



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE FARMACEUTICHE

CICLO XXII

COORDINATORE Prof. Manfredini

***INCAPSULAZIONE DI PRINCIPI ATTIVI
IN MICROPARTICELLE LIPIDICHE
PER SOMMINISTRAZIONE TOPICA ED
INALATORIA***

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/09

Dottorando

Dott. Mezzena Matteo

Tutore

Prof. Scalia Santo

Anni 2007/2009

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	5
1.1. VEICOLAZIONE DEI FARMACI.....	5
1.2. MICROPARTICELLE LIPIDICHE (ML).....	7
1.2.1. Tecniche di preparazione.....	8
1.2.1.1. Fusione a caldo.....	10
1.2.1.2. "Spray congealing".....	11
1.2.2. Caratteristiche ed applicazioni.....	13
1.3. SOMMINISTRAZIONE TOPICA.....	16
1.3.1. Anatomia e fisiologia della cute.....	16
1.3.2. Interazione della cute con i raggi solari.....	19
1.3.3. Filtri solari.....	26
1.3.4. Assorbimento transdermico.....	32
1.4. SOMMINISTRAZIONE POLMONARE.....	35
1.4.1. Anatomia e fisiologia del tratto respiratorio.....	36
1.4.2. Deposito polmonare.....	40
1.4.2.1. Parametri della ventilazione.....	42
1.4.2.2. Morfologia del tratto respiratorio.....	42
1.4.2.3. Caratteristiche dell'aerosol.....	43
1.4.3. "Delivery device".....	46
1.4.3.1. Nebulizzatori.....	47
1.4.3.2. Inalatori pressurizzati a dose controllata (MDI).....	48
1.4.3.3. Inalatori a polvere secca (DPI).....	48
1.4.3.4. Caratteristiche delle formulazioni per DPI.....	50
1.4.4. Terapie asmatiche.....	51
1.4.5. Corticosteroidi.....	52

2. SCOPO DELLA TESI.....	55
3. PARTE SPERIMENTALE.....	57
3.1. MATERIALI E METODI.....	57
3.1.1. Materiali.....	57
3.1.2. Preparazione microparticelle lipidiche.....	58
3.1.2.1. Tecnica della fusione a caldo.....	58
3.1.2.2. “Spray congealing”.....	59
3.1.2.3. “Spray Dried”.....	62
3.1.3. Cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC).....	63
3.1.4. Efficienza di incapsulazione.....	63
3.1.5. Caratterizzazione delle Microparticelle.....	64
3.1.6. Diffrattometria ai raggi X.....	64
3.1.7. Calorimetria a scansione differenziale.....	65
3.1.8. Prove di rilascio in vitro.....	65
3.1.9. Studi di diffusione/dissoluzione in vitro.....	65
3.1.10. Preparazione emulsioni.....	68
3.1.11. Studi di assorbimento transdermico in vitro.....	69
3.1.12. Studi di assorbimento transdermico in vivo.....	70
3.1.13. SPF in vitro.....	71
3.1.14. Prove di fotostabilità.....	72
3.1.15. Deposito polmonare in vitro.....	72
3.1.16. Analisi statistiche.....	74
4. RISULTATI.....	75
4.1. SOMMINISTRAZIONE TOPICA:	
FILTRI SOLARI.....	75
4.1.1. Influenza delle ML nella penetrazione cutanea del 4-MBC.....	75
4.1.1.1. Preparazione e caratterizzazione delle ML.....	76
4.1.1.2. Studi di penetrazione in-vitro.....	80

4.1.1.3. Studi di penetrazione in-vivo.....	81
4.1.2. Influenza delle liposfere sulla penetrazione cutanea di BMDBM....	84
4.1.2.1. Preparazione e caratterizzazione delle liposfere.....	85
4.1.2.2. Studi di penetrazione in-vivo.....	86
4.1.3. Influenza di un fotostabilizzatore associato al BMDBM in ML.....	88
4.1.3.1. Preparazione e caratterizzazione delle ML.....	88
4.1.3.2. Studi di fotodegradazione.....	91
4.1.4. BMDBM in ML associato all'Octocrilene.....	93
4.1.4.1. Preparazione e caratterizzazione delle ML.....	95
4.1.4.2. Studi di fotodegradazione.....	98
4.1.4.3. Determinazione del fattore protettivo solare in-vitro.....	100
4.1.5. Valutazione della tecnica Spray-Congeealing nella preparazione di ML ad alto contenuto di BMDBM.....	101
4.1.5.1. Preparazione delle ML.....	101
4.1.5.2. Caratterizzazione delle ML.....	103
4.1.5.3. Studi di rilascio in-vitro.....	106
4.1.5.4. Studi di fotodegradazione.....	108
4.2. SOMMINISTRAZIONE INALATORIA DI FARMACI ASMATICI.....	111
4.2.1. Microparticelle lipidiche di Budesonide a rilascio controllato per la terapia inalatoria.....	112
4.2.1.1. Preparazione e caratterizzazione delle ML.....	113
4.2.1.2. Studi di diffusione/dissoluzione in-vitro.....	121
4.2.1.3. Performance del deposito polmonare in-vitro.....	124
5. CONCLUSIONI.....	127
6. BIBLIOGRAFIA.....	129
7. ABBREVIAZIONI.....	147

1. INTRODUZIONE

1.1. VEICOLAZIONE DEI FARMACI

Negli ultimi anni il campo del *“drug delivery”* sta suscitando sempre più interesse grazie alla capacità di veicolare, e quindi direzionare i farmaci in specifici compartimenti del corpo o ancora meglio su specifici target, ottenendo una riduzione degli effetti collaterali ed un abbassamento della dose terapeutica [1]. L'ampia versatilità che offrono questi sistemi hanno portato la comunità scientifica a studiare e ricercare nuove terapie. Questi sistemi permettono la protezione dei principi attivi andando a modificarne il profilo di rilascio, l'assorbimento, la distribuzione e l'eliminazione, riuscendo ad aumentare l'efficacia e la sicurezza, che si traduce in un miglioramento della *“compliance”* del paziente. La somministrazione di medicinali tramite sistemi di rilascio del farmaco permette di ottenere vantaggi rispetto alle terapie farmacologiche convenzionali. L'intero quantitativo di farmaco necessario per un certo periodo viene somministrato in una volta e viene rilasciato in modo controllato, con il vantaggio ulteriore di indirizzare il rilascio del farmaco solamente in una zona sito-specifica evitando il contatto potenzialmente nocivo tra il farmaco ed organi non interessati. Alcune matrici rimanendo intatte controllano la velocità di rilascio del principio attivo che avviene per diffusione; in altri casi oltre al meccanismo diffusivo il rilascio avviene per contemporanea disgregazione della matrice. Variando la composizione della matrice è possibile modificare anche la cinetica di rilascio adattandola alle differenti esigenze.

Le innovazioni tecnologiche in esame vengono realizzate principalmente per somministrazione non invasiva orale (buccale), topica (pelle), trans-mucosale (nasale, sublinguale, vaginale, oculare e rettale) ed inalatoria.

I principali sistemi di *“drug delivery”* sono i liposomi, le micelle, le ciclodestrine e le

nano- e micro- particelle polimeriche e lipidiche.

Sin dagli anni '70 sono stati utilizzati, in forma sperimentale, dei sistemi colloidali cavi formati da singoli o doppi strati lipidici, detti liposomi, come veicoli di farmaci e la comprensione del loro comportamento in-vivo ha permesso di realizzare studi più mirati sul trattamento specifico di molte patologie.

L'interesse dei liposomi è relativo alla loro membrana, costituita da colesterolo e fosfolipidi, la cui struttura, composizione e proporzione sono simili alla membrana cellulare. I fosfolipidi hanno una coda idrofobica ed una testa idrofila le quali, dissolvendosi in acqua, si riorganizzano in modo tale che le code idrofobiche si attraggono tra loro, mentre le teste idrofile si dispongono a contatto con l'esterno e con l'ambiente acquoso interno. In questo modo, si formano dei bilayers fosfolipidici all'interno dei quali è possibile incapsulare farmaci di natura chimico-fisica molto diversa. In particolare, i composti lipofili si dispongono all'interno dell'ambiente idrofobico formato dal contatto tra le code dei fosfolipidi, mentre i principi attivi a carattere idrofilo si troveranno nell'ambiente acquoso interno delimitato dalle teste polari dei fosfolipidi. Per questo motivo, i liposomi diventano dei carriers ideali per molti tipi di farmaci, proteine biologicamente attive, antigeni e radioisotopi [2-4].

Un'evoluzione dei liposomi, dove i fosfolipidi di membrana sono sostituiti da lipidi anfifilici non ionici di sintesi, sono i niosomi o "*non ionic liposomes*". Tuttavia i liposomi, sebbene siano biocompatibili e biodegradabili, presentano un'elevata instabilità, bassa efficienza di incapsulazione e sono poco adatti alla produzione su larga scala. Le micro- e le nano- particelle polimeriche sebbene siano caratterizzate da una maggiore stabilità e capacità d'incorporazione, danno spesso problemi di biocompatibilità a causa della presenza di polimeri sintetici.

Le nano- e micro- particelle lipidiche sono state introdotte agli inizi degli anni '90, ma solo negli ultimi anni hanno attratto crescente attenzione in quanto vengono considerate un sistema di veicolazione innovativo che permette di superare gli svantaggi di carriers quali emulsioni, liposomi, micro e nanoparticelle polimeriche.

Le microparticelle lipidiche (ML) sono sistemi a matrice, formate da un nucleo solido lipidico stabilizzato in superficie da uno strato monomolecolare di tensioattivi. Rispetto alle emulsioni, hanno il vantaggio di un controllo del rilascio della sostanza incapsulata più efficace, a causa della ridotta diffusione attraverso la matrice solida. Le ML essendo costituite da lipidi naturali hanno in comune con i liposomi il vantaggio di essere biocompatibili e di possedere un profilo tossicologico estremamente favorevole. Al contrario dei liposomi, sono però stabili e possono essere prodotte su larga scala con procedure semplici e con costi contenuti.

1.2. MICROPARTICELLE LIPIDICHE (ML)

La matrice solida delle ML assicura oltre alla modulazione del rilascio, un'efficace azione protettiva nei confronti degli attivi incorporati. Le materie prime utilizzate per la preparazione delle microparticelle lipidiche sono eccipienti già ammessi nelle formulazioni cosmetiche e/o farmaceutiche e questo ne facilita l'introduzione nel mercato. Le ML sono state proposte come carrier di farmaci per vie di somministrazione diverse quali la topica, la parenterale e la via orale [5-7].

Nella somministrazione polmonare gli studi si sono concentrati nel campo delle nanoparticelle in quanto le dimensioni richieste per arrivare al target alveolare sono inferiori. Nonostante questo limite, recentemente sono stati effettuati studi che hanno dimostrato la possibilità di ottenere microparticelle con un range dimensionale idoneo anche per la via inalatoria [8-9].

Nel settore topico, sebbene le nanoparticelle lipidiche siano state studiate in maniera più dettagliata, le microparticelle lipidiche hanno le dimensioni ottimali a prevenire la penetrazione cutanea e sono quindi più adatte per la veicolazione di sostanze quali i filtri solari che espletano la loro funzione negli strati più esterni della pelle. Inoltre, sistemi di questo tipo, oltre ad avere un'elevata capacità di incapsulazione di

sostanze lipofile quali i filtri solari, presentano effetti protettivi sinergici nei confronti delle radiazioni UV dovuti a fenomeni di riflessione e scattering.

Gli studi riportati in questa tesi sono stati focalizzati sullo sviluppo di sistemi microparticellari lipidici applicati non solo alla tradizionale via topica, ma anche a quella inalatoria. Tali risultati sono stati ottenuti utilizzando diverse tecniche di preparazione confrontandone vantaggi e limiti.

1.2.1. Tecniche di preparazione

Vi sono svariate tecniche che possono essere utilizzate per la preparazione delle ML:

- Omogenizzazione ad alte pressioni a caldo [10]: una pre-emulsione, ottenuta miscelando a caldo la soluzione acquosa di emulsionante con il principio attivo disperso nel lipide fuso, viene fatta passare attraverso un omogenizzatore ad alta pressione riscaldato a temperature superiori a quelle del punto di fusione del lipide. La formulazione viene poi raffreddata e portata a temperatura ambiente.
- Omogenizzazione ad alte pressioni a freddo [10]: il principio attivo viene disciolto nel lipide fuso e dopo solidificazione viene macinato, in azoto liquido o ghiaccio secco, in mortai. Le particelle vengono poi disperse nella soluzione di tensioattivo e successivamente immerse nell'omogenizzatore ad alta pressione.
- "*Spray drying*" [11]: i lipidi ed i principi attivi lipofili sono solubilizzati contemporaneamente in un solvente organico. La miscela viene poi sottoposta a nebulizzazione in un essiccatore a spruzzo ("*spray drying*") dove il solvente viene eliminato per evaporazione in corrente di aria calda. Tale tecnica permette una ampia modulazione dimensionale grazie alla regolazione di diversi parametri strumentali che vanno ad influenzarne il processo.
- "*Spray congealing*" [11]: il farmaco viene disperso nel lipide allo stato fuso. Le microparticelle si ottengono atomizzando la sospensione calda in correnti d'aria fredda o bagni di ghiaccio di CO₂.

- Evaporazione del solvente [12]: il materiale lipidico ed il principio attivo vengono solubilizzati in un solvente volatile, questa soluzione viene emulsionata con la fase disperdente acquosa contenente un emulsionante. Dopo l'evaporazione del solvente mediante riscaldamento, la temperatura viene abbassata sempre sotto continua agitazione e le microparticelle formate vengono recuperate per filtrazione o centrifugazione, lavate ed essiccate.
- Fusione a caldo (principalmente per farmaci lipofili)[13,14]: il farmaco viene disperso nel lipide fuso. La miscela viene emulsionata in una soluzione acquosa contenente il tensioattivo. L'emulsione viene fatta raffreddare in bagno di ghiaccio o a temperatura ambiente. Le microparticelle ottenute vengono filtrate o centrifugate, lavate ed essiccate.
- Emulsione multipla A/O/A (per farmaci idrofili)[14]: il principio attivo da incapsulare è solubilizzato in una soluzione acquosa che viene poi emulsionata con il lipide fuso. L'emulsione primaria A/O ottenuta, è poi aggiunta alla fase acquosa esterna per formare una doppia emulsione del tipo A/O/A che viene poi raffreddata a temperatura ambiente o in bagno di ghiaccio. Le microparticelle formate vengono recuperate per filtrazione o centrifugazione, lavate ed essiccate.

La scelta delle tecniche utilizzate nel corso del mio dottorato è stata finalizzata principalmente all'ottenimento di sistemi "*solvent-free*" che permettono di avere buona biocompatibilità e limitati rischi di tossicità per l'organismo. Per questo motivo, tra le diverse tecniche e metodologie di preparazione delle ML sono state selezionate quelle che non richiedevano l'utilizzo di solventi organici: fusione a caldo e "*spray congealing*".

1.2.1.1. Fusione a caldo

Nel processo di produzione delle microparticelle, con la tecnica di fusione a caldo, è molto importante l'aspetto relativo alla ripartizione del farmaco tra la fase lipidica e quella acquosa (Fig.1.1). Durante la fase di omogenizzazione a caldo, il farmaco può diffondere dal lipide fuso alla fase acquosa. Nella fase di raffreddamento dell'emulsione O/A ottenuta, la solubilità del farmaco decresce, e quando si raggiunge la temperatura di ricristallizzazione del lipide si comincia a formare un nucleo che ingloba il farmaco presente in questa fase a questa temperatura. Riducendo la temperatura si ha inoltre la ripartizione del principio attivo nella fase lipidica a causa della sua ridotta solubilità in acqua. Il core già cristallizzato non è però accessibile al farmaco, per cui questo si concentrerà nella parte più esterna della microparticella e/o sulla superficie delle particelle. Quindi agendo sulla temperatura e sul rapporto tensioattivo/lipide impiegato si può modulare il tipo di rilascio (immediato, controllato) prodotto dalle microparticelle lipidiche.

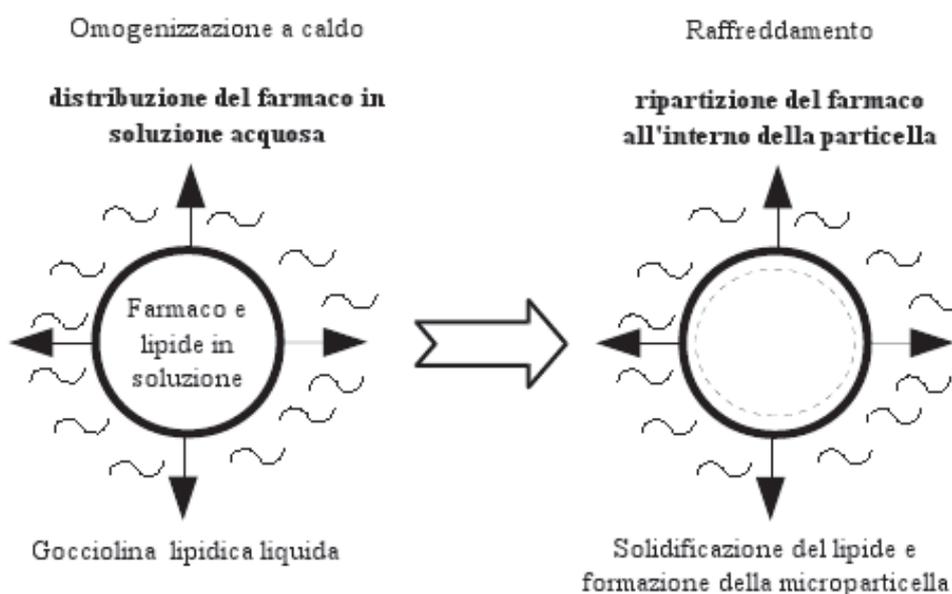


Fig.1.1: Ripartizione del farmaco durante la formazione della microparticella

Esistono tre possibili modelli di incapsulazione del farmaco (Fig.1.2) all'interno delle microparticelle [6]:

- soluzione solida: farmaco distribuito nella matrice lipidica
- "core-shell", con farmaco ripartito nella parte esterna della particella
- "core-shell", con farmaco concentrato nel core della particella

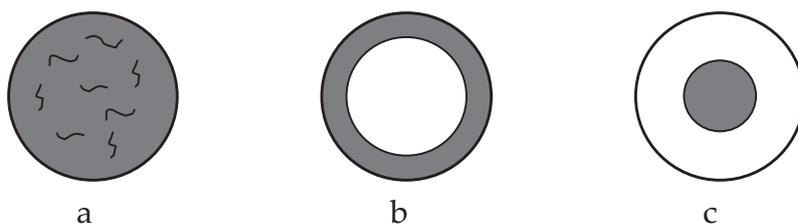


Fig.1.2: Modelli di incapsulazione: soluzione solida (a); core-shell: p.a. nella parte esterna della microparticella(b); core-shell: p.a. nel core (c).

1.2.1.2. Spray congealing

Anche nel processo di produzione delle microparticelle mediante lo "spray congealing" viene mantenuta la premessa di non utilizzare solventi organici. Questa tecnica permette di ottenere particelle sferiche senza aggiunta di tensioattivi e con un elevato "drug loading" sia per farmaci lipofili che per farmaci idrofili, a differenza della tecnica di fusione a caldo. Quest'ultima caratteristica sta rendendo lo "spray congealing" uno strumento di ampio interesse per la produzione di sistemi particellari.

Lo "spray congealing" (chiamata anche "spray chilling" o "spray cooling") pur essendo stato meno utilizzato in passato rispetto alle altre tecniche ha diversi vantaggi soprattutto dal punto di vista della sicurezza e della rapidità. La tecnica consiste nel disperdere il principio attivo da incapsulare nel lipide allo stato fuso; il lipide deve fondere ad una temperatura relativamente bassa (45-85°C). Successivamente la soluzione o la sospensione calda viene atomizzata e le goccioline che si formano, per

semplice caduta in una corrente di aria fredda o in un bagno di ghiaccio di CO₂, passano dallo stato liquido allo stato solido mediante un processo di congelamento. Le particelle che si vengono così a formare hanno in genere una forma sferica e regolare. Recentemente questa tecnica si è sviluppata sempre di più in quanto a differenza di altre tecniche, come lo *"spray drying"*, non vi è il problema dei solventi residui, diminuendo così notevolmente la necessità di controlli e i rischi di inquinamento ambientale. Proprio per il crescente interesse verso questa tecnica, sono stati sviluppati apparecchi dalle dimensioni ridotte in cui all'interno della camera di congelamento sono integrati dei grandi filtri in modo tale che i processi di raffreddamento e di separazione delle microparticelle avvengano nella stessa unità [15]. Le performance di questo metodo di produzione delle ML dipende principalmente dal sistema di nebulizzazione della soluzione o sospensione liquida. Per questo processo si possono usare diversi tipi di atomizzatori, che vengono scelti anche in base alle dimensioni delle microparticelle che si vogliono ottenere. Gli ugelli o atomizzatori che si trovano sul mercato si suddividono in quattro tipi: a disco rotante (o centrifughi), a pressione (o *"airless"*), pneumatici (o ad aria, detti anche ugelli a due componenti), ad ultrasuoni (Fig.1.3) [16].

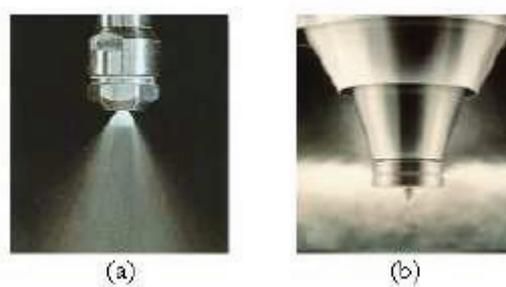


Fig.1.3: Tipi di ugelli: "nozze" (a), disco rotante (b)

Negli atomizzatori centrifughi la sospensione o la soluzione con il principio attivo è fatta gocciolare su un disco che ruota ad alta velocità e le gocce che si sono formate vengono poi fatte congelare in un flusso di aria fredda.

Lo "*spray congealing*" rotazionale ha il vantaggio di essere adattabile ad una grande varietà di valori di viscosità dell'alimentazione ed in questo modo la distribuzione delle dimensioni delle particelle risulta sempre omogenea [17]. Gli atomizzatori a pressione sono raramente usati nel processo di "*spray congealing*" perchè per atomizzare i fluidi viscosi si richiedono alti valori di pressione (70bar) e di flusso e conseguentemente la distribuzione della dimensione delle gocce che si formano risulterà disomogenea [16]. Al contrario gli ugelli pneumatici, sono largamente usati per questo processo, anche se l'aria di atomizzazione deve essere calda per evitare una solidificazione eccessivamente rapida [16]. Solitamente gli ugelli pneumatici atomizzano la sospensione in una camera a temperatura ambiente e si recuperano le microparticelle dopo che si sono solidificate per contatto con l'aria [18-21]. Le microparticelle prodotte con questa metodica presentano diversi vantaggi ma anche degli svantaggi, come ad esempio, la difficoltà di atomizzare dei fluidi troppo viscosi e la difficoltà di caricare le microparticelle con quantità di principio attivo superiori al 20% (p/p). Generalmente si ottengono delle microparticelle con dimensioni comprese tra 50-600 μm e prevale la presenza di microparticelle piccole o grandi come conseguenza della viscosità della sospensione. La difficoltà di questa tecnica a produrre particelle con diametri medi inferiori ai 30 μm può rappresentare un limite in alcune vie di somministrazione.

La ricerca, nell'ambito della tecnica dello "*spray congealing*" ha permesso di mettere a punto delle soluzioni tecnologiche che permettono di atomizzare sospensioni viscosi ("*wide pneumatic nozzle*") con cui è possibile ottenere delle microparticelle con un contenuto di principio attivo fino a 50% (p/p) [22].

1.2.2. Caratteristiche ed applicazioni

Determinare la percentuale di incorporazione del farmaco all'interno delle microparticelle, ovvero la "*loading capacity*", è un dato importante per valutare se le ML possono essere utilizzate come sistemi carrier. Inoltre, è preferibile produrre

delle ML contenenti elevate concentrazioni di farmaco in modo da ridurre sia la quantità di microparticelle da somministrare che il numero di somministrazioni. Generalmente la “*loading capacity*” rappresenta la quantità percentuale (p/p) di farmaco presente nelle particelle rispetto al peso delle particelle stesse.

La quantità di farmaco incorporata nelle particelle può essere espressa anche in termini di efficienza d’incapsulazione. Tale valore è calcolato come il rapporto percentuale della quantità totale di farmaco incorporato nelle microparticelle rispetto alla quantità introdotta inizialmente nella preparazione. L’efficienza di incapsulazione varia da 1% a 5% per i composti idrofili fino ad arrivare all’80% per molecole lipofile.

La solubilità e la miscibilità del farmaco nel lipide fuso, le caratteristiche chimico-fisiche del materiale lipidico e il suo stato polimorfico possono influenzare la capacità di incapsulazione del farmaco all’interno delle ML [6]. Per ottenere un’adeguata incorporazione di principio attivo, soprattutto nella tecnica a fusione, il requisito fondamentale è una sufficiente solubilità del farmaco nel lipide fuso. Normalmente, la solubilità dovrebbe essere maggiore di quella richiesta, poiché tende ad abbassarsi durante il raffreddamento del lipide. Per aumentare la solubilità del farmaco nel lipide si possono aggiungere agenti solubilizzanti come mono- e digliceridi nei lipidi, la cui presenza favorisce la solubilizzazione. Anche la struttura chimica del lipide è importante, perché lipidi con elevato grado di cristallinità portano all’espulsione del farmaco e di conseguenza ad una minore efficienza di incapsulazione.

I lipidi utilizzati nella produzione di ML sono di varia natura e vanno da miscele di mono-, di- e trigliceridi agli oli vegetali idrogenati, miscele di glicerilbenato e cetil palmitato, cere, colesterolo e fosfolipidi [23].

Lipidi chimicamente polidispersi, come quelli utilizzati in cosmesi, mostrano un’ottima capacità di incorporazione. La struttura cristallina, correlata alla natura chimica del lipide, è il fattore chiave che influenza l’efficacia d’incapsulamento del farmaco nel tempo.

Le microparticelle sono delle preparazioni sostanzialmente stabili. Possono essere mantenute a temperatura ambiente per circa due anni senza che si verifichino modificazioni chimico-fisiche di tipo significativo. Nel caso di utilizzo di oli vegetali, invece, è opportuno mantenere la preparazione ad una temperatura inferiore a quella di fusione degli oli utilizzati [24].

Le microparticelle sono ben tollerate dall'organismo in quanto composte da materiali lipidici naturali e surfattanti già ammessi ed utilizzati in formulazioni cosmetiche e farmaceutiche. La tollerabilità di questi veicoli è stata confermata sia da studi in vitro che in vivo [6].

Le ML possono essere utilizzate per somministrare principi attivi per diverse vie: orale, sottocutanea, intramuscolo, polmonare e topica. Il raggiungimento di diverse tipologie di target biologico è reso possibile grazie al vasto range dimensionale di questo tipo di carriers. Sono riportati in letteratura studi sull'applicazione topica di insetto repellenti e sulla somministrazione di antitrombotici, antitumorali e vaccini [6,24,25]. Inoltre, la preparazione di microparticelle con le tecniche tradizionali ha mostrato promettenti risultati di veicolazione per diversi tipi di peptidi e proteine [26]. In questo ambito, per ovviare ai problemi di tossicità dei solventi organici residui, l'utilizzo dei fluidi supercritici risulta un'ottima strategia. Inoltre questa tecnica limita i problemi relativi alla denaturazione delle proteine [27,28].

La progettazione di medicinali si sta sempre più indirizzando verso l'introduzione sul mercato di molecole in nuove forme farmaceutiche a rilascio modificato. Il segmento di mercato di queste forme farmaceutiche destinate alla via orale copre circa il 50%, seguito a distanza dai sistemi destinati alla via polmonare, alla via transdermica ed alla via iniettabile, che ricoprono, rispettivamente, circa il 20%, il 12% e il 7% del mercato.

Nel corso del progetto di ricerca svolto nell'ambito del mio dottorato mi sono interessato in particolare dell'applicazione delle ML per la somministrazione topica ed inalatoria di principi attivi. Per comprendere meglio il rationale di questi studi è

necessario descrivere le caratteristiche e le problematiche relative a queste due vie di somministrazione.

1.3. SOMMINISTRAZIONE TOPICA

1.3.1. Anatomia e fisiologia della cute

La cute è una struttura anatomica appiattita e molto estesa, che ricopre tutta la superficie esterna del corpo e continua con le mucose in corrispondenza degli orifizi delle cavità che si aprono all'esterno. E' costituita da un tessuto epiteliale detto epidermide e da un connettivo, detto derma, cui fa seguito il tessuto connettivo sottocutaneo, ricco di grasso, che giunge fino alle fasce che coprono i muscoli o le ossa, a seconda delle sedi corporee (Fig.1.4).

La pelle, escluso il tessuto sottocutaneo, rappresenta una frazione cospicua del peso corporeo, circa il 5-6%, la sua superficie è in rapporto alla statura e si aggira mediamente intorno a 1.8m², mentre il suo spessore è variabile da un minimo di 0,5mm ad un massimo di 4mm. Lo strato superficiale rappresenta una piccola parte del totale, ed il suo spessore varia tra 50 e 150µm.

L'apparato tegumentario svolge molte importanti funzioni, tra le quali fornire una protezione contro gli insulti esterni di carattere meccanico, chimico, termico, biologico e fisico. Queste funzioni sono svolte principalmente dall'epidermide, caratterizzata da una superficie compatta e flessibile.

Il derma fornisce un efficiente supporto meccanico, consistente ed elastico, grazie alla presenza di fibre connettivali.

Il sottocutaneo garantisce l'ammortizzazione di traumi e della pressione esercitata dal peso corporeo.

La pelle fornisce un'indispensabile protezione contro l'incontrollata perdita di acqua dalla sua superficie, grazie all'impermeabilità dell'epidermide. Inoltre, provvede alla

regolazione della dispersione del calore prodotto all'interno del corpo.

L'epidermide è un epitelio di rivestimento pavimentoso cheratinizzato, costituito da quattro strati che partendo dalla superficie esterna comprendono: strato corneo, granuloso, spinoso e basale.

Lo strato corneo rappresenta il componente più importante, che conferisce alla pelle la sua funzione fondamentale di barriera. Esso è costituito da cellule appiattite ricche di cheratina: i corneociti. I corneociti sono privi di nucleo e di organuli, posseggono un contenuto di acqua esiguo e sono tenuti insieme da una matrice densa ed omogenea, costituita da colesterolo, ceramidi ed acidi grassi insaturi [29].

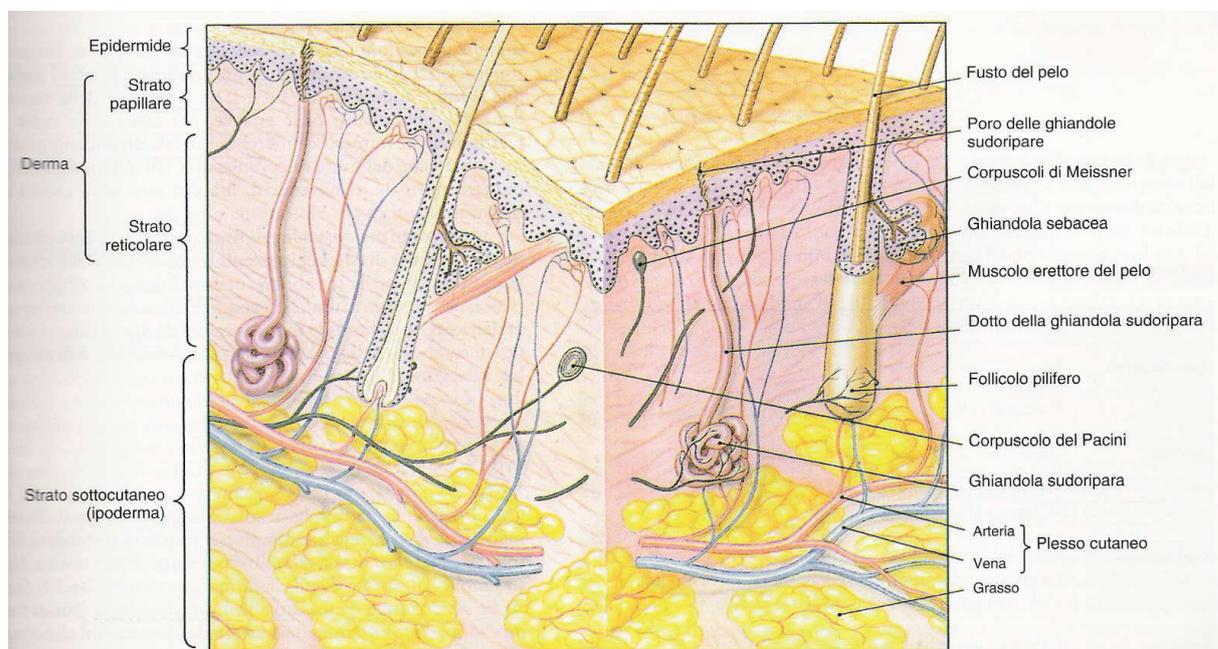


Fig.1.4: Struttura della pelle

Proteine sintetizzate negli strati sottostanti e disposte sul versante citoplasmatico partecipano al mantenimento dello spessore e della rigidità della membrana dei corneociti. Lo spessore dello strato corneo varia da 10 a 100 μ m, a seconda delle aree del corpo. Lo strato corneo è in continua formazione e rinnovamento grazie al processo di desquamazione che dura circa due settimane.

Procedendo verso l'interno, sotto lo strato corneo, vi sono lo strato granuloso e lo

strato spinoso. Nelle cellule dello strato spinoso vengono sintetizzati piccoli granuli contenenti sostanze lipidiche disposti a strati alterni. Il loro contenuto viene secreto nello spazio tra le cellule dello strato granuloso. Queste ultime sono caratterizzate da un citoplasma contenente granuli di cheratoialina, un'importante proteina che concorre alla formazione dello strato corneo. Inoltre, i cheratinociti presentano dei granuli, detti corpi lamellari, composti principalmente da lipidi, che si fondono con la membrana cellulare e riversano il loro contenuto negli spazi intercellulari. In questo modo si viene a formare una struttura lamellare che contribuisce a rendere l'epidermide impermeabile.

La regolazione della proliferazione e del differenziamento dell'epidermide dipendono dal contatto dello strato germinativo con la membrana basale.

Tra le cellule dello strato basale, di particolare importanza sono i melanociti responsabili della sintesi di melanina, il pigmento con funzione protettiva nei confronti dei raggi ultravioletti.

La superficie della pelle è ricoperta da una sottile emulsione idrolipidica che contribuisce a mantenere la superficie dell'epidermide morbida e flessibile, prevenendo la formazione di screpolature ed irritazioni provocate da agenti esterni. Il pH del mantello idrolipidico è circa 5,5, pertanto presenta una certa attività batteriostatica nei confronti di batteri e miceti.

Lo strato sottostante all'epidermide è il derma, un connettivo fibroso denso. La porzione più superficiale di questo tessuto è detto derma papillare, mentre quella più profonda è detta derma reticolare. La matrice extracellulare contiene prevalentemente fibre di collagene, glicoproteine, proteoglicani e glicosaminoglicani (acido ialuronico) [30]. E' in questo tessuto che si trovano ghiandole sebacee, sudoripare e follicoli piliferi. Inoltre il derma è attraversato da vasi sanguigni e da terminazioni nervose, deputate a raccogliere stimoli tattili.

L'ipoderma, tessuto adiposo sottocutaneo, è costituito da adipociti. Queste cellule hanno una distribuzione variabile a seconda del sesso, della dieta e della condizione

ormonale dell'individuo.

1.3.2. Interazione della cute con i raggi solari

La luce solare è costituita da un'ampia gamma di radiazioni (raggi gamma e X, raggi UV, luce visibile, raggi IR, microonde e onde radio) (Fig.1.5). Le radiazioni più energetiche (raggi gamma, X e UV) e le radiazioni meno energetiche (IR, microonde e radio) sono in gran parte assorbite o riflesse dall'atmosfera (dal vapor acqueo, dalla CO₂, e dallo strato di ozono nella stratosfera). Giungono quindi sulla superficie terrestre le radiazioni visibili (37%), che sono quelle percepite dal nostro occhio, e una parte dei raggi infrarossi (60%) e UV (3%).

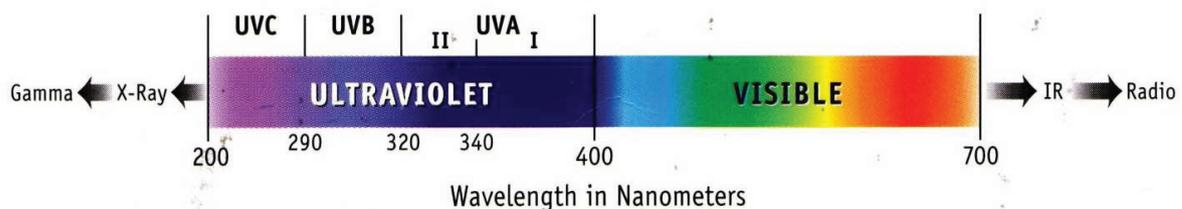


Fig.1.5: La radiazione solare

La capacità delle radiazioni di penetrare attraverso la pelle è direttamente proporzionale alla lunghezza d'onda delle radiazioni stesse, le radiazioni più penetranti sono quelle dotate di minor energia, mentre le radiazioni ad elevata energia sono quelle che penetrano di meno e quindi svolgono la loro azione in superficie, a livello epidermico.

Le radiazioni infrarosse (800-1000nm) sono radiazioni termiche che penetrano negli strati più profondi della pelle e vengono percepite come calore determinando una vasodilatazione locale. Un'eccessiva esposizione a queste radiazioni può danneggiare la pelle per ipertermia (colpo di sole), provocando sintomi che vanno dalla vasodilatazione alla disidratazione cutanea.

Le radiazioni visibili (400 – 800nm) raggiungono anch'esse gli strati più profondi della pelle, però non sono dannose per la cute. Sono importanti per la regolazione di alcune funzioni del nostro corpo (regolazione sonno-veglia e andamento circadiano degli ormoni).

Le radiazioni UV si dividono in:

- UV-A (400-320nm): penetrano più profondamente fino al derma e all'ipoderma (Fig.1.6). Un'esposizione troppo prolungata provoca l'insorgenza di effetti a lungo termine quali: invecchiamento cutaneo, radicali liberi e tumori cutanei. Sono responsabili della pigmentazione diretta della cute.
- UV-B (320-290nm): Presentano scarsa capacità di penetrazione, e limitata all'epidermide (Fig.1.6). L'energia ad essa associata è sufficiente a causare severi danni fotochimici quali: ustione, eritema solare, tumori e alterazione del sistema immunitario. Provocano pigmentazione indiretta.
- UV-C (290-200nm): sono quasi completamente assorbiti dallo strato atmosferico dell'ozono, arrivano in piccola quantità sulla terra. Sono estremamente pericolosi per la vita.

La radiazione solare presenta numerosi effetti benefici come per esempio la sintesi di vitamina D3 (Fig.1.8), tuttavia è stato dimostrato che un'esposizione eccessiva è sicuramente nociva per l'uomo provocando numerosi effetti negativi quali eritema e ustioni, fotoimmunosoppressione, fotoinvecchiamento cutaneo e fotocarcinogenesi (Fig. 1.7)[31].

