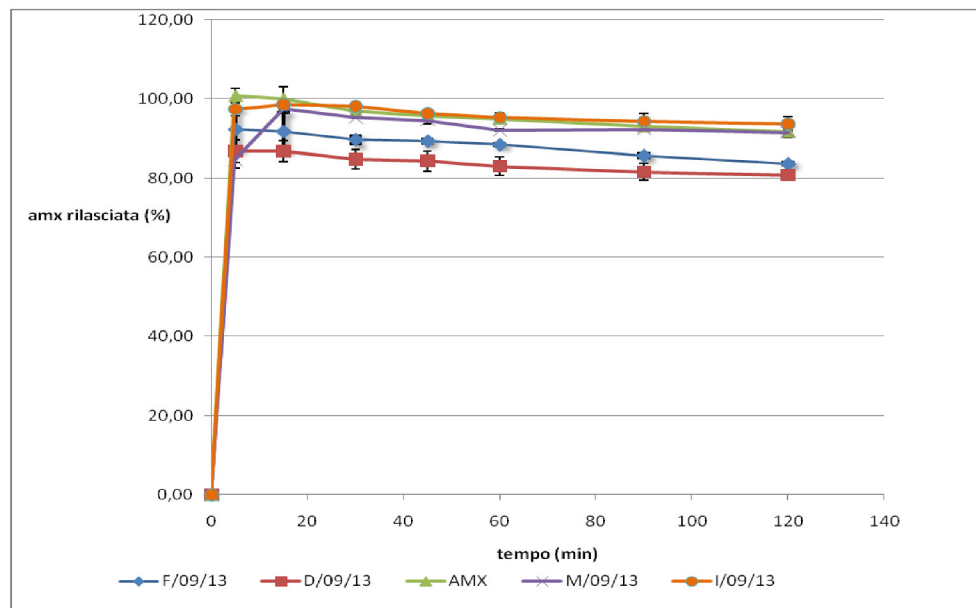
4.3.5. Test di rilascio in-vitro

Il test di rilascio in-vitro è stato effettuato impiegando quale mezzo di dissoluzione un tampone USP pH 1.2. Per confronto il test è stato condotto su AMX-TH tal quale.

La Figura 31 riporta i profili di rilascio delle formulazioni F, D, I e M ottenute rispettivamente per evaporazione del solvente, adsorbimento, sealing heating e miscela fisica. La dissoluzione di AMX-TH in tampone pH 1.2 è rapida e completa dopo i primi 5 minuti dall'inizio del test. Il profilo di rilascio di AMX-TH tal quale è simile a quello delle formulazioni. In tutti i casi si ha un picco massimo di rilascio nei primi 5-15 minuti seguito da una progressiva riduzione del farmaco dovuto probabilmente a fenomeni di degradazione.

In conclusione il profilo di rilascio del farmaco non è influenzato dalla presenza di zeolite, indipendentemente dal metodo di caricamento impiegato.

Figura 31. Profili di rilascio in-vitro delle formulazioni F, D, I e M in tampone pH 1.2 confrontati con quelli di dissoluzione di AMX nello stesso mezzo.



4.3.6. Potenziale Z

È stato misurato il Potenziale Zeta (PZ) delle formulazioni I e della miscela fisica. In presenza del farmaco il Potenziale Zeta si sposta leggermente verso valori più positivi (circa -45 mV). Per confronto è stato misurato il PZ della clinoptilolite (la stessa impiegata nelle formulazioni) in una soluzione di AMX-TH (senza che prima ci sia stata una interazione tra il farmaco e la zeolite) ottenendo un valore di PZ simile a quello delle formulazioni. Inoltre la clinoptilolite ottenuta dalle formulazioni, recuperata separandola dal farmaco mediante solubilizzazione di quest'ultimo e centrifugazione, mostra un PZ praticamente uguale a quello della zeolite di partenza. Per questi motivi è da ritenersi che la variazione del PZ nelle formulazioni potrebbe essere o una conseguenza di deboli interazioni tra farmaco in soluzione e clinoptilolite in sospensione (a prescindere dal tipo di formulazione), oppure potrebbe essere dovuta alla modifica del mezzo disperdente da parte del farmaco in soluzione, che quindi potrebbe influenzare il risultato finale (il PZ varia al variare del mezzo disperdente, e i risultati sono confrontabili se ottenuti nelle stesse condizioni).

A conferma di quanto osservato dai profili di rilascio delle formulazioni, anche con questa analisi non si osserva nessuna importante interazione tra AMX-TH e Na-clinoptilolite.

4.3.7. Studi di stabilità

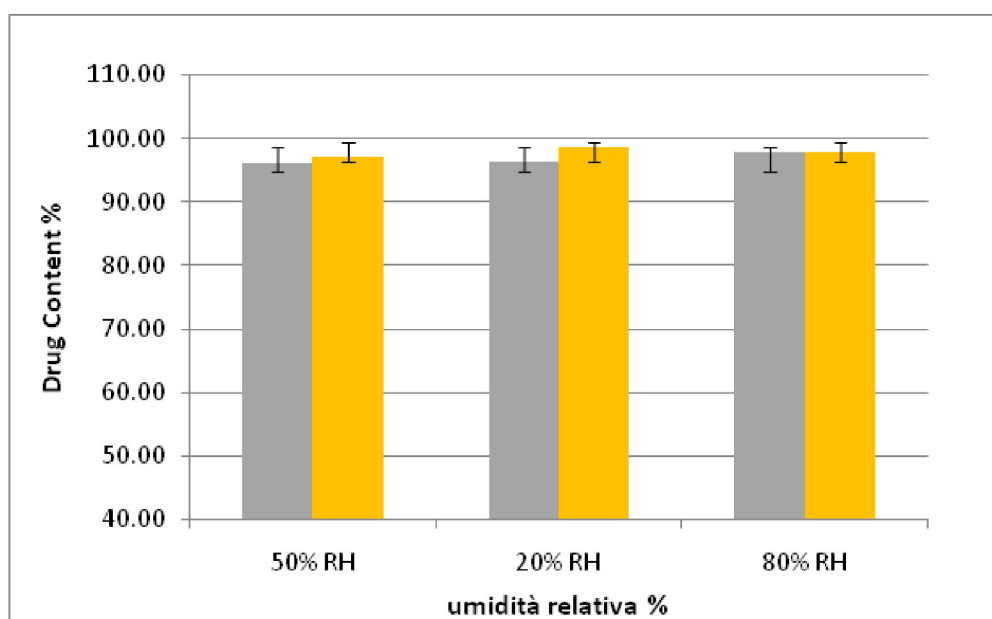
La stabilità della AMX-TH pura e della amoxicillina nella miscela fisica [$\frac{1}{3}$ AMX-TH + $\frac{2}{3}$ FA-Na] è stata valutata, a $21\pm 3^\circ\text{C}$, a diverse umidità relative (20 ± 3 , 52 ± 3 , $80\pm 5\%$) lungo un arco temporale di 18 mesi.

