

## AMILASI IN SISTEMI MICROPARTICELLARI: SIMULAZIONE *IN VITRO* DEL TRANSITO NEL TRATTO GASTROENTERICO

**Scocca S.<sup>1</sup>, Pace M.<sup>1</sup>, Torre M.L.<sup>2</sup>, Faustini M.<sup>1</sup>, Riccardi A.<sup>1</sup>,  
Russo V.<sup>1</sup>, Munari E.<sup>1</sup>, Conte U.<sup>2</sup>, Maffeo G.<sup>1</sup>, Vigo D.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 10, Milano.*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Chimica Farmaceutica, Facoltà di Farmacia, Università degli Studi di Pavia, Via Taramelli 12, Pavia.*

### Summary

The damaging effect of gastric acidic medium and pepsin proteolytic activity induce structural and functional alterations, often irreversible, on the oral administered enzymes. In our research, alginate microparticles containing  $\alpha$ -amylase, an enteric polymer and a lyoprotectant were prepared with extrusion or spray method and freeze-dried. The loading process of this protein into the microparticles and freeze drying process maintain until 90% of enzyme activity. To verify the stability of encapsulated enzyme in acidic medium and the enzymatic activity in enteric environment, a dissolution test was performed. The enzymatic activity in the enteric medium was 20% and 30% for  $\alpha$ -amylase in extruded and sprayed systems, respectively. These microparticle systems offer promising applications in human and veterinary medicine and gastroenterology as well as in human and animal nutrition.

**Parole chiave:** enzimi, amilasi, rilascio controllato.

### Introduzione

La somministrazione orale di sostanze proteiche nelle specie monogastriche presenta notevoli limitazioni poiché la loro integrità strutturale e funzionale, e quindi l'attività biologica, viene seriamente compromessa dall'acido cloridrico e dalla pepsina a livello gastrico (1). L'ambiente acido e proteolitico gastrico induce, infatti, degradazione degli enzimi somministrati con riduzione dell'attività a valori anche inferiori al 1-2% (2,3). La possibilità di attraversare lo stomaco evitando la denaturazione renderebbe interessante e vantaggiosa la somministrazione di enzimi *per os* (4). Obiettivo della ricerca è, pertanto, quello di sviluppare e valutare sistemi microparticellari gastroresistenti per il rilascio controllato di enzimi destinati alla somministrazione orale nelle specie monogastriche. Tali sistemi offrono interessanti potenzialità applicative nel campo della zootecnia, della medicina (gastroenterologia) e della nutrizione. In particolare, la somministrazione orale di enzimi pancreatici microincapsulati ad animali in fase peri-svezzamento è prevedibile possa non solo migliorare l'efficienza dietetica ed accelerare lo sviluppo, ma anche prevenire patologie enteriche fortemente debilitanti. Nel presente lavoro è stata scelta  $\alpha$ -amilasi per le sue potenzialità applicative nella pratica zootecnica, nella terapia di patologie del tratto gastroenterico ed in alimentazione. L'enzima impiegato è stato immobilizzato in microsferi liofilizzate e l'efficacia della formulazione a rilascio controllato pH dipendente è stata verificata *in vitro* mediante simulazione del transito attraverso il tratto gastroenterico. Ciò che si intende ottenere è un sistema che giunto a livello gastrico sia in grado di garantire un buon livello di gastroprotezione e che, in seguito, a livello enterico, dia luogo a dissoluzione con liberazione dell'enzima veicolato in modo che possa svolgere il suo effetto biologico.