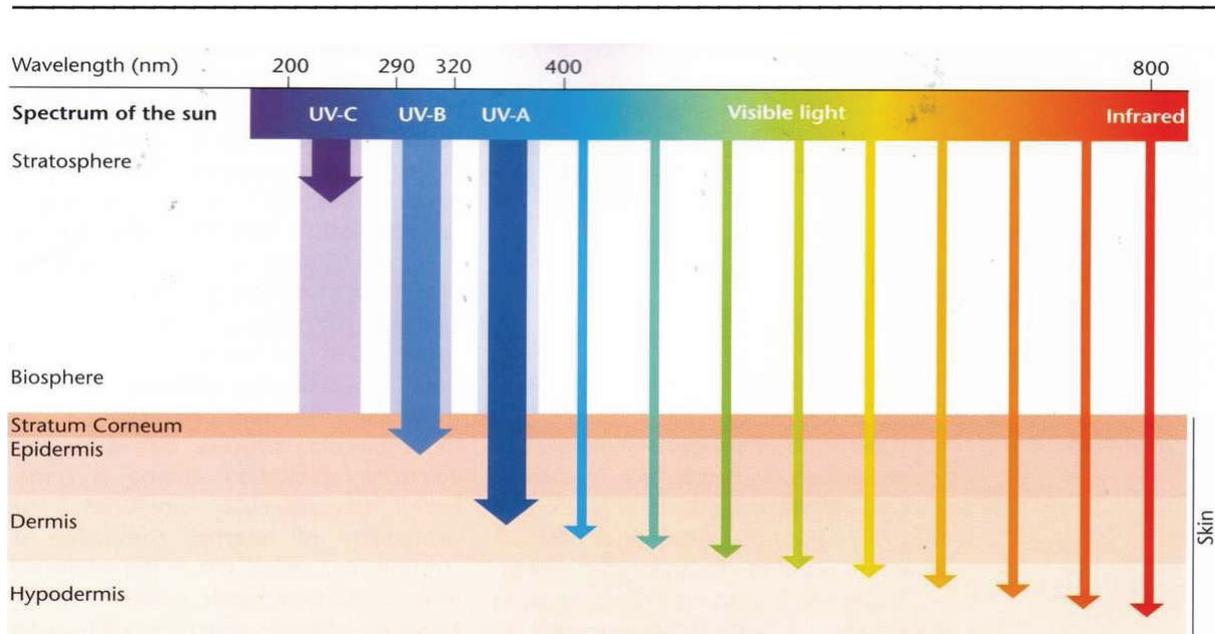


Fig.1.6: La penetrazione dei raggi UV

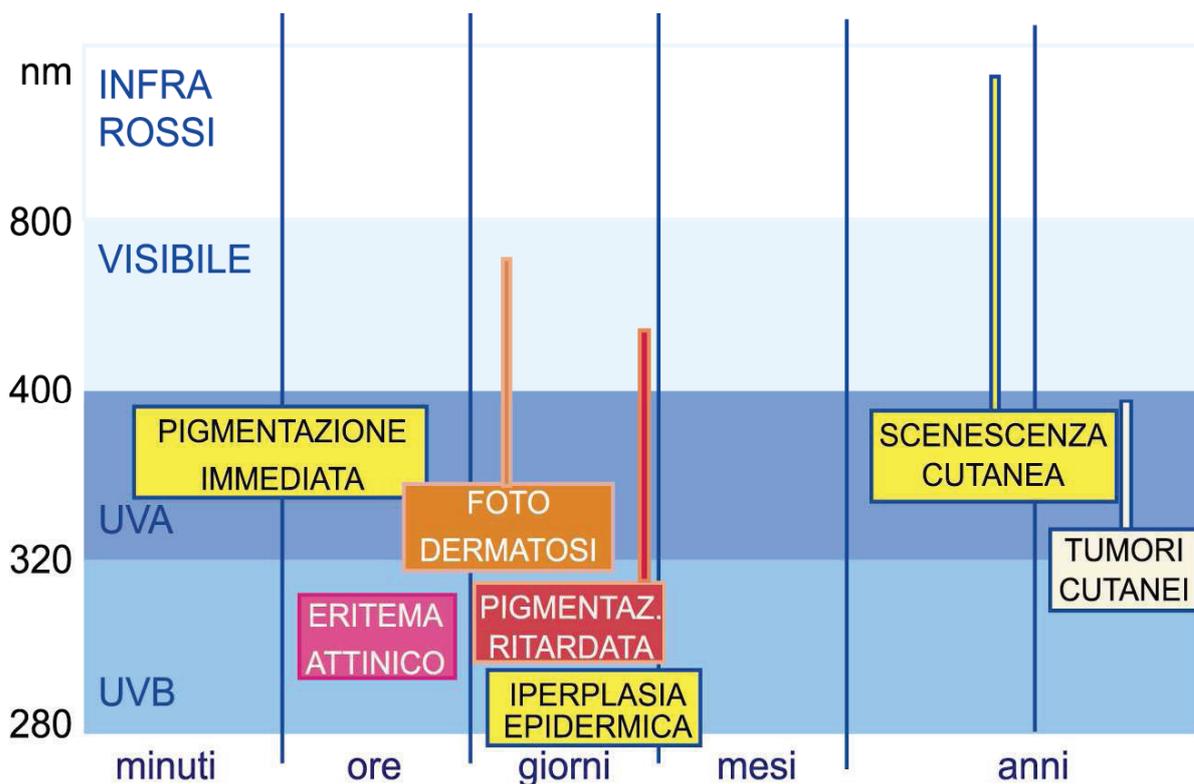


Fig.1.7: Relazione tra l'esposizione ai raggi UV e la possibilità di danni

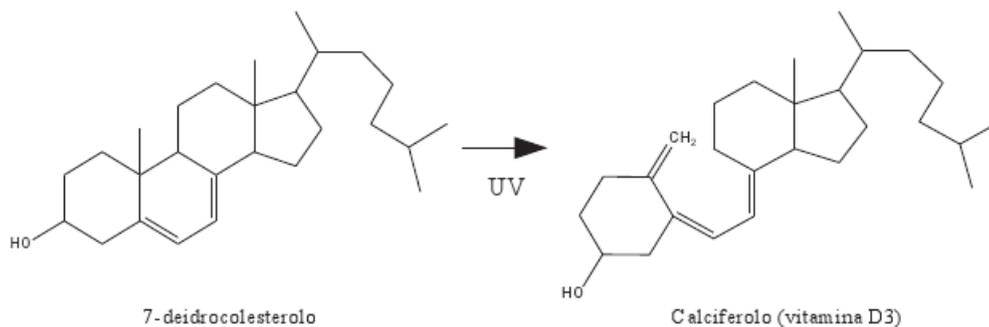


Fig.1.8: Biosintesi della vitamina D3

La biosintesi della melanina [32] costituisce la principale difesa endogena nei confronti delle radiazioni solari, prevenendo i danni indotti dall'esposizione alla luce solare, in particolare riducendo l'esposizione degli strati più profondi dell'epidermide e del derma sottostante alle radiazioni UV. Oltre ad assorbire le radiazioni UV la melanina è anche in grado di neutralizzare i radicali liberi che possono provocare alterazioni a livello dei lipidi, delle proteine e del DNA. Le cellule dei melanociti producono due tipi di melanina: l'eumelina di colore bruno-nero, prevalente nei soggetti di pelle nera che agisce come un filtro solare ostacolando la penetrazione delle radiazioni. L'altro tipo di melanina è la feomelanina un pigmento di colore biondo-rosso prevalente nei soggetti con carnagione chiara e capelli biondo-rossicci, è un filtro meno efficace e può addirittura degradarsi per azione dei raggi UV. Negli altri individui in genere i due tipi di melanina si mescolano ed è la presenza maggiore dell'uno o dell'altro che determina la diversa carnagione e le diverse risposte al sole.

Le radiazioni UV-A provocano una pigmentazione diretta immediata che inizia 5-10 minuti dopo l'inizio dell'esposizione alla luce solare e che permane per circa 36 ore. Invece le radiazioni UV-B determinano una pigmentazione indiretta, tale reazione si verifica 72 ore dopo l'irraggiamento e corrisponde alla neosintesi di melanina.

Questo è un effetto benefico dal punto di vista estetico ed è il processo di pigmentazione della cute (abbronzatura) dovuto alla sintesi di melanina da parte dei melanociti. Nelle cellule dell'epidermide, la melanina si dispone in maniera concentrica intorno alla membrana nucleare, assorbendo le radiazioni UV prima che esse possano danneggiare il DNA nucleare.

I melanociti rispondono all'incrementata esposizione alle radiazioni UV aumentando la loro attività [33].

La pelle però dispone anche di altri meccanismi per proteggersi dalle radiazioni solari quali l'ipercheratosi reattiva, questo meccanismo si instaura quando la pelle non è ancora pigmentata e quindi priva di protezione, l'unica difesa dai raggi UV in questo caso è rappresentata dallo strato corneo che attenua il passaggio degli UV-B e in parte degli UV-A più corti. Nell'arco di alcuni giorni di esposizione, lo spessore dello strato corneo diventa doppio rispetto al normale riducendo così ulteriormente la quota di raggi UV in grado di attraversare il corneo. Questa capacità di protezione si integra con altri meccanismi di difesa complementari propri dello strato corneo quali la sudorazione e la secrezione sebacea che aumentano il potere di riflessione dei raggi UV da parte del film idrolipidico di superficie. Le ghiandole sudoripare endocrine secernono una sostanza l'acido urocanico, tale sostanza, che deriva dalla deaminazione dell'istidina, si comporta come un filtro solare ed in seguito all'assorbimento delle radiazioni UV subisce fotoisomerizzazione passando dalla forma trans, termodinamicamente più stabile, alla forma cis.

Altri fenomeni di autoprotezione sono l'accumulo di β -carotene nei cheratinociti, un pigmento di colore giallo-arancio, che può essere convertito in vitamina A, importante per il mantenimento dell'epitelio. Il β -carotene agisce da *quencher* dell'ossigeno singoletto.

L'attivazione della superossido dismutasi e della glutazione perossidasi, che agiscono da "*scavenger*" verso forme reattive dell'ossigeno, sono altri meccanismi di autoprotezione.

Malgrado l'instaurarsi dei diversi meccanismi di protezione, l'esposizione eccessiva alle radiazioni solari può causare seri danni a livello della cute che si differenziano in danni acuti o cronici.

Il danno acuto è manifestato dall'eritema solare che si manifesta alcune ore dopo un'intensa fotoesposizione con un arrossamento cutaneo non associato alla comparsa di vescicolo-bolle, transitorio che si ripara con desquamazione e completa "*restitutio ad integrum*".

L'ustione solare, viceversa, è caratterizzata dalla presenza di vescicole o flittene su base eritemato-edematosa e dall'esito in lentiggini solari. L'azione eritematogena è principalmente svolta dai raggi UV-B che necessitano di una dose dalle 100 alle 1000 volte inferiore rispetto agli UV-A per produrre lo stesso grado di arrossamento.

I danni cronici, causati dalle radiazioni UV sono la fotoimmunosoppressione, il fotoinvecchiamento, la fotocarcinogenesi [34].

La fotoimmunosoppressione è dovuta all'azione delle radiazioni UV sulle cellule del Langerhans che sono, a livello cutaneo, le principali cellule presentanti l'antigene, e sui linfociti "*skin homing*". L'azione immunosoppressiva di UV-A e UV-B avviene direttamente, ma anche tramite la produzione di citochine da parte dei cheratinociti; è inoltre un elemento patogenetico importante per lo sviluppo di tumori cutanei. Questa proprietà della radiazioni UV viene anche sfruttata per la cura di numerose patologie dermatologiche (fototerapia). Il fotoinvecchiamento è causato dall'azione cronica dei raggi UV-A e UV-B a livello dell'epidermide e del derma, che si somma agli effetti di cronoinvecchiamento. I segni clinici di fotoinvecchiamento sono la formazione di rughe, depigmentazioni, fragilità cutanea, ispessimento cutaneo, teleangectasie, dilatazione degli osti follicolari, pseudocomedoni. A livello istologico si possono osservare atrofia epidermica, diminuita formazione e alterazione delle fibre di collagene, alterazioni a carico delle fibre elastiche, accumulo di materiale omogeneo e amorfo a livello dermico (elastosi solare), alterazioni del microcircolo. Questi danni sembra siano causati dalla formazione, da parte dei raggi UV, di

radicali a livello dell'epidermide e del derma.

Il principale effetto nocivo cronico delle radiazioni UV-A e UV-B a livello cutaneo è rappresentato dalla fotocarcinogenesi. Le radiazioni UV provocano la formazione di dimeri di pirimidina che si possono formare tra due timine o tra una timina e una citosina. La formazione di questi dimeri provoca una modificazione della composizione del DNA.

La riparazione si basa sul riconoscimento del danno seguito da un processo di escissione-resintesi del tratto di DNA danneggiato, in cui sono coinvolti almeno 20 geni. Se gli enzimi non sono in grado di riparare il danno, la mutazione viene fissata e la cellula può andare incontro a trasformazione maligna. Nei cancri cutanei da UV le principali mutazioni sono state riscontrate a livello dei geni che codificano per ras e p53 [35,36]. E' stato ipotizzato che la proteina p53, nelle cellule normali, ha la funzione di prevenire il cancro bloccando la riproduzione di una cellula con il DNA danneggiato fino a quando non sia stato riparato.

Quando il danno è troppo esteso per essere riparato la proteina p53 induce apoptosi della cellula, impedendo così che essa si trasformi in cellula cancerosa. Se il gene p53 subisce mutazione, compromettendo la sua normale funzione, la cellula non andrà incontro a morte programmata, ma l'alterazione genica sarà trasmessa alla progenie promuovendo la crescita del tumore. I tumori che colpiscono la cute sono: il carcinoma delle cellule basali, il carcinoma a cellule squamose e i melanomi [37].

Il carcinoma basocellulare è un tumore maligno localmente aggressivo ed infiltrante, che origina dallo strato delle cellule basali dell'epidermide, ma che metastatizza raramente.

Il carcinoma a cellule squamose insorge dai cheratinociti epidermici e ha una bassa capacità di formare metastasi, anche se superiore rispetto al carcinoma delle cellule basali. Il tumore, dal punto di vista istologico, è ben differenziato ed invade il derma.

Il melanoma insorge dai melanociti cutanei e la sua incidenza, in questi ultimi anni, è in forte aumento, questo anche a seguito dell'aumentata esposizione solare in

giovane età che sembra proprio essere il fattore predisponente di maggiore entità. Questo tumore colpisce le persone di entrambi i sessi con particolare predilezione per le persone di pelle chiara. Vi sono anche altri fattori che predispongono al danno quali: la familiarità, la presenza di nei displastici congeniti o acquisiti, la presenza di efelidi nelle aree esposte al sole, l'immunosoppressione e lo xeroderma pigmentoso. La maggior parte dei melanomi ha una fase iniziale di crescita superficiale (radiale) che può durare da alcuni anni fino a una decade o più. Durante questa fase i melanociti proliferano lateralmente nell'epidermide lungo la linea di giunzione dermo-epidermica o nel derma papillare ma non metastatizzano. Successivamente possono entrare in una fase di crescita verticale in cui le cellule maligne penetrano nel derma reticolare sottostante. Vi sono quattro tipi di melanoma:

- Melanoma a diffusione superficiale
- Lentigo maligna melanoma
- Melanomi nodulari
- Melanoma lentiginoso acrale

E' importante sottolineare che i tumori della pelle sono il tipo di neoplasia umana più diffusa. Solo negli USA, ogni anno sono diagnosticati 13 milioni di nuovi casi; questo numero è equivalente all'incidenza di tutti gli altri tipi di tumori umani [38]. E' stato dimostrato che oltre il 90% delle neoplasie cutanee è causato dall'esposizione eccessiva alle radiazioni UV della luce solare [39].

1.3.3. Filtri solari

Uno dei metodi più diffusi per proteggere la pelle dagli effetti dannosi della radiazioni UV è basato sull'applicazione topica di filtri solari [40-42].

I filtri solari sono sostanze in grado di ridurre la dose di radiazioni UV che raggiunge la pelle e sono disponibili in una grande varietà di tipi e formulazioni. Dal punto di vista legislativo gli specifici derivati di cui è autorizzato l'uso nei prodotti cosmetici sono presenti in un allegato della legge 713/86. Tale norma rientra nel percorso di

unificazione della regolamentazione europea sull'impiego commerciale dei filtri solari e riporta quelli ammessi specificandone la concentrazione massima che può essere utilizzata in una formulazione [43]. La normativa australiana è più restrittiva poiché i rischi derivanti dall'esposizione solare in Australia sono maggiori per la sua posizione geografica, la presenza del buco dell'ozono è l'elevata percentuale di soggetti con pelle chiara tra la popolazione residente. Questa normativa fornisce delle linee guida molto precise riguardo alle caratteristiche fotoprotettive dei prodotti solari, indicando un preciso rapporto tra fattore di protezione relativo ai raggi UV-A e UV-B considerando in particolare la radiazione compresa nell'intervallo 320-360nm. Questa radiazione, definita UV-A corti, è particolarmente dannosa in quanto dotata di specifica attività mutagena e quindi cancerogena [44].

A seconda del meccanismo con cui agiscono, i filtri solari possono essere distinti in filtri fisici o inorganici e in filtri chimici o organici.

I **filtri fisici** sono sostanze schermanti in grado di riflettere o disperdere le radiazioni solari. I più utilizzati sono il biossido di titanio (TiO_2) e l'ossido di zinco (ZnO).

Questo tipo di filtro permette di ottenere un'adeguata protezione senza dover utilizzare quantità elevate di filtri organici. I filtri fisici non sono solubili nel veicolo e perciò vanno finemente dispersi e mantenuti in sospensione in esso. Per ottenere ossidi opachi all'UV, ma dotati di elevata trasparenza nel visibile (importante per evitare la colorazione bianca della pelle), sono stati messi a punto ossidi micronizzati con dimensioni inferiori ai 100nm.

Il biossido di titanio è più efficace per la protezione dai raggi UV-B mentre l'ossido di zinco risulta essere più efficace nello schermare le radiazioni UV-A. I filtri fisici possono agire con meccanismi d'azione diversi. Quando una radiazione interagisce con un prodotto applicato sulla cute, una piccola frazione viene riflessa dalla superficie del film, la restante parte penetra in esso per rifrazione. Di questa frazione, parte viene assorbita dalla particella solida, parte diffusa e parte trasmessa. Per quanto riguarda il processo di assorbimento, tutte le radiazioni di lunghezza d'onda

(λ) inferiori a 400nm e 385nm oltre ad essere diffuse vengono assorbite rispettivamente da TiO₂ e ZnO.

Le λ superiori vanno incontro soltanto al fenomeno di diffusione. Risulta evidente che l'efficacia degli schermi fisici dipende dalle dimensioni delle particelle e dalla loro dispersione stabile ed omogenea nel prodotto finito. Se si verificano fenomeni di aggregazione, le particelle che si uniscono a formare l'agglomerato e si comportano come singole particelle di dimensioni maggiori, agendo da pigmento bianco e non da schermo UV.

I **filtri chimici** sono molecole organiche capaci di assorbire l'energia delle radiazioni UV. Sono più utilizzati dei filtri fisici e generalmente, nella loro struttura, presentano un anello aromatico sostituito in grado di assorbire le radiazioni e di convertirle in una forma di energia meno dannosa quali calore, radiazioni a λ maggiori, energia vibrazionale e rotazionale. L'energia radiante assorbita dal filtro viene utilizzata dagli elettroni degli orbitali più esterni per compiere transizioni elettroniche del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ ed $n \rightarrow \pi^*$. La molecola quindi, passa da uno stato energetico fondamentale ad uno stato eccitato nel quale rimane per un tempo molto breve e successivamente ritorna allo stato fondamentale emettendo una quantità di energia pari a quella assorbita. La reazione che esprime questo evento è:



dove F_0 rappresenta lo stato fondamentale, 1F lo stato eccitato caratterizzato come stato di singoletto, h è la costante di Planck e ν la frequenza della radiazione incidente.

L'energia assorbita dal filtro viene dissipata in vari modi (Fig.1.9):

- *conversione interna*, associata all'emissione di calore. È il modo più frequente e più innocuo con cui un filtro solare torna dallo stato eccitato a quello fondamentale.
- *fluorescenza*, caratterizzata dall'emissione di luce a lunghezza d'onda maggiore di quella assorbita

- “*intersystem crossing*”, reazione nella quale lo stato di singoletto eccitato è convertito in tripletto con spin elettronici paralleli che presenta un tempo di emivita relativamente lungo e quindi una maggiore probabilità di interagire con altre specie (eccipienti della formulazione, ossigeno, cute). Il ritorno allo stato fondamentale può avvenire mediante:
 - fosforescenza, ossia emissione di luce ad una lunghezza d’onda inferiore a quella assorbita
 - formazione di radicali liberi in seguito ad interazioni con molecole circostanti [45].
 - accoppiamento con O₂ con formazione di ossigeno singoletto, specie molto reattiva in grado di reagire con componenti della formulazione o costituenti della pelle come i lipidi di membrana formando perossidi, idroperossidi e radicali liberi.
- *foto degradazione* fenomeno che porta alla modificazione della struttura chimica del filtro stesso con riduzione del potere protettivo e produzione di frammenti potenzialmente tossici. La radiazione assorbita può anche causare processi di isomerizzazione cis-trans che pur alterando la struttura originaria del filtro, non ne riduce in maniera significativa la capacità di assorbimento delle radiazioni UV.

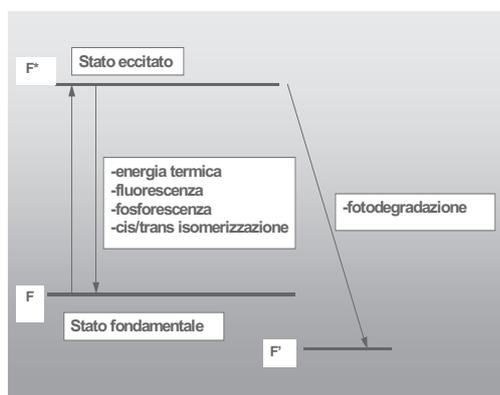


Fig.1.9: Emissione dell'energia in seguito ad assorbimento di radiazioni elettromagnetiche

In base alle caratteristiche dell'unità strutturale attiva, i filtri chimici oggi in commercio ed approvati dalla normativa CEE si suddividono in alcuni gruppi principali:

Classe	Caratteristiche
Derivati del PABA	Filtrano gli UV-B; λ_{\max} nel range 285-310nm
Cinnamati	Filtrano gli UV-B; agiscono da quencher; λ_{\max} nel range 308-311 nm
Derivati della benzilidencanfora	Filtrano gli UV-B; agiscono da quencher; λ_{\max} nel range 289-298 nm
Derivati del dibenzoilmetano	Filtrano gli UV-A; λ_{\max} nel range 350-355nm
Benzofenoni	Filtrano gli UV-A e gli UV-B; λ_{\max} nel range 285-323nm
Salicilati	Filtrano gli UV-B; λ_{\max} attorno a 305nm

Tab.1.1: Caratteristiche delle principali classi di filtri solari

La differenziazione tra filtri fisici e filtri chimici è importante in quanto non tutte le radiazioni UV hanno la medesima azione fisiologica, e quindi l'azione di uno schermo chimico permette di avere una buona protezione pur mantenendo una certa capacità abbronzante.

Lunghezza d'onda	Capacità eritematogena	Capacità di abbronzatura
297 nm (UV-B)	100%	100%
302 nm (UV-B)	55%	50%
313 nm (UV-B)	3%	2%
334 nm (UV-A)	0%	0.4%
366 nm (UV-A)	0%	0.12%

Tab.1.2: Radiazioni UV: capacità eritematogena e di abbronzatura

Le radiazioni dotate delle maggiori capacità abbronzanti sono anche quelle con la più alta attività eritematogena (Tab.1.2), e quindi necessitano di un'adeguata protezione, al fine di salvaguardare la salute della cute.

Poiché i filtri solari vengono utilizzati da un numero sempre crescente di persone e per lunghi periodi di tempo è importante garantirne l'efficacia e la sicurezza [37,46].

L'efficacia viene valutata mediante il *fattore di protezione solare* (SPF) che esprime il rapporto tra la minima dose di radiazioni in grado di provocare il primo percettibile arrossamento eritematoso ("*minimal erythematic dose*", MED) per una pelle protetta e non protetta. Quindi maggiore è il valore di SPF, maggiore è la protezione fornita dal filtro solare. La valutazione dell'efficacia può essere anche suddivisa in base agli effetti benefici a breve termine ed effetti a lungo termine. Gli effetti a breve termine sono legati alla comparsa dell'abbronzatura evitando l'insorgere di eritema solare, quelli a lungo termine sono invece legati alla prevenzione del fotoinvecchiamento e alla riduzione del rischio di formazione di tumori cutanei. La sicurezza del filtro è legata alla determinazione del suo profilo tossicologico (comparsa di fenomeni allergici, fotodecomposizione, metabolismo, escrezione).

I requisiti ideali di un filtro solare, sono:

- elevata assorbanza nell'UV nel quale si desidera avere protezione
- coefficiente di estinzione specifico indipendenti dal solvente o dal pH
- dissipazione dell'energia assorbita con il minore impatto per i tessuti
- stabilità chimica
- fotostabilità
- minimo o nullo assorbimento percutaneo
- buon profilo tossicologico
- buona compatibilità con gli altri componenti della formulazione
- omogenea distribuzione nel veicolo della formulazione.

Un'elevata fotostabilità e un ridotto assorbimento transdermico rappresentano due delle caratteristiche più importanti per assicurare l'efficacia e la sicurezza dei filtri solari.

Infatti, la decomposizione del filtro solare in seguito ad irradiazione ne riduce l'efficacia protettiva durante l'utilizzo. Inoltre è stato dimostrato [47,48] che i prodotti di fotodegradazione possono interagire con sostanze presenti sulla pelle, portare alla formazione di radicali liberi e prodotti potenzialmente tossici, responsabili di manifestazioni allergiche e fotoallergiche [49-51]. L'impiego di alcuni filtri può aggravare alcune patologie cutanee quali dermatite diffusa, dermatite cronica attinica, xeroderma pigmentoso, reattività persistente alla luce. La fotoinstabilità di un filtro non è necessariamente la causa dell'insorgere di manifestazioni allergiche o altri effetti nocivi, ma questi fenomeni dipendono sia dalla natura delle sostanze presenti sulla cute sia dai prodotti che si formano.

Un altro aspetto importante per assicurare l'efficacia di un filtro solare è un assorbimento ridotto. Poiché queste sostanze esplicano la loro azione sulla superficie della pelle, è necessario che in seguito ad applicazione topica vengano trattenute negli strati più esterni del corneo e che il loro assorbimento transdermico sia minimo. Infatti la penetrazione del filtro attraverso la cute oltre a ridurre l'effetto protettivo, può anche aumentare il rischio di reazioni allergiche.

1.3.4. Assorbimento transdermico

La possibilità da parte della pelle di assorbire sostanze applicate per via topica è da molto tempo oggetto di approfondite ricerche, sia per veicolare farmaci all'interno dell'organismo, sia per favorire la localizzazione di principi attivi destinati a rimanere sulla superficie.

Un composto che viene a contatto con la pelle ha a disposizione diverse vie per penetrare nel tessuto vivente: i follicoli piliferi, i dotti delle ghiandole sudoripare e lo strato corneo. Poiché l'area relativa alle aperture degli annessi cutanei rappresenta

soltanto l'1% dell'intera superficie della pelle, il loro contributo nel determinare la concentrazione del farmaco nei tessuti è poco significativo. È quindi la via transepidermica che offre le maggiori possibilità di penetrazione e poiché lo strato corneo è formato da cellule morte, il passaggio avviene mediante un processo di diffusione passiva [52].

Tale trasporto è governato dalla legge di Fick:

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{R \cdot D_s \cdot A \cdot a}{h}$$

dove:

a = l'attività del veicolo ($a = C_v \cdot \alpha$, dove C_v è la concentrazione di principio attivo nel veicolo ed α il coefficiente di attività);

R = coefficiente di ripartizione della molecola tra membrana e veicolo;

D_s = coefficiente di diffusione della molecola attraverso lo strato corneo;

A = superficie interessata all'assorbimento;

h = spessore attraversato.

Questa legge mette in evidenza come il passaggio attraverso lo strato corneo sia direttamente proporzionale alla concentrazione ed alla capacità di diffondere della sostanza applicata ed inversamente proporzionale allo spessore della membrana.

Il coefficiente di ripartizione corneo/veicolo si riferisce al rapporto tra la concentrazione della sostanza nel corneo e quella nel veicolo. È un parametro importante che descrive l'affinità della sostanza per lo strato corneo e la sua capacità di lasciare il veicolo.

È chiaro che l'assorbimento attraverso la barriera epidermica di una sostanza, sia esso un principio attivo o un componente della formulazione, dipende da diversi fattori:

- solubilità adeguata sia in ambiente lipofilo (strato corneo), che in quello idrofilo (strati sottostanti il corneo ed il derma). Perciò soltanto le molecole che possiedono un appropriato coefficiente di ripartizione saranno in grado di permeare la pelle fino agli strati più profondi;
- un basso peso molecolare; generalmente le molecole con un $PM > 5000$ penetrano con difficoltà ed in scarsa quantità.

Altri parametri che possono influenzare la capacità di assorbimento sono il pKa, il grado di ionizzazione, la pressione di vapore.

La cute stessa esplica un ruolo di notevole importanza nella penetrazione, in quanto la perdita di integrità ne riduce le proprietà di barriera. Infatti, la rimozione dello strato corneo per cause accidentali come l'abrasione, porta ad un notevole aumento della permeabilità cutanea. Anche agenti chimici come acidi e solventi possono danneggiare l'efficacia della barriera dello strato corneo con modificazioni sull'assorbimento. L'aumento eccessivo di idratazione o la presenza di patologie a carico dello strato corneo sono fra le cause dell'aumento di permeabilità cutanea.

Per quanto concerne invece la resistenza che la cute esercita alla penetrazione, questa, varia a seconda della zona di applicazione. Tali differenze sono da attribuire al diverso spessore dello strato corneo e alla diversa composizione dei lipidi in esso contenuti.

La penetrazione di una molecola inoltre, non dipende solo dalle sue proprietà chimico-fisiche e dalle caratteristiche della cute stessa, ma anche dal tipo di veicolo utilizzato. È opportuno quindi valutare la composizione del veicolo e l'effetto che può avere sulla penetrazione cutanea. Il veicolo può influenzare l'assorbimento percutaneo modificando le proprietà della molecola penetrante (attività termodinamica), o alterando la permeabilità della cute, attraverso l'uso di veicoli occlusivi oppure introducendo nella formulazione sostanze in grado di modificare le proprietà di barriera della pelle. Quest'ultime vengono dette "promotori di assorbimento" (ad esempio tensioattivi, urea, dimetilsolfossido, ed azone) e

dovrebbero agire riducendo in maniera reversibile la resistenza diffusionale dello strato corneo. Bisogna però tenere in considerazione che, oltre all'aumento di assorbimento del principio attivo, può aumentare anche l'assorbimento degli altri componenti della formulazione e che alcuni promotori, per essere efficaci, devono essere presenti in elevate concentrazioni, causando effetti indesiderati o tossici a livello cutaneo e perciò il loro impiego è limitato.

1.4. SOMMINISTRAZIONE POLMONARE

La terapia inalatoria è considerata la metodica di trattamento d'elezione delle patologie respiratorie bronchiali, con particolare riferimento alla patologia asmatica acuta e cronica, in quanto permette di ottenere maggiori concentrazioni di farmaco in loco minimizzando gli effetti collaterali rispetto ai farmaci assunti per via sistemica. Essa si presta bene alla somministrazione di farmaci gassosi o volatili (anestetici generali), ma anche per farmaci non volatili che possono essere somministrati sotto forma di particelle disperse solide (polverizzate) o liquide. Piccole molecole come i glucocorticoidi (budesonide, fluticasone), i β 2-agonisti (terbutaline, salbutamolo, salmeterolo e formeterolo) e gli antibiotici (tobramicina) sono le principali categorie di farmaci utilizzate per il trattamento delle malattie polmonari.

Con questa via il farmaco arriva direttamente al sito desiderato con la possibilità di utilizzare una dose molto inferiore se comparata con le altre vie di somministrazione come quella orale o di iniezione [53]. Ottenendo una rapida azione del principio attivo in situ e quindi riuscendo a ridurre gli effetti collaterali associati alla distribuzione sistemica. Inoltre, la bassa attività metabolica dei polmoni permette un trasporto sistemico, senza il passaggio epatico, evitando gli effetti di stasi gastrica e di pH. Il percorso polmonare è provvisto di una vasta e ben perfusa area superficiale (circa 100m²) che permette un alto grado di assorbimento attraverso le membrane

mucosali broncopolmonari [54].

Questa somministrazione è spesso utilizzata per il trattamento di malattie come l'asma e il COPD ("*Chronic obstructive pulmonary disease*") e può essere impiegata nel trattamento delle infezioni batteriche o per ridurre la tossicità di certe sostanze (amminoglicosidi) [55].

I polmoni sono strutturati in modo tale da permettere il passaggio di gas, ma di evitare l'entrata di corpi estranei. Per superare queste barriere fisiologiche sono richiesti sofisticati metodi di somministrazione, ovvero sistemi aerosol sottoforma di nebulati, goccioline o particelle solide di farmaco da veicolare durante il respiro.

L'efficacia del trattamento è relativa alla reale possibilità che una sostanziale dose di farmaco (broncodilatatore, anti-infiammatorio o antibiotico) arrivi in prossimità degli alveoli dove può esercitare la sua azione terapeutica. Questa quantità dipende dalla fisiologia del respiro, dalla "*clearance*" mucociliare, dall'efficacia dell'inalatore, dalle caratteristiche della formulazione e dalle proprietà aerodinamiche. La conseguenza è che la somministrazione di tali prodotti richiede lo sviluppo di una delle più complesse tipologie di formulazioni, perché devono essere costituite oltre che da un attivo propriamente formulato anche da un corretto "*device*".

In conclusione l'efficacia della terapia inalatoria, specialmente per le formulazioni di farmaci in polvere, è dipendente da fattori relativi al paziente, al "*device*" e alle caratteristiche della formulazione.

1.4.1. Anatomia e fisiologia del tratto respiratorio

I polmoni fisiologicamente sono responsabili degli scambi gassosi e non dell'assorbimento, le loro caratteristiche funzionali e anatomiche differiscono nell'assorbimento da quelle di altri compartimenti corporei, risulta quindi fondamentale nella somministrazione polmonare garantire l'integrità e il corretto funzionamento della mucosa respiratoria [56].

La terapia inalatoria richiede la conoscenza delle funzioni polmonari e la

correlazione di esse con le proprietà meccaniche degli alveoli durante la ventilazione. Le vie aeree dispongono di percorsi nei quali il flusso d'aria normalmente non incontra grandi resistenze per raggiungere gli alveoli, sede della funzione essenziale, lo scambio gassoso.

I polmoni sono spugnosi ed elastici, il che permette la loro espansione durante l'inspirazione e il ritorno alle condizioni iniziali in seguito all'espirazione. Questo apparato è da sempre associato alla struttura di un albero rovesciato, dove la porzione tracheo-bronchiale rappresenta il tronco e gli alveoli la chioma. Il sistema respiratorio si suddivide in tre porzioni: naso-faringe (dalle narici alle laringe), il tratto tracheo-bronchiale (dalla trachea fino ai bronchioli terminali) e il tratto polmonare (dotti e sacchi alveolari).

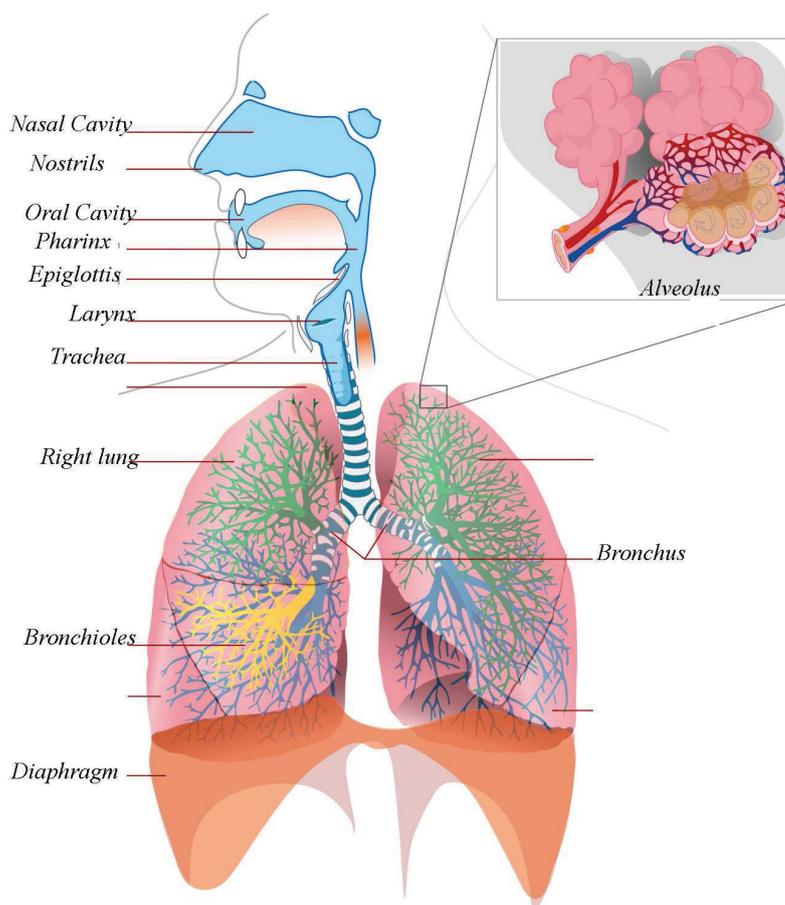


Fig.1.10: Schema del sistema respiratorio

La trachea ha una struttura flessibile tubolare collegata superiormente alla laringe e inferiormente ai bronchi, che si dividono in due rami principali, destro e sinistro. I bronchi hanno un iniziale porzione extrapolmoni per poi diventare intrapolmonari [57]. All'interno dei polmoni i bronchi vanno incontro a ripetute biforcazioni, con una riduzione graduale del diametro del lume fino alla formazione dei bronchioli. Questa vasta area è il più piccolo tratto di conduzione dell'aria (diametro inferiore ad 1 mm) e funge da collegamento con gli alveoli, la struttura respiratoria polmonare dove ha luogo lo scambio dei gas. Gli alveoli sono localizzati alla fine di circa 17 biforcazioni delle vie aeree accompagnate da altrettante riduzioni graduali dello spessore delle pareti polmonari [58].

Il sistema respiratorio può essere suddiviso anche a seconda delle sue funzionalità, in due diverse zone.

La **zona di conduzione** è costituita dalle prime 16 generazioni che includono la trachea (generazione 0) e tutte le seguenti biforcazioni fino ai bronchioli terminali [59]. Questa zona permette il trasporto del flusso d'aria dall'esterno all'interno dei polmoni durante il respiro.

La **zona respiratoria** è costituita dai bronchioli terminali e dai dotti e sacchi alveolari, ovvero tutte le strutture che partecipano allo scambio gassoso, e possiede una area superficiale molto elevata.