I diffrattogrammi (non riportati), non hanno evidenziato nessuna variazione significativa dell'intensità e/o della posizione dei picchi nell'intervallo temporale considerato.

I risultati delle analisi in HPLC, eseguite allo scadere dei 18 mesi, sono mostrati in Figura 32, ove la degradazione è il complemento a 100 del "Drug Content". Si nota che in tutti i casi (farmaco isolato e farmaco nella miscela) c'è stata una leggera degradazione dell'amoxicillina triidrata, mai superiore al 4%, e che l'umidità relativa non sembra correlata con tale degradazione. E' interessante notare che la degradazione riscontrata sperimentalmente è perfino leggermente inferiore a quella postulata (ma non misurata) in letteratura sulla base di altri studi di stabilità: 10% di degradazione dopo 38 mesi di stoccaggio a 20°C (Bird, 1994).

Si sottolinea, infine, che non si notano differenze che possano essere considerate significative fra la degradazione del farmaco tal quale e quello miscelato con la clinoptilolite.

Figura 32. Drug content della AMX-TH nel puro (giallo) e nella miscela fisica (grigio) conservate a diverse umidità relative per 18 mesi. La degradazione è il complemento a 100 del Drug content.



5. Conclusioni

Sinteticamente i risultati conseguiti sono i seguenti.

- 1) Si è ottenuto, a partire da un litotipo zeolitizzato, e mediante un procedimento che si è mostrato riproducibile, un materiale contenente ca. il 90% di Na-clinoptilolite. Tale materiale, è stato caratterizzato per quanto possibile seguendo le raccomandazioni e le procedure delle farmacopee Europea e Statunitense. Fondamentalmente il materiale realizzato è in grado di massimizzare le proprietà della zeolite contenuta e, da un punto di vista mineralogico, chimico e microbiologico, non mostra controindicazioni per l'impiego in prodotti farmaceutici per uso orale. Nello specifico, il materiale non contiene fasi minerali fibrose, ha un contenuto di quarzo $< 0.5\%$, ed un contenuto di metalli pesanti inferiore a quello stabilito nella farmacopee per argille somministrabili per via orale; inoltre la bioaccessibilità orale di elementi potenzialmente dannosi per la salute risulta essere di almeno due ordini di grandezza al di sotto dei limiti previsti dalla USP. Anche dal punto di vista della qualità microbiologica il materiale soddisfa i requisiti delle farmacopee. Pertanto il prodotto realizzato nelle sperimentazioni successive è in grado di fornire risultati che possono essere messi in relazione con le forme di clinoptilolite realizzate, e non con eventuali interferenze dovute ad agenti terzi.
- 2) I risultati ottenuti dai test microbiologici effettuati sia sul ceppo di riferimento che sui ceppi clinici, confermano i presupposti del progetto di ricerca. La clinoptilolite in forma sodio (campione FA-Na) possiede una attività antibatterica nei confronti dell'*H. pylori*. Questa attività antibatterica è attribuibile alla sottrazione di ammonio dall'ambiente in cui prolifera il batterio. Questa tesi è confermata dal fatto che la stessa clinoptilolite portata in forma ammonio (campione FA-NH₄), non mostra alcuna attività antibatterica, neanche a concentrazioni relativamente elevate. Inoltre è stato escluso che l'attività antibatterica della Na-clinoptilolite sia dovuta al rilascio di ioni sodio piuttosto che dalla sottrazione di ammonio, dato che soluzioni di NaCl, a parità di presenza di Na⁺, non hanno mostrato capacità di inibire la crescita del batterio.
- 3) I ceppi clinici hanno mostrato una sensibilità diversa rispetto a quella del ceppo di collezione, mostrandosi meno sensibili alla Na-clinoptilolite (MIC 16 mg/ml) rispetto al ceppo di riferimento (MIC 0.5 mg/ml). D'altra parte anche le MIC degli antibiotici sono risultate più elevate nei ceppi clinici rispetto a quello di collezione.

- 4) Anche le forme argento e zinco di clinoptilolite (campioni FA-Ag e FA-Zn) hanno mostrato di possedere attività antibatterica. Contrariamente a FA-Na, i campioni FA-Zn e FA-Ag mostrano attività antibatterica simile sia per i ceppi clinici che per il ceppo di riferimento.
- 5) Nel complesso l'efficacia dell'attività antibatterica varia in funzione del ceppo batterico e del catione che viene ceduto dalla zeolite in cambio dell'ammonio. Mentre per il ceppo di riferimento la sottrazione di ammonio sembra essere il meccanismo d'azione principale per l'inibizione della crescita batterica, per i ceppi clinici testati la tipologia del catione rilasciato dalla clinoptilolite pare giocare un ruolo più importante rispetto alla sottrazione di ammonio.
- 6) Gli studi di sinergia hanno innanzitutto rivelato che non ci sono incompatibilità tra la clinoptilolite e gli antibiotici. Al contrario, gli studi effettuati con il ceppo di collezione, hanno dimostrato che c'è una sinergia tra la Na-clinoptilolite e l'amoxicillina triidrata. Nei test sui ceppi clinici, invece, è stata osservata una sinergia tra la clinoptilolite preparata nella forma zinco e gli antibiotici claritromicina e levofloxacina.
- 7) Gli studi pre-formulativi dimostrano che l'amoxicillina triidrata non interagisce, nemmeno blandamente, con la zeolite, infatti non si sono osservati rilasci ritardati o prolungati dell'antibiotico.
- 8) Infine, nella formulazione realizzata per miscela fisica di clinoptilolite e amoxicillina triidrata, in 18 mesi la zeolite non ha determinato, a temperatura ambiente e per umidità relative fra 20-80%, degradazioni del farmaco diverse da quelle che il farmaco non combinato sviluppa normalmente.