### Materiali e metodi

Per la preparazione delle microsfele, oltre all'enzima ( $\alpha$ -amilasi, SIGMA Chemical Co), sono stati utilizzati diversi materiali: alginato di sodio (SIGMA Chemical Co) come carrier per la sua capacità di formare un reticolo tridimensionale compatto, polimetacrilato, polimero gastroresistente biodegradabile con solubilità pH dipendente (Röhm Pharma; GmbH, Darmstadt, D), insolubile in acido, ma solubile in soluzioni a pH neutro alcalino, e il lattosio (Carlo Erba, Milano, Italia) come lioprotettore (5). Per l'allestimento delle microsfele una soluzione contenente enzima (0.3% p/v), alginato di sodio (2.5% p/v), polimetacrilato (5% p/v) e lattosio (2.25% p/v) è stata estrusa attraverso aghi (25G) oppure nebulizzata in una soluzione fisiologica addizionata di cloruro di calcio ipersaturato. I sistemi ottenuti con le due metodiche, lavati con fisiologica, sono stati liofilizzati. La composizione percentuale delle microsfele è riportata in Tabella 1.

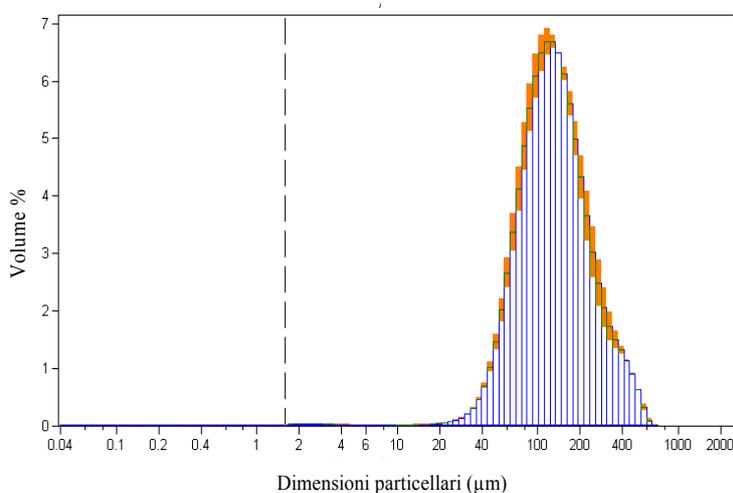
Enzima	3.0 %	Polimetacrilato	49.9 %
Alginato di calcio	24.8 %	Lattosio	22.3 %

**Tabella 1.** Composizione percentuale delle microsfele liofilizzate.

Dei preparati liofilizzati ottenuti per nebulizzazione è stata valutata la distribuzione granulometrica mediante granulometro *laser scattering*. Di entrambe le preparazioni è stata determinata l'attività enzimatica dopo un test di simulazione *in vitro* del transito attraverso l'apparato gastroenterico (test di dissoluzione *in vitro* secondo Farmacopea Ufficiale). In particolare le microsfele sono state sospese in fluido gastrico artificiale a pH 1.2 per 2 h a 38°C; dopo tale intervallo di tempo sono state separate per filtrazione e risospese in fluido intestinale artificiale a pH 7.5±0.1 per 30' a 38°C. In ambiente intestinale artificiale le sfere vanno incontro a dissoluzione completa liberando l'enzima. L'attività enzimatica è stata determinata per via spettrofotometrica ad una lunghezza d'onda di 405 nm secondo la metodica di Bergmeyer (6).

## Risultati

L'analisi granulometrica delle microsfele ottenute mediante nebulizzazione ha evidenziato una distribuzione unimodale, quindi l'esistenza di un'unica popolazione di particelle il cui 90° percentile è inferiore a 280  $\mu\text{m}$ , i valori di diametro medio sono di 153±76  $\mu\text{m}$  (Figura 1). Le sfere ottenute per estrusione avevano invece un diametro medio di ca. 3-4 mm e 1.5-2 mm, rispettivamente fresche e liofilizzate.



**Figura 1.** Distribuzione granulometrica delle particelle liofilizzate

ottenute per nebulizzazione.

Per quanto riguarda l'attività enzimatica i risultati sono riassunti in Tabella 2.