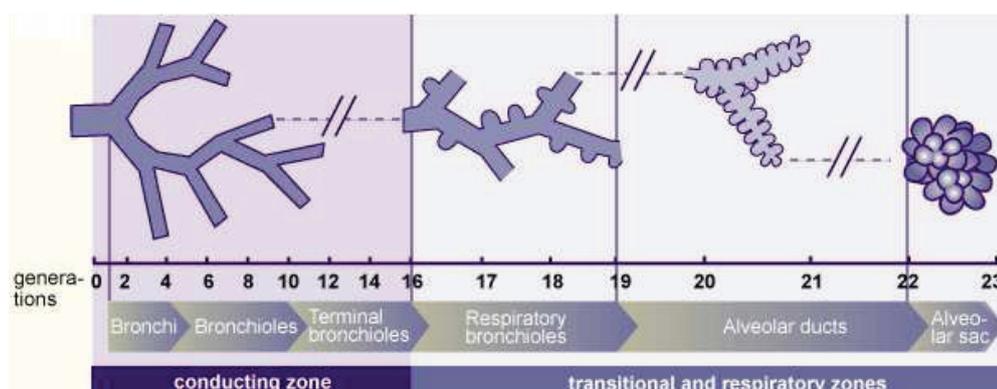


Fig.1.11: Schema delle generazioni delle vie aeree e divisione delle zone respiratorie

L'epitelio delle vie polmonari include vari tipi di cellule che svolgono differenti funzioni a seconda del particolare sito di localizzazione:

- **Cellule ciliate:** sono disposte sulla superficie del lume, si estendono dalla trachea fino ai bronchi terminali e sono le più numerose. Dalla loro superficie apicale sporgono le cilia, che ricoprono la mucosa e provvedono al moto, giocando un ruolo decisivo nella rimozione di piccole particelle inalate nei polmoni.
- **Cellule mucosali:** sono interposte tra le cellule ciliari e si estendono lungo tutto lo spessore dell'epitelio. La loro funzione principale è la secrezione di muco che è un fluido viscoso contenente protoglicani e glicoproteine. Esse coprono la superficie del lume e svolgono diverse funzioni: proteggono l'epitelio dalla disidratazione, promuovono la saturazione dell'aria inalata attraverso l'acqua del muco, reprimono la formazione di colonie batteriche grazie alla presenza nel muco di proteine antibatteriche (lisozima) e proteggono dalla inalazione di xenobiotici.

L'inefficacia della "*clearance*" può essere il risultato di disfunzioni ciliari o ipersecrezione mucociliare (come può avvenire nella fibrosi cistica o nella bronchite cronica) e trasformarsi in una infezione od ostruzione delle vie aeree. Tale situazione può influire negativamente sull'attività terapeutica di un farmaco a causa dell'incremento dello spessore dello strato mucosale che deve essere attraversato per poter permettere al farmaco di raggiungere il sito d'azione [60].

- **Cellule di Clara:** si trovano tra le cellule ciliate, ma non sono cellule ciliate in possesso di una superficie apicale di forma sferica. Sono cellule che prevenendo l'adesione al lume, in particolare durante l'espiazione attraverso la secrezione di agenti attivi di superficie (lipoproteine).
- **Pneumociti di tipo 1° e 2°:** costituiscono l'epitelio alveolare. I primi coprono circa il 95% dell'area superficiale alveolare e sono squamosi mentre i secondi

sono cellule secretorie cuboidali espresse tra il primo tipo ma localizzate principalmente nelle giunzioni. La quantità di queste cellule sono simile alle prime ma ricoprono solo il 5% della superficie alveolare. Sono cellule differenziate che si sostituiscono alle cellule di tipo primo in caso di danno.

Le cellule epiteliali di tipo 2° sono le uniche che a livello polmonare sono capaci di produrre tutti i componenti surfactanti. Questi agenti di superficie sono composti da circa il 90% (p/p) di lipidi (di cui 80-90% fosfolipidi) e il restante 10% da proteine. Questa composizione può differire in presenza di patologie [61].

A differenza della maggior parte dei lipidi presenti nei vari organi, i lipidi surfactanti sono caratterizzati da un elevato numero di catene di acidi grassi saturi, come la predominante dipalmoil-fosfatidil colina (DPPC) che contribuisce a conferire l'unicità ai tensioattivi polmonari [62]. La componente insatura è costituita da fosfatidilcolina (circa 35%), fosfatidilglicerolo (circa 10%), fosfatidilinositolo (circa 2%), fosfatidiletanolamina (circa 3%) e sfingomieline (circa 2,5%). La frazione proteica comprende una vasta varietà di sieroproteine e quattro apoproteine che sono associate a surfactanti e contribuiscono anch'esse a queste specifiche funzioni [62-64].

1.4.2. Deposito polmonare

Il sistema respiratorio limita l'entrata di corpi estranei utilizzando la particolare geometria anatomica delle vie aeree e i meccanismi di "clearance" polmonare [65]. I meccanismi che governano il deposito particellare polmonare sono: l'impatto inerziale, la sedimentazione gravitazionale, la diffusione, l'intercezione e l'attrazione elettrostatica [66]. Questi meccanismi possono differire principalmente a causa delle seguenti variabili:

- parametri di ventilazione
- morfologia del tratto respiratorio
- caratteristiche dell'aerosol

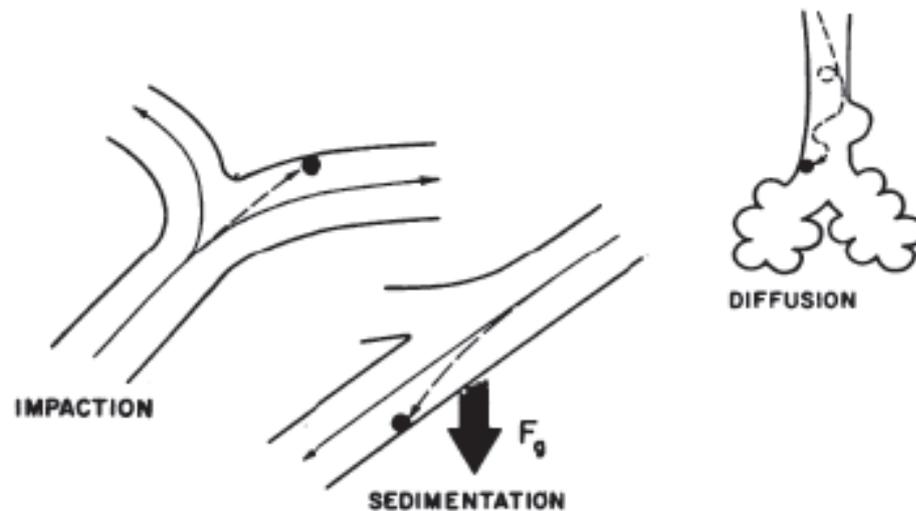


Fig.1.12: Meccanismi di deposito particellare nel tratto respiratorio

Impatto inerziale: definito come il deposito inerziale di una particella su una superficie aerea. Esso avviene principalmente in prossimità delle biforcazioni dei grandi rami di conduzione, dove la velocità del flusso è elevata e ci sono rapidi cambi di direzione.

Sedimentazione gravitazionale: avviene nei piccoli rami di conduzione, dove la velocità del flusso è bassa e solo per il particolato inferiore ai $5\mu\text{m}$ di diametro.

Diffusione: avviene nelle piccolissime vie di conduzione e negli alveoli, dove il flusso è veramente basso e solo per le particelle con diametri inferiori al micron (sotto $0.5\mu\text{m}$) soggette ai moti Browniani.

Intercezione: è importante solo per fibre e aggregati. Per queste particelle il deposito può avvenire quando entrano in contatto con la parete anche se il loro centro di massa potrebbe rimanere nel fluido [67-69].

Attrazione elettrostatica: le cariche elettrostatiche aumentano il deposito attraverso l'incremento delle forze attrattive verso le pareti, in particolare per particelle appena prodotte.

1.4.2.1. Parametri della ventilazione

Per pazienti con una predefinita morfologia il respiro è l'unico parametro che può essere regolato. Diversi studi hanno provato che il deposito polmonare totale è influenzato dal profilo del respiro e dalle condizioni fisiologiche dei polmoni. In particolare si è visto che un blando respiro è preferibile per una terapia inalatoria destinata ad un target situato nelle regioni più profonde dei polmoni. Inoltre la turbolenza all'interno dei dotti alveolari viene incrementata attraverso l'aumento della velocità di inalazione. Questo modifica il deposito all'interno dei polmoni, perché da un lato si aumentano i meccanismi di impatto nelle vie superiori, ma contemporaneamente dall'altro lato diminuiscono la sedimentazione e la diffusione a causa di un minor tempo di permanenza [70]. La velocità della distribuzione dell'aria all'interno dei polmoni è determinata dal volume corrente (quantità d'aria mobilizzata con ciascun atto respiratorio non forzato), per questa ragione la massa trasportata nelle regioni più profonde può essere migliorata incrementando il volume corrente, ovvero trattenendo il respiro per diversi secondi dopo l'inspirazione [71]. Le particelle con un'alta densità e un piccolo diametro geometrico hanno un leggero incremento della frazione di deposito rispetto ad altre aerodinamicamente simili, ma con bassa densità ed un maggiore diametro geometrico (tipica situazione di particelle porose) [70]. Questo può essere spiegato dal fatto che particelle con minore diametro geometrico si depositano principalmente per diffusione, essendo funzione del diametro geometrico ma questo è indipendente della densità.

1.4.2.2. Morfologia del tratto respiratorio

Variazioni individuali dell'anatomia respiratoria modificano il deposito particellare in diversi modi: i diametri delle vie aeree influenzano il moto particellare prima che il particolato entri a contatto con le pareti; la sezione delle biforcazioni determina la velocità del flusso e le variazioni dei diametri dei rami bronchiali influenzano le

caratteristiche tra il volume corretto e la riserva di aria nei polmoni [72]. Per le particelle con diametro aerodinamico sotto i $2\mu\text{m}$ i moti convettivi possono essere i più importanti fattori che influenzano l'efficienza del deposito. Ci sono quindi differenze individuali significative nell'anatomia del tratto respiratorio. La superficie dello strato mucosale definisce l'effettivo diametro delle conduzioni aeree per il flusso d'aria. Nei soggetti normali, lo strato mucosale nelle alte vie respiratorie è di circa $5\mu\text{m}$ mentre nei bronchioli terminali lo spessore può essere solo di $0-1\mu\text{m}$ e quindi le riduzioni delle traiettorie d'aria date dal muco sono trascurabili. In caso di soggetti con bronchiti invece, lo spessore di muco è elevato e si può accumulare in certi punti, dando origine a parziale o completa occlusione di alcune vie aeree. Il flusso d'aria attraverso queste vie parzialmente occluse probabilmente causerà un incremento del deposito di piccole particelle, determinato dall'impatto e dalla diffusione turbolenta [73].

Per di più le malattie come l'asma, il COPD, la fibrosi cistica ed il cancro polmonare possono modificare l'anatomia del tratto respiratorio mediante ostruzione o costrizione delle vie aeree.

1.4.2.3. Caratteristiche dell'aerosol

Un aerosol viene definito come un sistema costituito da particelle solide o liquide disperse in un mezzo gassoso capace di mantenerle sospese per il tempo necessario alla somministrazione. Il diametro per le particelle sferiche è definito come il diametro geometrico reale, mentre per quelle non sferiche si determina la proiezione dell'area e viene definito come il diametro geometrico equivalente. Un'altra importante convenzione è rappresentata dal diametro aerodinamico (equivalente) definito come il diametro di una particella sferica avente densità unitaria ($1\text{g}/\text{cm}^3$) e comportamento aerodinamico uguale (stessa velocità di sedimentazione in aria) alla particella considerata [66]. Questo parametro si calcola utilizzando la seguente formula:

$$d_{ae} = d_v \sqrt{\left(\frac{\rho_{part}}{\chi\rho_0}\right)}$$

Dove:

d_v = diametro geometrico della particella sferica a densità unitaria

ρ_{part} = densità della particella considerata

ρ_0 = densità della particella di 1g/cm³

χ = parametro della forma dinamica, equivale ad 1 nel caso di sfere perfette

Questo valore descrive il comportamento delle particelle all'interno del flusso e si basa non solo sul diametro volume, ma anche sulla loro forma e densità. Nel caso di aerosol polidispersi la distribuzione dimensione del diametro è caratterizzata dalla media dei diametri aerodinamici (MMAD, "mass mean aerodynamic diameter"). Usualmente la distribuzione dimensionale viene rappresentata attraverso una funzione logaritmica e descritta mediante la media geometrica e la deviazione standard geometrica. Con questi valori si può prevedere il deposito polmonare e quindi la loro applicazione, in quanto particelle con valori maggiori di 5 μ m tendono a fermarsi a livello della orofaringe. In questo caso non esplicano gli effetti clinici desiderati e possono determinare effetti collaterali a causa dell'assorbimento nel tratto gastrointestinale.

Le particelle di farmaco comprese tra i 2-5 μ m raggiungono invece il distretto polmonare, ed in particolare le zone più soggette alla nascita di un infiammazione o all'attacco di batteri patogeni, riuscendo a svolgere la loro azione terapeutica.

Particelle con diametro < di 2 μ m raggiungono gli alveoli e vengono assorbite nel circolo sanguigno. Tale caratteristica permette, mediante la somministrazione polmonare, di ottenere un'azione sistemica. Questa viene favorita da un aumento dell'area superficiale data dagli alveoli dotati di una ricca vascolarizzazione, che permette un rapido assorbimento del farmaco depositato; si evitano rischi di degradazione che spesso si verificano tramite somministrazione orale a causa del

passaggio nel tratto gastrointestinale; si evitano gli effetti metabolici dati dal primo passaggio epatico.

Il diametro aerodinamico è il parametro fondamentale per prevedere l'impatto e la sedimentazione del deposito particellare, mentre il meccanismo di diffusione, che riguarda principalmente le particelle $<$ di $0.5\mu\text{m}$, dipende unicamente dal diametro e non è influenzato dalla forma e dalla densità particellare.

In aggiunta al diametro, il profilo del deposito è determinato da altre peculiarità della polvere: le caratteristiche dello stato solido, l'igroscopicità, le forze interparticellari e la composizione chimica.

L'indice di cristallinità definisce la natura dello stato solido della polvere, determinando la presenza di strutture cristalline o amorfe, che possono influenzare le caratteristiche aereodinamiche della polvere [73].

L'indice igroscopico indica la tendenza che possiede la polvere a formare aggregati nel tempo. Un fattore complicato per le particelle idrofile è il cambiamento di diametro che avviene in condizioni di umidità, il quale può modificare significativamente il deposito e l'efficienza polmonare. Risulta quindi fondamentale evitare cambiamenti del contenuto di umidità della polvere, durante tutto il periodo di conservazione, cercando di mantenere il valore il più basso possibile. Questo valore viene influenzato dal metodo di preparazione della polvere e dalla natura dei componenti [74]. La presenza di forze interparticellari che si contrappongono alla dispersione delle particelle è l'aspetto più critico da verificare nello studio del comportamento aerodinamico della polvere. Le forze attrattive che portano alla formazione di agglomerati sono: le forze di Van der Waals, le forze capillari e le forze elettrostatiche. Le prime si generano fra dipoli indotti o permanenti e agiscono solo a brevissime distanze, mentre le ultime si formano dallo scambio di elettroni tra le superfici non conduttrici.

I sistemi altamente coesivi limitano la performance del processo di aerosolizzazione e di conseguenza il deposito polmonare [75]. La forza richiesta nell'aerosolizzazione e

L'aderenza delle particelle è direttamente proporzionale alla somma delle energie superficiali di particelle contigue ed inversamente proporzionale alla proiezione dell'area di contatto. Di conseguenza gli approcci per migliorare l'efficienza dell'aerosol sono la riduzione dell'energia libera superficiale oppure la modificazione della forma della particella al fine di limitare l'area di contatto. L'alterazione dell'energia superficiale può avvenire attraverso l'aggiunta di eccipienti durante la fase di preparazione [76-81] oppure mediante il controllo della cristallizzazione [82,83]. L'uso dello *"spray-drying"* si è rivelato un utile strumento per produrre polveri API fisicamente stabili e con rugosità variabile [84-87]. E' stato dimostrato infatti che la performance d'aerosolizzazione delle particelle contenenti Albumina bovina (BSA), con differenti gradi di corrugazione superficiale, può essere controllata variando le condizioni dello *"spray-drying"* durante la preparazione [84]. Recentemente la relazione tra morfologia, adesione ed efficienza, in modelli di polveri con diversi gradi di corrugazione, è stata determinata quantitativamente [88], evidenziando che all'aumentare della rugosità corrisponde un aumento del deposito particellare polmonare, probabilmente legato ad una riduzione dei punti di contatto con le pareti respiratorie.

1.4.3. "Delivery device"

I sistemi per la terapia inalatoria, per essere accettati, devono rispettare diversi criteri: essere costituiti da particelle con diametro inferiore ai 10 μ m (ideale compreso tra 0.5-5 μ m) con differenze in base al tipo di applicazione; produrre dosi di farmaco riproducibili; proteggere la stabilità chimico-fisica del farmaco; essere relativamente comodi e semplici da utilizzare.

Il sistema inalatorio ideale risulta essere di facile uso, non costoso e con un *"device"* portatile per migliorare la *"compliance"* del paziente. I *"device"* usati per ottenere un adeguato deposito polmonare si suddividono in: nebulizzatori, inalatori a dose controllata (MDI) e inalatori a polvere secca (DPI).

1.4.3.1. Nebulizzatori

Nella terapia inalatoria sono stati i primi ad essere utilizzati, generano aerosol a partire da sospensioni o soluzioni di farmaci in appropriati solventi [89]. Nelle soluzioni i principi attivi sono disciolti in un solvente con la formazione di una fase omogenea, mentre per i farmaci insolubili o instabili in soluzione si utilizza la sospensione ottenendo un sistema eterogeneo. Queste formulazioni possono contenere conservanti per inibire la crescita batterica [90].

I sistemi più utilizzati per questa categoria di *“device”* includono:

- Nebulizzatore a getto d'aria: l'aerosol è formato attraverso un flusso d'aria ad alta velocità, generata da una sorgente pressurizzata, direzionata contro un sottile strato di soluzione liquida. Ci sono differenti nebulizzatori, ma tutti seguono lo stesso processo, il flusso di gas passa attraverso un ugello e impattando con la soluzione di farmaco vi è la formazione del nebulizzato sotto forma di goccioline.
- Nebulizzatore ultrasonico: usa la rapida vibrazione di un cristallo piezoelettrico per generare le goccioline. La frequenza della vibrazione determina il diametro delle gocce della soluzione.

Nuove apparecchiature di *“device”* per gli spray liquidi includono l'uso dell'atomizzazione piezoelettrica, sistemi con ugelli micro-spray ad alta pressione e la generazione di nubi elettrostatiche.

Nonostante siano sistemi che non richiedono troppa cooperazione da parte dei pazienti e che permettono un alto dosaggio di medicamento hanno degli inconvenienti come la lunga durata della somministrazione, un debole controllo del sovradosaggio e costi elevati.

Per i nebulizzatori la quantità di farmaco inspirata equivale approssimativamente alla metà del dosaggio veicolato ma solo il 10% raggiunge il sito d'azione nell'albero respiratorio [72].

1.4.3.2. Inalatori pressurizzati a dose controllata (MDI)

Attualmente sono i più utilizzati per la somministrazione inalatoria, sono disponibili commercialmente come pressurizzati, sono maneggevoli e di facile utilizzo. Il medicamento, all'interno del contenitore, viene mescolato con un propellente e tale miscela viene espulsa in precise quantità in seguito all'attivazione del "device" [91].

La tecnica e la formulazione adottate per l'inalazione influenzano la risposta terapeutica. Il farmaco può essere sospeso o dissolto in un adatto propellente che viene pressurizzato fino a liquefarsi all'interno del contenitore. Il propellente liquefatto serve come fonte di energia per espellere la formulazione dalla valvola e come mezzo disperdente per il farmaco e gli altri eccipienti [92]. Per ottenere un buon deposito di farmaco è richiesta una coordinazione tra l'inalazione e l'attivazione del "device", questo risulta molto importante soprattutto per i bambini e gli anziani [93]. La tecnica inalatoria è stata migliorata con l'introduzione di spaziatori, che permettono al farmaco la permanenza all'interno del tubo per qualche secondo prima dell'inalazione, riducendo il problema del coordinamento del paziente.

Un problema ulteriore è dato dall'instabilità della natura fisica delle particelle di farmaco sospese nel propellente, che combinato con il design non ottimale della valvola, porta ad un dose non riproducibile dopo periodi di riposo prolungati. Inoltre la dose è somministrata a velocità molto elevate e questo può determinare un prematuro deposito orofaringeo e di conseguenza, un limitato deposito alveo-polmonare (10-20%). Parte del problema può essere superato con l'uso di sistemi che diminuiscono il flusso (Gentlehaler) [94].

1.4.3.3. Inalatori a polvere secca (DPI)

I DPI sono utilizzati dagli anni 50 e possiedono importanti vantaggi: assenza di propellenti e necessità di coordinamento o attivazione, perché questa avviene tramite il flusso inspiratorio del paziente [95].

I benefici di questi “*device*” risultano strettamente collegati al tipo di flusso respiratorio generato dal paziente, perché le malattie trattate usando questa via di somministrazione spesso peggiorano le funzionalità respiratorie e conseguentemente i pazienti non hanno un ottimale FEV (volume di forza espiratoria) [96].

Questi dispositivi sono attendibili solo se la turbolenza creata nella camera del “*device*” è disponibile per disperdere al meglio la polvere. Un flusso di 30L/min è un requisito facilmente ottenibile anche per pazienti con capacità polmonari compromesse (asmatici, bambini ed anziani) [97].

I DPI sono progettati per ottenere un rapido trasporto della polvere una volta rilasciata, usando l’inspirazione del paziente per inalare le particelle contenenti il farmaco [98,99].

Ci sono due tipi principali di DPI in commercio:

- “*device*” a **singola dose**: il primo ad essere utilizzato è stato lo Spinhaler® (Aventis), ma ne esistono di diversi tipi come si può notare dalla figura seguente.



Fig.1.13: Tipi di “*device*” a singola dose

Il meccanismo base è costituito dalla foratura della capsula, che contiene la formulazione, e dalla conseguente inspirazione del paziente. Questa inspirazione genera un flusso d'aria che fa ruotare velocemente la capsula e proietta la polvere all'interno dello stesso flusso [100].

- **“device” a dose multipla:** che si suddividono in altre due categorie. I primi sono i sistemi *“reservoir”* che contengono una grossa quantità di farmaco, rilasciata in piccole dosi terapeutiche dopo ciascuna attivazione (es. Turbohaler™ usato con β 2-agonisti e corticosteroidi separatamente o in combinazione) [101]. I secondi sono i sistemi a multipla unità di dose che utilizza preparati individuali e dosi di farmaco sigillate (es. Aerohaler™ usato con fenoterolo o ipratropio bromuro). Il design è molto simile ai *“device”* mono-dose, permette un alto grado di protezione dall'umidità e assicura l'uniformità di dosaggio.

1.4.3.4. Caratteristiche delle formulazioni per DPI

Il comportamento delle particelle durante l'inalazione è altamente dipendente dalle caratteristiche della formulazione e per questo motivo le proprietà fisiche inerenti all'attivo e alla formulazione finale devono essere ben valutate. Il raggiungimento delle più profonde porzioni dell'apparato respiratorio dovrebbe essere teoricamente possibile solo mediante uno stretto controllo del diametro delle particelle [102]. Come descritto in precedenza il parametro maggiormente usato per definire il diametro particellare e che meglio descrive il deposito nel tratto respiratorio è il diametro aerodinamico delle particelle. Convenzionalmente l'ottimizzazione delle caratteristiche aereodinamiche richiede la riduzione del diametro al di sotto dei 5 μ m. Tali particelle sono conformi al deposito nel tratto polmonare, ma certi metodi di riduzione del diametro, come la macinatura (*“jet-milling”*), può determinare cambiamenti delle proprietà fisiche delle particelle [104,105]. Per superare questi effetti lo *“spray-drying”* può essere una valida alternativa, dato che permette di produrre facilmente particelle con un ampio range dimensionale [105]. Una strategia

molto attraente nella preparazione delle particelle è la possibile manipolazione sia del diametro che della densità. In quanto particelle superiori ai 6µm possono ancora penetrare all'interno della regione alveolare purchè il loro diametro aerodinamico medio sia compreso tra 1-3µm, che corrisponde ad una densità particellare inferiore a 0.4g/cm³ [106].

E' possibile utilizzare diverse tecniche di produzione per ottenere polveri micronizzate adatte alla veicolazione polmonare. Queste tecniche, oltre alla classica a letto fluido, includono lo "*spray-drying*", lo "*spray freeze-drying*" e l'estrazioni tramite fluidi supercritici.

L'uso di tecniche avanzate di ingegneria particellare permettono l'ottimizzazione della frazione fine particellare (FPF) e un incremento della capacità di aerosol o di dissoluzione del farmaco [107,108].

Le particelle sono costituite anche da altri eccipienti che devono essere approvati ed autorizzati per l'impiego nelle formulazioni inalatorie. Il carrier più utilizzato è la fosfatidilcolina in quanto è naturale ed è presente nei surfactanti polmonari.

1.4.4. Terapie asmatiche

L'asma è una malattia infiammatoria cronica delle vie aeree bronchiali nella quale giocano un ruolo fondamentale numerose cellule, in particolare i mastociti, gli eosinofii e i linfociti T. Nei soggetti predisposti questa infiammazione provoca episodi ricorrenti di respiro sibilante, difficoltà respiratoria, senso di costrizione toracica e tosse. Questi sintomi sono di solito associati con diffusa ma variabile broncocostrizione reversibile dopo terapia con broncodilatatori o spontaneamente. L'infiammazione provoca anche un aumento della risposta delle vie aeree a numerosi stimoli più o meno specifici. La definizione di asma nel tempo ha cambiato significato e non considera unicamente le modificazioni funzionali e quindi solo il broncospasmo, ma anche il ruolo determinante dell'infiammazione nella genesi dei sintomi e delle alterazioni funzionali.

Le classi di farmaci maggiormente usate nel trattamento dell'asma cronico sono:

- **Broncodilatatori**
 - β 2-agonisti: rilassano i muscoli lisci bronchiali; diminuiscono la degranolazione delle mast cellule e il rilascio d'istamina; inibiscono la fuoriuscita microvascolare nelle vie aeree e aumentano la "clearance" mucociliare.
 - Anticolinergici: rilassano la muscolatura liscia bronchiale attraverso l'inibizione competitiva dei recettori muscarinici colinergici (M3).
- **Corticosteroidi:** inibiscono l'infiammazione mediante la regolazione inversa dei β recettori; inibiscono la produzione di citochine e l'attivazione delle proteine adesive.
- **Leucotrieni modificati**
- **Stabilizzatori delle mast cellule:** inibiscono il rilascio d'istamina dalle cellule; bloccano sia prematuramente che successivamente la risposta agli allergeni.
- **Metilxantine:** rilassano la muscolatura liscia mediante l'inibizione della fosfodiesterasi e possono migliorare la contrattilità miocardica secondo meccanismi sconosciuti.

1.4.5. Corticosteroidi

La somministrazione di glucocorticoidi, come agenti anti-infiammatori, è la più efficace ed utilizzata terapia inalatoria, per il trattamento di pazienti con asma e rinite allergica oppure per malattie croniche avanzate di ostruzioni polmonari. Questo gruppo di farmaci esercita una varietà di azioni sul rilascio dei mediatori, includendo l'inibizione della secrezione di metaboliti dalle cellule infiammatorie e la generazione dei metaboliti della ciclossigenasi e lipossigenasi dall'acido arachidonico. I corticosteroidi producono un effetto biologico attraverso la diffusione nelle cellule, l'interazione con il recettore citoplasmatico e l'induzione o la repressione della sintesi di varie proteine.

La budesonide, il trimcinolone acetone e il fluticasone propionato sono tutti glucocorticoidi e possiedono un elevato grado di inattivazione tramite primo passaggio epatico della frazione inghiottita, ma nessuna evidenza di metabolismo epatico nella frazione direzionata ai polmoni [109,110]. Risulta che la biodisponibilità polmonare dei glucocorticoidi è probabilmente determinata dalla complessiva esposizione sistemica. L'efficacia degli agenti inalatori nel tratto respiratorio dipendono dal sito di deposito e dalle proprietà chimico-fisiche del farmaco. Quest'ultime determinano il grado di dissoluzione e di conseguenza l'assorbimento sistemico, il metabolismo e l'eliminazione del farmaco. Se il farmaco si deposita nelle vie aeree superiori la "clearance" mucociliare agisce prima della dissoluzione e dell'assorbimento, mentre se il farmaco arriva nelle basse vie aeree potrebbe essere eliminato dai macrofagi tramite la fagocitosi [111]. Tuttavia la velocità della "clearance" dei macrofagi è molto inferiore rispetto a quella mucociliare. Particelle insolubili possono quindi rimanere giorni a livelli alveolare prima di essere completamente rimosse dai macrofagi a seconda del loro diametro, della forma e del caricamento [112]. I medicinali utilizzati per le malattie respiratorie sono veicolati principalmente mediante DPI o MDI per il trasporto delle particelle solide nelle regioni alveolari. Le particelle sono di diametro molto piccolo e quindi si prevede un'alta velocità di dissoluzione del farmaco grazie all'elevatissima area superficiale. Tuttavia i glucocorticoidi sono composti poco solubili in acqua e il processo di dissoluzione può essere uno step limitante per la loro azione e per l'assorbimento sistemico. Inoltre sono composti idrofobici con il seguente grado di lipofilia: FP > BD > TA [113].

Il beclometasone dipropionato, la budesonide e altri farmaci a struttura steroidea sono stati ampiamente utilizzati per via inalatoria, per la comprovata efficacia, sebbene oggi non esista una uniformità di risultati clinici a causa delle numerose variabili che entrano in gioco per ciascuna forma farmaceutica. Inoltre solo una minima frazione di farmaco aerosolizzato si deposita nei polmoni mentre gran parte

del farmaco viene ingerito, assorbito dal sistema gastrointestinale provocando effetti collaterali a livello sistemico. Inoltre, la percentuale di farmaco che si deposita a livello polmonare ha una scarsa o assente capacità di diffusione attraverso la mucosa polmonare così che si ha un effetto terapeutico prettamente superficiale.

A tal fine, la moderna ricerca tecnologico-farmaceutica è attualmente indirizzata verso l'incapsulazione dei farmaci antiasmatici all'interno di opportuni sistemi di veicolazione tra i quali quelli maggiormente studiati sono i liposomi, i niosomi e le nano e microparticelle. Il principio attivo viene incapsulato in opportuni carrier al fine di determinare la sua penetrazione nel distretto dell'organismo dove dovrà espletare l'azione terapeutica. Inoltre, il complesso farmaco-carrier ha l'importante vantaggio di diminuire l'insorgenza di spiacevoli effetti indesiderati, i quali sono spesso la principale causa dell'abbassamento della "*compliance*" da parte del paziente.

2. SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo della tesi riguarda lo sviluppo e l'ottimizzazione di carrier particellari lipidici "*solvent-free*" per la somministrazione topica e polmonare, al fine di ottenere sistemi di veicolazione di principi attivi aventi una migliore biocompatibilità e stabilità, una maggiore "*compliance*" per il paziente ed un rilascio del farmaco dalla matrice modulato nel tempo.

Nel campo topico, i filtri solari più comunemente usati verranno incapsulati all'interno di microparticelle lipidiche per ridurre l'assorbimento transdermico e/o limitarne la fotodegradazione. Valutando i possibili effetti sinergici di fotostabilità in presenza di molecole fotostabilizzanti, allo scopo di ottenere sistemi ad ampio spettro d'azione, requisito obbligatorio per le attuali preparazioni in commercio. Inoltre, si osserverà la stabilità e l'efficacia di tali sistemi in seguito all'incorporazione in formulazioni topiche, che simulano le condizioni reali d'utilizzo dei prodotti solari, cercando di correlare gli studi di penetrazione cutanea in-vivo con quelli in-vitro. Infine, si cercherà di sviluppare sistemi particellari con un elevato contenuto di filtri allo scopo di ridurre la quantità di microparticelle da incorporare nella formulazione per ottenere una fotoprotezione sufficiente.

Nel campo inalatorio, la ricerca si baserà sullo studio di farmaci corticosteroidi nel trattamento dell'asma. La premessa è quella di ottenere sistemi particellari biocompatibili con diametri idonei alla terapia polmonare, parametro fondamentale per la veicolazione dell'aerosol. Grazie al carrier lipidico si cercherà di associare a questo aspetto un rilascio controllato del principio attivo in situ, al fine di minimizzare i problemi di accumulo polmonare e di prolungare l'effetto terapeutico del farmaco. La possibilità di ridurre il numero di somministrazioni risulta particolarmente importante in certe forme di asma, nelle quali si richiede un effetto prolungato nel tempo ad esempio per la terapia di eventuali attacchi notturni.

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1. MATERIALI E METODI

3.1.1. Materiali

Il butilmetossidibenzoilmetano, l'octildimetilaminobenzoato, il 4-metilbenziliden canfora e l'octilmetossicinnamato sono stati forniti dalla Merck (Darmstadt, Germania). L'octocrilene è stato acquistato dalla BASF (Ludwigshafen, Germania) e la budesonide è stata acquistata da Yicheng Chemical Corp (Jiangsu, Cina).

Per la preparazione delle microparticelle, la tristerina, la fosfatidilcolina e l'acido stearico sono stati forniti dalla Fluka (Milano, Italia), il glicerilbenato (Compritol[®] 888 ATO) ed il poloxamer 188 (Lutrol[®] F68) rispettivamente da Gattefossè (Cedex, Francia) e BASF (Ludwigshafen, Germania); la cera carnauba dalla Polichimica (Bologna, Italia) ed il Pluronic F-68 (Pluronic[®] BASF Corp.) dalla Sigma-Aldrich (St.Luis, USA).

Il Miglyol 812 (trigliceride capro/caprilico) ed il glicole propilenico utilizzati per le prove di rilascio sono stati acquistati da Polichimica (Bologna, Italia) e dalla Polichimica (Bologna, Italia) rispettivamente. I vari eccipienti utilizzati per la preparazione del fluido polmonare simulato sono stati prodotti da AnalR[®]-BDH (Kilsyth, Victoria, Australia), Ajax Chemicals (Sydney, NSW, Australia) e Standard Laboratories Pty (Melbourne, Victoria, Australia).

Gli eccipienti per la preparazione delle emulsioni sono stati forniti da Sigma Aldrich (Steinheim, Germania) ed Henkel (Fino Mornasco, Italia). Lo scotch (Crystal 600, 19mm) per il "*tape-stripping*" è stato acquistato da 3M (Francia).

La metil- β -ciclodestrina è stata prodotta da Aldrich Chimica (Milano, Italia), la fosfatidilcolina idrogenata dalla Fluka Chemie (Buchs, Svizzera)

I solventi metanolo, acetonitrile ed acqua per cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC) sono stati forniti dalla Merck (Darmstadt, Germania).

Gli altri reagenti utilizzati erano tutti di grado analitico (Sigma, Milano, Italia).

3.1.2. Preparazione Microparticelle Lipidiche

Le microparticelle sono state preparate con diverse metodiche:

- Tecnica della fusione a caldo (Fig.3.1)
- "Spray Congealing"
- "Spray Drying"

3.1.2.1. Tecnica della fusione a caldo

Nella preparazione delle microparticelle con la tecnica di fusione il lipide viene fatto fondere in bagno termostato ad una temperatura di circa dieci gradi maggiore al suo punto di fusione; il tensioattivo viene disperso in acqua deionizzata e scaldato alla stessa temperatura del lipide.

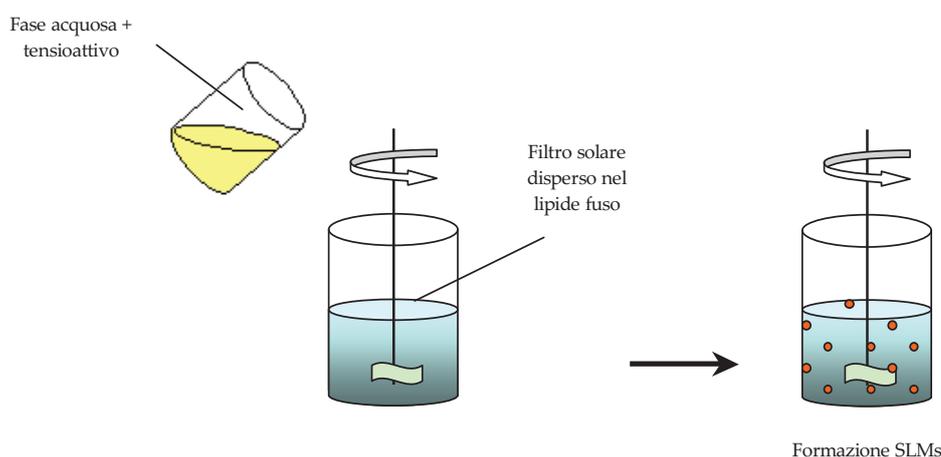


Fig.3.1: Rappresentazione schematica della preparazione di microparticelle.

I principi attivi sono stati dispersi direttamente nel lipide fuso o solubilizzati in 1ml di solvente (etanolo, acetone) ed aggiunti alla fase oleosa. La fase acquosa viene emulsionata con quella oleosa ad una velocità compresa tra 10000-16500 rpm per 2

minuti mediante UltraTurrax. L'emulsione ottenuta viene fatta raffreddare in bagno di ghiaccio sotto agitazione magnetica e le microparticelle formate vengono separate per centrifugazione (6000rpm per 15 minuti) e liofilizzate.

Nel caso della preparazione di microparticelle contenenti la Budesonide, durante l'emulsione viene sottoposta ad ultrasuoni (Model 450, Branson Ultrasonics Corporation, USA a ciclo costante 20kHz ed a una potenza di 450W). Inoltre, le particelle vengono essiccate mediante "spray drying" utilizzando un Buchi Mini Spray Dryer B-290 (Buchi Laboratory-Techniques, Switzerland) nelle seguenti condizioni: temperatura d'entrata di 65°C; temperatura d'uscita 39-41°C; flusso d'aria dello spray di 800l/h; flusso d'aria secco 40m³/h; flusso della soluzione 2.9ml/min; diametro del foro 0.5mm. Le polveri ottenute sono state conservate in contenitori con gel di silice per almeno 48h prima dell'utilizzo.

3.1.2.2. "Spray Congealing"

Il sistema di "spray congealing" utilizzato è equipaggiato con uno speciale "wide pneumatic nozzle" [22], un nebulizzatore a due componenti azionato ad aria compressa. Il lipide (cera carnauba) è stato scaldato ad una temperatura di 10°C al di sopra del proprio punto di fusione (89°C), mentre il tensioattivo (fosfatidilcolina) ed il filtro solare (BMDBM) sono stati aggiunti, sotto agitazione magnetica per ottenere un fluido uniforme, nella camera termostata al di sopra di un ugello pneumatico ("wide pneumatic nozzle"). La principale differenza di questo tipo di atomizzatore rispetto al metodo tradizionale è che il diametro interno dell'orefizio è più largo (4.5mm) e che lavora sfruttando l'effetto Venturi.

L'effetto Venturi descrive il fenomeno che avviene quando un fluido che scorre attraverso un condotto viene forzato a passare attraverso un foro di piccole dimensioni. Tale restringimento del condotto causa una diminuzione di pressione e quindi il fluido viene aspirato verso il foro di uscita. La configurazione di questo venturimetro è insolita, perchè contrariamente a quanto avviene negli altri

dispositivi, l'aria viene alimentata in direzione radiale, mentre il liquido viene introdotto assialmente e procede con percorso rettilineo (Fig.3.2).

Quindi in questo tipo di venturimetro un getto d'aria investe il materiale fuso in caduta, provocando, nel punto C, la nebulizzazione del materiale e la formazione di goccioline che, essendo accelerate in maniera minima dall'aria, cadono formando un cono di diametro ristretto (circa 90°). Questo sistema richiede un modesto consumo di aria e genera una nebulizzazione uniforme.