Quanto sopra suggerirebbe di proseguire ulteriormente ricerche aventi per oggetto l'impiego di clinoptiloliti opportunamente preparate in formulazioni da impiegare per l'eradicazione dell'*Helicobacter pylori*.

6. Ringraziamenti

Ringrazio il mio relatore di tesi, Dott. Guido Cerri, del Dipartimento di Scienze della Natura e del Territorio dell'Università di Sassari, per il grande supporto datomi durante i tre anni di dottorato.

Ringrazio i tre correlatori per il grande contributo dato per la realizzazione del progetto di ricerca: il Dott. Antonio Brundu, (Dipartimento di Scienze della Natura e del Territorio), la Dott.ssa Giovanna Rassu e la Prof.ssa Elisabetta Gavini, entrambe del Dipartimento di Chimica e Farmacia dell'Università di Sassari.

Inoltre si ringrazia: la Dott.ssa Aleksandra Daković e il Dott. Milan Kragović dell'Institute for Technology of Nuclear and Other Mineral Raw Materials, di Belgrado (Serbia), per avermi ospitato nei loro laboratori e per il supporto ricevuto durante tutte le analisi effettuate presso il suddetto istituto; il Dott. J. Krstić dell'Istituto di Chimica, Tecnologia e Metallurgia dell'Università di Belgrado per le determinazioni in *gas adsorption*; la Dott.ssa Danina Krajišnik della Facoltà di Farmacia dell'Università di Belgrado, per le misurazioni dei Potenziali Zeta dei materiali; il Sig. Massimo Cossu, del Dipartimento di Chimica e Farmacia dell'Università di Sassari, per il supporto nella caratterizzazione dei materiali e negli studi formulativi; la Dott.ssa Claudia Juliano, del Dipartimento di Chimica e Farmacia dell'Università di Sassari, per avermi supportato negli studi microbiologici relativi al ceppo di collezione; il Dott. Trung Nam Phan, presso il "Carlo Urbani Center" - Department of Microbiology, dell'Università di Huè, in Vietnam, per avermi ospitato nei suoi laboratori e per avermi supportato durante gli studi microbiologici svolti sui ceppi clinici di *H. pylori*; la Dott.ssa Bianca Paglietti, del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Sassari, per gli utili suggerimenti dati riguardo l'esecuzione di alcuni test microbiologici; il Prof. Piero Cappuccinelli, del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Sassari, per i contatti presi riguardo la mia permanenza presso il Department of Microbiology, Hue University of Medicine and Pharmacy, in Vietnam.

Si ringrazia il Fondo Sociale Europeo - progetto "Ulisse"- per il supporto economico durante lo svolgimento delle attività di ricerca svolte in Serbia ed in Vietnam.

Questo lavoro di ricerca è inserito nell'ambito del progetto PRIN 2010MKHT9B_008, Responsabile Scientifico: Dott. Guido Cerri.

7. Bibliografia

- Abrahams PW, 2012. Involuntary soil ingestion and geophagia: A source and sink of mineral nutrients and potentially harmful elements to consumers of earth materials. *Appl. Geochem.*; 27, 954–968.
- Adamis Z, Tátrai E, Honma K, Six É, Ungváry G, 2000. In Vitro and in Vivo Tests for Determination of the Pathogenicity of Quartz, Diatomaceous Earth, Mordenite and Clinoptilolite. *Ann. Occup. Hyg.*; 44, 67-74.
- Adamis Z, Williams RB, 2005. Bentonite, kaolin, and selected clay minerals. *Environmental Health Criteria. World Health Organization Library*, vol. 231. Cataloguing-in-Publication Data, Geneva.
- Aguzzi C, Capra P, Bonferoni C, Cerezo P, Salcedo I, Sánchez R, Caramella C, Viseras C, 2010. Chitosan-silicate biocomposites to be used in modified drug release of 5-aminosalicylic acid (5-ASA). *Appl Clay Sci*; 50, 106–111.
- Aguzzi C, Cerezo P, Viseras C, Caramella C, 2007. Use of clays as drug delivery systems: possibilities and limitations. *Appl Clay Sci*; 36, 22–36.
- Aiello R, Colella C, 1996. Materiali microporosi e zeoliti. In: *Manuale dei materiali per l'ingegneria*. AIMAT, McGraw-Hill, 629-659.
- Amorim R, Vilaça N, Martinho O, Reis RM, Sardo M, Rocha J, Fonseca AM, Baltazar F, Neves IC, 2012 Zeolite Structures Loading with an Anticancer Compound As Drug Delivery Systems. *J. Phys. Chem. C*; 116 (48), 25642–25650.
- Andronikashvili T, Pagava K, Kurashvili T, Eprikashvili L, 2009. Possibility of Application of Natural Zeolites for Medicinal Purposes. *Bull. Georgian National Academy of Sciences*; 3, 158-167.
- Armbruster T, 2001. Clinoptilolite-heulandite: applications and basic research. In: Galarnau, A., Di Renzo F, Faujula F, Vedrine J (Eds.) *Zeolites and Mesoporous Materials at the Dawn of the 21st Century*. *Stud. Surf. Sci. Catal.*; 135, 13-27.
- Armbruster T, Gunter ME, 2001. Crystal structure of natural zeolites. In: *Natural Zeolites: Occurrence, Properties, Applications* (Bish, D.L., Ming, D.W., editors), *Reviews in Mineralogy & Geochemistry*, Mineralogical Society of America, 45, 18-67.
- Bardonnet PL, Faivre V, Pugh WJ, Piffaretti JC, Falson F, 2006. Gastroretentive dosage forms: Overview and special case of *Helicobacter pylori*. *J Control Release*; 111; 1 – 18.
- Bauerfeind P, Garner RM, Mobley LT, 1996. Allelic exchange mutagenesis of NixA in *Helicobacter pylori* results in reduced nickel transport and urease activity. *Infect. Immun.*; 64:2877–2880.
- Beltcheva M, Metcheva R, Popov N, Teodorova SE, Heredia-Rojas JA, Rodriguez-de la Fuente AO, Rodríguez-Flores LE, Topashka-Ancheva M, 2012. Modified Natural Clinoptilolite Detoxifies Small Mammal's Organism Loaded with Lead I. Lead Disposition and Kinetic Model for Lead Bioaccumulation. *Biol. Trace Elem. Res.*; 147, 180–188.
- Bien J, Bozko M, Malek NP, Bozko P., 2014. *Helicobacter pylori* Eradication Therapy: Advantages and Disadvantages. *Curr Pharm Des*; Vol. 20, No. 28
- Bird AE, 1994. Amoxicillin. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, 23, 1–52.
- Bish, D.L., Boak, J.M., 2001. Clinoptilolite-Heulandite Nomenclature. In: *Natural Zeolites: Occurrence, Properties, Applications* (Bish, D.L., Ming, D.W., editors), *Reviews in Mineralogy & Geochemistry*, Mineralogical Society of America, 45, 207-216.
- Bish, 2006. Parallels and Distinctions Between Clay Minerals and Zeolites. In: Bergaya, Theng, Lagaly (eds), *Handbook of Clay Science. Developments in Clay Science*, 1, 1097-1112.
- Blaser MJ, 1993. *Helicobacter pylori*: microbiology of a “slow” bacterial infection. *Trends Microbiol.*; 1, 255-259.
- Bode G, Malfertheiner P, Lehnhardt G, Nilius M, Ditschuneit H, 1993. Ultrastructural localization of urease of *Helicobacter pylori*. *Med. Microbiol. Immunol.*; 182:233–242.
- Boer JL, Mulrooney SB, Hausinger RP, 2014. Nickel-dependent metalloenzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*; 544, 142–152.