	Attività (U.I./mg di enzima)	
	Pre-dissoluzione	Post-dissoluzione
<b><math>\alpha</math>-amilasi libera</b>	1.9±0.04	0±0.0
<b><math>\alpha</math>-amilasi sfere estruse</b>	1.75±0.02	0.35±0.03 <sup>a</sup>
<b><math>\alpha</math>-amilasi microsfele nebulizzate</b>	1.7±0.05	0.5±0.01 <sup>b</sup>

**Tabella 2.** Attività di  $\alpha$ -amilasi libera o microincapsulata prima e dopo il test di dissoluzione (media±ds, n=6) (a,b P<0.05).

Prima del test di dissoluzione nei sistemi gastroprotetti viene mantenuto circa il 90% dell'attività enzimatica iniziale con entrambe le metodiche utilizzate. Dopo il test di dissoluzione l'attività residua è risultata essere pari a ca. 20% e 30% di quella iniziale, rispettivamente nelle preparazioni ottenute per estrusione e in quelle ottenute per nebulizzazione. La differenza in attività residua tra i due metodi utilizzati risulta essere statisticamente significativa (T test, P<0.05). L'enzima libero dopo la permanenza in fluido gastrico artificiale perdeva completamente la propria attività.

### Discussione

Le metodiche hanno permesso di veicolare  $\alpha$ -amilasi in sistemi microparticellari a rilascio controllato per la vettorizzazione e il direzionamento in sede intestinale, senza l'impiego, durante le fasi di preparazione, né di temperature elevate né di solventi organici, tra le principali cause di denaturazione proteica. Risultati migliori si sono osservati con il sistema di nebulizzazione. Il processo di caricamento degli enzimi nelle microsfele e la loro liofilizzazione non hanno compromesso l'attività enzimatica che, effettivamente, viene mantenuta pressoché inalterata, fino al 90%. L'alginato di sodio e il secondo polimero anionico a solubilità pH dipendente hanno garantito la protezione nei confronti dell'ambiente acido gastrico simulato. Le dimensioni particellari delle preparazioni ottenute per nebulizzazione sono tali da rendere le polveri scorrevoli e particolarmente versatili: possono, pertanto, essere facilmente addizionate ad alimenti liquidi, solidi e semisolidi. In questi sistemi microparticellari si ha in effetti una parziale riduzione di attività enzimatica, ma il buon grado di attività residua può essere sfruttato a scopo terapeutico/nutrizionale nel settore veterinario dei monogastrici e dei poligastrici non ruminanti.

### Conclusioni

Le indicazioni derivate dalla fase sperimentale condotta *in vitro* evidenziano un'efficace protezione in ambiente acido gastrico e un rapido rilascio della proteina enzimatica con buona attività biologica in ambiente enterico. Questi sistemi di vettorizzazione possono pertanto essere impiegati nel settore della gastroenterologia e della nutrizione nelle specie monogastriche per migliorare l'efficienza digestiva e l'assorbimento di principi nutritivi ed indurre, pertanto, un miglioramento delle performance di crescita e dello stato sanitario dell'animale.

### **Bibliografia**

- 1) Wang, W. (1999) *Int. J. Pharm.*, 185, 129-188.
- 2) Sinha, V.R.; Trehan, A. (2003) *J. Control. Release*, 90, 261-280.
- 3) Kompella, U.B.; Lee, V.H.L. (2001) *Adv. Drug Deliver Rev.*, 46, 211-245.
- 4) Orive, G. et al. (2003) *Cur. Opin. Biotech.*, 14, 659-664.
- 5) Vigo, D. et al. (22/06/2004) Brevetto Italiano MI 2004A001255
- 6) Bergmeyer, H.U. (1983) in “*Methods of Enzymatic Analysis*”, 3<sup>rd</sup> Ed., 4, 157-161, Verlag Chemie.

### **Ringraziamenti**

Questo lavoro è stato finanziato dalle Università di Pavia e Milano (FAR e FIRST).