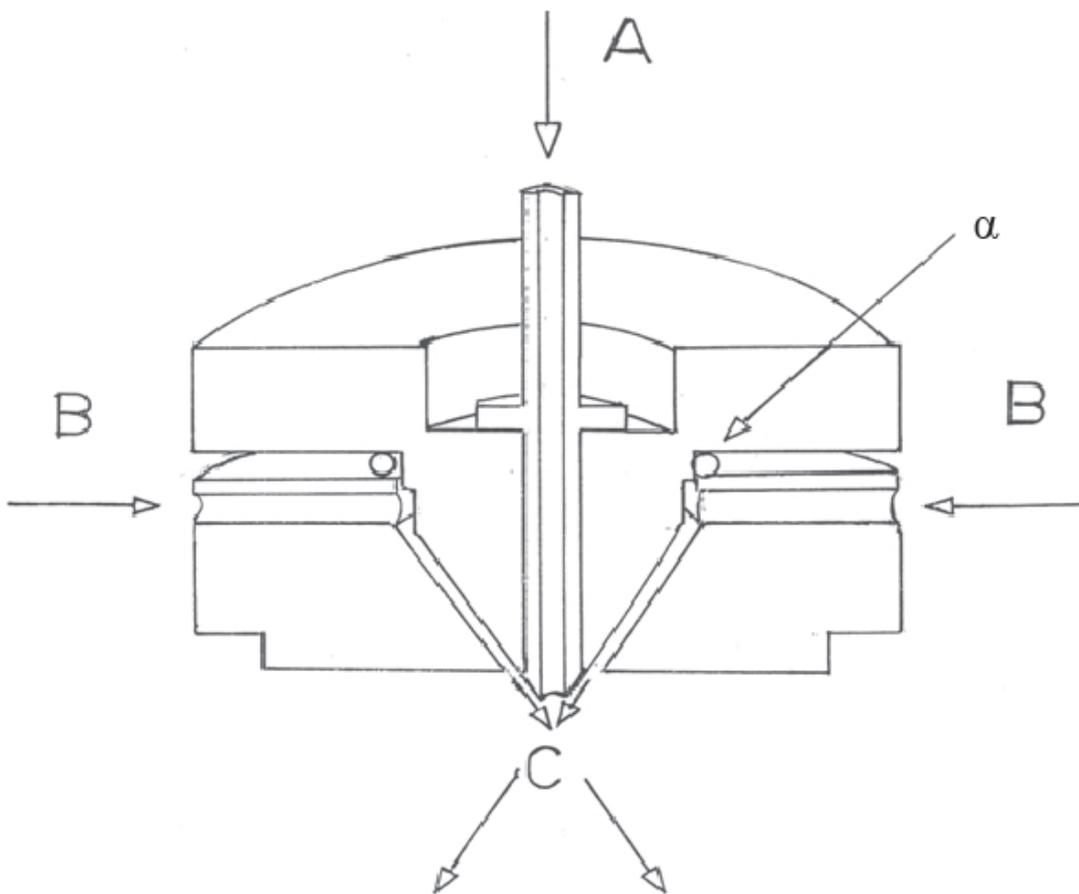


Fig.3.2: Schema dell' ugello a venturimetro

(A: entrata del materiale fuso; B: entrata aria di condizionamento; C: scarico)

In pratica l'ugello di nebulizzazione è connesso a tre tubi, posti ad una distanza di 120° l'uno dall'altro e perpendicolarmente rispetto al cono d'entrata del materiale,

che permettono l'ingresso di aria compressa a temperatura ambiente, la quale viene incanalata verso la punta dell'ugello stesso: qui si crea un effetto di risucchio del materiale fuso caricato superiormente e la nebulizzazione. L'atomizzazione porta alla formazione di gocce della miscela fusa che solidificano a temperatura ambiente e vengono raccolte all'interno di una camera.

L'ugello posizionato a circa 200cm di altezza e in posizione perfettamente perpendicolare al terreno, è riscaldato per mezzo di resistenze ad una temperatura di poco superiore al punto di fusione dell'eccipiente più altofondente, al fine di evitare la solidificazione del materiale all'interno dello strumento.

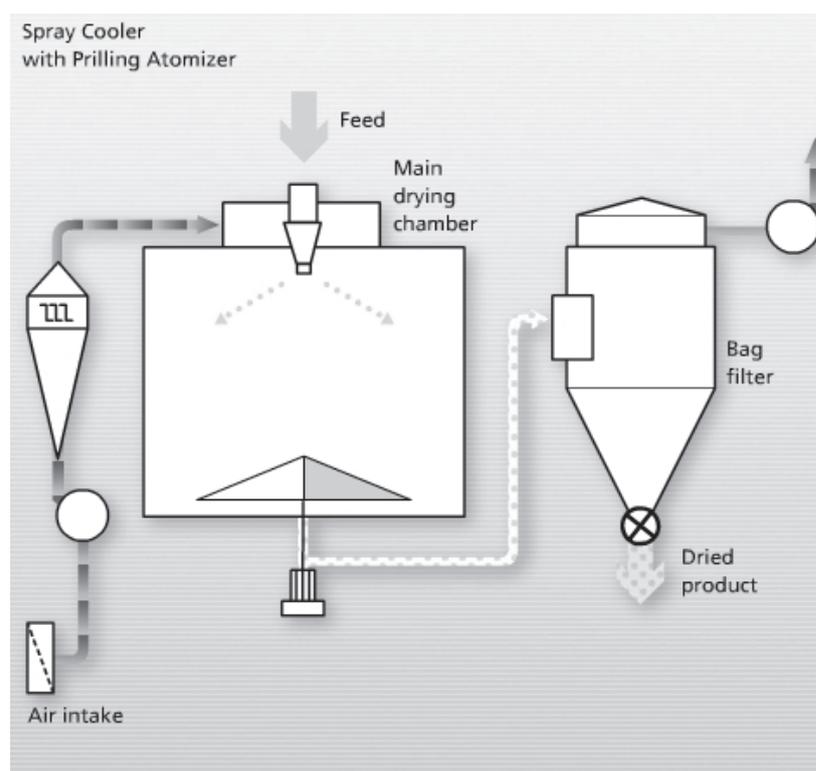


Fig.3.3: Schema generale del funzionamento dello "Spray-Congelamento"

Una volta ottenuto il composto fuso, si procede con il caricamento sullo strumento precedentemente impostato, regolando la temperatura di riscaldamento dell'ugello e il flusso di aria in entrata. L'aria in entrata viene mantenuta alla pressione stabile di

2atm; la temperatura dell'ugello (120°C) è portata a valori più alti del punto di fusione del carrier per evitare una eventuale solidificazione del materiale e l'otturazione dell'ugello.

3.1.2.3. "Spray Drying"

Questo strumento è stato utilizzato per ottenere microparticelle di sola budesonide con diametro simile alle particelle lipidiche prodotte tramite la tecnica di fusione a caldo. Le particelle amorphe e cristalline di budesonide sono state preparate con lo "spray-drying" ad una concentrazione di 1.75% (m/m) di budesonide in etanolo al 95%, secondo le seguenti condizioni: temperatura d'entrata 100°C; temperatura d'uscita 66°C; flusso di N₂ 380L/h; flusso di N₂ secco 40m³/h; flusso della soluzione 8.9ml/min; diametro foro 0.5mm.

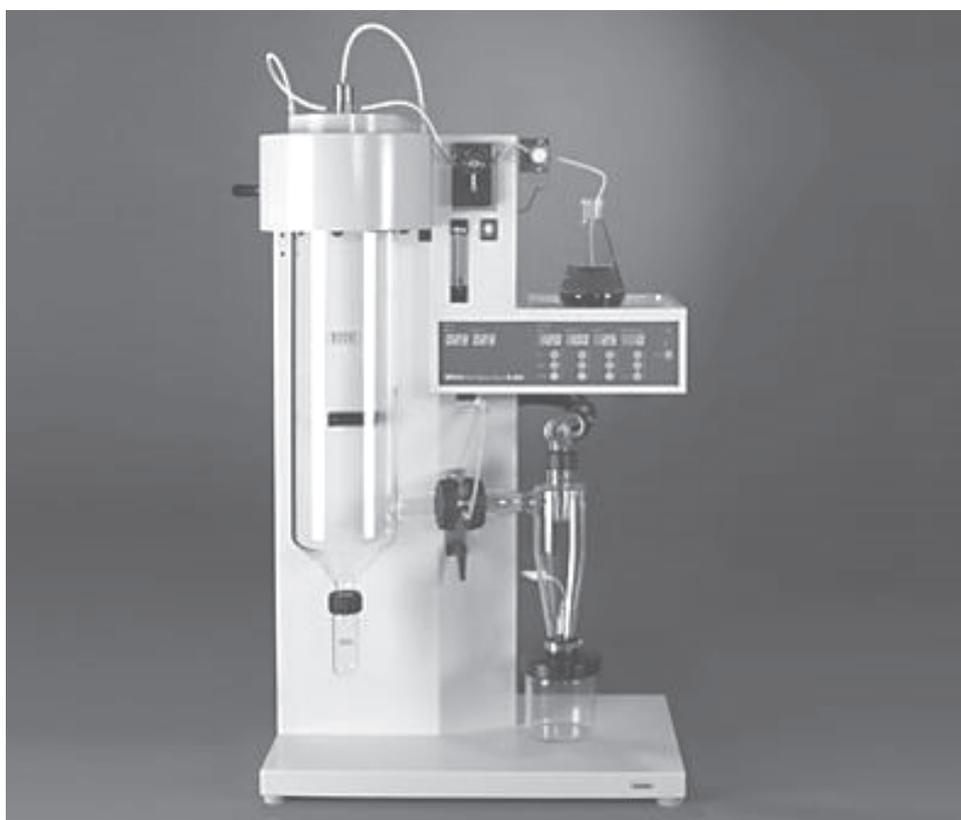


Fig.3.4: Immagine dello "Spray-Drying"

3.1.3. Cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC)

Sono stati utilizzati due diversi sistemi. Il primo apparato HPLC utilizzato è costituito da una pompa modello Lab Flow 3000; un rivelatore UV-Vis a lunghezza d'onda variabile (modello 975-UV, Jasco, Tokyo, Giappone) collegato ad una valvola di iniezione (modello 7125, Rheodyne, Cotati, Ca, USA) con capillare di campionamento ("loop") da 20 μ l.

L'acquisizione e l'elaborazione dei dati sono realizzati mediante il software Borwin (JBMS Developpements, Le Fontanil, Francia). L'iniezione del campione è stata effettuata con una microsiringa da 10 μ l (modello 80365, Hamilton, Bonaduz, Svizzera). È stata utilizzata una colonna Zorbax CN impaccata con particelle da 5 μ m (150 x 3.0 mm di diametro interno; Agilent Technologies, USA) e fornita di un'opportuna pre-colonna (Phenomenex, USA). Le analisi sono state effettuate con una fase mobile costituita da metanolo-acetonitrile-acqua, in condizioni isocratiche ad un flusso compreso tra 0.4-1.0ml/min.

L'identità dei picchi dei filtri solari è stata verificata mediante confronto del tempo di ritenzione con quello del corrispondente standard.

Il secondo apparato HPLC utilizzato per le analisi della budesonide è costituito da un Waters 600 model Controller, da un rivelatore modello 2487 a doppia lunghezza d'onda ed una pompa modello 515 collegata ad un autocampionatore modello 717plus con volume d'iniezione pari a 100 μ l. Le analisi sono state effettuate con una colonna Waters Nova-Pak C-18 a 280nm e con un flusso di 1.0ml/min. La fase mobile utilizzata è costituita da 65:35 (v/v) metanolo/acqua.

3.1.4. Efficienza di incapsulazione

Una quantità esattamente pesata di microparticelle (30-100mg) è stata dispersa in etanolo e sottoposta a sonicazione per 15-20 minuti. Successivamente il campione è stato trasferito in un matraccio tarato, filtrato utilizzando filtri con pori di diametro di 0.45 μ m (filtri Whatman, 0.45 μ m) ed analizzato mediante spettroscopia UV (Model

lambda 3B, Perkin-Elmer) o HPLC per determinare la concentrazione dei principi attivi in soluzione.

3.1.5. Caratterizzazione delle Microparticelle

Le microparticelle sono state caratterizzate mediante microscopio a scansione elettronica (SEM, Cambridge Stereoscan 360, Cambridge Instruments, Bar Hill, UK). La dimensione delle microparticelle è stata determinata attraverso analisi computerizzate delle immagini (Micrometrics™ camera 122CU e software Vision 1.0) ottenute mediante microscopio ottico (Nikon Diaphot inverted microscope, Tokio, Japan). Sono state analizzate almeno 100 microparticelle per ogni tipo di preparazione.

Nello studio sulla budesonide le dimensioni delle microparticelle sono state determinate attraverso diffrazione laser utilizzando lo strumento Mastersizer® 2000-Scirocco® 2000 (Malvern Instruments, Malvern, UK). I campioni di polveri sono stati dispersi usando lo "Scirocco dry dispersion unit" (Malvern, UK) ad una pressione di 4 bar e con un intervallo medio del 50%. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplo e sono stati oscurati i valori compresi tra 0.3% e 10%. La distribuzione particellare è stata determinata utilizzando un indice di rifrazione pari a 1.6 sia per il lipide che per la budesonide. La morfologia delle varie polveri di budesonide è stata studiata utilizzando un microscopio a scansione elettronica (SEM) a 5keV (Zeiss Ultra plus, Carl Zeiss Pty Ltd, Sydney, Australia). Le immagini sono state raccolte in maniera casuale con 3 diversi ingrandimenti (1000x, 5000x e 10000x). I campioni sono stati ricoperti di oro con uno spessore approssimativo di 15-20nm.

3.1.6. Diffrazione ai raggi X

I diffrattogrammi dei raggi X sono stati ottenuti con un diffrattometro per polveri D 5000 (Siemens, Munich, Germania) usando per il generatore un voltaggio di 45kV e una corrente di 25mA con un anodo di rame. Lo strumento è dotato di un

monocromatore a grafite e la lunghezza d'onda della radiazione incidente è pari a 1.5406 Å.

I diffrattogrammi sono stati registrati a partire da 3° (2θ) fino a 50° (2θ) ad una velocità angolare di 1° (2θ) per secondo usando la prima, la seconda e la terza fenditura da 1°, mentre la quarta da 0.15°.

3.1.7. Calorimetria a scansione differenziale

La risposta termica dei campioni di microparticelle è stata analizzata utilizzando un calorimetro a scansione differenziale (DSC823e, Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach, Svizzera). Sono stati pesati approssimativamente 5mg di polvere ed esaminati in un range tra 20°C e 300°C con un incremento di temperatura pari a 10°C/min.

3.1.8. Prove di rilascio in vitro

Quantità esattamente pesate di principi attivi liberi o incapsulati sono stati dispersi in glicole propilenico o Miglyol 812 (50-100ml) e tenuti in agitazione a 37°C a 100 rpm su piastra rotante. Ad intervalli di tempo regolari si preleva dalla sospensione un'aliquota (1-2ml) che viene reintegrata con solvente fresco. I campioni vengono filtrati utilizzando filtri con pori di diametro di 0.45µm ed analizzati mediante spettroscopia UV o tramite HPLC.

3.1.9. Studi di diffusione/dissoluzione in vitro

Per determinare il profilo di diffusione/dissoluzione della budesonide nelle differenti formulazioni di polveri è stato utilizzato l'apparato 4 della Farmacopea Britannica [114] modificato. Questo metodo è descritto nel dettaglio da Salama et al., [115].

In breve, circa 25mg di ML o 1,0mg di budesonide sono stati pesati e inseriti sopra un filtro a membrana (Pall HT Tuffryn 0.2µm, Pall Corporation, New York, USA). Un secondo filtro è stato utilizzato per coprire le polveri e tramite altri 2 dischi metallici

sono stati inseriti all'interno della cella a flusso.



Fig.3.5 : Immagine del sistema utilizzato

Il mezzo di dissoluzione (50ml, 37°C) è stato fatto passare attraverso la cella a flusso, all'interno di un sistema chiuso costituito da tubi Tygon® (59mm, Saint Gobain Performance Plastics, USA) e ad una pompa peristaltica (velocità stabile) con un flusso di 1.5ml/min. L'area esposta al flusso è pari a 2.5cm di diametro e la direzione del flusso viene mantenuta verticale per evitare volumi morti.

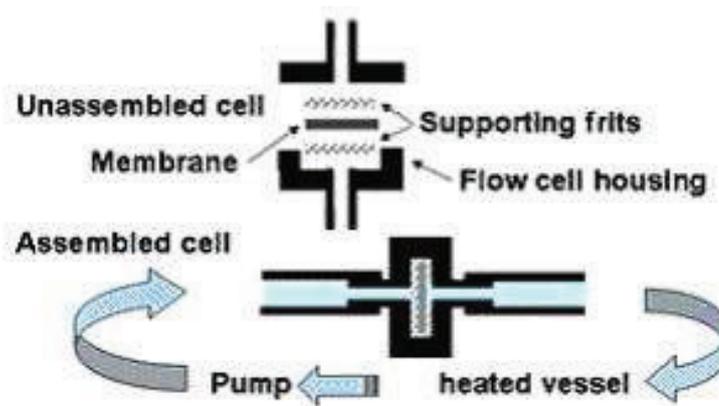


Fig.3.6: Schema funzionamento cella a flusso

A intervalli di tempo aliquote di 1ml del mezzo vengono prelevate e reintegrate con pari volume di solvente fresco. Alla fine dell'esperimento la cella viene deassemblata ed il particolato rimanente viene disciolto e testato per ottenere il recupero della massa totale. Sono stati utilizzati con due differenti mezzi di dissoluzione: tampone fosfato (0.05M PBS, pH 7.4) e fluido polmonare simulato (SLF, vedi tabella seguente) a pH 7.4 [116,117]. Ogni formulazione è stata testata 5 volte con ciascun mezzo.

Ioni	Composizione fisiologica [a]	Fluido polmonare simulato (SLF) [b]
Calcio, Ca ²⁺	5	5
Magnesio, Mg ²⁺	2	2
Potassio, K ⁺	4	4
Sodio, Na ⁺	145	145
Totale cationi	156	156
Bicarbonato, HCO ³⁻	31	31
Cloruro, Cl ⁻	114	114
Citrato, H ₅ C ₆ O ₇ ³⁻	-	1
Acetato, H ₃ C ₂ O ₂ ⁻	7	7
Fosfato, HPO ₄ ²⁻	2	2
Solfato SO ₄ ²⁻	1	1
Proteine	1	-
Totale anioni	156	156
pH	7.3-7.4	7.3-7.4
[a] Diem e Lenter (1970) ; [b] Moss (1979)		

Tab. 3.1: composizione del fluido polmonare e del fluido polmonare simulato (mEq/l)

3.1.10. Preparazione emulsioni

Sono state preparate emulsioni contenenti i filtri solari in forma libera o incapsulati in microparticelle. Le materie prime utilizzate per la preparazione delle emulsioni e le relative concentrazioni sono riportate in tabella.

Fase oleosa	% p/p	Fase acquosa	% p/p
Principi attivi (filtri solari)	1 – 3	Glicerina	2
Sorbitano monostearato	2	EDTA	0.1
PolioSSI-sorbitano monostearato	4.5	Acido deidroacetico	0.1
Alcool cetilstearylco	5 – 7	Na-benzoato	0.1
Octilpalmitato/ Isopropilisostearato	5 – 9	H ₂ O	66-67
Vasellina	5 – 6		
Butil idrossi anisolo (BHA)	0.02 - 0.05		

Tab.3.2: Ingredienti dell'emulsione O/A.

Si procede con la preparazione della fase acquosa e della fase oleosa pesando in successione i diversi componenti. Il filtro libero viene solubilizzato all'interno della fase oleosa mentre il BHA viene disperso a parte con una porzione dell'isopropilisostearato. Sia la fase acquosa che quella oleosa vengono scaldate (60-70°C) fino a completa solubilizzazione dei componenti. La fase acquosa viene aggiunta gradualmente e sotto agitazione (6500 rpm) a quella oleosa, ottenendo così un'emulsione O/A per inversione di fase. Si lascia raffreddare e a temperatura ambiente si aggiunge, sempre sotto agitazione, il BHA solubilizzato in isopropilisostearato.

Le formulazioni con i filtri solari incapsulati all'interno delle microparticelle sono preparate disperdendo in una parte dell'acqua utilizzata per la preparazione le micro particelle, che vengono poi aggiunte nella fase di raffreddamento (40°C).

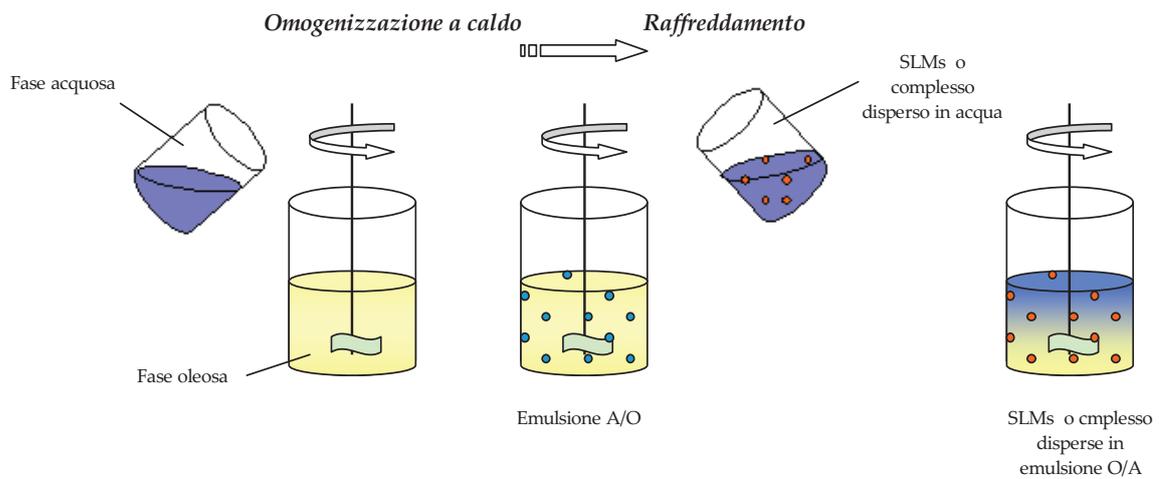


Fig. 3.7: Rappresentazione schematica della preparazione dell'emulsione.

3.1.11. Studi di assorbimento transdermico in vitro

Gli studi sono stati condotti con celle di Franz statiche (Fig.3.8).

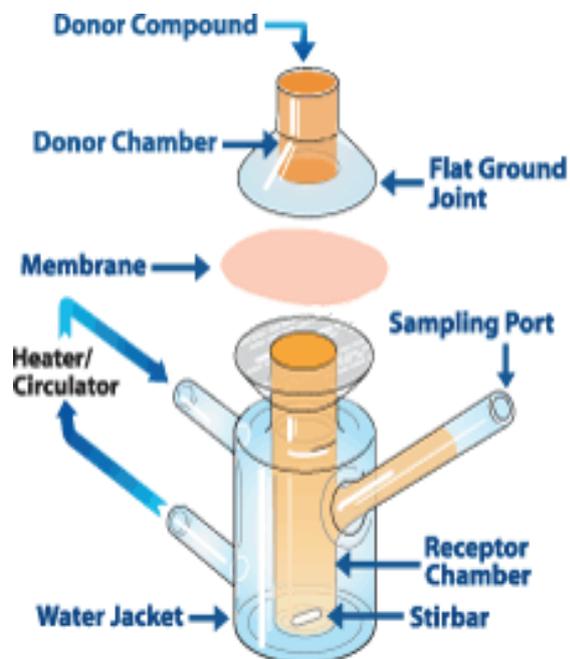


Fig.3.8: Schema di una cella di Franz

Membrane di cellulosa acetato (diametro medio dei pori 0.2 μ m) sono state inserite tra il compartimento donatore e quello ricevente (sezione area superficiale pari a 1.7cm²). La zona ricevente è stata riempita con un volume noto, pari circa a 8ml, di tampone fosfato (pH 7.4) contenente metil- β -ciclodestrina (60mM) per assicurare le condizioni "sink" [118]. Il fluido viene mantenuto a 37°C e sotto agitazione magnetica. Porzioni (30-50mg) dell'emulsioni contenenti il filtro solare libero o incapsulato nelle microparticelle sono state applicate sulla membrana nel comparto donatore ed ad intervalli di tempo appropriati aliquote (50-100 μ l) del comparto ricevente vengono prelevate e rimpiazzate con pari volume di solvente fresco. I campioni prelevati dalla cella vengono infine analizzati mediante HPLC per determinare la quantità di filtro permeata.

3.1.12. Studi di assorbimento transdermico in vivo

Gli studi in vivo di assorbimento percutaneo sono stati condotti mediante la tecnica del "Tape Stripping" che si basa sulla rimozione graduale dello strato corneo dell'epidermide, mediante l'applicazione e poi l'asportazione di un particolare nastro adesivo (Fig.3.9).

Gli esperimenti sono stati condotti su volontari con età compresa tra 20 e 30 anni. Dopo aver pulito l'avambraccio del volontario con acqua ed etanolo e delimitata un'area di applicazione di 2x5 cm, una quantità nota di emulsione (25-50mg) viene applicata sull'area delimitata e dopo un tempo di applicazione di 30 minuti viene rimossa la formulazione non assorbita con l'aiuto di un bastoncino cotonato. Lo strato corneo è stato gradualmente asportato mediante 10-20 strip consecutivi effettuati utilizzando lo Scotch Crystal 3M. Ciascun strip è stato applicato con pressione costante mediante un roller di 500g fatto scorrere per 20 volte. Il primo strip è stato estratto ed analizzato insieme al bastoncino cotonato per determinare la quantità di sostanza non assorbita. I restanti strips invece, raccolti in gruppi di tre sono stati tagliuzzati ed estratti con metanolo/acetonitrile (90:10, v/v) mediante

sonicazione. I campioni sono stati poi trasferiti in matracci tarati da 20 ml, filtrati ed analizzati mediante HPLC.

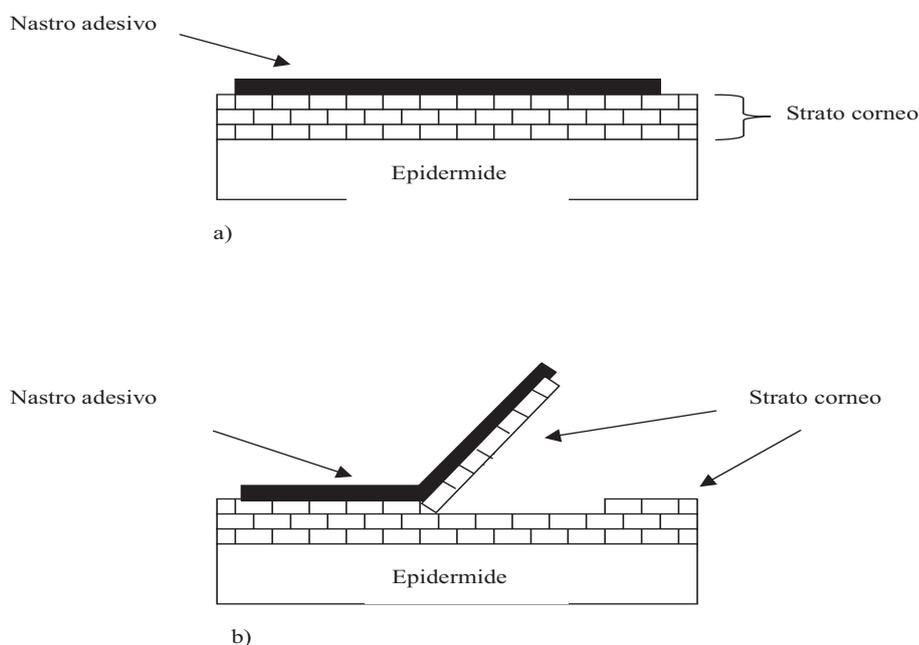


Fig.3.9: Rappresentazione schematica del "Tape stripping": il nastro adesivo viene posizionato sul corneo (a).
Rimuovendo il nastro (b) si provoca una desquamazione forzata del corneo.

3.1.13. SPF in vitro

La determinazione del fattore di protezione solare delle creme è stato determinato in vitro in accordo con la tecnica di Diffey & Robson (1989). Il metodo si basa sulla misura dello spettro di trasmissione delle radiazioni UV attraverso un cerotto Transpore (3M Health Care, Neuss, Germany), prima e dopo l'applicazione dell'emulsione solare. Le creme vengono spalmate in modo uniforme sul cerotto ad una concentrazione di 2 mg/cm². Il cerotto Transpore viene inserito all'interno dello spettrofotometro (Model V-530PC UV-VIS; Jasco, Tokio, Japan) e dopo irraggiamento gli spettri sono stati processati con un personal computer che calcola il valore di SPF.

3.1.14. Prove di fotostabilità

Gli esperimenti sono stati effettuati utilizzando un simulatore solare Suntest CPS+ (Atlas; Germania) costituito da una lampada allo Xenon (intensità dell'energia radiante emessa: 500-750W/m² per 1-2 ore a seconda della metodica utilizzata) dotata di filtri ottici con coating riflettente IR e con un filtro UV/Suprax, per simulare le condizioni reali di esposizione solare. Tale energia UV è pari a 10 volte la minima dose erimatogena (MED) che corrisponde alla dose di radiazione a cui si è sottoposti nel corso di 4 ore di esposizione al sole nella zona equatoriale.

La temperatura del simulatore viene mantenuta a 38-40°C mediante un circuito di raffreddamento ad aria. Dopo irraggiamento con il simulatore solare il campione, posto su appositi supporti (cerotti Transpore), viene sonicato con varie porzioni di solvente (ciascuna da 8ml per 5 minuti) e trasferito in matracci tarati.

Il cerotto viene estratto ulteriormente sotto agitazione per 12 ore e la frazione ottenuta (15ml) aggiunta alle altre è portata a volume con metanolo o etanolo (50ml). Un'aliquota viene analizzata mediante HPLC per misurare la concentrazione di filtro solare.

Il grado di fotodegradazione è stato determinato paragonando le aree dei picchi ottenuti dalle analisi del campione sottoposto ad irraggiamento con quelli relativi allo stesso campione non irraggiato.

3.1.15. Deposito polmonare in vitro

La frazione di particelle fini delle microparticelle di budesonide e delle microparticelle di riferimento prodotte mediante "spray-drying" sono state valutate usando il "multi-stage liquid impinger" (MSLI) (Copley Scientific Ltd, Nottingham, UK) raffigurato nella pagina seguente.

La struttura del MSLI è costituita da 4 compartimenti a ciascuno dei quali corrisponde un determinato diametro aereodinamico (Tab.3.3), mentre un quinto compartimento contiene un filtro per il recupero del particolato più fine.



Fig.3.10: Immagine del "Multi-stage liquid impinger"

Compartimenti	Diametro Aereodinamico - Cut-off (μm)
Stage 1	13
Stage 2	6.8
Stage 3	3.1
Stage 4	1.7
Stage 5 (filtro)	< 1.7

Tab. 3.3: Limiti inferiori di diametro aereodinamico associati ai vari compartimenti dell'MSLI

Prima di iniziare il test, vengono aggiunti 20ml di etanolo ai vari comparti (da 1 a 4). La simulazione del respiro è effettuata mediante pompa rotativa GAST (Erweka GmbH, Germany) ad un flusso di 60L/min, controllato con flussimetro calibrato (TSI 3063, TSI instruments Ltd., Buckinghamshire, UK). Approssimativamente 11mg di campione sono stati accuratamente pesati all'interno di capsule di

idrossipropilcellulosa (Capsugel, Sydney, Australia), le quali vengono introdotte in un *“device”* specifico, Aerolizer™ (Novartis, Basel, Svizzera), per l'inalazione di polveri. Il *“device”* viene collegato ad un adattatore boccale e quest'ultimo all'MSLI costituito da un tubo esterno che simula la trachea (*“throat”*). Il *“device”* è dotato di punzoni che permettono di forare la capsula, allo scopo di far fuoriuscire il principio attivo in seguito all'attivazione dell'aspirazione. Il sistema aspira i vari campioni di polveri per 4 secondi a 60L/min. Gli esperimenti per ciascuna polvere vengono ripetuti 3 volte, per permettere il deposito di tutte e 3 le capsule di principio attivo. Il *“device”*, le capsule, l'adattatore boccale e tutti i vari compartimenti dell'MSLI sono stati quindi lavati con etanolo e trasferiti separatamente in cilindri graduati per essere analizzati tramite HPLC. Tutte le formulazioni sono state testate in triplo.

3.1.16. Analisi statistiche

L'analisi statistica dei dati è stata eseguita usando il t-student test, l'analisi della varianza (ANOVA) e il Tukey's test. Le differenze fra i dati ottenuti sono state considerate significative per valori di $p < 0.05$.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. SOMMINISTRAZIONE TOPICA: FILTRI SOLARI

Le microparticelle lipidiche possono essere usate come veicolo cosmetico per applicazioni topiche [13,119,120]. Sono infatti composte da lipidi naturali biocompatibili e ben tollerati dalla cute e presentano proprietà adesive che portano alla formazione di un film con effetto occlusivo sulla pelle. Inoltre grazie alle loro dimensioni la penetrazione attraverso la cute è limitata, favorendo l'efficacia di tutti quei principi attivi che espletano la loro azione sulla superficie della pelle. Negli ultimi anni, in ambito cosmetico, si assiste ad un nuovo approccio che vede l'impiego di sistemi micro- e nanoparticellari, con particolare interesse per quelli a composizione lipidica in quanto presentano una maggiore biocompatibilità ed affinità per la cute.

La scelta di produrre microparticelle invece di nanoparticelle, per l'incapsulazione dei filtri, limita il problema fondamentale dell'assorbimento transdermico, nel quale gioca un ruolo importante la distribuzione particellare. Attualmente infatti, i problemi ed i rischi di tossicità legati alle dimensioni ridotte delle nanoparticelle sono al centro di numerosi dibattiti nella comunità scientifica con pareri spesso discordanti sulla loro sicurezza e accumulo negli organi.

4.1.1. Influenza delle ML nella penetrazione cutanea del 4-MBC

Il 4-metilbenziliden-canfora (Fig.4.1) è un derivato della canfora utilizzato ampiamente nell'industria cosmetica per la sua capacità di proteggere la pelle dalle radiazioni ultraviolette, in modo particolare dalle radiazioni UV-B.

È una polvere di colore bianco, insolubile in acqua e con un punto di fusione di 66-70°C.

In questo studio, si è cercato di limitare la penetrazione cutanea del filtro utilizzando un carrier lipidico.

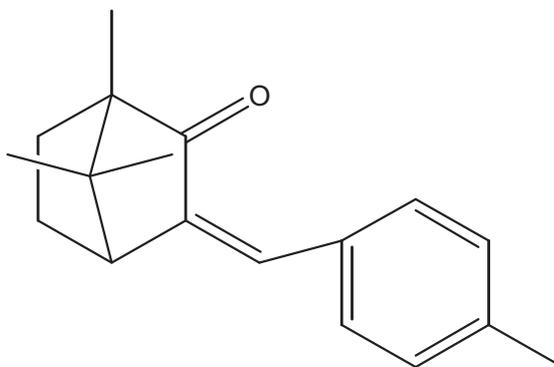


Fig.4.1: Struttura chimica del metilbenziliden canfora

Questa esigenza nasce dal fatto che recenti studi hanno dimostrato che l'MBC viene assorbito a livello sistemico dopo l'applicazione topica [121,122]. Anche se i livelli misurati nel plasma umano sono bassi [121,122] questo aspetto deve essere considerato con attenzione in quanto studi in-vitro e su animali hanno dimostrato un attività estrogenica del filtro [122]. Risulta quindi necessario sviluppare nuovi sistemi per cercare di minimizzare la sua penetrazione. In questo lavoro le microparticelle lipidiche rappresentano un carrier adatto, sia dal punto di vista dimensionale [119,120,123] sia per quanto riguarda la compatibilità con i costituenti della pelle.

Lo scopo dello studio consiste nella preparazione e caratterizzazione di ML contenenti l'MBC e nella determinazione della penetrazione cutanea sia in vitro che in vivo dopo l'introduzione delle microparticelle in una formulazione topica (emulsione O/A), per simularne l'utilizzo e valutare quindi l'efficacia e la stabilità.

4.1.1.1. Preparazione e caratterizzazione delle ML

Le microparticelle sono state preparate con la tecnica della fusione [23,123] usando varie matrici lipidiche (tristearina, glicerilbeneato, cetilpalmitato) e diversi

emulsionanti (fosfatidilcolina, polisorbato 60). Per valutare l'influenza dei vari componenti sull'efficienza di ritenzione delle microparticelle gli studi di rilascio sono stati effettuati usando come fluido il glicole propilenico, opportunamente scelto.

In esso infatti il filtro deve risultare sufficientemente solubile e allo stesso tempo, le particelle lipidiche devono rimanere intatte. Nel grafico sottostante (Fig.4.2) si possono osservare le differenze dei profili di rilascio dell'MBC nei vari tipi di matrice lipidica.

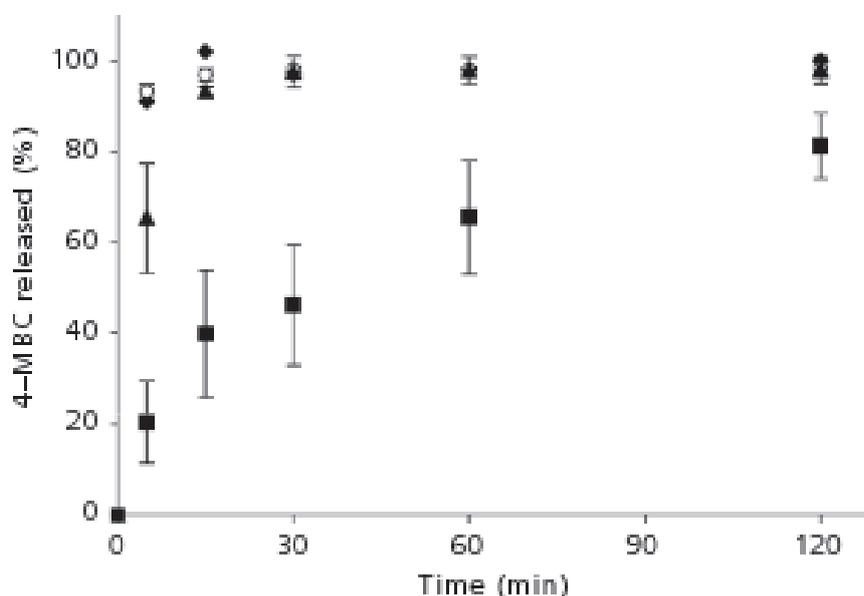


Fig.4.2: Dissoluzione (◆) e profili di rilascio dell'MBC dalle ML in cetil palmitato (○), gliceril benato (▲) e tristearina (■).

Come si può osservare, solo nella preparazione con la tristearina si ottiene un profilo di rilascio dell'MBC modulato nel tempo, con una diminuzione statisticamente significativa (Kruskal-Wallis test).

Tale risultato indica l'avvenuta incapsulazione del filtro UV all'interno della matrice lipidica e dimostra quanto il tipo di materiale lipidico giochi un ruolo fondamentale nel processo di incorporazione. Il graduale rilascio del filtro dalla matrice di tristearina può essere attribuito a trasformazioni polimorfiche del trigliceride da una

forma stabile ad una instabile [124]. Infatti è stato dimostrato che modificazioni del lipide cristallino sono un importante fattore che influenza la performance dei sistemi particellari [23].

Inoltre, poiché i punti di fusione dei lipidi presi in esame sono diversi (glicerilbenato 83°C; tristearina 65°C; cetilpalmitato 53°C), il profilo di rilascio può dipendere anche dalla temperatura di preparazione, dove ad alte temperature viene favorito il “*burst effects*” [125].

Nessuna differenza di comportamento, nel rilascio del MBC, è stata invece riscontrata utilizzando i diversi tipi di tensioattivi.

La caratterizzazione delle microparticelle di tristearina mediante SEM mostra particelle con forma sferica e superficie irregolare (Fig.4.3).

Il diametro particellare è compreso tra 7-80µm, con la maggior parte della popolazione nel range tra 20-40µm, diametro ottimale per l'applicazione topica quando si vuole prevenire l'assorbimento percutaneo [126,127].