- Boles MO, Girven RJ, Gane PAC, 1978. The Structure of Amoxycillin Trihydrate and a Comparison with the Structures of Ampicillin. *Acta Cryst.*; B34, 461-466.
- Bonferoni C, Cerri G, de'Gennaro M, Juliano C, Caramella C, 2007. Zn²⁺-exchanged clinoptilolite-rich rock as active carrier for antibiotics in anti-acne topical therapy. In-vitro characterization and preliminary formulation studies. *Appl Clay Sci*; 36, 95-102.
- Braden B, 2012. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *BMJ*;344:e828.
- Brundu A, Cerri G, 2015. Thermal transformation of Cs-clinoptilolite to CsAlSi5O12. *Micropor Mesopor Mat*; 208, 44-49.
- Carrettero MI, Gomes CSF, Tateo F, 2006. Clays and Human Health. In: Bergaya F, Theng BKG., Lagaly G (eds), *Handbook of Clay Science. Developments in Clay Science*; 1, 717-741.
- Carrettero MI, Pozo M, 2009. Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical industry. Part I. Excipients and medical applications. *Appl Clay Sci*; 46; 73-80.
- Carrettero MI, Pozo M, 2010. Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical and cosmetic industries. Part II. Active ingredients. *Appl Clay Sci*; 47; 171-181.
- Cerri G, 2000. Caratterizzazione geologica, mineralogica e tecnologica dei tufi zeolitizzati della Sardegna settentrionale. PhD Thesis, University of Sassari, Italy.
- Cerri G, Brundu A, Bonferoni C, Caramella C, de'Gennaro M, 2009. Evaluation of zeolites as protease inhibitors for possible employment in the delivery of peptidic drugs. XIV Int Clay Conf, Castellaneta, Italy, 14-20. Vol II, p529.
- Cerri G, Brundu A, Bonferoni C, Caramella C, de'Gennaro M, 2010. Clinoptilolite as protease inhibitor for possible employment in the delivery of peptidic drugs. In: *Zeolite 2010, 8th Int Conf on Natural Zeolites*, Sofia, Bulgaria, 10-18, 56.
- Cerri G, Cappelletti P, Langella A, de'Gennaro M, 2001. Zeolitization of Oligo-Miocene volcanoclastic rocks from Logudoro (Northern Sardinia, Italy). *Contrib Mineral Petr*; 140, 404-421.
- Cerri G, Langella A, Pansini M, Cappelletti P, 2002. Methods of determining cation exchange capacities for clinoptilolite-rich rocks of the Logudoro region in northern Sardinia, Italy. *Clays Clay Miner*, Vol. 50, No 1, pp. 127-135.
- Cerri G., Oggiano G. (2002). Le epiclastiti zeolitizzate del Logudoro orientale: un livello guida all'interno della successione vulcano-sedimentaria della Sardegna centrosettentrionale. *Bollettino della società geologica italiana*; vol. 121, pp. 3-10.
- Cerri. G, de'Gennaro M, Bonferoni C, Caramella , 2004. Zeolites in biomedical application: Zn-exchanged clinoptilolite-rich rock as active carrier for antibiotics in anti-acne topical therapy. *Appl Clay Sci*; 27, 141-150.
- Chan FKL, Leung WK, 2000. Peptic ulcers. *Lancet*; 2002; 360: 933-41.
- Choy JH, Choi SJ., Oh JM, Park T, 2007. Clay minerals and layered double hydroxides for novel biological applications. *Appl Clay Sci*; 36, 122-132.
- Clyne M, Labigne A, Drumm B, 1995. *Helicobacter pylori* Requires an Acidic Environment to Survive in the Presence of Urea. *Infect. Immun.*; p. 1669-1673.
- Colella C, 2011. A critical reconsideration of biomedical and veterinary applications of natural zeolites. *Clay Miner*; 46, 295-309.
- Cornejo J, 1990. Las arcillas en formulaciones farmacéuticas. In: Galan E., Ortega M. (Eds.), *Conferencias de IXyXReuniones de la Sociedad Española de Arcillas*; pp. 51-68.
- Cover TL, Halter SA, Blaser MJ. 1992. Characterization of HeLa cell vacuoles induced by *Helicobacter pylori* broth culture supernatant. *Hum. Pathol.* 23:1004-1010.
- Daković A, Kragović M, Rottinghaus GE, Sekulić Ž, Milićević S, Milonjić SK, Zarić S, 2010, Influence of natural zeolitic tuff and organozeolites surface charge on sorption of ionizable fumonisin B1. *Colloids Surf., B*; 76, 272-278.
- Danilczuk M, Długopolska K, Ruman T, Pogocki D, 2008. Molecular Sieves in Medicine. *Mini Rev Med Chem*;

8, 1407-1417.