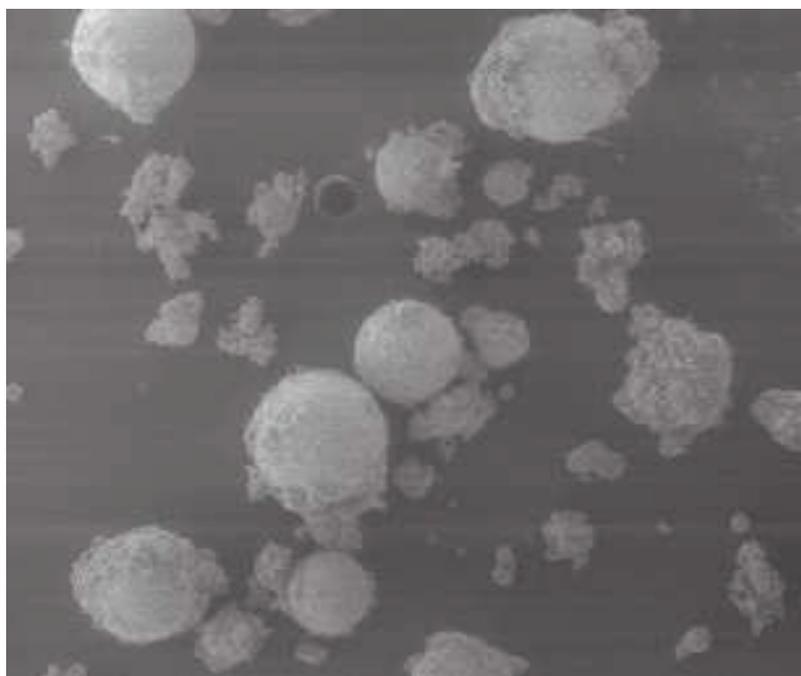


Fig.4.3: Immagine SEM della microparticelle di tristearina caricate con l'MBC

La quantità di MBC incorporata nelle microparticelle è risultata pari a $18.2\% \pm 0.6$ (m/m), che corrisponde ad un'efficienza di incapsulazione di 72.2%.

Un'ulteriore caratterizzazione delle particelle è stata condotta tramite l'analisi termica (DSC) (Fig.4.4).

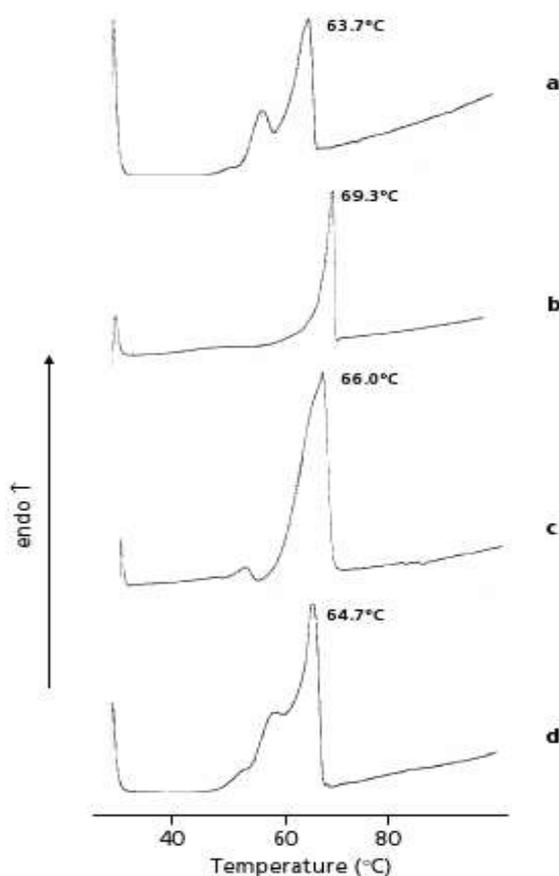


Fig.4.4: DSC termogrammi delle microparticelle vuote (a), dell'MBC (b), della miscela fisica MBC/particelle vuote (18/82) (c) e delle ML con il filtro incapsulato (d).

Come è stato riportato in precedenza, la cristallizzazione della tristearina nelle particelle determina una parziale modificazione polimorfica della forma β stabile ($T_{max}=63-64^{\circ}\text{C}$) nella forma α instabile ($T_{max}= \text{circa } 53^{\circ}\text{C}$) e, in certi casi, nella β instabile ($T_{max}= \text{circa } 57^{\circ}\text{C}$). Le particelle senza filtro (Fig. 4.4a) mostrano 2 picchi termici attribuiti alla forma stabile della tristearina ($T_{max}= 63.7^{\circ}\text{C} \pm 0.6$) ed a quella

instabile. La curva dell'MBC (Fig.4.4b) mostra un picco endotermico a $69.3^{\circ}\text{C} \pm 0.2$, corrispondente al proprio punto di fusione. La miscela fisica (Fig.4.4c) MBC e particelle vuote determina un picco endotermico ad una temperatura inferiore ($T_{\text{max}} = 66.0^{\circ}\text{C} \pm 0.3$) che può essere relativo alla sovrapposizione del picco dell'MBC con quello della forma stabile di tristearina. Il profilo delle microparticelle con il filtro incapsulato (Fig.4.4d) evidenzia una transizione termica principale a $64.7^{\circ}\text{C} \pm 0.3$, attribuibile alla forma stabile di tristearina. Questo picco risulta meno marcato rispetto a quello della miscela fisica (Fig.4.4c), inoltre il picco di fusione dell'MBC non è più presente suggerendo che il filtro risulta disperso in un stato amorfo all'interno delle particelle.

4.1.1.2. Studi di penetrazione in-vitro

In questo studio la penetrazione dell'MBC attraverso una membrana di cellulosa acetato è stata effettuata usando una crema O/A, un modello formulativo ottimale che rappresenta la maggior parte dei prodotti solari [128] e che simula il reale utilizzo.

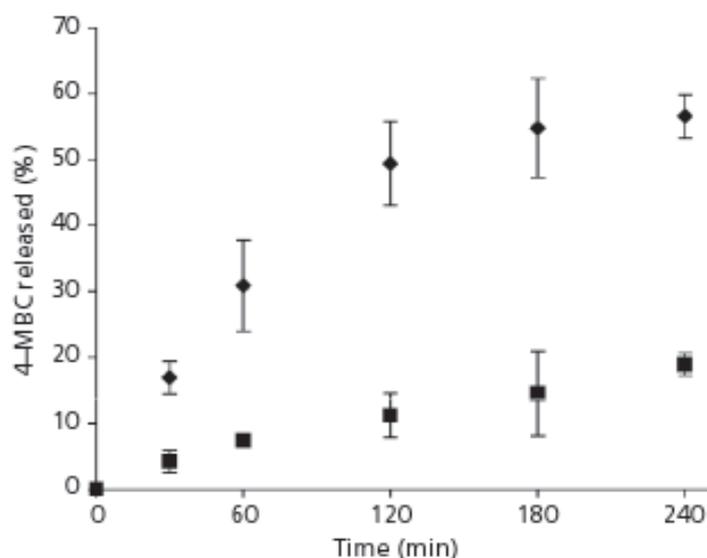


Fig.4.5: Celle di Franz: profili di rilascio dell'MBC in forma libera (◆) e incapsulato nelle ML (■) dalle emulsioni O/A.

Le creme a confronto contengono il filtro in forma libera o microincapsulata. I risultati ottenuti (Fig.4.5) dimostrano che la permeazione dall'emulsione con il filtro incapsulato all'interno delle microparticelle presenta una diminuzione statisticamente significativa rispetto a quella dove il filtro è in forma libera.

I risultati determinati con questi studi mediante le celle di Franz correlati ai dati ottenuti negli esperimenti di rilascio (Fig.4.2) indicano che, anche dopo l'incorporazione delle particelle all'interno dell'emulsione, viene mantenuta la capacità di rilascio modulata del filtro.

4.1.1.3. Studi di penetrazione in-vivo

La penetrazione del filtro solare all'interno della pelle umana è stata studiata usando il metodo del "Tape-stripping" (Fig.4.6), tecnica non invasiva basata sulla progressiva rimozione degli strati più esterni della cute (strato corneo) mediante uno scotch adesivo [118,129,130].



Fig.4.6: Sequenza Tape stripping: 1.applicazione della crema; 2. rimozione della quantità non assorbita, 3. applicazione dello scotch; 4. pressione con peso tarato prima della rimozione

La quantità di componente attivo trasferita nei vari strip determina il profilo di penetrazione nello strato corneo ed è un metodo per predirne l'assorbimento transdermico [131].

Gli esperimenti sono stati condotti confrontando i 2 tipi di emulsioni O/A. Il recupero totale del filtro risulta maggiore del 75.8%, accettabile considerando l'utilizzo di solo 15 strips [129].

La quantità di MBC recuperato nei vari gruppi di strips è rappresentato nella figura seguente (Fig.4.7).

La percentuale della dose di filtro penetrata all'interno dello strato corneo è 36.55% per l'MBC libero e 24.57% per l'MBC incapsulato nelle ML.

La concentrazione di sostanza attiva che penetra nello strato corneo è in relazione alla quantità che può raggiungere il sistema circolatorio [131], quindi i risultati ottenuti suggeriscono che l'MBC può essere assorbito in seguito ad applicazione topica, in accordo con quanto dimostrato da studi precedenti [121].

Per entrambi le preparazioni la quantità maggiore di filtro (54.9-59.33%) è stata recuperata dagli strati superiori del corneo (strips 2-4) e diminuisce gradualmente all'aumentare della profondità degli strips.

Dai dati si osserva che la penetrazione all'interno dello strato corneo risulta inferiore per l'emulsione contenente il filtro incapsulato nelle microparticelle rispetto a quella con l'MBC libero (Fig.4.7). Inoltre dall'analisi statistica si può osservare una differenza significativa tra le formulazioni negli strati superiori del corneo (strips 2-4) dove è localizzata la maggior quantità di filtro UV.

La diminuzione della penetrazione cutanea dell'MBC può essere determinata dalla capacità delle particelle di modulare il rilascio del filtro, ma anche dal fatto che le particelle con diametro > di 10µm non penetrano nella pelle [126,127] e tendono a formare un film che fissa le molecole di filtro in superficie [120].

Dai dati ottenuti si può osservare una certa correlazione tra gli studi in-vivo (Fig.4.7) ed in-vitro (Fig.4.5), tuttavia l'effetto delle ML negli studi con le celle di Franz risulta

maggiore rispetto a quello ottenuto con la tecnica del "Tape-stripping".

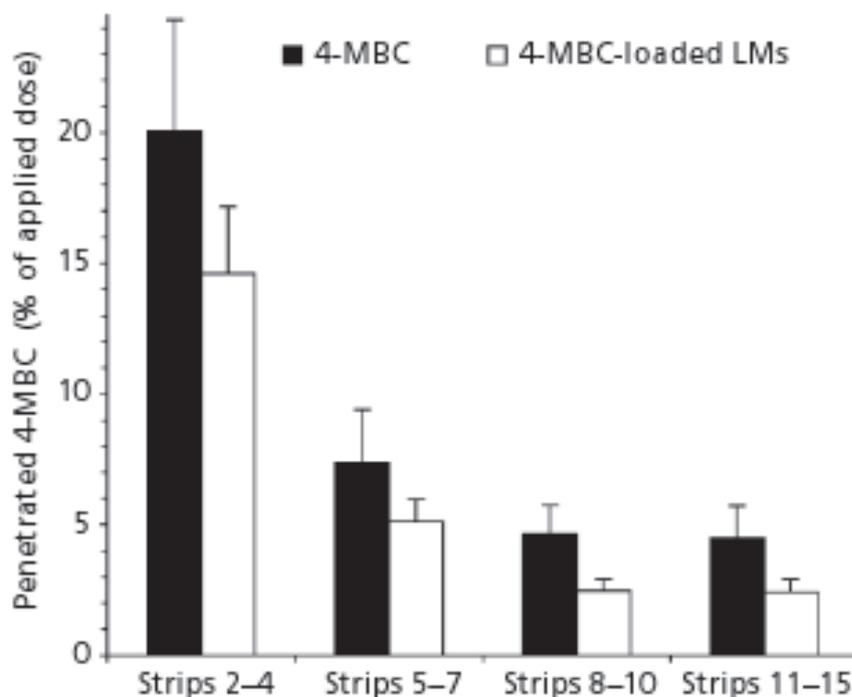


Fig.4.7: Profili di concentrazione dell'MBC nello strato corneo in-vivo dopo applicazione dell'emulsione O/A contenente MBC libero o incapsulato nelle ML.

Test	Diminuzione della diffusione dell'MBC
Celle di Franz	66.7 – 77.3%
Tape stripping	27.3 – 46.9%

Questa differenza può essere dovuta al fatto che la pelle umana rappresenta una barriera più efficace rispetto alla membrana di cellulosa acetato, inoltre l'interazione delle particelle lipidiche e del tensioattivo con i componenti dello strato corneo costituiscono un ulteriore fattore che può diminuire la penetrazione [125].

Risulta quindi necessario associare gli studi in-vivo ai modelli in-vitro, in quanto questi ultimi seppur validi per predirne gli effetti, possono fornire risultati che non rispecchiano la situazione reale.

4.1.2. Influenza delle liposfere sulla penetrazione cutanea di BMDBM

Il butilmetossidibenzoilmetano (BMDBM o Avobenzone) (Fig.4.8) è uno dei filtri solari chimici maggiormente utilizzati per proteggere la cute dalle radiazioni UV-A. Assorbe tra 310-390 nm [132].

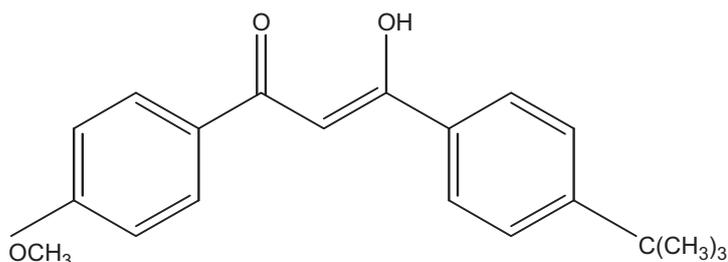


Fig.4.8: Formula di struttura del butilmetossidibenzoilmetano

Si presenta sotto forma di polvere di colore giallo pallido, fonde tra 81-86°C, è solubile in molti solventi organici ed insolubile in acqua [133].

Anche se il BMDBM è il filtro solare maggiormente usato come filtro UV-A [42,134,135] ed è incluso nella lista dei filtri solari permessi dagli organismi di controllo [135] in Europa, negli USA, in Giappone ed in Australia, ha una scarsa fotostabilità. Quando viene irradiato dalla luce si degrada, dando non solo una diminuzione nella protezione dai raggi UV-A, ma generando anche delle molecole potenzialmente tossiche [134,136,137].

Dalla fotodegradazione del filtro, infatti, si generano radicali liberi sul carbonio che possono direttamente o indirettamente creare dei danni alla cute [138,139]. La fotostabilità del filtro BMDBM è un fattore limitante per la formulazione dei prodotti solari [134]. Inoltre una riduzione della capacità filtrante UV-A può passare inosservata, esponendo così i soggetti ad un rischio maggiore dovuto agli effetti dannosi cronici tipici di queste radiazioni.

Al fine di aumentare la stabilità dei filtri solari, prevenendone la fotodegradazione e

la formazione di prodotti potenzialmente tossici, sono stati sviluppati sistemi di veicolazione dei filtri UV quali l'incapsulazione all'interno di ciclodestrine, di micro- o nano- particelle polimeriche o lipidiche [124,138,140] . In particolare si è voluto verificare per quest'ultimo un possibile effetto anche sull'assorbimento percutaneo del BMDBM.

4.1.2.1. Preparazione e caratterizzazione delle liposfere

La tecnica di preparazione delle liposfere utilizzata è quella della fusione, in quanto evita l'uso di solventi organici e impiega materiali con un alto grado di biocompatibilità [13,124].

Come si può osservare dalla figura 4.9 le liposfere caricate con BMDBM presentano una forma sferica con una superficie liscia.

Il diametro particellare risulta compreso tra 10-70 μm , con la maggior parte della popolazione nel range 10-40 μm , condizione ottimale per l'applicazione topica. Il titolo delle liposfere cariche risulta pari a $20.40\% \pm 1.21$, corrispondente ad un efficienza d'incapsulazione compresa tra 89-93%.

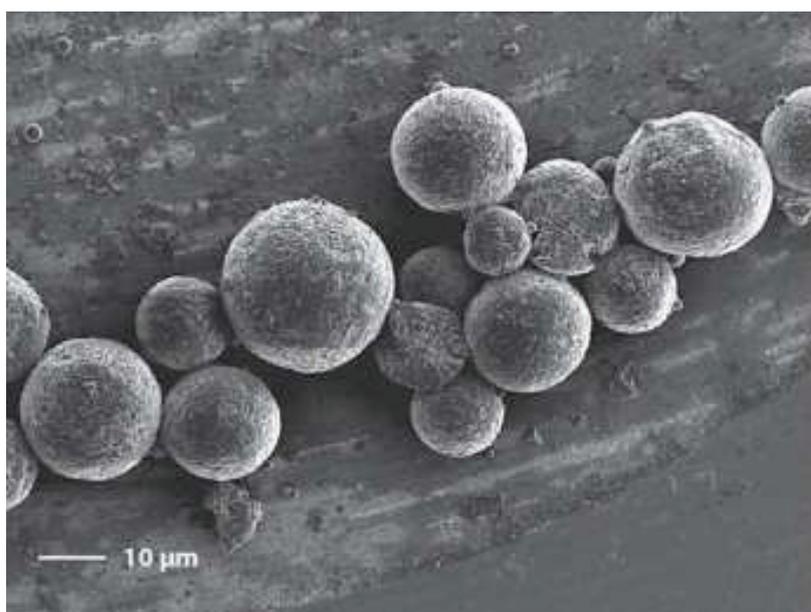


Fig.4.9: Immagine alla SEM delle liposfere contenenti BMDBM

In accordo con studi precedenti [124] si può osservare che le liposfere permettono un rilascio prolungato nel tempo del filtro in confronto alla dissoluzione del solo BMDBM (Fig.4.10).

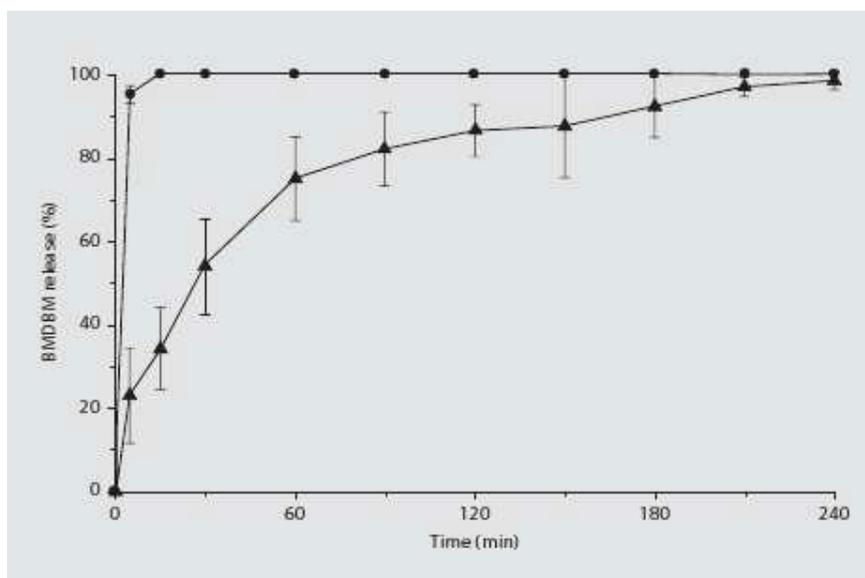


Fig.4.10: Dissoluzione del BMDBM libero (●) e del BMDBM nelle liposfere (▲)

4.1.2.2. Penetrazione cutanea in-vivo

Gli studi sono stati condotti applicando a volontari delle dosi di crema O/A contenenti BMDBM libero o incapsulato. In seguito all'applicazione dell'emulsione sulla cute si può notare (Fig.4.11) che la struttura della formulazione non viene modificata, dimostrando una buona stabilità meccanica.

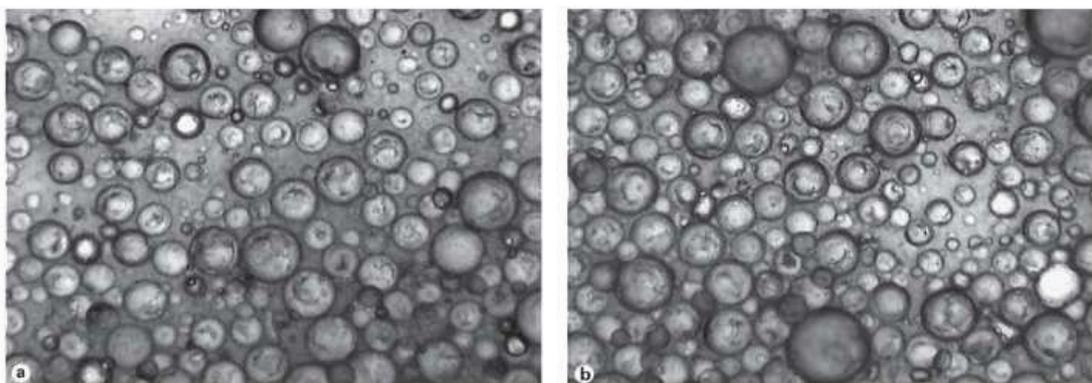


Fig.4.11: Immagine al microscopio ottico prima (a) e dopo (b) l'applicazione sulla pelle

Per valutare la penetrazione cutanea in-vivo, anche in questo studio, si utilizza la tecnica del “*Tape-stripping*” (vedi paragrafo 3.2.1.3.), in quanto è stato proposto come metodo standard per valutare la bioequivalenza delle forme topiche [131].

I dati ottenuti sono riportati nelle seguenti tabelle (Tab.4.1) come valori medi e rispettive deviazioni standard:

	BMDBM libero	BMDBM incapsulato
% non assorbita	81.30 ± 12.34	85.27 ± 8.26
% recuperata dallo strato corneo (strips 2-10)	9.68 ± 1.51	16.65 ± 2.99
% totale di recupero	90.98 ± 5.67	101.92 ± 4.77

Tab.4.1: Dati del recupero della penetrazione in-vivo del BMDBM

Gruppi	BMDBM libero	BMDBM incapsulato
Strips 2-4	6.30 ± 2.58	8.03 ± 2.76
Strips 5-7	1.75 ± 0.35	4.92 ± 0.58
Strips 8-10	1.63 ± 0.61	3.70 ± 1.30

Tab.4.2: Dati della penetrazione del BMDBM suddivisi nei vari gruppi di strips

Il recupero totale risulta maggiore del 90% in accordo con le linee guida della COLIPA [141]. La media della percentuale penetrata rispetto alla dose applicata risulta pari al 9.7% per il BMDBM libero e del 16.6% per il BMDBM incapsulato. Il diverso grado di penetrazione osservato può essere dovuto alla maggiore viscosità della formulazione contenente le liposfere. Infatti una formulazione a viscosità maggiore determina a parità di dose una più rapida penetrazione nella pelle di un filtro lipofilo [142]. Inoltre l'effetto occlusivo porta ad un incremento dell'idratazione dello strato corneo e ad un maggiore assorbimento delle sostanze lipofile [142].

4.1.3. Incapsulazione di un fotostabilizzatore associato al BMDDBM in ML

Gli effetti dannosi delle radiazioni UV-B (290-320nm) sono riconosciuti da decenni [37] mentre il ruolo delle radiazioni UV-A per molto tempo sono state ignorate [40]. Tuttavia, negli ultimi anni il coinvolgimento dei raggi UV-A nell'induzione di patologie cutanee è stata ampiamente dimostrata [40,143]. Quindi, risulta molto importante l'incorporazione all'interno delle formulazioni di filtri UV-A [40,41,136]. In precedenti studi è stato dimostrato che l'incapsulazione del BMDDBM all'interno delle particelle lipidiche diminuisce l'entità di fotodegradazione del filtro UV-A [124,144].

Da qui la proposta dello studio di cercare di migliorare l'efficacia protettiva delle ML, tramite il caricamento del filtro solare BMDDBM (UV-A) associato ad un noto agente fotostabilizzante (MBC, UV-B). L'influenza del processo di microincapsulazione sulla degradazione del BMDDBM è stata valutata dopo l'introduzione delle particelle in formulazioni topiche.

4.1.3.1 Preparazione e caratterizzazione delle ML

Per la preparazione delle microparticelle, caricate con una miscela di BMDDBM-MBC, è stata adottata la tecnica dell'emulsione a caldo [23], esaminando diversi rapporti e combinazioni di lipide (tristearina, acido stearico, gliceril benato) emulsificante per determinare le condizioni ottimali. La resa migliore del processo è stata ottenuta con un rapporto lipide/tensioattivo di 6:1.

Per valutare l'influenza della matrice lipidica sulla capacità di intrappolare i filtri nelle ML sono stati eseguiti degli studi di rilascio in-vitro usando glicole propilenico come "*medium*", in quanto in esso le particelle rimangono intatte, mentre i 2 filtri sono sufficientemente solubili (BMDDBM 1.62g/l ; MBC 2.5g/l) per assicurare le condizioni "*sink*". Si possono osservare (Fig.4.12) marcate differenze nel rilascio dei filtri a secondo del tipo di matrice utilizzata.

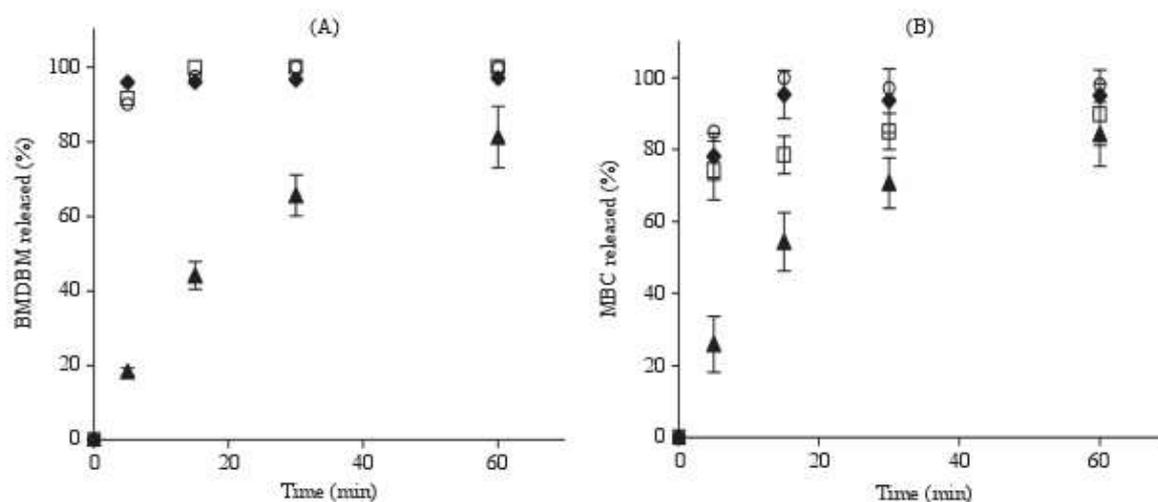


Fig.4.12: Dissoluzione (○) e rilascio di BMDBM (grafico A) e MBC (grafico B) dalle ML preparate con acido stearico(□), gliceril benato (◆) o tristearina (▲)

Dai profili di rilascio (Fig.4.12) si può osservare che con matrici di acido stearico e gliceril benato non vi è una diminuzione significativa rispetto alla velocità di dissoluzione del BMDBM. Invece con la matrice di tristearina si ottiene un rilascio modulato nel tempo per entrambi i filtri e di conseguenza questo suggerisce l'avvenuta incapsulazione nel lipide. Queste differenze sono probabilmente dovute alle diverse affinità tra i filtri UV ed al materiale lipidico [23]. Inoltre la variazione di temperatura nella produzione delle ML, dovuta ai differenti punti di fusione, rappresenta un altro importante fattore che può influenzare la performance del sistema, in quanto è noto che alte temperature favoriscono il fenomeno "burst-effect" [125].

L'analisi morfologica delle ML di tristearina effettuata tramite SEM e microscopio ottico, mostra che le particelle hanno forme sferiche con la presenza di piccoli frammenti irregolari (Fig.4.13).

Il diametro particellare calcolato è compreso tra 19-40 μ m (con una media pari a 29.9 μ m \pm 5.9), con il 58% della popolazione nel range 30-40 μ m, ideale per evitare la penetrazione cutanea [145]. La capacità di caricamento delle microparticelle risulta

rispettivamente del $10.4\% \pm 0.9$ (m/m) per il BMDBM e del $10.1\% \pm 0.3$ per l'MBC mentre l'efficienza d'incapsulazione varia nel range del 56.7-58.4%.

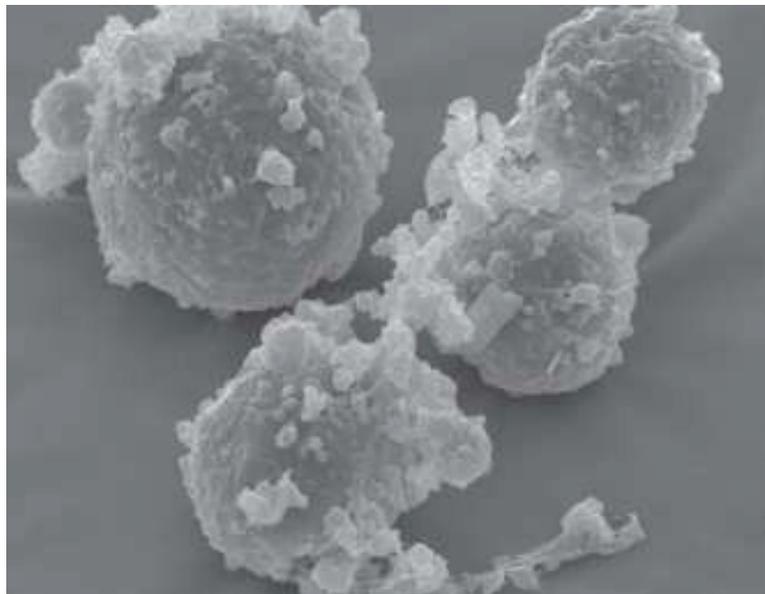


Fig.4.13: Immagine SEM delle particelle di tristearina

Le particelle contenenti solo BMDBM non presentano differenze significative di morfologia e diametro particellare (diametro medio = $27.2\mu\text{m} \pm 8.4$) se confrontate con quello contenenti i 2 filtri. Tuttavia l'efficienza di incapsulazione risulta più alta (65.5%) per la preparazione basata solo sul BMDBM. Questo è probabilmente dovuto alla minor dissoluzione del BMDBM nella fase lipidica fusa quando viene aggiunto l'MBC.

Un'ulteriore caratterizzazione delle particelle è stata condotta utilizzando il diffrattometro a raggi-X. Come è illustrato nella figura a pagina seguente (Fig.4.14), il diffrattogramma della miscela fisica (Fig.4.14A), costituita dai filtri liberi addizionati a particelle vuote, mostra i picchi cristallini caratteristici del BMDBM (10.8° , 19.6° , 20.1°) e dell'MBC (8.3° , 8.5° , 14.9° , 15.2°). Di contro, nel grafico raffigurante le ML (Fig.4.14B) questi picchi cristallini non sono stati riscontrati, questo suggerisce che i filtri UV sono presenti in forma amorfa all'interno delle particelle.

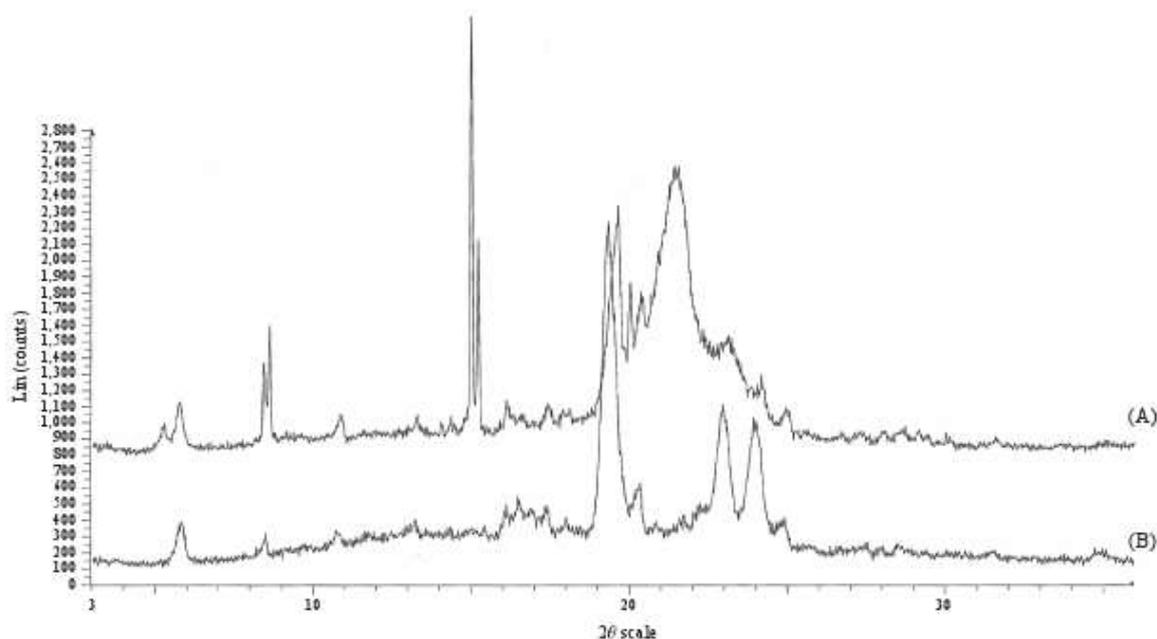


Fig.4.14: Raggi-X della miscela fisica (A) e delle ML caricate con BMDBM/MBC (B)

I picchi a 5.7° e 19.3° presenti nella figura 3B sono dovuti alla tristearina. Tuttavia se confrontiamo i diffrattogrammi della miscela fisica (Fig.4.14A) con quelli delle ML (Fig.4.14B) possiamo notare che in quest'ultimo vi è l'assenza del picco di tristearina a 21.5° e la comparsa di 2 segnali a 22.9° e 23.9° . Questo può essere dovuto alle modificazioni polimorfiche della tristearina (dalla forma β stabile a quelle α e β' instabili) durante la cristallizzazione nelle particelle [124].

4.1.3.2. Studi di fotodegradazione

In studi precedenti, sono stati determinati gli effetti delle ML sul comportamento fotochimico del BMDBM, in presenza del solo filtro UV-A [124,144].

L'aspetto innovativo di questa ricerca è la determinazione di un eventuale effetto sinergico, dovuto all'incorporazione di un filtro UV-B (MBC) assieme al BMDBM all'interno delle microparticelle. Questa preparazione è stata confrontata con un'altra contenente ML caricate solo con BMDBM e con una terza preparazione dove entrambi i filtri sono in forma libera. Per la determinazione dell'influenza delle

particelle lipidiche, sulla fotodegradazione del BMDBM, tutte le varie preparazioni sono state introdotte in creme O/A.

I risultati degli esperimenti ottenuti nelle varie emulsioni, espressi come percentuale di fotodegradazione del filtro BMDBM, sono riportati nella seguente tabella (Tab.4.3):

Crema O/A	% BMDBM degradato
BMDBM/MBC liberi	33.8 ± 5.5
BMDBM incapsulato – MBC libero	25.3 ± 4.2
BMDBM/MBC incapsulati nelle ML	16.9 ± 5.9

Tab.4.3: Percentuale di BMDBM fotodegradato nelle diverse formulazioni

Nella formulazione con i 2 filtri in forma libera è stato ottenuto un valore di fotodegradazione del BMDBM pari a 33.8%, in accordo con i dati riportati in precedenti studi [134,146], mentre la percentuale degradata nella crema contenente il solo filtro UV-A incapsulato risulta del 25.3%. Si può inoltre osservare un'ulteriore riduzione statisticamente significativa nella formulazione con entrambi i filtri incapsulati pari a 16.9%. Questi risultati dimostrano che il co-caricamento con un fotostabilizzatore (MBC) all'interno di ML migliora la fotostabilità del BMDBM.

Il fenomeno può essere dovuto ad una migliore interazione tra il fotostabilizzatore e il BMDBM all'interno del core lipidico, senza interferenze con gli eccipienti dell'emulsione.

In aggiunta si può osservare che anche l'MBC subisce una decomposizione indotta dalla luce, in quanto si ottiene un valore di degradazione di 23.9% ± 2.3 in forma libera e del 14.9% ± 3.9 se incapsulato nelle ML. La stabilizzazione dell'MBC nelle ML può così contribuire alla maggiore efficacia delle particelle.

4.1.4. BMDBM in ML associato all'Octocrilene

L'Octocrilene (OCR, Fig.4.15) è un filtro UV-B solubile in olio, approvato per l'uso in preparazioni solari. È un liquido color giallo pallido, limpido e viscoso.

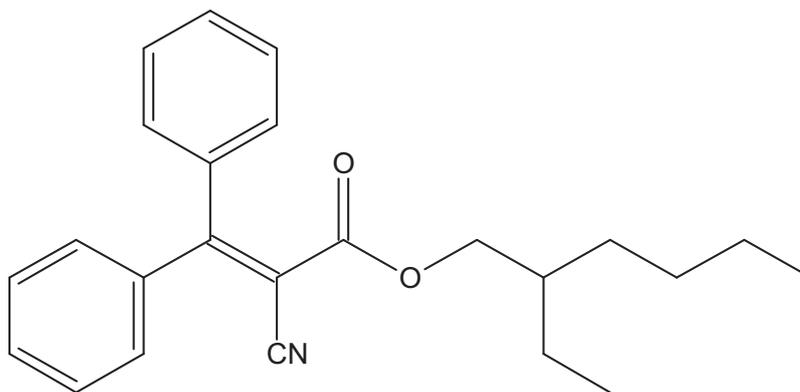


Fig.4.15: Formula di struttura dell'Octocrilene

È miscibile in molti oli cosmetici ed è rapidamente incorporato nella fase oleosa dell'emulsione. Grazie alla sua natura idrofobica è particolarmente indicato per formulazioni resistenti all'acqua o idrorepellenti. Può essere combinato con altri filtri, come l'OMC per dare prodotti ad elevato SPF. Infine possiede un'eccellente stabilità alla luce.

L'Octilmetossicinnamato (OMC, Fig.4.16), invece, è un derivato dell'acido cinnamico. L'OMC è un filtro organico UV-B ampiamente utilizzato in quanto è in grado di assorbire le radiazioni responsabili dell'eritema. Viene utilizzato oltre che per i prodotti solari anche in formulazioni per i capelli e pelle.

Ha un punto di ebollizione di 199°C e densità pari a 1.007g/ml. È un liquido color giallo pallido, limpido e leggermente oleoso ed inodore, miscibile con un gran numero di sostanze lipofile usate in cosmesi, e questa sua caratteristica ne determina la facile incorporazione in creme, lozioni, oli e latti.

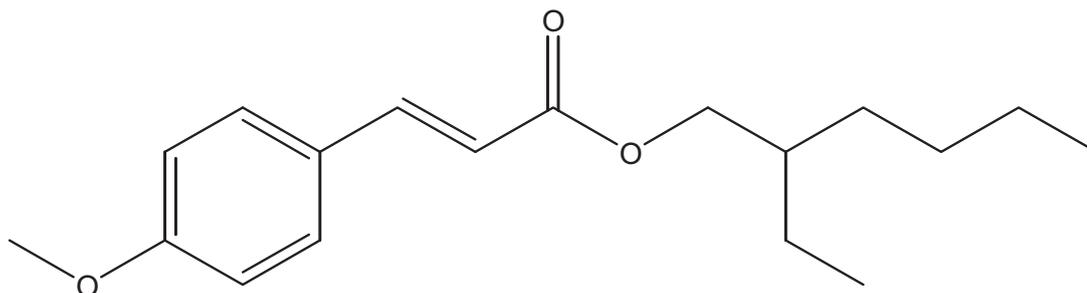


Fig.4.16: Formula di struttura dell'octilmetossicinnamato

Come già spiegato in precedenza, risulta fondamentale che i prodotti solari siano dotati di un effetto protettivo nei confronti dell'intero range delle radiazioni UV (290-400 nm). Allo scopo di ottenere queste caratteristiche, si devono introdurre nelle formulazioni varie combinazioni di filtri UV-B e UV-A. All'interno della classe degli UV-A, il BMDBM è sicuramente il più utilizzato [134,147,148], nonostante i problemi legati alla formazione di radicali liberi in seguito alla propria fotodegradazione [138,139]. Questa instabilità può essere ridotta attraverso l'aggiunta di filtri UV-B, come l'MBC (visto nello studio precedente) o l'Octocrilene (OCR), in quanto possiedono un'energia di tripletto analoga al BMDBM e quindi possono fungere da "quencher" [134,146]. A causa della bassa efficacia dell'MBC e dei suoi problemi di sicurezza [146], l'Octocrilene viene generalmente preferito come fotostabilizzatore [128,134]. Tuttavia si è visto che questo effetto viene ridotto quando è in combinazione con l'OMC [136,139,149]. Tale aspetto è estremamente importante perché l'OMC è il filtro UV-B più utilizzato in associazione al BMDBM [134,147,148]. La proposta dello studio nasce, quindi, dalla necessità di trovare nuovi sistemi che migliorino la fotostabilità del BMDBM quando associato al filtro OMC.

Per questo scopo le particelle lipidiche rappresentano un promettente sistema carrier, in quanto abbiamo visto dagli studi precedenti gli effetti di fotostabilizzazione su filtri UV incapsulati singolarmente [119,123,134,144]. Lo studio in esame valuta gli effetti dell'incapsulazione di più filtri associati all'interno delle ML.

4.1.4.1. Preparazione e caratterizzazione delle ML

Le particelle lipidiche sono state preparate mediante la tecnica di fusione a caldo utilizzando varie combinazioni di lipidi/tensioattivi per ottimizzare l'efficienza di incapsulazione, mentre gli studi di rilascio sono stati effettuati utilizzando glicole propilenico che assicura le condizioni "sink".

Nella figura (Fig.4.17) si possono osservare le differenze di rilascio dei filtri utilizzando come lipidi tristearina e gliceril benato, e come tensioattivi fosfatidilcolina e polaxamer 188, come tensioattivi. Per entrambi i filtri la migliore efficienza d'incapsulazione, indicata da un rilascio modulato, è ottenuta per le microparticelle preparate con il glicerilbenato e il polaxamer 188.

La maggiore resa è stata ottenuta con un rapporto lipide/emulsificante di 7:1. Inoltre sono stati valutati ulteriori parametri, come il numero di giri e il tempo di emulsione, per l'ottimizzazione del processo di produzione delle microsfele. Dalle immagini SEM (Fig.4.18), delle ML caricate con entrambi i filtri, si possono osservare delle particelle di forma sferica con qualche frammento irregolare e con diametro particellare compreso tra 7-25 μm (medio 12.7 μm ; con un indice di polidispersività di 0.69). La maggior parte della popolazione di particelle (73%) risulta all'interno del range ottimale di 7-15 μm [33]. La quantità di BMDBM e di OCR incorporata risulta rispettivamente pari a 15.2% \pm 0.4 (m/m) e a 10.6% \pm 2.1 (m/m), mentre l'efficienza d'incapsulazione rimane compresa nel range di 76.9-80.9%.

Le microparticelle caricate solo con BMDBM, e con l'OCR libero, non mostrano particolari differenze ne dal punto di vista morfologico ne da quello dimensionale (diametro medio 10.6 μm , indice di polidispersività 0.67), con un'efficienza d'incapsulazione pari a 76.6%. Anche il profilo di rilascio del BMDBM è del tutto confrontabile con la preparazione dove il BMDBM è incapsulato assieme all'OCR. Perciò possiamo asserire che le caratteristiche fisiche delle particelle caricate con il BMDBM non sono influenzate dal co-caricamento con l'OCR.

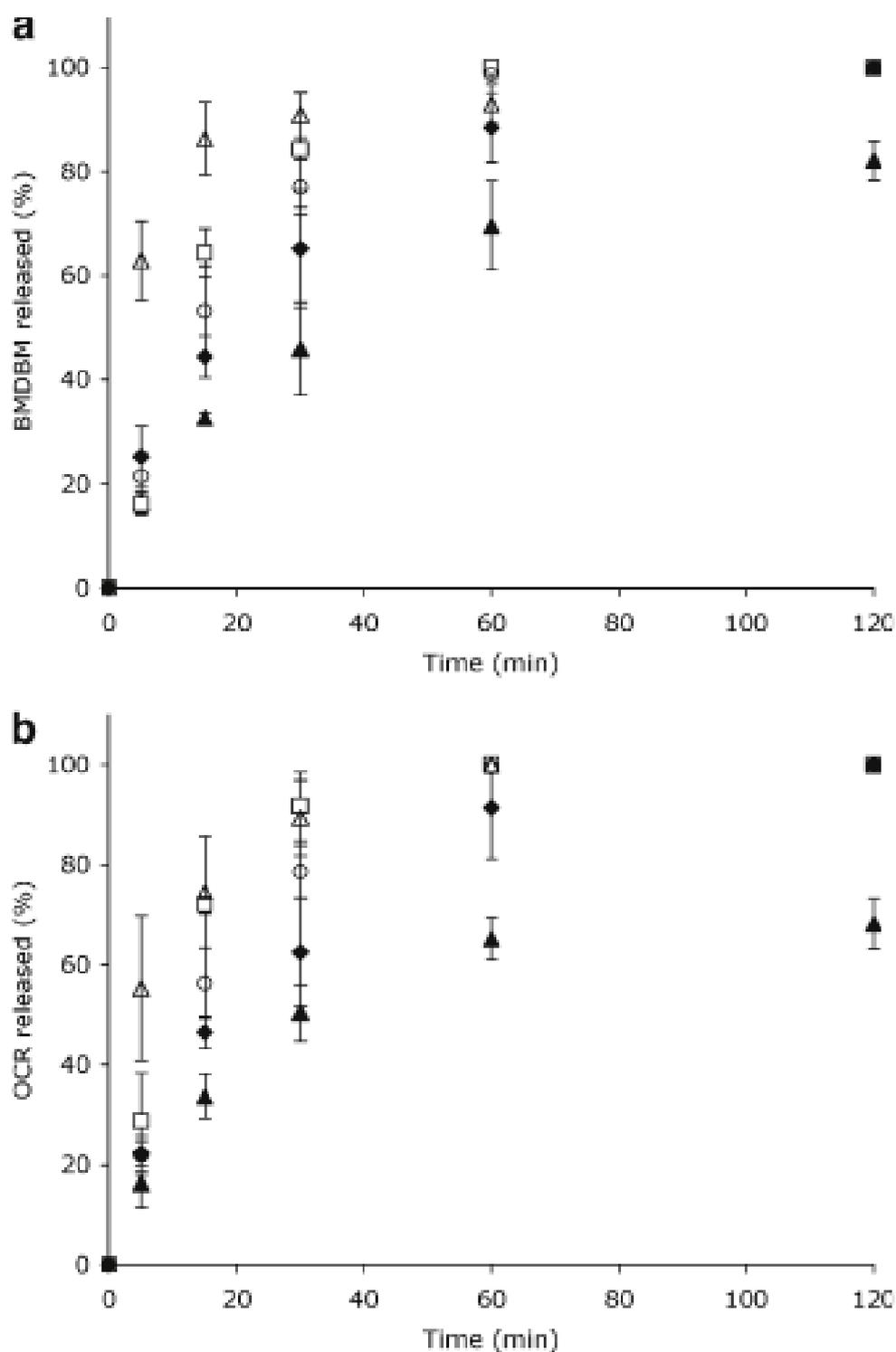


Fig.4.17: Profili di dissoluzione (Δ) e rilascio del BMDBM (a) e del OCR (b) dalle ML preparate con: tristearina-fosfatidilcolina (\blacklozenge), tristearina-polaxamer188 (\circ), glicerilbenato-fosfatidilcolina (\square) e glicerilbenato-polaxamer188 (\blacktriangle)

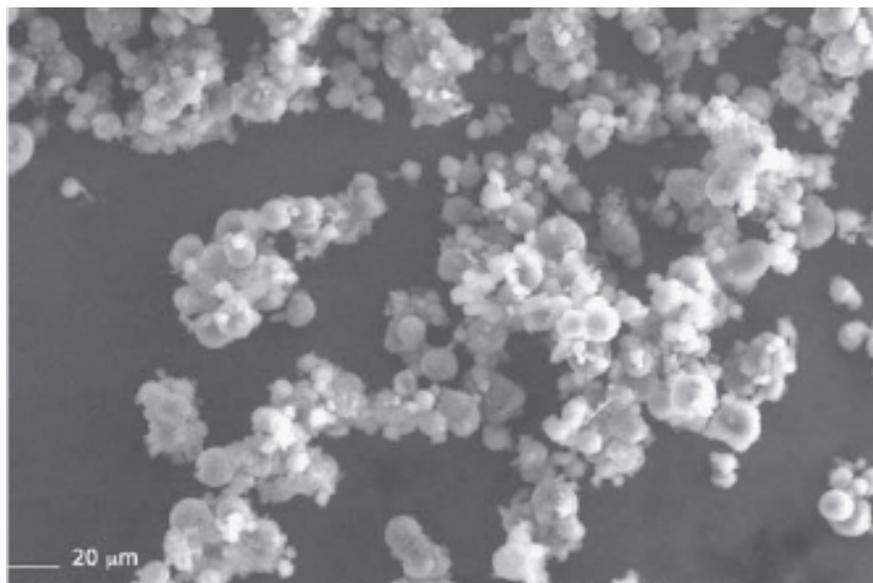


Fig.4.18: Immagine SEM delle ML caricate con BMDBM-OCR

Ulteriori informazioni sullo stato solido delle ML sono state ottenute mediante la diffrazione delle polveri ai raggi-x (Fig.4.19).

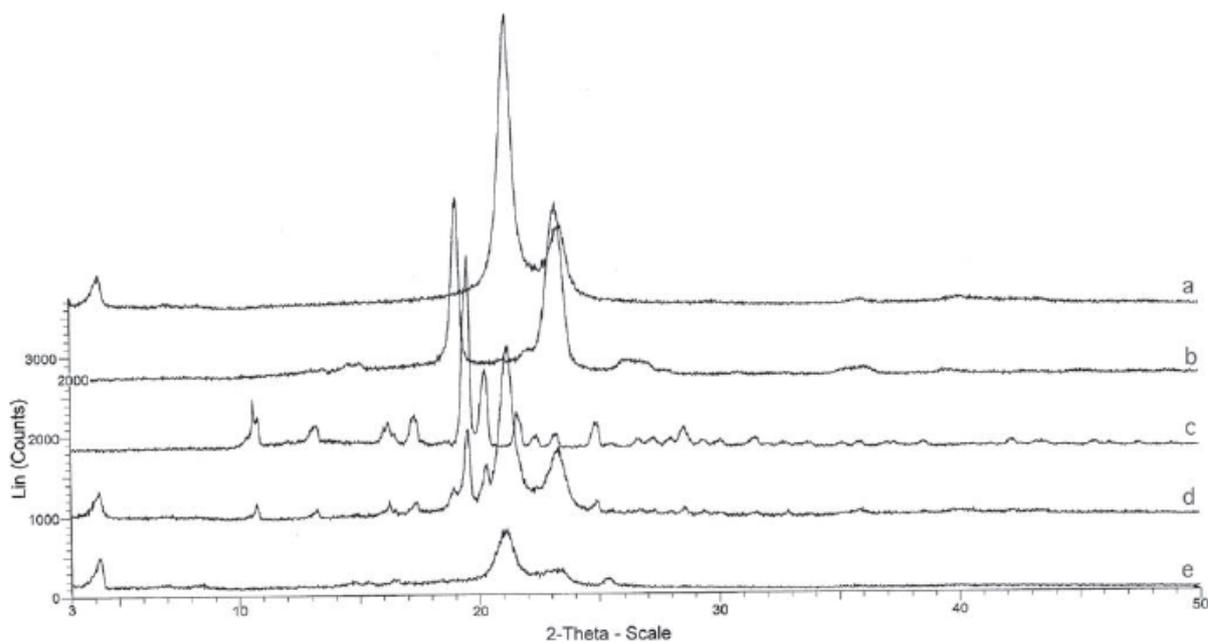


Fig.4.19: Raggi-X: gliceribenato (a), polaxamer 188 (b), BMDBM (c), miscela fisica (d), ML co-caricate con BMDBM-OCR (e).

Osservando il grafico della miscela fisica (Fig.4.19d), costituita dai filtri e dalle particelle con solo gli eccipienti, si possono notare i picchi cristallini del gliceril benato (4.1°, 21.1°, 23.3°; Fig.4.19a), del polaxamer 188 (18.9°, 23.3°; Fig.4.19b) e del BMDBM (10.7°, 13.2°, 16.2°, 17.3°, 19.5°, 20.3°, 24.9°; Fig.4.19c), per l'OCR non esiste nessun segnale essendo un olio.

I picchi caratteristici del BMDBM non sono visibili nel diffrattogramma relativo alle ML (Fig.4.19e), suggerendo che questo sia incapsulato in forma amorfa. Inoltre, nel grafico delle ML il tipico segnale del gliceril benato non scompare del tutto, indicando una parziale presenza del lipide in forma cristallina nelle particelle.

4.1.4.2. Studi di fotodegradazione

Nel presente lavoro il comportamento fotochimico del BMDBM (filtro UV-A) incapsulato è stato esaminato in presenza dei filtri OCR e OMC (filtri UV-B), usando una crema O/A come veicolo. Questo sistema riproduce le condizioni reali dei prodotti solari in commercio, in quanto il BMDBM è associato all'OMC e stabilizzato con molecole di OCR, incluse spesso per ridurre la fotoinstabilità [128,134,146].

Allo scopo di verificare l'effetto stabilizzante dell'OCR, studi preliminari sono stati condotti su creme con il filtro UV non incapsulato. La percentuale di BMDBM fotodegradata nella formulazione contenente solo BMDBM/OMC risulta del 32.6% ± 2.3, mentre in un'altra contenente tutti e 3 i filtri del 28.6% ± 2.4, con una riduzione statisticamente significativa ($P < 0.03$, t-student).

Questi risultati sono in accordo con precedenti studi [136,148,149] che dimostrano una lieve diminuzione nella degradazione del BMDBM grazie alla presenza del filtro OCR, il quale appare essere piuttosto stabile (decomposizione <4.1%) in accordo con altri studi [134,146,148].

In seguito gli esperimenti sono stati condotti su creme contenenti il BMDBM incapsulato nelle ML combinato con l'OCR e l'OMC in forma libera (Fig.4.20).

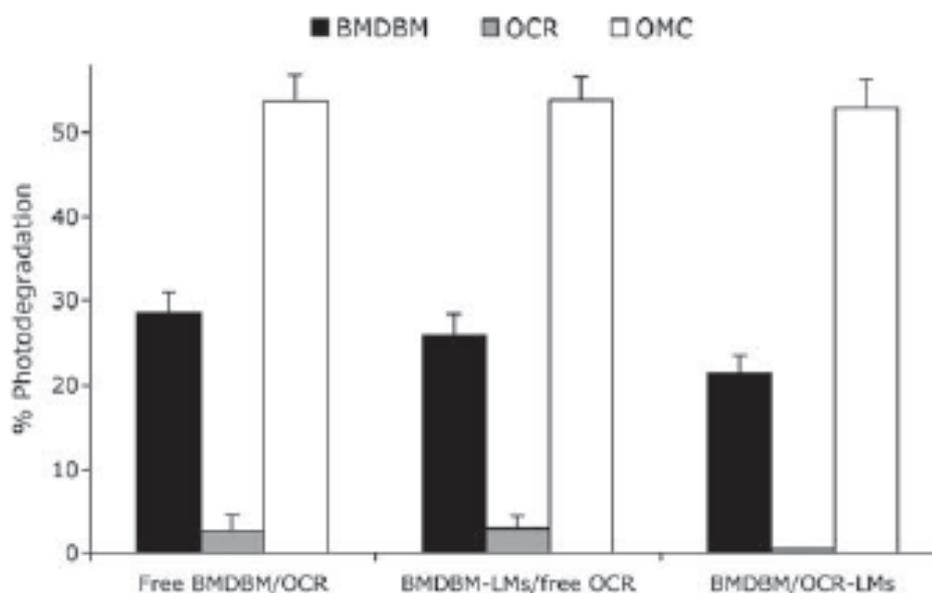


Fig.4.20: Fotodegradazione del BMDBM, OCR e OMC nelle diverse formulazioni

La quantità di BMDBM fotodegradata dopo irraggiamento risulta pari a $26.0\% \pm 2.5$, indicando una riduzione rispetto ai risultati ottenuti con i filtri non incapsulati ($28.0\% \pm 2.4$) (Fig.4.20) statisticamente significativa. Tuttavia, tale differenza non appare così marcata rispetto ai dati ottenuti nelle formulazioni contenenti il BMDBM, come unico filtro UV [18]. Questa discrepanza può essere dovuta dal fatto che il comportamento fotochimico del BMDBM cambia se viene associato ad altri filtri UV [134,136,146,148].

Infine, è stato determinato il comportamento del filtro UV-A incapsulato assieme all'OCR ed in presenza dell'OMC libero, per valutare un eventuale miglioramento nella stabilità del BMDBM. Dai dati ottenuti in questa formulazione, si può notare una riduzione della fotodegradazione del BMDBM ($21.5\% \pm 2.1$) (Fig.4.20). Questo valore determina una differenza statisticamente significata rispetto ai dati ottenuti con gli altri sistemi.

Un'ulteriore prova è stata effettuata su creme costituite da particelle di tristearina al posto del gliceril benato, ottenendo valori di fotodegradazione pari a $29.4\% \pm 2.2$.

L'effetto di stabilizzazione risulta quindi correlato alla capacità di modulazione del rilascio del filtro dalle particelle (Fig.4.20), dove ad un elevata velocità di rilascio corrisponde un ridotto effetto protettivo.

Osservando i risultati (Tab.4.4) si può notare che anche l'OCR in seguito all'incapsulazione nelle particelle incrementa la propria fotostabilità (<0.6%).

Crema O/A (* con OMC libero)	%BMDBM degradato	%OCR degradato	%OMC degradato
Solo BMDBM/OCR liberi	32.6 ± 2.3	< 4.9	-
BMDBM/OCR liberi *	28.0 ± 2.4		53.8 ± 3.1
BMDBM incapsulato – OCR libero *	26.0 ± 2.5		52.9-53.8
BMDBM/OCR incapsulati *	21.5 ± 2.1	< 0.6	

Tab.4.4: Risultati riassuntivi della degradazione dei vari filtri liberi o incapsulati nelle ML

Dai risultati descritti sopra, si può osservare che il co-caricamento dei filtri BMDBM/OCR all'interno delle particelle lipidiche determinano un maggiore effetto fotoprotettivo sul BMDBM rispetto alle particelle dove il filtro UV-A è incapsulato da solo.

4.1.4.3. Determinazione del fattore protettivo solare in-vitro

Anche in questo lavoro, come nei precedenti, è stato valutato se il processo d'incapsulazione e la successiva incorporazione nelle formulazioni topiche alterano la capacità fotoprotettiva dei filtri. Questi esperimenti sono stati fatti comparando i valori di SPF in-vitro e il rapporto UV-A/UV-B delle varie creme O/A, in quanto questi parametri rappresentano un requisito fondamentale per i prodotti solari [41,149]. Dai valori ottenuti non sono mai state rivelate differenze significative tra le varie preparazioni.

Tuttavia per la prima volta, in questo studio, sono state prodotte creme con valori di SPF simili a quelle in commercio, per simulare al meglio le reali condizioni d'utilizzo. Dai dati ottenuti (valori SPF compresi tra 6.1-6.7 ; rapporto UV-A/UV-B tra 1.0-1.1), non è stata riscontrata nessuna differenza significativa quindi si può affermare che le formulazioni contenenti i filtri solari all'interno di particelle lipidiche possono costituire un'utile alternativa ai tradizionali prodotti solari che contengono il BMDBM.

4.1.5. Valutazione della tecnica Spray Congealing nella preparazione di ML ad alto contenuto di BMDBM

Nonostante siano stati sviluppati dei sistemi efficaci per migliorare la fotostabilità del BMDBM, mediante ciclodestrine, micro- e nanoparticelle [124,138,150], la loro limitata capacità di caricamento (4-20%, p/p) [124,138,144] ne impedisce l'applicazione alla preparazione di prodotti finiti. Infatti, per soddisfare i criteri di protezione UV-A stabiliti dagli organismi internazionali [41,135], quantità relativamente elevate di polveri (10-15% p/p) devono essere introdotte nella formulazione [124,144]. Questo influenza negativamente le caratteristiche di spalmabilità e stendibilità del prodotto solare. Allo scopo di ovviare a questo problema, in questo studio, è stata valutata la possibilità di incorporare elevate quantità (fino al 50%, p/p) di BMDBM in ML cercando di mantenere inalterate le caratteristiche di rilascio dei sistemi ottenuti.

4.1.5.1. Preparazioni delle ML

Per la preparazione delle ML sono state confrontate due metodologie: la tradizionale tecnica di fusione a caldo [23] e una metodica innovativa, "spray congealing", associata con un "wide pneumatic nozzle" [22] che permette la nebulizzazione di fluidi ad elevata viscosità e quindi la produzione di particelle con un elevato contenuto di

principio attivo incorporato [22]. Entrambi i metodi hanno il vantaggio di evitare l'uso di solventi organici. Inoltre, nella tecnica dello "spray congealing" che prevede la nebulizzazione del lipide fuso in cui è solubilizzato il principio attivo da incapsulare, non viene utilizzato alcun solvente.

Inizialmente sono state preparate ML (Tab.4.5) prive di principio attivo, utilizzando come tensioattivo una sostanza biocompatibile, la fosfatidilcolina e come lipide la cera carnauba (lotto 1-3) con entrambe le tecniche. Successivamente sono state preparate le microparticelle contenenti il filtro BMDBM (lotto 2) mediante la tecnica della fusione a caldo. Infine, sono state preparate microparticelle con la stessa composizione mediante la tecnica dello "spray congealing" con e senza tensioattivo (lotto 4-5).

Tecniche	Lotto	BMDBM	Cera carnauba	PC*
<i>Metodo fusione a caldo</i>	1	-	93	7
	2	46.5	46.5	7
<i>Spray coangeling</i>	3	-	93	7
	4	46.5	46.5	7
	5	50	50	-

* PC : fosfatidilcolina

Tab.4.5 : Composizione percentuale dei vari lotti di ML (% p/p)

La cera carnauba è stata scelta perché particolarmente idonea per la tecnica dello "spray congealing", in quanto permette di ottenere particelle sferiche con superficie liscia e conferisce alle particelle buone proprietà di rilascio [22]. Inoltre questo lipide migliora la capacità protettiva solare, grazie alla propria composizione chimica comprendente cinnammati [151].

4.1.5.2. Caratterizzazione delle ML

La percentuale di caricamento delle ML risulta elevata (40,1-48,5%) per tutti i sistemi particellari (lotto 2,4,5) senza differenze significative tra i vari metodi di produzione esaminati, con un'efficienza d'incapsulazione superiore all'86,3%.

L'analisi mediante microscopio a scansione elettronica (SEM) delle microparticelle, preparate attraverso il metodo per fusione a caldo e dello "spray congealing", mostra notevoli differenze morfologiche tra i due campioni di microparticelle (Fig.4.21; Fig.4.22).

Dalle immagini ottenute con il SEM si può osservare che le ML preparate attraverso il metodo della fusione a caldo (lotto 1 e 2) hanno una forma e una superficie piuttosto irregolare (Fig.4.21), mentre quelle preparate con "spray congealing" mostrano una forma sferica e una superficie liscia (Fig.4.22).

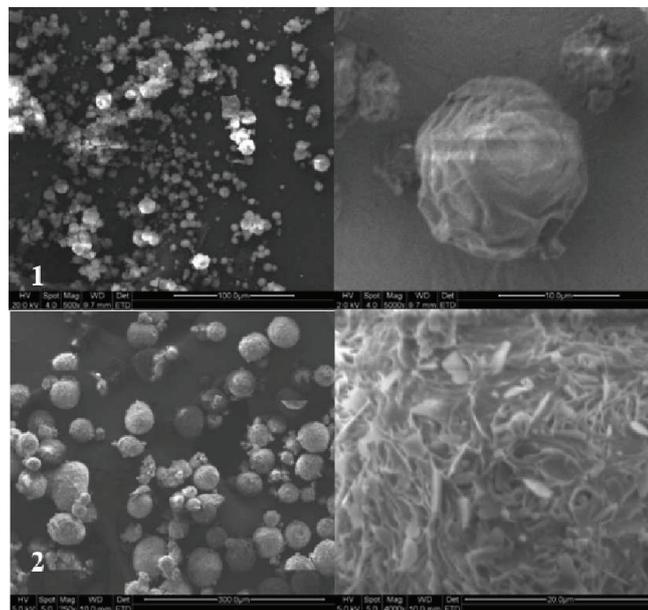


Fig.4.21: Immagine alla SEM delle ML preparate mediante la tecnica della fusione a caldo (lotto 1-2)

Inoltre, le ML preparate per fusione a caldo mostrano una dimensione minore rispetto a quelle ottenute con lo "spray congealing". L'incorporazione del BMDBM nelle microparticelle porta ad un aumento delle dimensioni per le ML preparate per

fusione e ad una diminuzione dimensionale per quelle preparate con lo "spray congealing".

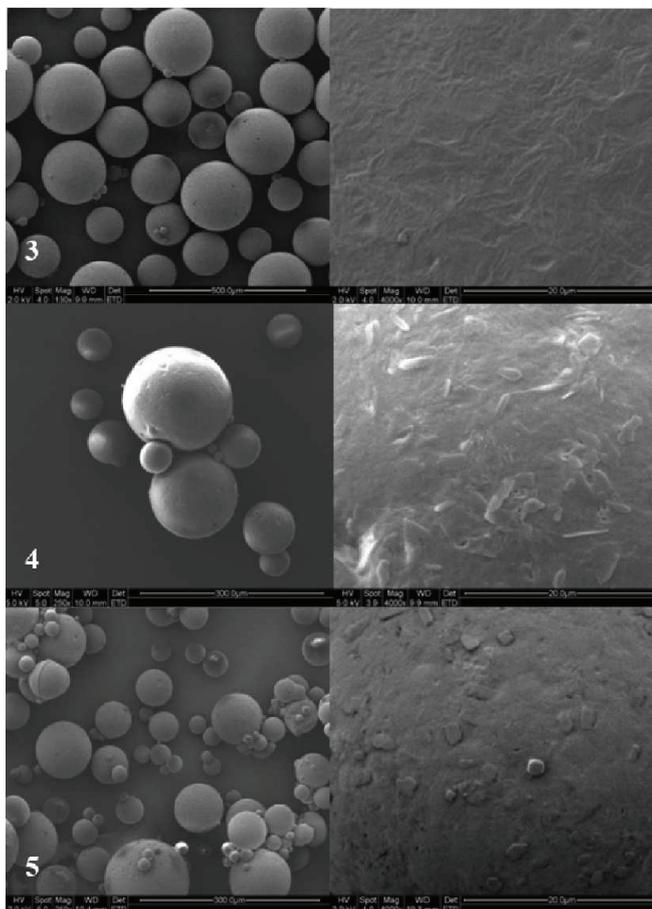


Fig.4.22: Immagine alla SEM delle ML preparate mediante la tecnica dello Spray Congealing (lotto 3-5)

L'analisi dimensionale delle microparticelle, ottenute con il microscopio ottico, ha confermato che le particelle prodotte per fusione a caldo (range dimensionale compreso tra 18 e 66 μm , con l'86% della popolazione compresa tra i 20 e i 60 μm) (Fig.4.23A) sono più piccole e con una distribuzione dimensionale meno ampia rispetto a quelle preparate con il metodo dello "spray congealing" (range dimensionale compreso tra 6-146 μm , con il 51% della popolazione compresa tra 20 e 60 μm) (Fig.4.22B).

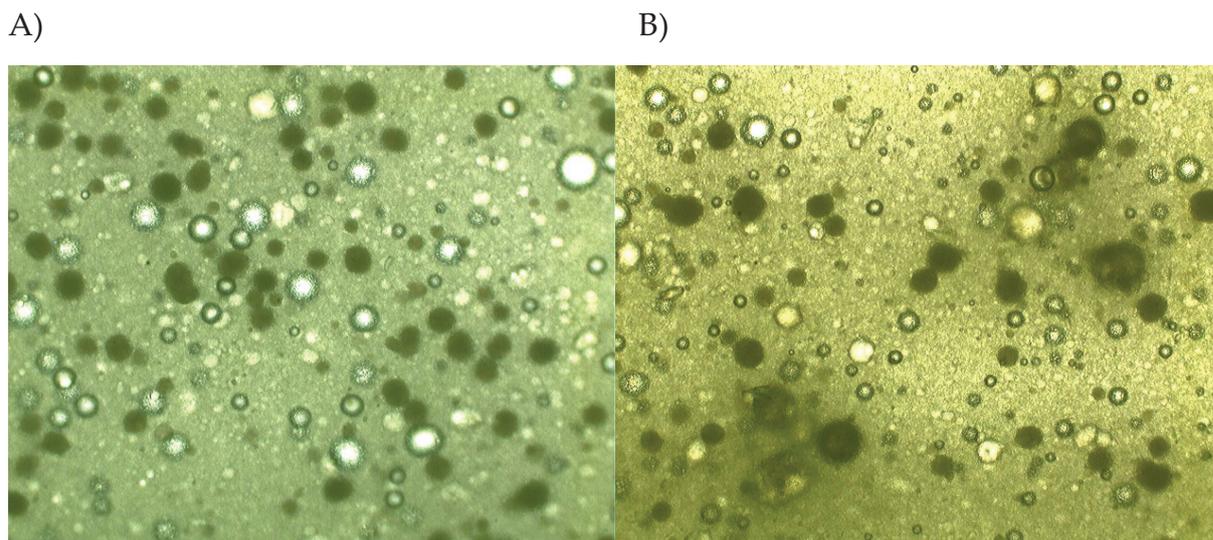


Fig.4.23 : Immagini al microscopio ottico delle ML prodotte per fusione a caldo (A) e con spray congealing (B)

Ulteriori informazioni sullo stato solido delle ML sono state ottenute attraverso la diffrazione ai raggi X delle polveri (Fig.4.24).

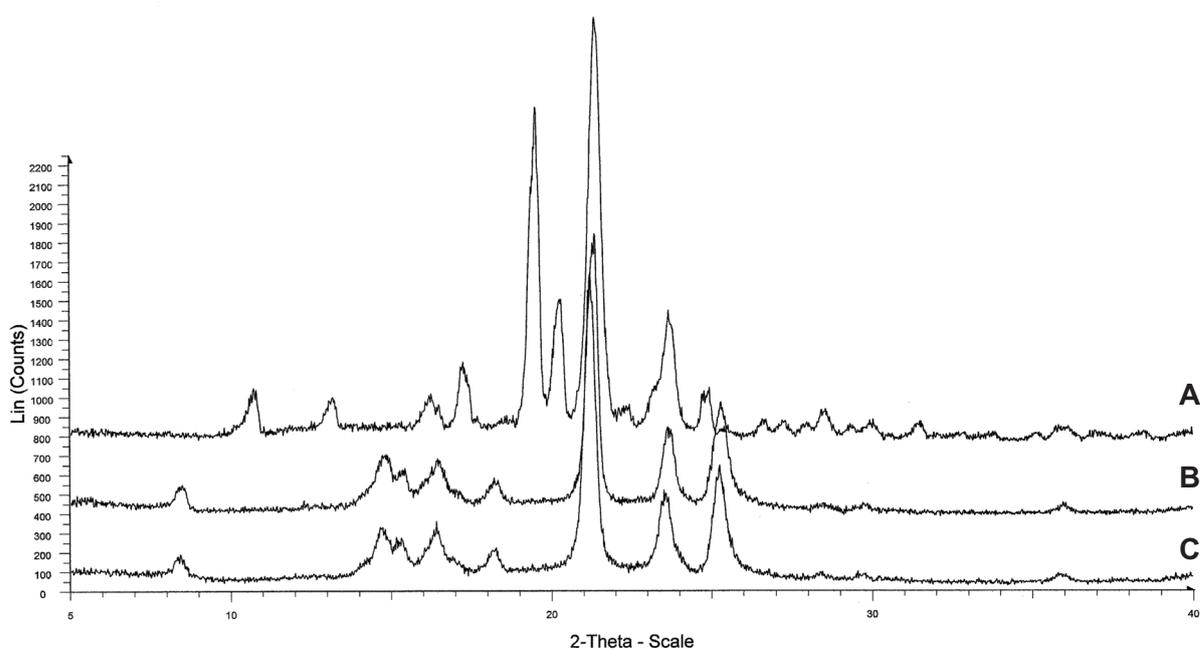


Fig.4.24: Diffratogrammi ai raggi X delle polveri della miscela fisica (A), delle ML preparate per fusione a caldo (B) e mediante "spray congealing" (C)

Il diffrattogramma della miscela fisica, costituito da BMDBM e dalle microparticelle vuote (Fig.4.24A) mostra i picchi relativi alla forma cristallina del BMDBM (10.7°, 13.1°, 17.2°, 19.5°, 20.2° e 24.8° di 2 θ) e della cera carnauba (21.3°, 23.6° di 2 θ). I diffrattogrammi delle ML preparate per fusione a caldo (Fig.4.24B) o "spray congealing" (Fig.4.24C) sono sovrapponibili ed i picchi caratteristici del BMDBM non sono presenti. Questo indica che il filtro solare è disperso in uno stato amorfo all'interno delle ML. Inoltre, confrontando il diffrattogramma della miscela fisica (4.24A) con quello delle particelle lipidiche caricate con BMDBM (Fig. 4.24B e 4.24C), si può notare la formazione di un nuovo picco a 25.2° che potrebbe indicare una modificazione polimorfica della cera carnauba, dovuta ad una variazione della struttura cristallina causata dall'incorporazione del BMDBM.

4.1.5.3. Studi di rilascio in-vitro

Per valutare l'influenza della tecnica usata nella preparazione delle microparticelle lipidiche sull'incapsulazione del BMDBM sono stati fatti studi di rilascio in vitro sulle ML, preventivamente setacciate, usando come mezzo di dissoluzione glicole propilenico. Il rilascio del filtro solare dalle microparticelle preparate attraverso entrambi i metodi è minore rispetto alla dissoluzione del filtro (Fig.4.25). Questo indica che il filtro UV-A è stato incorporato nella matrice della microparticella lipidica.

La riduzione nel rilascio risulta statisticamente significativa (ANOVA e Test di Tukey) sia per le microparticelle preparate con lo "spray congealing", che per quelle ottenute con la tecnica della fusione. Per queste ultime la significatività è limitata ai punti dei prelievi a 5 e a 15 minuti. Sono inoltre evidenziabili ulteriori differenze nei profili di rilascio delle microparticelle preparate con le due tecniche.

Le microparticelle preparate con la metodica dello "spray congealing" mostrano una cinetica di rilascio inferiore, infatti dopo due ore solo il 26% del filtro UV-A incapsulato viene rilasciato, mentre nel caso delle ML ottenute con la tecnica

tradizionale la percentuale di rilascio è del 58%.

Questo indica che sebbene l'efficienza di incapsulazione sia simile per i due metodi, le microparticelle preparate mediante "spray congealing" hanno una maggior capacità di ritenzione del principio attivo.

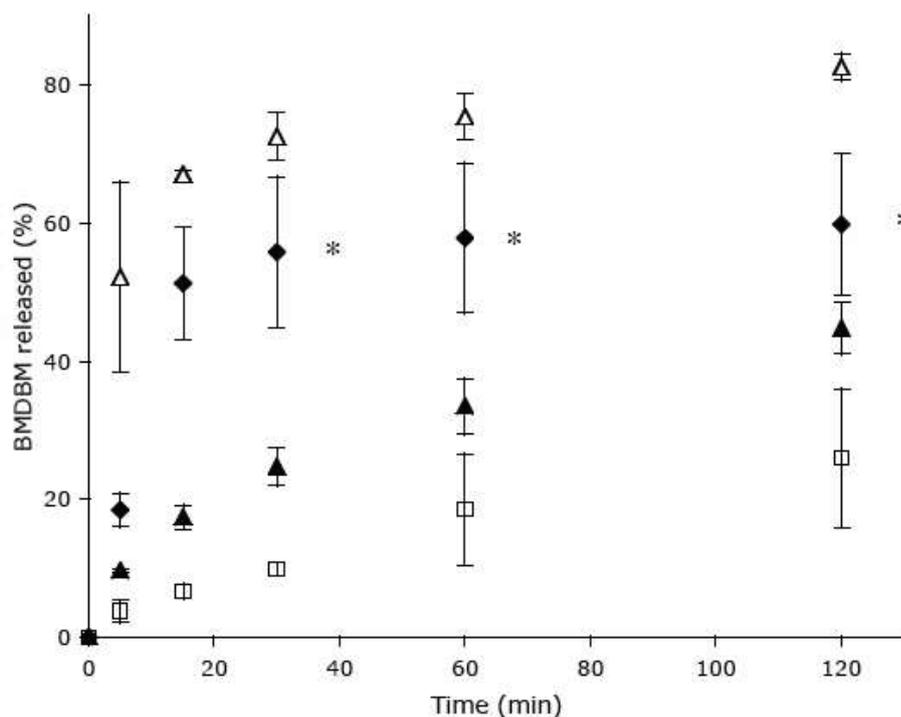


Fig.4.25: Curva di dissoluzione (Δ) del BMDDBM e rilascio dalle ML preparate mediante la tecnica di fusione (lotto 2) (\blacklozenge) e mediante spray congealing con tensioattivo (lotto 4) (\square) e senza tensioattivo (lotto 5) (\blacktriangle)

I dati ottenuti dimostrano che la tecnica con cui vengono preparate le particelle lipidiche ha un'importanza fondamentale nel processo d'incorporazione soprattutto quando la quantità di principio attivo incapsulato nelle microparticelle è elevata. I risultati ottenuti dimostrano quindi che la tecnica dello "spray congealing" è più efficiente di quella della fusione a caldo.

Le microparticelle preparate mediante "spray congealing", senza l'utilizzo della fosfatidilcolina (lotto 5) inoltre, mostrano differenze nella curva di rilascio. Infatti dopo due ore viene rilasciato il 44.8% del filtro BMDDBM incorporato. La velocità di

rilascio risulta essere maggiore rispetto a quello delle microparticelle preparate con lo "spray congealing" in presenza di fosfatidilcolina, ma inferiore rispetto a quella delle microparticelle preparate con il metodo della fusione a caldo (usando il tensioattivo).

Questi risultati dimostrano che è possibile preparare microparticelle con una buona capacità di modulare il rilascio del principio attivo inglobato attraverso la tecnica dello "spray congealing" senza l'uso di tensioattivi.

4.1.5.4. Studi di fotodegradazione

Sono state preparate creme, contenenti il BMDDBM libero in combinazione con microparticelle lipidiche vuote (lotto 1), oppure la stessa concentrazione di filtro UV-A incorporato nelle ML (lotto 2 e 4).

Come si può vedere nella figura 4.26, nella preparazione contenente il BMDDBM libero il $38.6\% \pm 3.6$ del filtro solare si è degradato in seguito ad irraggiamento.