- Danz H, Gorner T, Hoffmann S, Woge O, 2009. Use of an activated zeolite as a pharmaceutical agent for reducing toxic substances. US Patent Application Publication, No. US 2009/0226492 A1.
- de Bernard M, Papini E, de Filippis V, Gottardi E, Telford J, Manetti R, Fontana A, Rappuoli R, Montecucco C, 1995. Low pH Activates the Vacuolating Toxin of *Helicobacter pylori*, Which Becomes Acid and Pepsin Resistant. *J. Biol. Chem.*; 270, 23937-23940.
- De Luca A, Iaquinto G, 2004. *Helicobacter pylori* and gastric diseases: a dangerous association. *Cancer Lett*; 213, 1–10.
- de'Gennaro M, Langella A, 1996. Italian zeolitized rocks of technological interest. *Miner Deposita*; 31, 452-472.
- Del Hoyo C, 2007. Layered double hydroxides and human health: an overview. *Appl Clay Sci*; 36, 103–121.
- Droy-Lafaix MT, Tateo F, 2006. Clays and Clay Minerals as Drugs. In: Bergaya F., Theng B.K.G, Lagaly G. (eds), *Handbook of Clay Science. Developments in Clay Science*, 1, 743-752.
- Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ, 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.*; 10(4):720-741.
- Endo H, Yoshida H, Ohmi N, Ohta K, Higuchi S, 2001. Localization of [14C] amoxicillin in rat gastric tissue when administered with lansoprazole and clarithromycin. *J Antimicrob Chemoth*; 48:923–6.
- Endo H, Yoshida H, Ohmi N, Ohta K, Higuchi S, Suga T, 2002. Localization of [14C] clarithromycin in rat gastric tissue when administered with lansoprazole and amoxicillin. *J Antimicrob Chemoth*; 50:285–8.
- Eur Ph., 2014. Bentonite. *Ph. Eur.* 8.0, 1636. European Pharmacopoeia Convention, Strasbourg, France.
- Eur Ph., 2014. Microbiological quality of non-sterile products for pharmaceutical use. *Ph. Eur.* 8.0, 559. European Pharmacopoeia Convention, Strasbourg, France.
- Eur Ph., 2014. Flowability. *Ph. Eur.* 8.0, 307. European Pharmacopoeia Convention, Strasbourg, France.
- Eyde, Holmes, 2006. Zeolites. In: Kogel J.E., Trivedi N.C., Barker J.M., Krukowski S.T. (eds), *Industrial Minerals & Rocks. SME*; 1039-1064.
- Farias T, Ruiz-Salvador AR, Rivera A, 2003. Interaction studies between drugs and a purified natural clinoptilolite. *Micropor Mesopor Mat*; 61, 117–125.
- Fedwick JP, Lapointe TK, Meddings JB, Sherman PM, Buret AG, 2005. *Helicobacter pylori* activates myosin light-chain kinase to disrupt claudin-4 and claudin-5 and increase epithelial permeability. *Infect Immun*; 73:7844–52.
- Ferdov S, Shikova E, Ivanova Z, Dimowa LT, Nikolova RP, Lin Z, Shivachev BL, 2013. A microporous titanosilicate for selective killing of HeLa cancer cells. *RSC Adv.*, 3, 8843-8848.
- Flowers JL, Lonky SA, Deitsch EJ, 2009. Clinical evidence supporting the use of an activated clinoptilolite suspension as an agent to increase urinary excretion of toxic heavy metals. *Nutr Diet Suppl*; 1, 11-18.
- Fornaseri, M., 1989. *Lezioni di Geochimica*. Veschi Ed., Milano, Italy, 334-336.
- Garcia-Basabe Y, Rodriguez-Iznaga I, de Menorval LC, Llewellyn P, Maurin G, Lewis DW, Binions R, Autie M, Ruiz-Salvador AR., 2010. Step-wise dealumination of natural clinoptilolite: Structural and physicochemical characterization. *Microporous Mesoporous Mater.*; 135, 187–196.
- Gaskell EE, Hamilton AR, 2014. Antimicrobial clay-based materials for wound care. *Future Med Chem.*; 6, 641-655.
- Gast K, 2014. Pharmaceutical compound which includes clinoptilolite. US Patent Application Publication, No. US 2014/0056804 A1, Feb. 27, 2014.
- Gomes C, Silva J, 2007. Minerals and clay minerals in medical geology. *Appl. Clay Sci.*; 36, 4-21.
- Graham DJ, Fischbach L, 2010. *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut*; 59:1143e1153.
- Grce M, Pavelic K, 2005. Antiviral properties of clinoptilolite. *Micropor Mesopor Mat*; 79, 165–169.
- Grindstaff J, Schroeder C, 2011. Heavy Metals Testing (USP<231>) Revisions: New Limits & Procedures for Elemental Impurities in Pharmaceuticals & Dietary Supplements. *Drug Development & Delivery*; 11, 67-70.

- Gulicovski JJ, Čerović LS, Milonjić SK, 2008. Point of Zero Charge and Isoelectric Point of Alumina. *Mater Manuf Process.*; 23, 615-619.
- Harvey CC, Lagaly G, 2006. Conventional applications. In: Bergaya F, Pheng BKG, Lagaly G (eds.). *Handbook of Clay Science*, Elsevier, 501-540.
- Hazell SL, Lee A, Brady L, Hennessy W, 1986. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in the colonization of the gastric epithelium. *J Infect Dis*;153:658-63.
- Hojzak I, Kolacek S, 2014. Is *Helicobacter pylori* Always a "Bad Guy"? *Curr Pharm Des.* ; 20(28):4517-20.
- IARC, 1994.. Infection with *Helicobacter pylori*. In: *Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori*. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization Lyon, France, 177- 202.
- IARC, 1997. Zeolites other than Erionite. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. International Agency for Research on Cancer Scientific Publications, Lyon, France, 68, 307-333.
- IARC, 2012. Erionite. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. International Agency for Research on Cancer Scientific Publications, Lyon, France, 100 C, 311-316.
- Intawongse M, Dean JR, 2006. In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. *Trends Anal. Chem.*; 25, 876-886.
- JP, 2011. Bentonite, *Japanese Pharmacopeia XVI*, 427-428. Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Tokyo, Japan.
- Kenjirou H, Yuichi T, Kunikazu M, Keiji Y, 2010. Salicylic Acid/g-Cyclodextrin 2:1 and 4:1 Complex Formation by Sealed-Heating Method. *Journal of pharmaceutical sciences*; vol. 99, no. 10.
- Kragović M, Daković A, Marković M, Krstić J, Gatta GD, Rotiroti N, (2013). Characterization of lead sorption by the natural and Fe(III)-modified zeolite. *Appl. Surf.*; 283, 764- 774.
- Krajišnik D, Daković A, Malenović A, Ljiljana Djekić L, Milan Kragović M, Vladimir Dobričić V, Milić J, 2013. An investigation of diclofenac sodium release from cetylpyridinium chloride-modified natural zeolite as a pharmaceutical excipient. *Microporous Mesoporous Mater.*; 167, 94-101.
- Kralj M, Pavelic K, 2003. *Medicine on a small scale*. *EMBO Rep* 2003; 4, 1008-1012.
- Labigne A, Cussac V, Courcoux P. Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J Bacteriol.*;173(6):1920-1931.
- Langella A, Pansini M, Cerri G, Cappelletti P, de'Gennaro M, 2003. Thermal behavior of natural and cation-exchanged clinoptilolite from Sardinia (Italy). *Clays Clay Miner*; 51, 625-633.
- Lansdown ABG, 2010. A Pharmacological and Toxicological Profile of Silver as an Antimicrobial Agent in Medical Devices. *Adv Pharmacol Sci.*; Volume 2010, Article ID 910686.
- Lawal OT, Igbokwe CO, Adeniyi BA, 2014. Antimicrobial activities and the Bactericidal Kinetics of *Allium ascalonicum* Linn. (Whole plant) against standard and clinical strains of *Helicobacter pylori*:Support for Ethnomedical Use. *Journal of Natural Sciences Research*; Vol.4, No.8.
- Lin Y-H, Chang C-H, Wu Y-S, Hsu Y-M, Chiou S-F, Chen Y-J, 2009. Development of pH- responsive chitosan/heparin nanoparticles for stomach-specific anti-*Helicobacter pylori* therapy. *Biomaterials*; 30;3332-3342.
- Lopes D, Nunes C, Cristina M, Martins L, Sarmento B, Reis S, 2014. Eradication of *Helicobacter pylori*: Past, present and future. *J. Control. Release*;189, 169-186.
- López-Galindo A, Viseras C, Cerezo P, 2007. Compositional, technical and safety specifications of clays to be used as pharmaceutical and cosmetic products. *Appl Clay Sci*; 36, 51-63.
- Lowe NM, Fekete K, Decsi T, 2009. Methods of assessment of zinc status in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr*; 89 (suppl):1S-12S.
- Lulf H, Bertucci A, Septiadi D, Corradini R, DeCola L, 2014. Multifunctional Inorganic Nanocontainers for DNA and Drug Delivery into Living Cells. *Chem. Eur. J.* ; 20, 10900 - 10904.
- Marshall BJ, 1988. The *Campylobacter pylori* story. *Scand. J. Gastroentero*; 23 (Suppl. 146) 58-66.
- Marshall BJ, Warren JR, 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic

- ulceration, *Lancet* (1984) 1311–1315.
- Martin-Kleiner I, Flegar-Meštrić Z, Zadro R, Breljak D, Stanović Janda S, Stojković R, Marušić M, Radačić M, Boranić M, 2001. The effect of the zeolite clinoptilolite on serum chemistry and hematopoiesis in mice. *Food Chem. Toxicol.*; 39, 717-727.
- Mascolo N, Summa V, Tateo F, 1999. Characterization of toxic elements in clays for human healing use. *Appl. Clay Sci.*; 15, 491–500.
- Mascolo N, Summa V, Tateo F, 2004. In vivo experimental data on the mobility of hazardous chemical elements from clays. *Appl. Clay Sci.*; 25, 23–28.
- Matsukura T, Tanaka H, 2000. Applicability of Zinc Complex of L-Carnosine for Medical Use. *Biochemistry*; 65 (7), 817-823.
- McGinity, O'Donnell, 1996. Pharmaceuticals. In: Ciullo, *Industrial Minerals and Their Uses*, Noyes Publications, 401-434.
- Megraud F, Lehours P, 2007. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clin. Microbiol. Rev.*; 20, 280–322.
- Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N, Levy J, Strachan D, Camm AJ, Northfield TC., 1994. Relation of *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease; *Br Heart J.*; 71(5):437-9.
- Milić J, Daković A, Krajišnik D, Rottinghaus GE, 2014. Modified Natural Zeolites—Functional Characterization and Biomedical Application. In: *Advanced Healthcare Materials* (A. Tiwari, ed.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9781118774205.ch10.
- Milonjić S K, Ruvarac A L, Šušić M V, 1975. The heat of immersion of natural magnetite in aqueous solutions *Thermochim Acta*; 11, 261-266.
- Mintova S, Jaber M, Valtchev V, 2015. Nanosized microporous crystals: emerging applications. *Chem. Soc. Rev.*; 44, 7207-7233.
- Mobley HL, Garner RM, Bauerfeind P, 1995. *Helicobacter pylori* nickel-transport gene NixA: synthesis of catalytically active urease in *Escherichia coli* independent of growth conditions. *Mol. Microbiol.*; 16:97–109.
- Montecucco C, Papinib E, de Bernarda M, Zorattia M, 1999. Molecular and cellular activities of *Helicobacter pylori* pathogenic factors. *FEBS Letters*; 452,16-21.
- Muhammad A, Sadaf H, Asghar A, Farooq A, Shaukat AS, Imran S, Aqdas Y, Sara H, Safyan A, Sajjad-ur-Rahman, 2014. Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Structural Features and In Vivo and In Vitro Therapeutic Effects against *Helicobacter pylori* Induced Gastritis. *Bioinorg Chem Appl*; Article ID 135824, 11 pages.
- Mumpton E, 2000. Natural zeolites: where have we been, where are we going? In: *Natural zeolites for the third millenium*. De Frede Ed, Napoli, Italy, 19–34.
- Oomen AG, Hack A, Minekus M, Zeijdner E, Cornelius C, Schoeters G, Verstraete W, Van De Wiele T, Wragg J, Rempelberg CJM, Sips AJAM, Van Wijnen JH, 2002. Comparison of Five In Vitro Digestion Models To Study the Bioaccessibility of Soil Contaminants. *Environ. Sci. Technol.*; 36, 3326-3334.
- Pabalan, RT; Bertetti FP, 2001. "Cation Exchange Properties of Natural Zeolites", in *Natural Zeolites: Occurrence, Properties, Applications* (Eds.: D. Bish and D. Ming). *Reviews Mineral. Geochem.*, 43, Mineralogical Society of America, Washington, D.C., p. 453.
- Palmieri, A., 2009. Bentonite. In: Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Quinn, M.E. (eds.). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6th ed., Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, London, 53-55.
- Parka Hee-Jin, Yeon Kima J, Kima J, Leeb Joon-Hee, Hahna Ji-Sook, Bock Guc M, Yoona J, 2009. Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity; *water res.*; 43, 1027 – 1032.
- Passaglia E, 2008. *Zeoliti naturali, zeolititi e loro applicazioni*. Arvan, pp. 104, ISBN-13: 978-88-87801-19-4.
- Patel P, Mendall MA, Khulusi S, Northfield TC, Strachan DP, 1994. *Helicobacter pylori* infection in childhood: risk factors and effect on growth. *BMJ*; 309(6962):1119-23.
- Pavelic K, Hadzija M, 2003. Medical Applications of Zeolites. In: Auerbach S.M., Carrado K.A., Dutta P.K.,