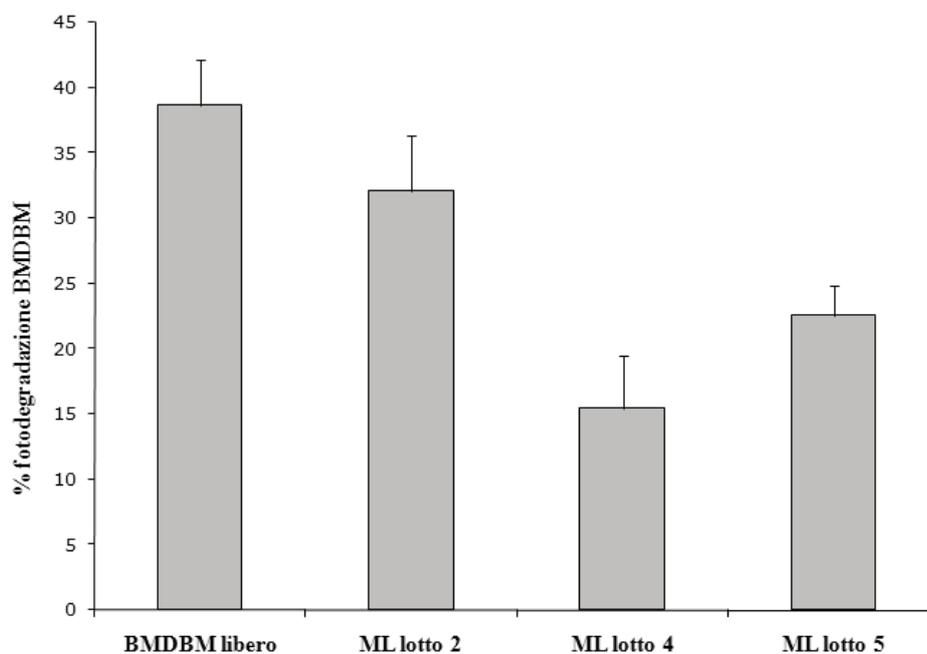


Fig.4.26: Percentuale di fotodegradazione del BMDDBM presente in forma libera o inglobato nelle ML

Questo risultato è in accordo con i dati riportati in letteratura [146]. La fotodegradazione del filtro è minore ($32.1\% \pm 4.3$) nella formulazione preparata con le ML ottenute con il metodo tradizionale della fusione (Fig.4.26), anche se la differenza non è marcata. Invece, nella formulazione preparata con le ML prodotte con la tecnica innovativa dello "*spray congealing*", si può notare una notevole riduzione (60%) della decomposizione del BMDBM indotta dall'esposizione alla luce solare (la fotodegradazione del filtro UV-A è pari a $15.4\% \pm 4.1$) (Fig.4.26).

Ulteriori studi di fotostabilità sono stati condotti su una crema contenente il filtro solare all'interno di microparticelle lipidiche ottenute con la metodica dello "*spray congealing*" ma senza l'utilizzo del tensioattivo (fosfatidilcolina) (lotto 5). Anche in questo caso si è osservato un aumento della fotostabilità del filtro (la percentuale di BMDBM degradata è pari al $22.5\% \pm 2.3$), sebbene inferiore rispetto a quella relativa alle microparticelle preparate con l'utilizzo del tensioattivo (Fig.4.26).

I risultati ottenuti indicano quindi che l'incorporazione del filtro solare all'interno delle ML diminuisce la fotoinstabilità del BMDBM anche quando esso viene incorporato ad elevate concentrazioni (40.1-46.5% p/p). Inoltre, l'efficacia fotostabilizzante dei sistemi microparticellari esaminati dipende dal metodo con cui sono stati prodotti ed è correlato alla loro capacità di modificare il rilascio del principio attivo (Fig.4.25). Infatti, le ML caratterizzate da un maggior controllo del rilascio (preparate con "*spray congealing*" e con l'utilizzo della fosfatidilcolina) mostrano un effetto protettivo maggiore.

Allo scopo di valutare i sistemi microparticellari in una preparazione che simuli le reali condizioni di utilizzo di questi prodotti, il comportamento fotochimico del BMDBM è stato esaminato anche in presenza di un filtro solare UV-B (OMC, Fig.4.27).

Creme, contenenti OMC e il BMDBM libero o microincapsulato mediante "*spray congealing*" sono state sottoposte ad irraggiamento nelle stesse condizioni sperimentali riportate precedentemente. Come illustrato nella figura 4.26, anche in

questo caso le ML producono una diminuzione statisticamente significativa della fotodecomposizione del BMDBM dal 33.6% al 28.8% (Fig.4.27).

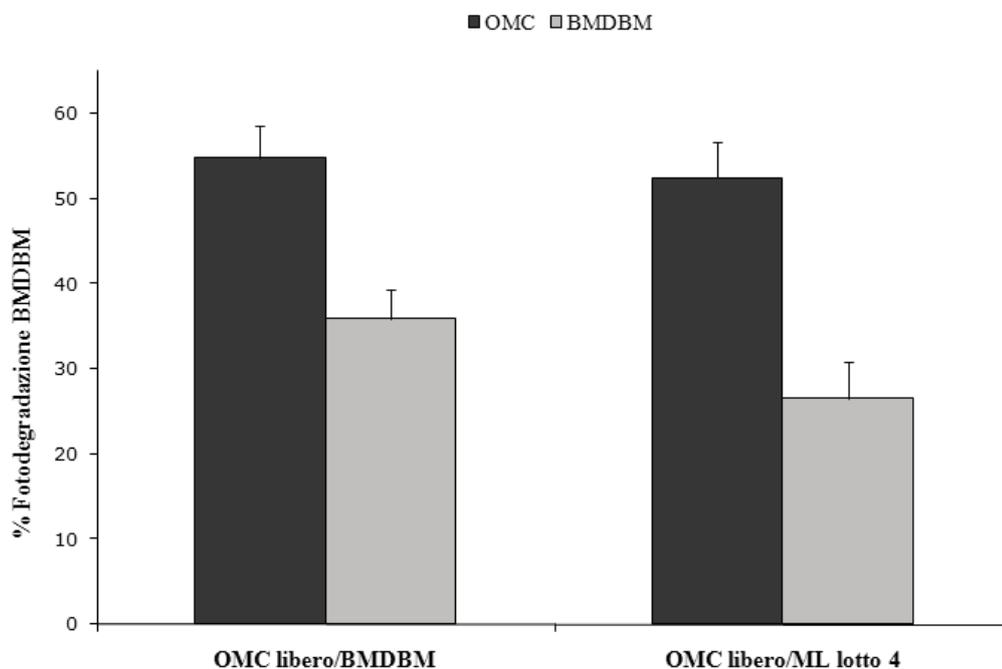


Fig.4.27: Percentuale di fotodegradazione del BMDBM e dell'OMC presenti nelle varie formulazioni.

In questo caso si può notare che l'efficacia protettiva delle ML non è così marcata come nel caso delle formulazioni contenenti solo il filtro BMDBM (Fig.4.26). Questa discrepanza potrebbe essere dovuta ad una variazione del comportamento fotochimico del BMDBM quando associato con l'OMC [136,146].

La percentuale di degradazione dell'OMC è infine simile (54.1-54.5%) in entrambe le formulazioni. Questo è un risultato atteso in quanto il filtro UV-B è stato inserito nelle formulazioni in forma libera.

4.2. SOMMINISTRAZIONE INALATORIA DI FARMACI ASMATICI

La veicolazione di farmaci per somministrazione inalatoria è diventata la più popolare via per il trattamento dell'asma e di altre malattie connesse all'apparato respiratorio. In aggiunta, tale modello di veicolazione mostra significative promesse come metodo nel trattamento delle infezioni locali [152] e come sistema portale [153]. In particolare l'uso degli inalatori a polvere secca (DPI) ha acquisito un utilizzo sempre maggiore come metodo di veicolazione di farmaci inalatori, in quanto gli ingredienti farmaceutici attivi (API) mantengono una maggiore stabilità, permettono variazioni ampie di dosaggio ed avendo un dispositivo di natura passiva assicurano una migliore "compliance" al paziente. Tuttavia, come è stato descritto in precedenza, allo scopo di migliorare l'efficienza di deposito polmonare l'API deve avere un diametro aereodinamico $<$ di $6\mu\text{m}$ e l'adesione/coesione tra il farmaco e le particelle di carrier devono essere inferiori alla forza impartita dal paziente durante l'inalazione.

Negli ultimi anni la comunità scientifica si sta concentrando nella ricerca di metodi di veicolazione che permettano di conferire a questi sistemi un rilascio controllato del farmaco nel tempo. I vantaggi di avere sistemi con queste proprietà comprendono una riduzione della dose, un'efficacia terapeutica durante il sonno (importante in quanto l'asma può essere di natura circadiana), una più rapida rimozione del farmaco e un incremento della permanenza del farmaco sul sito bersaglio (nel trattamento delle infezioni). Nonostante siano stati fatti diversi approcci [154,155] in questa direzione, attualmente non esiste nessun prodotto a rilascio controllato in commercio. Un approccio che può determinare un efficiente controllo di rilascio nella terapia inalatoria è l'uso delle particelle lipidiche.

4.2.1. Microparticelle lipidiche di Budesonide a rilascio controllato per la terapia inalatoria

La Budesonide è un potente glucocorticoide steroideo (vedi paragrafo 1.4.5.) con elevata attività anti-infiammatoria e bassi effetti sistemici. Attualmente è il farmaco più usato nel trattamento dei sintomi della rinite allergica stagionale (allergia al polline) e della rinite allergica perenne (allergia provocata da altri agenti, quali polvere domestica o animali). Inoltre, può essere usato anche per il trattamento e la prevenzione dei polipi nasali (protuberanze nella mucosa del naso).

La struttura chimica della Budesonide [Fig.4.28] è costituita da un centro chirale a livello del carbonio 22, il quale determina la formazione di 2 epimeri: 22R e 22S. Entrambe le forme possiedono un effetto farmacologico, anche se studi in-vitro suggeriscono che l'epimero R sia 2-3 volte più potente rispetto all'epimero S. [156].

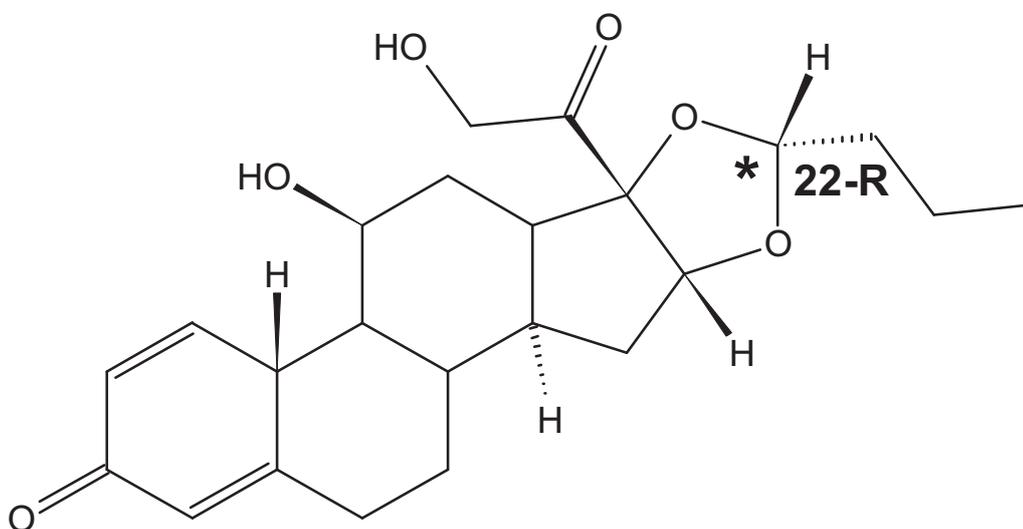


Fig.4.28: Struttura chimica dell'epimero 22-R della Budesonide.

Le microparticelle lipidiche sono state studiate prevalentemente per formulazioni ad uso orale, parenterale e topico [6,23], trascurando le eventuali potenzialità di questi sistemi nella veicolazione polmonare. Tuttavia, in un precedente studio [8] è stato

dimostrato che è possibile ottenere microparticelle contenenti Budesonide con un diametro idoneo al trasporto polmonare, anche se non ne è mai stata controllata la performance.

In un ultimo recente studio riportato in letteratura la performance di microparticelle lipidiche, caricate con Budesonide è stata determinata nei vari DPI in commercio [9]. In questo lavoro non viene preso però in considerazione l'effetto di rilascio del farmaco dalla matrice e soprattutto il metodo di preparazione utilizzato, che mediante spray-dried comporta l'uso di solventi organici.

L'utilizzo di matrici idrofobiche nella veicolazione polmonare dei farmaci può determinare effetti infiammatori oppure tossici dovuti all'accumulo nel sito bersaglio, avendo difficoltà ad essere eliminate. Tuttavia, un recente studio dimostra che le particelle lipidiche, costituite da matrici di gliceril benato e stabilizzate con polaxamer, non evidenziano significative variazioni nella risposta infiammatoria [8].

Lo scopo di questo studio è stato quello di preparare delle particelle lipidiche senza l'utilizzo di solventi organici ed aventi dimensioni idonee alla somministrazione polmonare e con proprietà di rilascio controllato del farmaco per ridurre eventuali problemi di tossicità. Valutarne inoltre le caratteristiche morfologiche e le performance aereodinamiche tramite studi in-vitro di deposito polmonare. Questi esperimenti sono stati effettuati comparando le microparticelle lipidiche a particelle di sola Budesonide (in forma amorfa e cristallina) preparate mediante "spray-drying" per ottenere diametri aereodinamici simili.

4.2.1.1. Preparazione e caratterizzazione delle microparticelle lipidiche

Le particelle sono state prodotte mediante la tecnica di fusione a caldo, per evitare l'utilizzo di solventi organici, con l'aggiunta degli ultrasuoni per cercare di ridurre il più possibile il diametro particellare.

In una prima fase sono stati preparati diversi lotti di particelle, senza principio attivo, utilizzando varie combinazioni di lipide/tensioattivo per determinare le condizioni

che permettono di ottenere particelle con diametri idonei alla somministrazione polmonare. L'ottimizzazione dimensionale è stata fatta valutando anche l'influenza di diversi parametri (rapporto lipide/tensioattivo, velocità di agitazione, tempo dell'emulsione) durante il processo di produzione delle particelle, seguendo le indicazioni di un precedente studio [8].

In una seconda fase, dopo aver selezionato l'intervallo dimensionale ottimale per le diverse coppie di matrice/tensioattivo (gliceril benato - polaxamer), sono stati preparati vari campioni di microparticelle caricate con la Budesonide e su queste sono state effettuate delle prove di rilascio per avere indicazioni sulla loro capacità di intrappolare il farmaco all'interno del core e soprattutto di modularne la diffusione nel tempo (Fig.4.29).

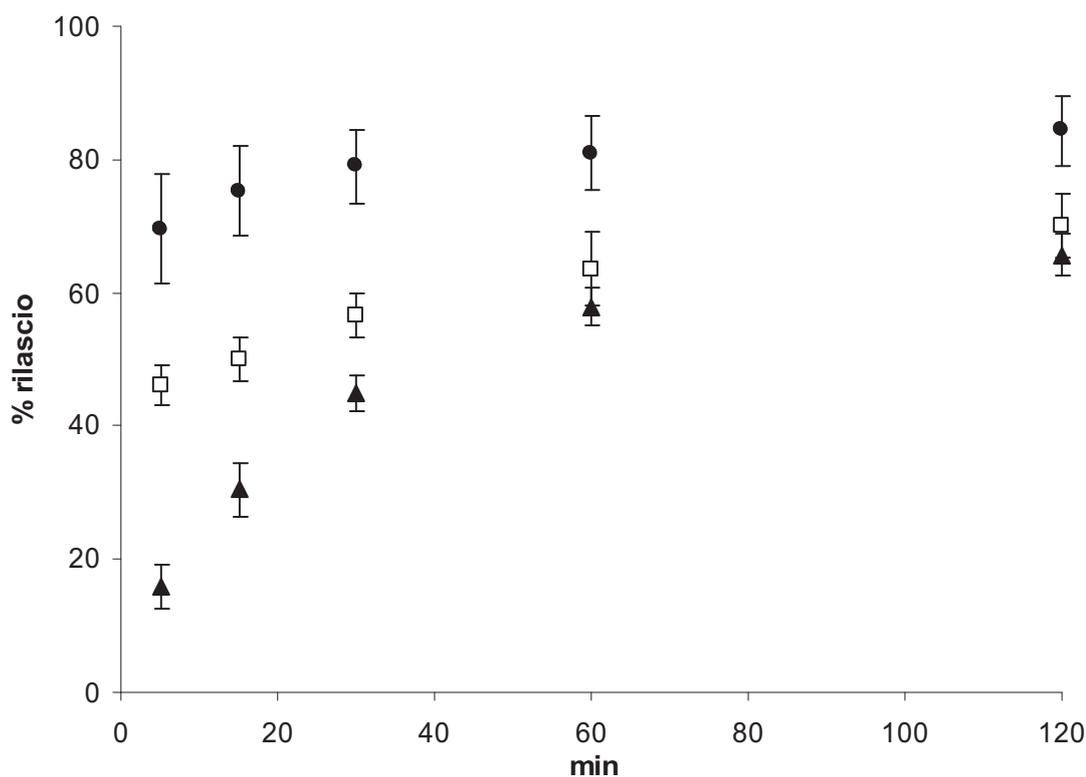


Fig.4.29: Profilo di dissoluzione della Budesonide (●) e del rilascio delle ML costituite da glicerilbenato-polaxamer (▲) e da tristearina-fosfatidilcolina (□).

Queste prove preliminari sono state condotte utilizzando un classico apparato di dissoluzione che opera in condizioni statiche. Poiché le particelle sono altamente idrofobiche e di dimensioni piccole, per valutarne il rilascio in maniera accurata è opportuno utilizzare una cella a flusso, la quale permette di bagnare totalmente le polveri e simulare in maniera più realistica le condizioni a livello polmonare [115]. Inoltre il profilo di dissoluzione della Budesonide è stato determinato sulla materia prima che possiede dimensioni molto inferiori rispetto alle microparticelle, e quindi determina una cinetica di rilascio maggiore. Nonostante queste problematiche, con la metodica tradizionale è stato possibile ottenere utili indicazioni della dissoluzione del farmaco, in quanto il grafico mostra una spiccata modulazione del rilascio da parte delle particelle costituite da gliceril benato/polaxamer rispetto a quelle di tristearina/fosfatidilcolina (Fig.4.29).

In seguito all'individuazione dell'intervallo dimensionale ottimale e della combinazione di lipide/tensioattivo, che garantisce la migliore modulazione del farmaco dalla matrice, si è proceduto alla preparazione delle ML, contenenti Budesonide tramite la tecnica di fusione a caldo con l'aggiunta degli ultrasuoni (seguendo le condizioni descritte nel paragrafo 3.1.2.1.).

La scelta della quantità di Budesonide caricata nelle ML corrisponde a 400 μ g di farmaco per 10mg di polvere inalata, l'equivalente alla dose terapeutica utilizzata in commercio per i farmaci steroidei.

Le microparticelle ottenute sono state analizzate, mediante HPLC [157], per determinare il contenuto (p/p) di Budesonide ($2.9\% \pm 0.3$) e l'efficienza di incapsulazione, corrispondente a $77.9\% \pm 7.5$.

La distribuzione del diametro particellare delle ML è stata determinata mediante diffrazione laser ottenendo come valore medio $3.45\mu\text{m} \pm 0.27$, accettabile per la somministrazione polmonare (diametro aereodinamico ottimale compreso tra 1-6 μm).

Per poter valutare, in maniera precisa, l'influenza del carrier lipidico sul rilascio del farmaco, ma soprattutto sulla simulazione in-vitro del deposito polmonare risulta fondamentale preparare polveri di Budesonide, usate come riferimento, che abbiano un diametro medio simile a quello delle ML.

Per riuscire a produrre queste polveri è stato utilizzato lo "spray-drying" che, grazie alle sue caratteristiche, permette di ottenere particelle con un ampio range dimensionale. In seguito a vari tentativi, fatti modificando numerosi parametri dello strumento (concentrazione della Budesonide, temperatura d'entrata, flusso dell'aria, flusso di N² secco e la velocità della soluzione) sono state ottenute particelle da un soluzione etanolica di Budesonide con diametro di $3.13\mu\text{m} \pm 0.12$ per le polveri amorfe e di $3.22\mu\text{m} \pm 0.09$ per le polveri cristalline (Tab.4.6), determinate sempre tramite diffrazione laser.

Preparazioni	Diametro medio; D(0.5)	Deviazione Standard
ML per fusione	3.45	0.27
SD Budesonide cristallina	3.22	0.09
SD Budesonide amorfa	3.13	0.12

*SD: Spray-dried

Tab.4.6: Riassunto diametri particellare delle diverse preparazioni

Come si può osservare nel grafico a pagina seguente (Fig.4.30), nelle varie preparazioni i profili della distribuzione dimensionale delle polveri sono del tutto confrontabili.

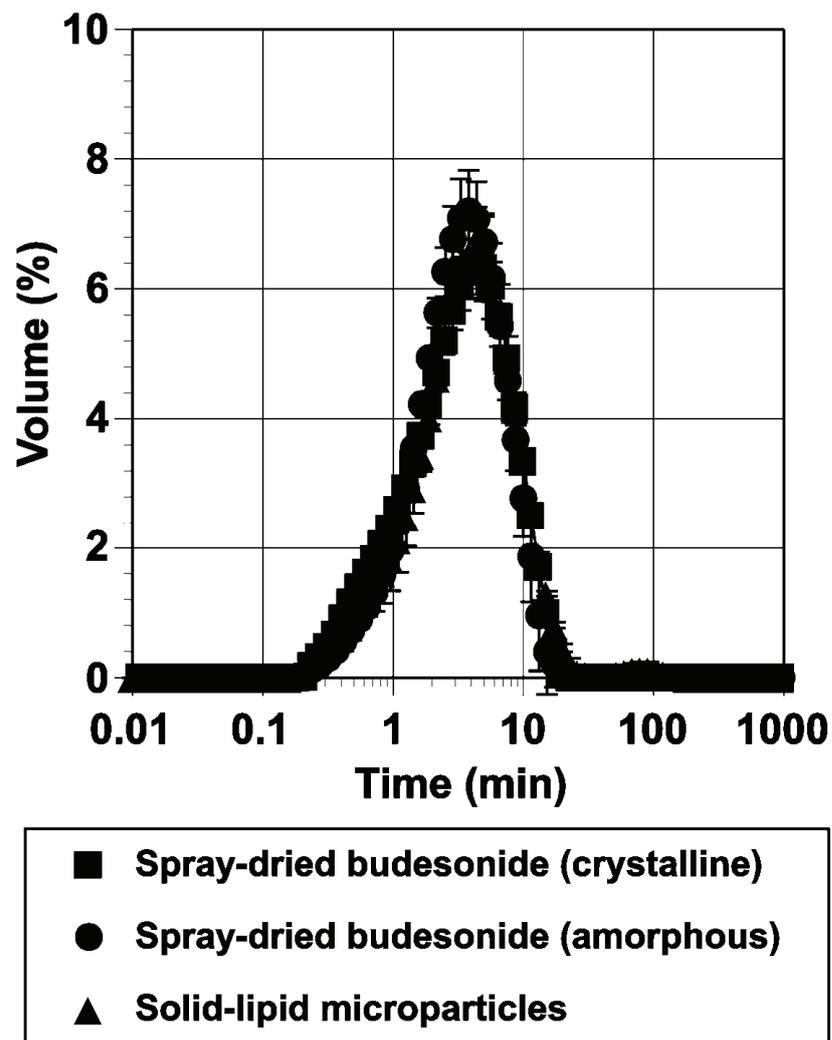


Fig.4.30: Distribuzione del diametro particellare delle ML (▲) e della Budesonide amorfa (●) e cristallina (■) preparate mediante "spray-drying"

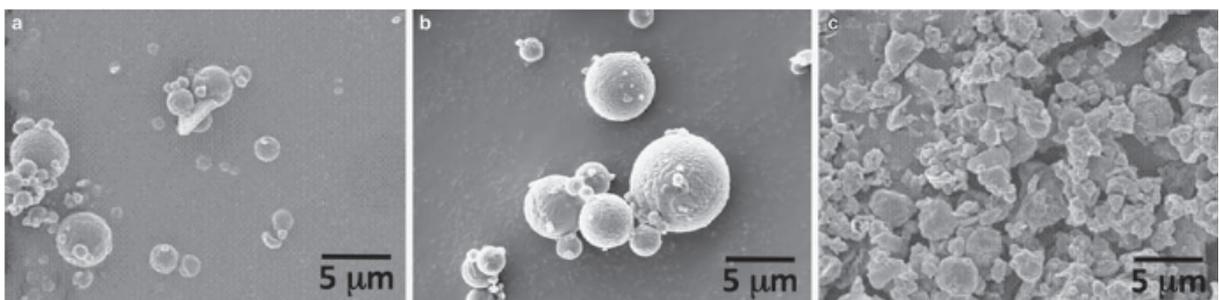


Fig.4.31: Immagini al microscopio a scansione elettronica delle microparticelle lipidiche (c) e della Budesonide amorfa (a) e cristallina (b) preparate mediante "spray-drying"

Ulteriore conferma che il diametro delle varie preparazione rientra nello stesso range è dato dall'analisi qualitativa effettuata tramite SEM. Dalle immagini dei campioni (Fig.4.31) si può osservare che le particelle ottenute con lo "spray-drying" hanno forma sferica regolare, mentre quelle prodotte con la tecnica della fusione presentano una geometria irregolare.

E' interessante notare che le ML, caricate con Budesonide, possiedono una morfologia del tutto confrontabile a quella ottenuta con lo stesso procedimento riportato in un precedente studio [8], anche se in quest'ultimo lavoro la polidispersività era di ben tre ordini di grandezza (0.1-100 μ m).

La risposta termica delle particelle e dei propri componenti è stata valutata con la DSC (Fig.4.32).

Nei termogrammi illustrati nel grafico A (Fig.4.32), corrispondenti alle particelle di Budesonide cristallina prodotte con lo "spray-drying" e alla Budesonide in polvere, si evidenzia un picco endotermico a 259°C che indica il punto di fusione del principio attivo [158,159]. A confronto le particelle di Budesonide amorfe oltre ad avere il picco endotermico della Budesonide a 258°C, presentano un picco esotermico a 110°C, determinati dalla cristallizzazione e dalla successiva fusione del cortisterioido. Questi dati indicano che le particelle di Budesonide, preparate mediante "spray-drying" e con diametro simile alle ML, sono state prodotte con successo.

Nei termogrammi illustrati nel grafico B (Fig.4.32), si osserva che le particelle contenenti solo il lipide presentano due picchi endotermici (uno a ~48°C e un altro maggiore a ~72°C) che possono essere dovuti a transizione polimorfica e fusione endotermica del gliceril benato. Tale lipide è una miscela di mono-, di- e trigliceridi che possono formare vari polimorfi (α , β e β') [160]. Il picco più basso può essere relativo alla transizione polimorfica monotropica della subunità α in quella β , a causa del rapido raffreddamento durante la produzione [160], mentre il picco a 72°C è in accordo con i precedenti studi [160-163].

Dall'analisi termica delle microparticelle lipidiche contenenti Budesonide (ML) si

ottiene un termogramma simile, con i due picchi endotermici ($\sim 48^{\circ}\text{C}$ e $\sim 72^{\circ}\text{C}$) dati dalla transizione polimorfica e dalla fusione del lipide. Non essendoci nessun altro picco relativo alla cristallizzazione della Budesonide amorfa o alla sua fusione si può concludere che la Budesonide risulta miscibile nella componente lipidica fusa.

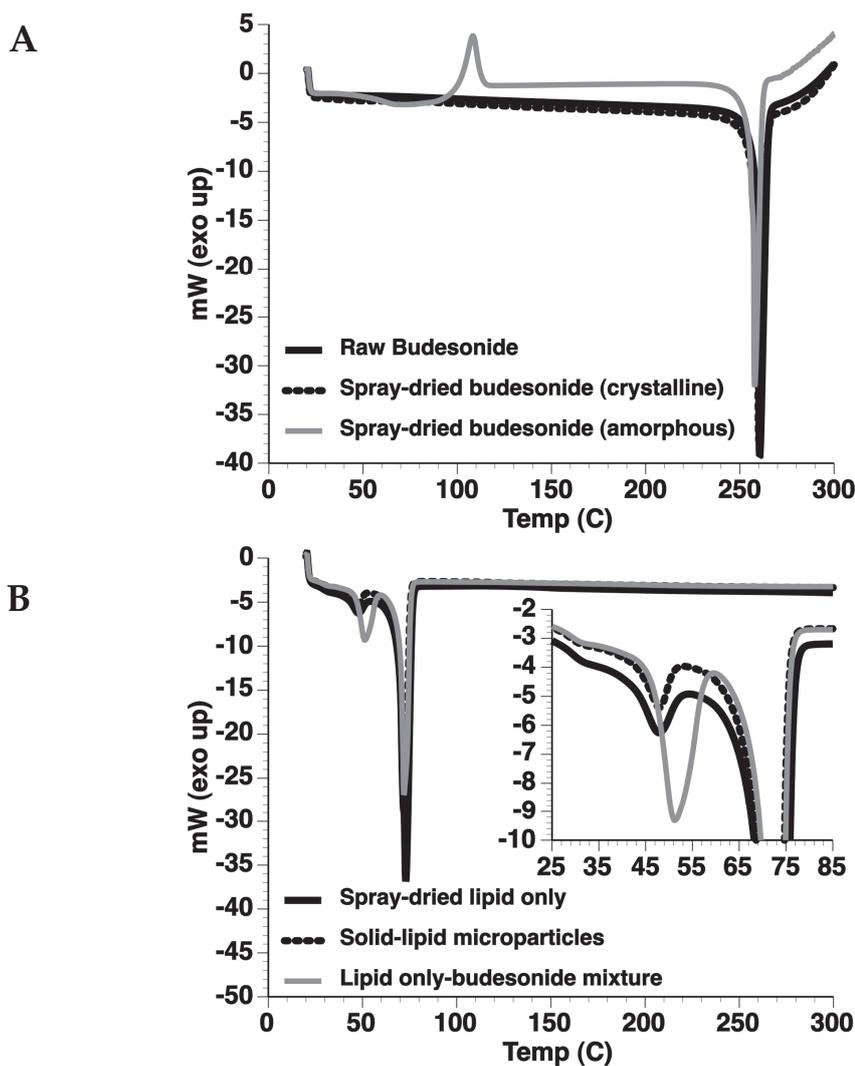


Fig.4.32: Termogrammi delle polveri. In alto: la Budesonide in polvere e le preparazioni mediante "spray-drying" in forma cristallina e amorfa. In basso rispettivamente le particelle con solo il lipide, le ML e la miscela fisica (costituita da Budesonide libera e particelle lipidiche vuote)

Sugli stessi campioni, sono stati effettuati ulteriori studi tramite la diffrazione ai raggi-x. Le analisi (Fig.4.33A) della Budesonide in polvere e delle particelle cristalline

prodotte mediante “*spray-drying*” mostrano un profilo analogo a quello osservato in studi precedenti [158,164], mentre per le particelle amorfe l’analisi mostra un singolo picco diffuso caratteristico di un materiale amorfo.

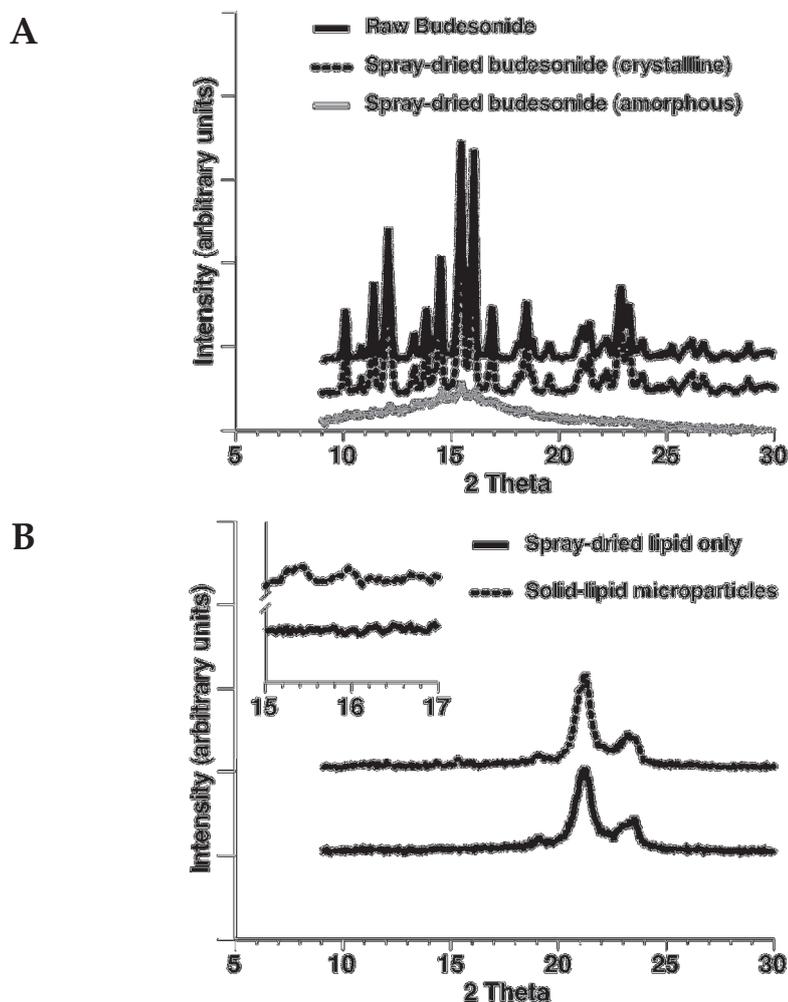


Fig.4.33: Diffrazione delle polveri ai raggi-x. In alto: la Budesonide “raw” in polvere e le preparazioni prodotte con lo “*spray-drying*”. In basso le particelle scariche e le ML (tecnica per fusione)

Le analisi delle microparticelle con e senza Budesonide (Fig.4.33B) mostrano 2 picchi a circa 21.3° e 23.5° che suggeriscono la presenza di una subunità α metastabile e una forma β primaria [160]. Inoltre, dall’ingrandimento del grafico, nelle particelle contenenti Budesonide si possono notare due piccoli picchi a 15.2° e 15.8° attribuibili ad una parziale presenza di principio attivo cristallino sulla matrice lipidica.

4.2.1.2. Studi di diffusione/dissoluzione in-vitro

Per la determinazione delle cinetiche di rilascio delle polveri dalle diverse formulazioni è stato adottato l'apparato 4 delle Farmacopea Britannica [165], modificato secondo le indicazioni fornite da un precedente studio (vedi paragrafo 3.1.9.) [115].

L'apparato a flusso viene considerato un modello sperimentale appropriato e la Farmacopea ne raccomanda l'impiego, per i test a rilascio controllato, nei sistemi particellari [165].

I risultati, ottenuti valutando le polveri amorfe, quelle cristalline e le microparticelle preparate con il metodo della fusione, sono riportati nei grafici a pagina 122 (Fig.4.34) condotti sia in tampone fosfato che in fluido polmonare simulato.

L'influenza delle varie formulazioni e i valori di rilascio della Budesonide sono state analizzate statisticamente usando un metodo a modello-indipendente dei "fit" fattori [115,166,167] (Tab.4.7). In generale, il "fit" fattore confronta direttamente la differenza tra le percentuali del farmaco rilasciate in un precisa unità di tempo, tra un riferimento e la formulazione testata. Il fattore di differenza (f_1) ed il fattore di similitudine (f_2) sono rispettivamente calcolati usando l'equazione 1 e l'equazione 2:

$$\text{Equazione 1 } f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} \times 100$$

$$\text{Equazione 2 } f_2 = 50 \times \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right) \right]^{0.5} \times 100 \right\}$$

Dove:

n = numero dei prelievi ai vari tempi del campione

R_t e T_t = medie percentuali del farmaco rilasciato ad ogni intervallo di tempo (t), del riferimento ed della formulazione testata

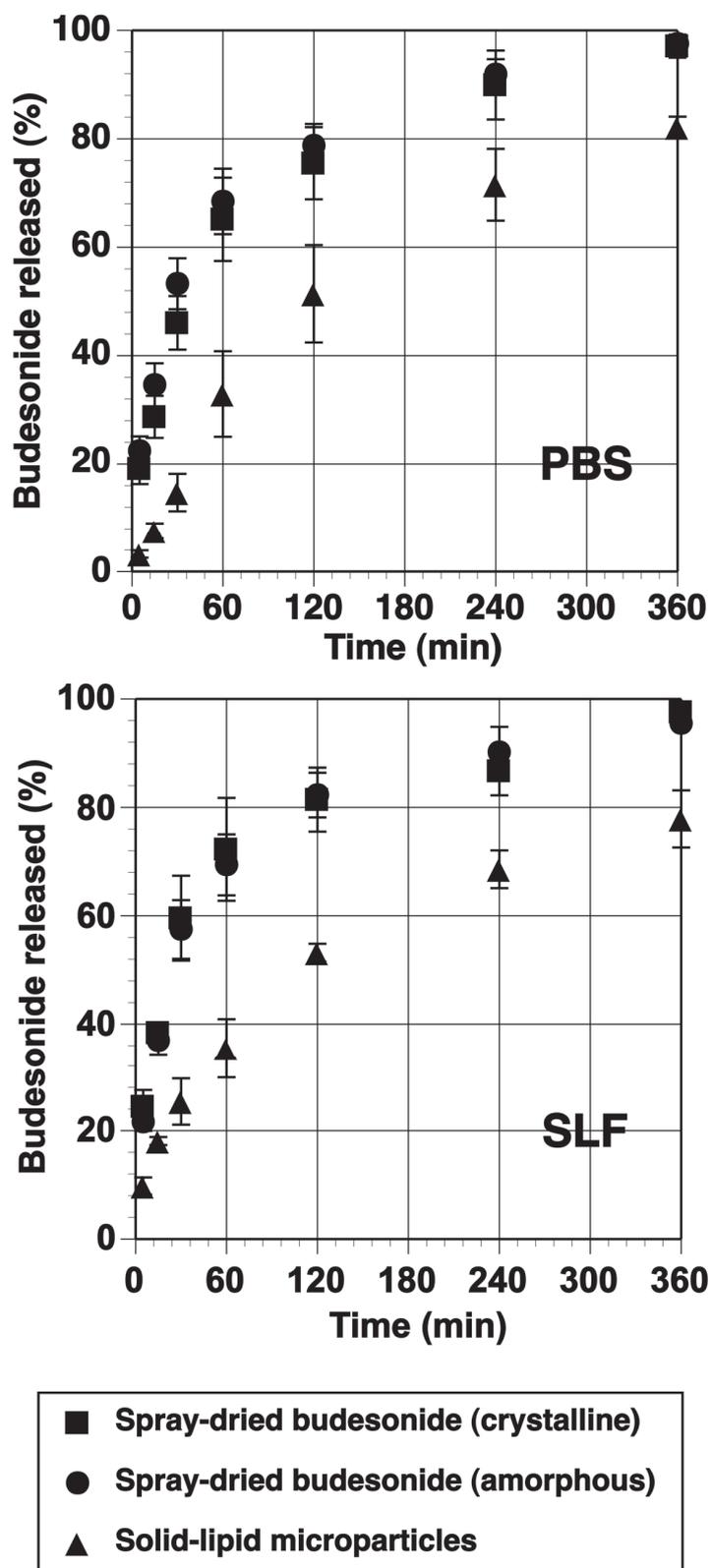


Fig.4.34: Studi di diffusione/dissoluzione in-vitro della Budesonide dalle particelle cristalline (■) e amorphe (●) ottenute con lo "spray-drying" e dalle microparticelle lipidiche prodotte per fusione (▲), in tampone fosfato (PBS, in alto) e nel fluido polmonare simulato (SLF, in basso)

In generale la curva viene considerata statisticamente differente con valori di $f_1 > 15$ e valori di $f_2 < 50$.