- (eds), Handbook of Zeolite Science & Technology. Marcel Dekker, Inc, 1143-1174.
- Pavelic K, Hadzija M, Bedrica LJ, Pavelic J, Dikic I, Katic M, Kralj M, Bosnar M, Kapitanovic S, Poljak-Blazi M, Krizanac S, Stojkovic R, Jurin M, Subotic B, Colic, 2001. Natural zeolite clinoptilolite: New adjuvant in anticancer therapy. *J Mol Med*; 78, 708–720.
- Pavelic K, Katic M, Sverko V, Marotti T, Bosnjak B, Balog T, Stojkovic R, Radacic M, Colic M, Poljak-Blazi M, 2002. Immunostimulatory effect of natural clinoptilolite as a possible mechanism of its antimetastatic ability. *J Cancer Res Clin*; 128, 37–44.
- Pei Q, Yang GP, Li ZJ, Peng XD, Fan JH, Zhao-Qian Liu ZQ, 2011. Simultaneous analysis of amoxicillin and sulbactam in human plasma by HPLC-DAD for assessment of bioequivalence. *J Chrom B*; 879, 2000-2004.
- Peiponen K.-E, Silfsten P, Pajander J, Ketolainen J, 2013. Broadening of a THz pulse as a measure of the porosity of pharmaceutical tablets. *International Journal of Pharmaceutics*; 447, 7– 11.
- Perez-Perez GI, Gower CB, Blaser MJ, 1994. Effects of cations on *Helicobacter pylori* urease activity, release, and stability. *Infect. Immun.*; 62:299–302.
- Perna F, 2007. Polimorfismo Genetico ed Infezione da *Helicobacter Pylori*. PhD Thesis, University of Bologna, Italy.
- Phadnis SH, Parlow MH, Levy M, Ilver D, Caulkins CM, Connors JB, Dunn BE, 1996. Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. *Infect. Immun.*; 64:905–912.
- Potgieter W, Samuels CS, Snyman JR, 2014. Potentiated clinoptilolite: artificially enhanced aluminosilicate reduces symptoms associated with endoscopically negative gastroesophageal reflux disease and nonsteroidal anti-inflammatory drug induced gastritis. *Clin Exp Gastroenterol*; 7, 215-220.
- Pounder RE, Ng D, 1995. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther*; 9 suppl. 2:33–9.
- Rassu G, Gavini E, Jonassen H, Zambito Y, Fogli S, Breschi MC, Giunchedi P, 2009. New chitosan derivatives for the preparation of rokitamycin loaded microspheres designed for ocular or nasal administration. *J Pharm Sci*; 98, 4852-4865.
- Ricci V, Sommi P, Fiocca R, Romano M, Solcia, E Ventura U, 1997. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin accumulates within the endosomal-vacuolar compartment of cultured gastric cells and potentiates the vacuolating activity of ammonia. *J. Pathol.*; 183, 453-459.
- Rivera A, Farías T, 2005. Clinoptilolite–surfactant composites as drug support: A new potential application. *Microporous Mesoporous Mater.*; 80, 337–346.
- Rivera-Garza M, Olguin MT, García -Sosa I, Alcantara D, Rodriguez-Fuentes G, 2000. Silver supported on natural Mexican zeolite as an antibacterial material. *Micropor. Mesopor. Mater.*; 39, 431.
- Rives V, del Arco M, Martín C, 2014. Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release: A review. *Appl Clay Sci*; 88–89, 239–269.
- Rodríguez -Fuentes G, Barrios MA, Iraizoz A, Perdomo I, Cedré B, 1997. Enterex: anti-diarrheic drug based on purified natural clinoptilolite. *Zeolites*, 19, 441–448.
- Rodríguez -Fuentes G, Rivera Denis A, Barrios Álvarez MA, Iraizoz Colarte A, 2006. Antacid drug based on purified natural clinoptilolite. *Microporous Mesoporous Mater.*; 94, 200–207.
- Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th ed., Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, London, 53-55.
- Ruby, M.V., Schoof, R., Brattin, W., Goldade, M., Post, G., Harnois, M., Mosby, D.E., Casteel, W., Berti, W., Carpenter, M., Edwards, D., Cragin, D., Chappell, W., 1999. Advances in Evaluating the Oral Bioavailability of Inorganics in Soil for Use in Human Health Risk Assessment. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 3697-3705.
- Saengmee-Anupharb S, Srihirin T, Thaweboon B, Thaweboon S, Amornsakchai T, Dechkunakorn S, Suddhasthira T, 2013. Antimicrobial effects of silver zeolite, silver zirconium phosphate silicate and silver zirconium phosphate against oral microorganisms. *Asian Pac J Trop Biomed.*; 3(1): 47-52.

- Salcedo I, Aguzzi C, Sandri G, Bonferoni MC, Mori M, Cerezo P, Sánchez R, Viseras C, Caramella C, 2012. In vitro biocompatibility and mucoadhesion of montmorillonite chitosan nanocomposite: A new drug delivery. *Appl Clay Sci*; 55, 131–137.
- Selvam T, Schwieger W, Dathe W, 2014. Natural Cuban zeolites for medical use and their histamine binding capacity. *Clay Miner*; 49, 501–512.
- Semmens MJ, Seyfarth M, 1978. The selectivity of clinoptilolite for certain heavy metals. In: *Natural Zeolites: Occurrence, Properties, Use* (Sand, L.B., Mumpton F.A., eds.), Pergamon Press, New York, 517-526.
- Shiota S, Yamaoka Y, 2014. Strategy for the Treatment of Helicobacter pylori Infection. *Curr Pharm Des*; 20, 4489-4500.
- Singh SK, Chidrawar VR, Ushir YV, Vadalía KR, Sheth NR, Singh S, 2010. Pharmaceutical characterization of amoxicillin trihydrate as mucoadhesive microspheres in management of h. pylori. *International Journal of PharmTech Research*, Vol.2, No.1, pp 348-358.
- Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, 2015. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Lett.*; 7(3):219–242.
- Smoot DT, Mobley HL, Chippendale GR, Lewison JF, Resau JH, 1990. Helicobacter pylori urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect. Immun.*; 58:1992–1994.
- Sternik D, Majdan M, Deryło-Marczewska A, Zukocinski G, Gładysz-Płaska A, Gun'ko VM, Mikhalovsky SV, 2011. Influence of Basic Red 1 dye adsorption on thermal stability of Na-clinoptilolite and Na-bentonite. *J Therm Anal Calorim*; 103, 607–615.
- Stewart DJ, Ackroyd R, 2011. Peptic ulcers and their complications. *Surgery*; 29, 568-574.
- Stylianou MA, 2012. Natural zeolites in medicine. In: *Inglezakis V.J. and Zorpas A.A. (eds.). Handbook of Natural Zeolites*, Bentham Science, 317-334.
- Tanimoto T, Nakajima K, 1996. Manufacture of antimicrobial zeolites. *Zeolites*; 16 (1), 82.
- Tateo, F., Summa, V., Bonelli, C.G., Bentivenga G., 2001. Mineralogy and geochemistry of herbalist's clays for internal use: simulation of the digestive process. *Applied Clay Science*, 20, 97–109.
- Titinchi SJJ, Singh MP, Abbo HS, Green IR, 2014. Advanced Materials for Biomedical Application and Drug Delivery. *Adv Healthc Mater*; 49–86.
- Topashka-Ancheva M, Beltcheva M, Metcheva R, Heredia Rojas JA, Rodriguez-De la Fuente AO, Gerasimova T, Rodríguez-Flores LE, Teodorova SE, 2012. Modified Natural Clinoptilolite Detoxifies Small Mammal's Organism Loaded with Lead II: Genetic, Cell, and Physiological Effects. *Biol. Trace Elem. Res.*; 147, 206–216.
- U.S. Environmental Protection Agency, 2015. Integrated Risk Information System (IRIS) database. <http://cfpub.epa.gov/ncea/iris/index.cfm?fuseaction=iris.showSubstanceList>.
- US Pharmacopoeia, 2009. Bentonite. USP 32-NF27, 1170. The US Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD.
- US Pharmacopoeia, 2009. Purified bentonite. USP 32-NF27, 1171. The US Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD.
- US Pharmacopoeia, 2013. USP<233> Elemental Impurities – Procedures. 1-3. The US Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD.
- US Pharmacopoeia, 2013. USP<232> Elemental Impurities – Limits. 1-3. The US Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD.
- US Pharmacopoeia, 2015. Frequently Asked Questions on the Implementation of USP General Chapters <232> Elemental Impurities—Limits, <233> Elemental Impurities—Procedures, and <2232> Elemental Contaminants in Dietary Supplements. Version 5: March 27, 2015. The US Pharmacopoeial Convention.
- Velazquez M, Feirtag JM, 1999. Helicobacter pylori: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods and water. *Int J Food Microbiol*; 53, 95 –104.
- Vilaça N, Morais-Santos F, Machado AF, Sirkecioğlu A, Pereira MFR, Sardo M, Rocha J, Parpot P, Fonseca

- AM, Baltazar F, Neves IC, 2015. Micro- and Mesoporous Structures as Drug Delivery Carriers for Salicylic Acid. *J. Phys. Chem. C*; 119 (7), 3589–3595.
- Virta R, 2015. Zeolites. USGS 2010 Minerals Yearbook.
- Viseras C, Cerezo P, Sanchez R, Salcedo I, Aguzzi C, 2010. Current challenges in clay minerals for drug delivery. *Appl Clay Sci*; 48, 291–295.
- Vujaković AD, Tomašević-Čanović MR., Daković AS., Dondur VT, 2000. The adsorption of sulphate, hydrogenchromate and dihydrogenphosphate anions on surfactant-modified clinoptilolite. *Appl. Clay Sci.*; 17, 265–277.
- Webster JA, 1997. Assessment of amoxicillin suppositories. School of Pharmaceutical Sciences, Rhodes University, Grahamstown.
- Williams LB, Haydel SE, Ferrell RE, 2009. Bentonite, Band-aids, and Borborygmi. *Elements*, 5, 99-104.
- Williams LB, Hillier S, 2014. Kaolins and Health: From First Grade to First Aid. *Elements*, 10, 207-211.
- Winston, P.W., Bates, D.H., 1960. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology*, 41, (1), 232-237.
- Wise WS, Nokleberg WJ, Kokinos M, 1969. Clinoptilolite and ferrierite from Agoura, California. *Amer. Mineral.*; 54, 887-895.
- Yaneva ZL, Staleva MS, Georgieva NV, 2015. Study on the host-guest interactions during caffeine encapsulation into zeolite. *European Journal of Chemistry*; 6 (2), 169-173.
- Zhong-Lu You, Yao Lu, Na Zhang, Bo-Wen Ding, Hui Sun, Peng Hou, Che Wang, 2011. Preparation and structural characterization of hetero-dinuclear Schiff base copper(II)–zinc(II) complexes and their inhibition studies on *Helicobacter pylori* urease. *Polyhedron*; Volume 30, Issue 13, 2186–2194.