Costante	Riferimento	Test	Differenza (f_1) (>15 differente)	Similitudine (f_2) (>50 simile)
Amorfo	PBS	SLF	3.76	72.74
Cristallino	PBS	SLF	8.69	55.85
ML	PBS	SLF	10.77	58.85
PBS	Amorfo	Cristallino	5.169	65.77
PBS	Amorfo	ML	50.41*	28.13*
PBS	Cristallino	ML	30.30*	31.44*
SLF	Amorfo	Cristallino	1.55	85.91
SLF	Amorfo	ML	44.24*	29.36*
SLF	Cristallino	ML	30.72*	29.37*

* $f_1 > 15$ e $f_2 < 50$ determina differenze statistiche

Tab.4.7: Analisi statistica dei profili di diffusione/dissoluzione della Budesonide dalle differenti formulazioni e nei differenti mezzi. Per ogni formulazione sono state effettuate 5 prove

Le analisi dei fattori di differenza e similitudine quando confrontano il fluido polmonare simulato o il tampone fosfato con ciascuna formulazione non determinano una differenza significativa tra i fluidi usati. Questi dati sono in accordo con uno studio precedente [114], nel quale utilizzando particelle cristalline di Budesonide non sono state evidenziate differenze significative tra i profili di rilascio in tampone fosfato e nel fluido polmonare simulato.

Anche dal confronto della dissoluzione tra le particelle amorfe e cristalline, nei vari fluidi, non si riscontrano differenze. Tale comportamento è interessante in quanto ci si aspetterebbe una cinetica di rilascio diversa per le particelle amorfe rispetto a

quelle cristalline.

Infine, il profilo di rilascio della Budesonide dalle microparticelle lipidiche risulta significativamente inferiore, rispetto sia alle particelle amorphe che a quelle cristalline, grazie all'incapsulazione del farmaco all'interno della matrice.

La percentuale di Budesonide in soluzione espressa in funzione del tempo è stata calcolata con una serie di modelli cinetici di rilascio (ordine zero, primo ordine, Hixon-Crowell e Higuchi). Basandosi sul coefficiente di correlazione, R^2 , la migliore funzione matematica per descrivere il rilascio, in tampone fosfato, è il modello di Higuchi ($r\% = kt^{0.5}$) dove i valori di R^2 sono di 0.93, 0.91 e 0.99 rispettivamente per le particelle cristalline, le particelle amorphe e le microparticelle lipidiche.

Dall'analisi matematica dei dati è stato possibile ricavare il tempo corrispondente al 50% del rilascio del farmaco (t_{50}) per ciascuna formulazione:

Amorphe	Cristalline	Microparticelle lipidiche
35.3 min	49.7 min	136.9 min

valori mostrano un moderato incremento nella dissoluzione della Budesonide nelle particelle amorphe rispetto alle cristalline, mentre il t_{50} del farmaco dalle microparticelle lipidiche risulta significativamente più lungo a causa del processo di diffusione.

4.2.1.3. Performance del deposito polmonare in-vitro

L'efficienza di aerosolizzazione delle varie polveri è stata valutata mediante MSLI ("*Multi stage liquid impinger*") usando le procedure descritte nella Farmacopea Britannica [168] (vedi paragrafo 3.1.15.).

La percentuale di Budesonide depositata da ciascuna formulazione nei diversi stadi dell'MSLI è rappresentata in figura 4.34. Il recupero totale di farmaco da tutte le formulazioni risulta maggiore del 95% della dose teorica applicata.

In generale, la Budesonide cristallina possiede una maggiore efficienza d'aerosolizzazione probabilmente a causa dell'incremento nel deposito dello stage 3 (S3, corrispondente a particelle con diametro aereodinamico tra 3.1-6.8 μ m).

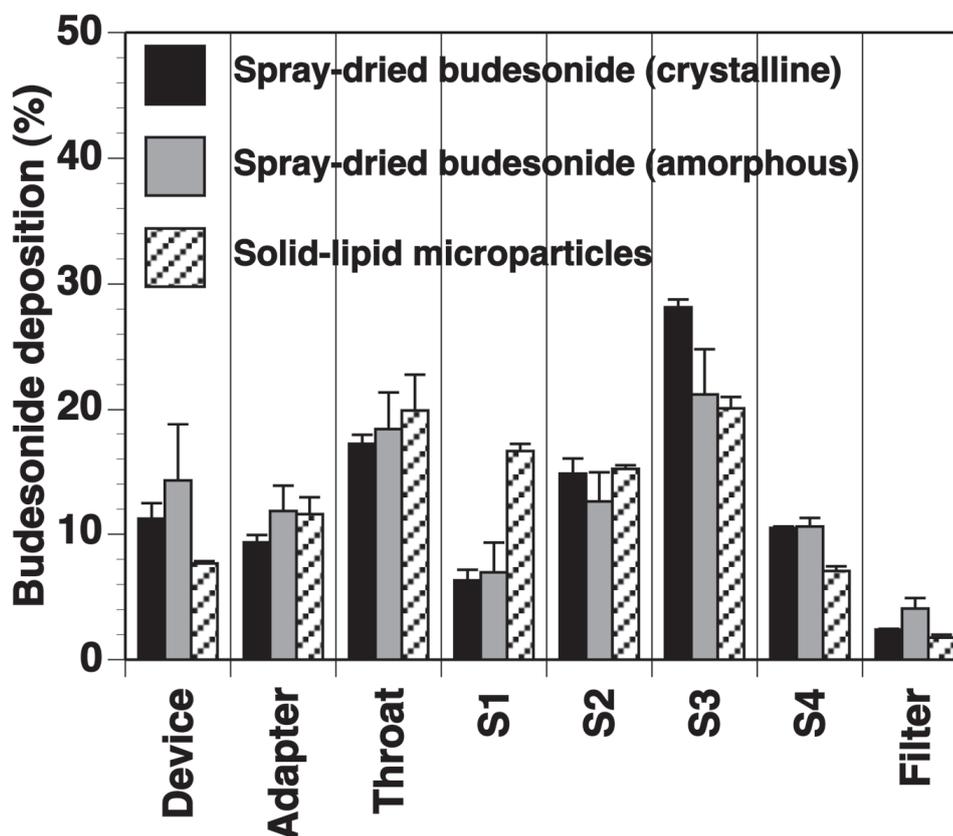


Fig.4.35: Efficienza *in-vitro* dell'aerosol delle particelle amorphe e cristalline di Budesonide e delle microparticelle lipidiche, misurate mediante MSLI

Se confrontiamo la formulazione cristallina con quella amorfa entrambe evidenziano una forma sferica e una simile distribuzione dimensionale, tuttavia è generalmente riportato che il materiale amorfo possiede una maggiore area superficiale, a causa del proprio stato metastabile [169,170].

Le ipotesi per spiegare differenze tra le microparticelle lipidiche ed i campioni di Budesonide risultano invece più complesse. La morfologia delle ML essendo irregolare può ridurre l'area di contatto o promuovere meccanismi ad incastro tra

superfici di particelle contigue. In particolare, il “*device*” delle ML determina un deposito significativamente inferiore rispetto ai campioni preparati mediante “*spray-drying*”. Questo può essere dato dalla ridotta adesione a causa della rugosità delle particelle e/o dalla riduzione dell’energia superficiale. La maggiore differenza si evidenzia nello stage 1, dove il deposito delle ML risulta significativamente maggiore rispetto a quello della Budesonide amorfa e cristallina. Tale frazione rappresenta le particelle con diametro aereodinamico superiore ai 13µm, questo indica che il flusso del processo di aerosol non è sufficientemente potente per favorire la rottura di eventuali agglomerati particellari. Tuttavia, si ottiene un deposito relativamente elevato delle microparticelle negli “*stages*” inferiori.

Per quantificare la performance delle varie formulazioni, sono state effettuate analisi lineari di regressione del deposito percentuale accumulato rispetto al logaritmo del diametro degli stage ed è stata calcolata la massa di particelle con diametro inferiore ai 5µm. Questa massa è rappresentata come la percentuale della dose totale (frazione fine particellare, FPF) ed è considerata rappresentativa delle particelle che dovrebbero avere un effetto terapeutico respiratorio [171]. La FPF delle particelle cristalline ed amorphe è pari a $29.5\% \pm 0.3$ e $27.3\% \pm 2.1$ rispettivamente. Questa differenza di FPF può essere dovuta alle differenze di metastabilità. La FPF delle microparticelle lipidiche è di $21.2\% \pm 0.6$, una percentuale accettabile per questi tipi di “*device*”, in quanto sono normalmente riscontrati valori di FPF inferiori al 20% [34]. I motivi di un valore di FPF inferiore nelle ML rispetto alle preparazioni di Budesonide prodotte con lo “*spray-drying*” può essere determinato da numerosi fattori. Le microparticelle lipidiche subiscono una serie di trasformazioni di fase a temperature relativamente basse che potrebbero comportare una maggiore instabilità e, quindi, una più alta adesione interparticellare rispetto alla Budesonide.

Inoltre, le microparticelle a base lipidica avendo una morfologia irregolare, rispetto alla natura sferica dei campioni allo “*spray-drying*”, potrebbero favorire una maggiore coesione particellare che causa una minore performance dell’aerosol.

5. CONCLUSIONI

Le ricerche condotte nel corso di questa tesi di dottorato hanno dimostrato che le microparticelle lipidiche rappresentano un efficace sistema di veicolazione di principi attivi. Esse infatti permettono di stabilizzare la sostanza incorporata, ridurre l'assorbimento attraverso la pelle e modularne il rilascio.

In particolare nel caso del filtro UV-B, metil benzilidencanfora, la sua incorporazione nelle microparticelle lipidiche ha permesso di ridurre l'assorbimento cutaneo. In questo modo non solo viene migliorata la sua efficienza fotoprotettiva, ma si limitano gli eventuali effetti tossici dovuti alla sua interazione con gli strati più profondi della pelle.

Per il filtro UV-A, butil metossidibenzoilmetano è stato dimostrato che l'effetto stabilizzante delle microparticelle lipidiche può essere ulteriormente potenziato grazie alla incapsulazione del filtro stesso associato con stabilizzanti quali il metil benzilidencanfora e l'octocrilene. In questo caso la matrice lipidica delle particelle oltre a proteggere il butil metossidibenzoilmetano dalla degradazione indotta dalla luce, favorisce la sua interazione con le sostanze stabilizzanti e quindi ne migliora l'efficacia.

Un altro aspetto che è stato investigato è quello relativo alle tecniche di preparazione delle microparticelle lipidiche ed in particolare alla possibilità di ridurre o eliminare l'uso di solventi organici. Questo non solo per ridurre l'impatto ambientale dei metodi di produzione di questi sistemi, specie su scala industriale, ma anche per risolvere i problemi legati alla presenza di tracce di solventi organici in preparazioni di tipo farmaceutico. L'utilizzo di tecniche quali la fusione a caldo e lo "*spray-congealing*" hanno permesso la preparazione di microparticelle lipidiche evitando l'utilizzo di solventi organici. Nel caso dello "*spray-congealing*" non è necessario

utilizzare alcun tipo di solvente. Quest'ultima tecnica ci ha permesso inoltre di ottenere microparticelle lipidiche con un elevato contenuto di principio attivo (>40%). Questo consente di preparare formulazioni con buone caratteristiche funzionali in quanto viene ridotta la quantità di polveri da incorporare nella preparazione per ottenere la concentrazione desiderata di principio attivo.

L'applicazione dei sistemi microparticellari sono stati studiati anche per la somministrazione inalatoria, cercando di sfruttare i vantaggi di biocompatibilità e di diffusione modulata del carrier lipidico. Dai risultati è stato dimostrato che è possibile ottenere particelle con morfologia e range dimensionale idoneo alla veicolazione polmonare. Le microparticelle inoltre, evidenziano un controllo di rilascio della Budesonide nel tempo e una buona performance di deposito polmonare in-vitro, dimostrando la possibilità di un loro potenziale utilizzo nel trattamento dell'asma.

7. BIBLIOGRAFIA

1. R. Langer, *Drug delivery and targeting*, Nature, (1998); **392**: 5-10.
2. M. Brisaert, M. Gabriels, V. Matthijs, J. Plaizier-Vercammen, *Liposomes with tretinoin: a physical and chemical evaluation*, J Pharm Biomed Anal., (2001); **26**(5-6): 909-17.
3. H. Schreier, *The new frontier: gene and oligonucleotide therapy*, Pharm Acta Helv., (1994); **68**(3): 145-59.
4. E. Toubou, HE. Junginger, ND. Weiner, T. Nagai, M. Mezei, *Liposomes as carrier for topical and transdermal delivery*, J Pharm Sci., (1994); **83**(9): 1189-203.
5. W. Mehnert, K. Mader, *Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications*, Advanced Drug Delivery Reviews, (2001); **47**: 165-196.
6. R.H. Muller, K. Mader, S. Gohla, *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-a review of the state of art*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, (2000); **50**: 161-177.
7. C. Schwarz, W. Mehnert, *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery; drug incorporation and physicochemical characterization*, Journal of Microencapsulation, (1999); **16**: 205-213.
8. V. Sanna, N. Kirschvink, P. Gustin, E. Gavini, I. Roland, L. Delattre, et al. *Preparation and in vivo toxicity study of solid lipid microparticles as carrier for pulmonary administration.*, AAPS PharmSciTech., 2004; **5**(2): e27.
9. T. Sebti, K. Amighi, *Preparation and in vitro evaluation of lipidic carriers and fillers for inhalation.*, Eur J Pharm Biopharm., (2006); **63**(1): 51-8.
10. R.H. Muller, W. Mehnert, J.S. Lucks et al., *Solid lipid nanoparticles (SLN)- an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, (1995); **41**: 62-69.

-
11. T. Eldem, P. Speiser, A. Hincal, *Optimization of spray-dried and congealed lipid micropellets and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy*, *Pharm. Res.*, (1991); **8**: 47-54.
 12. R. Cortesi, E. Esposito et al., *Production of lipospheres as carrier for bioactive compounds*, *Biomaterials*, (2002); **23**: 2283-2294.
 13. V. Iannuccelli, G. Coppi, S. Sergi, R. Cameroni, *Preparation and "in vitro" characterization of lipospheres as a carrier for the cosmetic application of glycolic acid*, *Journal Appl. Cosmetol.*, (2001); **19**: 113-119.
 14. R. Bodmeier, J. Wang, H. Bhagwatwar, *Process and formulation variables in the preparation of wax microparticles by a melt dispersion technique. I. Oil-in-water technique for water-insoluble drugs*, *Journal of Microencapsulation*, (1992); **9**: 89-98.
 15. *Spray cooling/spray congealing*, 2007, www.niroinc.com.
 16. M.J. Killeen, *Spray drying and "spray congealing" of pharmaceuticals*, in: J. Swarbrick, J.C. Boylan (Eds.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Marcel Dekker Inc., New York, (1996); **14**: 207-221.
 17. M.B. Mackaplow, I.E. Zarraga, J.F. Morris, *Rotary "spray congealing" of a suspension: effect of disk speed and dispersed particle properties*, *J. Microencapsul.*, (2006); **23**(7): 793-809.
 18. A. Maschke, C. Becker, D. Eyrich, J. Kiermaier, T. Blunk, A. Gopferich, *Development of a "spray congealing" process for the preparation of insulin-loaded lipid microparticles and characterization thereof*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, (2006); **65**(2): 175-187.
 19. M. Savolainen, C. Khoo, H. Glad, C. Dahlvqvist, A.M. Juppo, *Evaluation of controlled-release polar lipid microparticles*, *Int. J. Pharm.* (2002); **244**: 151-161.
 20. M. Savolainen, J. Herder, C. Khoo, K. Lovqvist, C. Dahlvqvist, H. Glad, A.-M. Juppo, *Evaluation of polar lipid-hydrophilic polymer microparticles*, *Int. J. Pharm.*, (2003); **262**: 47-62.
-

-
21. Q. Sheng, D. Deutsch, D.Q.M. Craig, *An Investigation into the interaction between taste masking fatty acid microspheres and alkaline buffer using thermal and spectroscopic analysis*, J. Pharm. Sci. (2005); **95**(5):1022–1028.
 22. B. Albertini, N. Passerini, F. Pattarino, L. Rodriguez, *New "spray congealing" atomizer for the microencapsulation of highly concentrated solid and liquid substances*, Eur. J. Pharm. Biopharm., (2008); **69**(1): 348-357.
 23. S. Jaspert, G. Piel, L. Delattre, B. Evrard, *Solid lipid microparticles: formulation, preparation, characterization, drug release and applications*, Expert Opin. Drug Deliv., (2005); **2**: 75-87.
 24. Y. Mizushima, *Lipid microspheres as drug carrier*, Advanced Drug Delivery Reviews, (1996); **20**: 113-115.
 25. Y. Takenaga, *Application of lipid microspheres for the treatment of cancer*, Advanced Drug Delivery Reviews, (1996); **20**: 209-219.
 26. J.L. Cleland, A. Daugherty and R. Mersny, *Emerging protein delivery methods*, Curr. Opin. Biotech., (2001); **12**: 212–219.
 27. R. Dos Santos, J. Richard, B. Pech, C. Thies, J.P. Benoit, *Microencapsulation of protein particles within lipids using a novel supercritical fluid process*, Int. J. Pharm., (2002); **242**(1-2): 69-78.
 28. A. Rothen-Weinhold, K. Besseghir, E. Vuaridel, E. Sublet, N. Oudry and R. Gurny, *Stability of somatostatin analogue in biodegradable implants*, Int. J. Pharm., (1999); **178**: 213–221.
 29. R. Caputo, E. Alessi, *Istologia della cute e degli annessi cutanei* In: Serri F., Riannetti A.- Trattato di dermatologia Vol. 1 Piccin ed. (2001); **3**: 5- 18.
 30. I. Chan, *The role of extracellular matrix protein in human skin* Clin. Exp. Dermat., (2004); **29**: 52-56.
 31. Lucas, McMichael, Smith, Armstrong, *Solar Ultraviolet Radiation - Global burden of disease from solar ultraviolet radiation*, World Health Organization Public Health and the Environment, (2006); Geneva.
-

-
32. Prota, *Melanina e melanogenesi*, Cosmetic & Toiletries Ed. It. 2/97, 9-22.
 33. Martini, Timmons, Tallitsch, *Anatomia Umana II ed.*, Edises, Napoli.
 34. A. Patrizi, F. Savoia, E. Varotti, I. Neri, *Effetti sanitari negativi della radiazione solare*, ARPA Rivista (2006); N. 2 Marzo-Aprile.
 35. Dunlap et al., *Uric acid photooxidation assay*, 19th IFSCC Congress, Sydney, (2006); Paper n°6, 53-63.
 36. H.N. Ananthswarny, S.M. Loughlin, P. Cox, R.L. Evans, S.E. Ullrich, M.L. Kripke, *Sunlight and skin cancer: inhibition of p53 mutations in UV irradiated mouse skin by sunscreen*, Nature Medicine, (1997); **3**(5): 510-4 .
 37. F.P. Gasparro, M. Mitchnick and J.F. Nash, *A Review of Sunscreen Safety and Efficacy*, Photochemistry and Photobiology, (1998); **68**: 243-256.
 38. A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, T. Murray, J. Xu, C. Smigal, MJ. Thun, *Cancer statistics, 2006*, Cancer j Clinicians (2002); **52**: 23-47
 39. BK. Armstrong, A. Kricger, *The epidemiology of UV induced skin cancer*, J Photochem. Photobiol. B, (2001); **63**(1-3): 8-18.
 40. A. Fourtanier, F. Bernerd, C. Bouillon, L. Marrot, D. Moyal, S. Seite, *Protection of skin biological targets by different types of sunscreens*, Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. (2006); **22**: 22-32.
 41. *EC Commission Recommendation on the efficacy of sunscreen products and the claims made relating thereto*, Official Journal of the European Union, L (2006); **265**: 39-43.
 42. B. Herzog, D. Hueglin, U. Osterwalder, *New sunscreen actives*, in: N. Shaath (Ed.), *Sunscreens*, 3rd ed., Taylor Francis Group, Boca Raton, FL, (2005); 292-296.
 43. Una migliore protezione contro il sole a seguito dell'azione della Commissione europea, 2007, www.europa.eu.
-

-
44. U. Citerinesi, *Cosmesi in Farmacia: le nuove frontiere. Prodotti solari: nuovi criteri formulativi*. Secondo corso di alta formazione in dermocosmesi, Facoltà di Farmacia, Università degli Studi di Napoli Federico II.
 45. M.M. Rieger, *Photostability of Cosmetic Ingredients on the Skin*, *Cosmetics & Toiletries magazine*, (1997); **112**: 65-72.
 46. C. Couteau, M. Pommier, E. Papis, L.J. Coiffard, *Study of the efficacy of 18 sun filters authorized in European Union tested in vitro*, *Pharmazie*, (2007); **62**(6): 449-52.
 47. S.H. Dromgoole and H.I. Maibach, *Sunscreening agent intolerance: contact and photocontact sensitisation and contact urticaria*, *Journal of the American Academy of dermatology*, (1990); **22**(6): 1068-78.
 48. V. A. De Leo, S. M. Suarez, M. J. Maso, *Photoallergic Contact Dermatitis. Results of photopatch testing in New York, 1985 to 1990*, *Arch. Dermatol.*, (1992); **128**(11): 1513-8
 49. A. Deflandre, G. Lang, *Photostability assessment of sunscreen*, *International Journal of Cosmetic Science*, (1998); **10**: 53-62.
 50. N. Tarras-Wahlberg, G. Stenhagen, O. Larkö, A. Rosén, A.M. Wennberg, O. Wennerström, *Changes in ultraviolet absorption of sunscreens after ultraviolet irradiation*, *Journal of Investigate Dermatology*, (1999); **113**: 547-553.
 51. H. Maier, G. Schauberg, K. Brunnhofer, H. Hönigsmann, *Change of ultraviolet absorbance of sunscreen by exposure to solar-simulated radiation*, *Journal of Investigate Dermatology*, (2001); **117**: 256-262.
 52. M. Amorosa, *Principi di Tecnica Farmaceutica*, Libreria Universitaria L. Tinarelli, Bologna
 53. I. Gonda, *The ascent of Pulmonary drug delivery*, *J. Pham. Sci.* (2000); **89**(7): 940-945.
 54. A.J. Hickey et al., *Inhalation aerosol- Physical and biological basis for therapy*, Vol.94, Marced Dekker Ed. NY.
-

-
55. M.J. de Jesus Valle, F.G. Lopez, A.D. Hurlé, A.S. Navarro, *Pulmonary versus systemic delivery of antibiotics: comparison of vancomycin dispositions in the isolated rat lung*, *Antimic. Agents Chemother*, (2007); **51**(10): 3771-3774.
 56. R.M. Berne, M.L. Levy, *Fisiologia*, Casa Editrice Ambrosiana.
 57. S.P. Newman, S.W. Clarke, *Therapeutic aerosol 1 – Physical and practical considerations*, *Torax* (1983); **38**: 881-886
 58. G. Azzali, R.D. Lockart, G.F. Hamilton, F.W. Fyfe, *Anatomia del corpo umano*, CEA
 59. A. Stevens, J. Lowe, *Istologia umana*, CEA
 60. V. Sauret, P.M. Halson, I.W. Brown, J.S. Fleming, A.G. Bailey, *Study of the three-dimensional geometry of the central conducting airways in man using computed tomographic (CT) images*, *J.Anat.* (2002); **200**: 123-34.
 61. H. Fehrenbach, *Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited*, *Respir Res* (2001); **2**: 33-46.
 62. M. Griese, *Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art*, *Eur. Respir. J.* (1999); **13**: 1455-1476.
 63. T.E. Weaver, J.A. Whitsett, *Function and regulation of expression of pulmonary surfactant-associated proteins*, *Biochem. J.* (1991); **273**: 249-264.
 64. F. Possmayer, K. Nag, K. Rodriguez, R. Qanbar, S. Schurch, *Surface activity in vitro: role of surfactant proteins (review)*, *Comp. Biochem. Physiol. Part A* (2001); **129**: 209-220.
 65. M. Lippmann, *Effects of fiber characteristics on lung deposition, retention and disease*, *Env. Health Persp.* (1990); **88**:311-217.
 66. B.O. Stuart, *Deposition and clearance of inhaled particles*, *Env.Health Persp.* (1984); **55**: 369-390.
 67. C. Darquenne, *Aerosol deposition in the human respiratory tract breathing air and 80:20 Heliox*, *J Aerosol Med* (2004); **17**(3): 278-285.
-

-
68. H.C. Yeh, R.F. Phalen, O.G. Raabe, *Factors influencing the deposition of inhaled particles*, *Env. Health Persp.* (1976); **15**: 147-156.
 69. T.R. Gerrity, C.S. Garard, D.B. Yeates, *A mathematical model of particle retention in the air-spaces of human lungs*, *Brit. J. Indust. Med.* (1983); **40**:121-130.
 70. N.R. Labiris, M.B. Dolovich, *Pulmonary drug delivery. Part I: Physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications*, *J. Clin. Pharmacol.* (2003); **56**: 588-599.
 71. A.J. Hickey, N.M. Concessio, *Descriptors of irregular particle morphology and power properties*, *Adv. Drug Del. Rev.* (1997); **26**: 29-40.
 72. T. Martonen, Y. Yang, *Deposition mechanics of pharmaceutical particles in human airways*. In: Hickey AJ, editor. *Inhalation aerosols*. New York: Marcel Dekker, (1996); 3-27.
 73. A.J. Hickey, T.B. Martonen., *Behaviour of hygroscopic pharmaceutical aerosol and the influence of hydrophobic additives*, *Pharm Res*, (1993); **10**(1): 1-7
 74. A.J. Hickey, H.M. Mansour, M.J. Telko, Z. Xu, H.D.C. Smyth, T. Mulder, R. Mclean, J. Langridge, D. Papadopoulos, *Physical characterization of component particles included in dry powder inhalers. II. Dynamic characteristics*, *J. Pharm. Sci.*, (2007); **96**(5): 1302-1319.
 75. I.J. Smith, M. Parry-Billings, *The inhalers of the future? A review of dry powder devices on the market today*, *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, (2003); **16**: 79–95.
 76. N.M. Ahfat, G. Buckton, R. Burrows, M.D. Ticehurst, *Predicting mixing performance using surface energy measurements*, *International Journal of Pharmaceutics*, (1997); **156**: 89–95.
 77. P. Begat, R. Price, H. Harris, D.A.V. Morton, J.N. Staniforth, *The influence of force control agents on the cohesive-adhesive balance in dry powder inhaler formulations*, *KONA*, (2005); **23**: 109–121.
-

-
78. A.J. Hickey, I. Gonda, W.J. Irwin, F.J.T. Fildes, *Effect of hydrophobic coating on the behavior of a hygroscopic aerosol powder in an environment of controlled temperature and relative-humidity*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, (1990); **79**: 1009–1014.
79. K. Iida, Y. Hayakawa, H. Okamoto, K. Danjo, H. Luenberger, *Effect of surface layering time of lactose carrier particles on dry powder inhalation properties of salbutamol sulfate*, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, (2004); **52**: 350–353.
80. P.M. Young, D. Cocconi, P. Colombo, R. Bettini, R. Price, D.F. Steele, M.J. Tobyn, *Characterization of a surface modified dry powder inhalation carrier prepared by “particle smoothing”*, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (2002); **54**: 1339–1344.
81. P. Lucas, K. Anderson, U.J. Potter, J.N. Staniforth, *Enhancement of small particle size dry powder aerosol formulations using an ultra low density additive*, *Pharmaceutical Research*, (1999); **16**: 1643–1647.
82. H.K. Chan, I. Gonda, *Aerodynamic properties of elongated particles of cromoglycic acid*, *Journal of Aerosol Science*, (1989); **20**: 157–168.
83. H.K. Chan, I. Gonda, *Physicochemical characterization of a new respirable form of nedocromil*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, (1995); **84**: 692–696.
84. X.M. Zeng, G.P. Martin, C. Marriott, J. Pritchard, *The use of lactose recrystallised from carbopol gels as a carrier for aerosolised salbutamol sulphate*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (2001); **51**: 55–62.
85. N.Y.K. Chew, H.K. Chan, *Use of solid corrugated particles to enhance powder aerosol performance*, *Pharmaceutical Research*, (2001); **18**: 1570–1577.
86. N.Y.K. Chew, P. Tang, H.K. Chan, J.A. Raper, *How much particle surface corrugation is sufficient to improve aerosol performance of powders?*, *Pharmaceutical Research*, (2005); **22**: 148–152.
-

-
87. L.A. Dellamary, T.E. Tarara, D.J. Smith, C.H. Woelk, A. Adractas, M.L. Costello, H. Gill, J.G. Weers, *Hollow porous particles in metered dose inhalers*, *Pharmaceutical Research*, (2000); **17**: 168–174.
 88. S. Adi, H. Adi, P. Tang, D. Traini, H.K. Chan, P.M. Young, *Micro-particle corrugation, adhesion and inhalation aerosol efficiency*, *European J. Pharm. Sciences*, (2008); **35**: 12-18.
 89. P.P.H. Le Brun, A.H. de Boer, H.G.M. Heijerman, H.W. Frijlink, *A review of the technical aspects of drug nebulization*, *Pharm. World Sci.*, (2000); **22**(3): 75-81.
 90. H. Steckel, F. Eskandar, *Factors affecting aerosol performance during nebulization with jet and ultrasonic nebulizer*, *Eu. J. Pharm. Sci.* (2003); **19**: 443-455.
 91. S.P. Newman, *Principles of metered-dose inhaler design*, *Res. Care* (2005); **50**(9): 1177-1190.
 92. B.Y. Khassawneh, M.K. Al-Ali, K.H. Alzoubi, M.Z. Batarseh, S.A. Al-Safi, A.M. Sharara, H.M. Alnasr, *Handling of inhaled devices in actual pulmonary practice: metered-dose inhaler versus dry powder inhalers*, *Pespir. Care* (2008); **53**(3): 324-328.
 93. N.R. Labiris, M.B. Dolovich, *Pulmonary drug delivery. Part II: The role of inhalant delivery devices and drug formulations in therapeutic effectiveness of aerosolized medications*, *J.Clin.Pharmacol* (2003); **56**:600-612.
 94. S.P. Newman, S.W. Clarke, *Bronchodilator delivery from Gentlehaler, a new low-velocity pressurized aerosol inhaler*, *Chest* (1993); **103**: 1442-1446.
 95. D. Prime, P.J. Atkins, A. Slater, B. Sumby, *Review of dry powder inhalers*, *Adv. D. Del. Rev.* (1997); **26**: 51-58.
 96. P.J. Atkins, *Dry Powder Inhalers: An overview*, *Res. Care* (2005); **50**(10): 1304-1312.
 97. H. Steckel, B.W. Muller, *In vitro evaluation of dry powder inhalers I: drug deposition of commonly used devices*, *Int. J. Pharm.* (1997); **154**: 19-29.
-

-
98. T. Srichana, G.P. Martin, C. Marriott, *Dry powder inhaler: the influence of device resistance and power formulation on drug and lactose deposition in vitro*, *Eu. J. Pharm. Sci.* (1998); **7**: 73-80.
 99. I. Ashurst, A. Malton, D. Prime, B. Sumbly, *Latest advances in the development of dry powder inhalers*, *PSTT*, (2000); **3**(7): 246-256.
 100. S.P. Newman, W.W. Busse, *Evolution of dry powder inhaler design, formulation, and performance*, *Res. Med.* (2002); **96**:293-304.
 101. N. Islam, E. Gladki, *Dry powder inhalers (DPIs), A review of device reliability and innovation*, *Int. J. Pharm.* (2008); **360**: 1-11.
 102. D.A. Edwards, C. Dunbar, *Bioengineering of therapeutic aerosols*, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* (2002); **4**: 93-107.
 103. P.J. Anderson, *Delivery options and devices for aerosolized therapeutics*, *Chest* (2001); **120**: 89-93.
 104. M.S. Coates, D.F. Fletcher, H.K. Chan, J.A. Raper, *The role of capsule on the performance of a dry powder inhaler using computational and experimental analyses*, *Pharm. Res.* (2005); **22**(6): 923-932.
 105. P.H. Hirst, G.R. Pitcairn, J.G. Weers, T.E. Tarara, A.R. Clark, L.A. Dellamary, G. Hall, J. Shorr, S.P. Newman, *In vivo lung deposition of hollow porous particles from a pressurized metered dose inhaler*, *Pharm. Res.* (2002); **19**(3): 258-264.
 106. D.A. Edwards, J. Hanes, G. Caponetti, J. Hrkach, A. Ben-Jebria, M.L. Eskew, J. Mintzes, D. Deaver, N. Lotan, R. Langer, *Large porous particles for pulmonary drug delivery*, *Science* (1997); **276**: 1868-1871.
 107. A.H.L. Chow, H.H.Y. Tong, P. Chattopadhyay, B.Y. Shekunov, *Particle engineering for pulmonary drug delivery*, *Pharm. Res.* (2007); **24**(3): 411-437.
 108. R. Veinhard, *Pharmaceutical particle engineering via Spray Drying.*, *Pharm. Res.*, (2008); **25**(5): 999-1022.
-

-
109. R.N. Brogden, D. McTavish, *Budesonide. An updated review of its pharmacological properties, and therapeutic efficacy in asthma and rhinitis*, *Drugs*, (1992); **44**(3): 375-407.
110. S. Rohatagi, A. Bye, C. Falcoz, A.E. Mackie, B. Meibohm, H. Mollmann, H. Derendorf, *Dynamic modelling of cortisol reduction after administration of fluticasone propionate*, *J Clin Pharmacol.*, (1996); **36**(10): 938-41.
111. M.B. Dolovich, M. Jordana, M.T. Newhouse, *Methodologic considerations in mucociliary clearance and lung epithelial adsorption measurements*, *Eur. J. Nucl. Med.*, (1987); **13**: 45-52.
112. E. Daviskas, S.D. Amderson, I. Gonda, H.K. Chan, P. Cook, R. Fulton, *Changes in mucociliary during and after isocapnic hyperventilation in asthmatic and healthy subjects*, *Eur. Respir J.* (1995); **8**(5): 742-51.
113. P. Rohdewald, N. Von Eiff, G. Wurthwein, *Activation of beclomethasone dipropionate in bronchial secretion and receptor affinities and solubility of inhaled glucocorticoids*, *Atemwegs Lungenkrankh.*, (1990); **16**: 79-84.
114. N.M. Davies, M.R. Feddah, *A novel method for assessing dissolution of aerosol inhaler products*, *Int. J. Pharm.*, (2003); **255**: 175-187.
115. R.O. Salama, D. Traini, H.K. Chan, P.M. Young, *Preparation and characterisation of controlled release co-spray dried drug-polymer microparticles for inhalation 2: evaluation of in vitro release profiling methodologies for controlled release respiratory aerosols*, *Eur J. Pharm Biopharm.*, (2008); **70**(1): 145-52.
116. K. Diem, C. Lenter, *Documenta Geigy Scientific Tables*, 7th ed. p.523 (1970).
117. O.R. Moss, *Simulants of lung interstitial fluid*, *Health Phys.*, (1979); **36**: 447-448.
118. S. Scalia, R. Tursilli, V. Iannuccelli, *Complexation of the sunscreen agent, 4-methylbenzylidene camphor with cyclodextrins: effect on photostability and human stratum corneum penetration*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (2007); **44**: 29-34.
-

-
119. G. Yener, T. Incegul, N. Yener, *Importance of using solid lipid microspheres as carrier for UV filters on the example octyl methoxy cinnamate*, *International Journal of Pharmaceutics*, (2003); **258**: 203-207.
 120. S.A. Wissing, R.H. Muller, *Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vitro release and in vivo skin penetration*, *Journal of Controlled Release*, (2002); **81**(3): 225-233.
 121. N.R. Janjua, B. Mogensen, A. Andersson, J.H. Petersen, M. Henriksen, N.E. Skakkebæk, H.C. Wulf, *Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans*. *J. Invest. Dermatol.*, (2004); **123**: 57–61.
 122. U.M.D. Schauer, W. Völkel, A. Heusener, T. Colnot, T.H. Broschard, F. von Landenberg, W. Dekant, *Kinetics of 3-(4-methylbenzylidene) camphor in rats and humans after dermal application*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, (2006); **216**: 339–346.
 123. R. Tursilli, G. Piel, L. Delattre, S. Scalia, *Solid lipid microparticles containing the sunscreen agent, octyl-dimethylaminobenzoate: effect of the vehicle*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, (2006); **66**: 483–487.
 124. V. Iannuccelli, N. Sala, R. Tursilli, G. Coppi, S. Scalia, *Influence of liposphere preparation on butyl-methoxydibenzoylmethane photostability*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, (2006); **63**: 140–145.
 125. R.H. Müller, M. Radtke, S.A. Wissing, *Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, (2002); **54**: S131–S155.
 126. J.W. Wiechers, *Avoiding transdermal cosmetic delivery*, *Cosmet. Toil.*, (2000); **115**: 39–46.
-

-
127. R. Toll, U. Jacobi, H. Richter, J. Lademann, H. Schaefer, U. Blume-Peytavi, *Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles.*, J. Invest. Dermatol., (2004); **121**: 68–176.
128. K. Klein, I. Palefsky, *Formulating sunscreen products*. In: Shaath, N. (ed.) *Sunscreens*. Taylor Francis Group, Boca Raton, FL, (2005); pp 356–362.
129. E. Chatelain, B. Gabard, C. Surber, *Skin penetration and sun protection factor of five UV filters: effect of the vehicle*, Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol., (2003); **16**: 28–35.
130. H.J. Weigmann, U. Jacobi, C. Antoniou, G.N. Tsikrikas, V. Wendel, C. Rapp, H. Gers-Barlag,, W. Sterry, J. Lademann, *Determination of penetration profiles of topically applied substances by means of tape stripping and optical spectroscopy: UV filter substance in sunscreens*, J. Biomed. Opt., (2005) **10**: 1–7.
131. V.P. Shah, G.L. Flynn, A. Yacobi, H.I. Maibach, C. Bon, N.M. Fleischer, T.J. Franz, S.A. Kaplan, J. Kawamoto, L.J. Lesko, J.P. Marty, L.K. Pershing, H. Schaefer, J.A. Sequeira, S.P. Shrivastava, J. Wilkin, R.L. Williams, *AAPS/FDA workshop report: bioequivalence of topical dermatological dosage forms – methods of evaluation of bioequivalence*, Pharm Res (1998); **15**: 167–171.
132. G. Vielhaber, S. Grether-Beck, O. Koch, W. Johncock, J. Krutmann, *Sunscreens with an absorption maximum of ≥ 360 nm provide optimal protection against UVA1-induced expression of matrix metalloproteinase-1, interleukin-1, and interleukin-6 in human dermal fibroblasts*, Photochem. Photobiol. Sci., (2006); **5**: 275–282.
133. *Eusolex R 9020*, www.merck-chemicals.com.
134. C.A. Bonda, *The photostability of organic sunscreen actives*, in: N. Shaath (Ed.), *Sunscreens*, 3rd ed., Taylor Francis Group, Boca Raton, FL, (2005); 323-345.
135. D.C. Steinberg, *Regulations of sunscreens worldwide*, in: N. Shaath (Ed.), *Sunscreens*, 3rd ed., Taylor Francis Group, Boca Raton, FL, (2005); 180-183.
136. E. Chatelain, B. Gabard, *Photostabilization of butyl methoxydibenzoylmethane (Avobenzone) and ethylhexylmethoxycinnamate by bis-ethylhexyloxyphenol*
-

-
- methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a new UV broadband filter*, Photochem. Photobiol, (2001); **74**: 401-406.
137. B.L. Diffey, R.P. Stokes, S. Forestier, C. Mazilier, A. Rougier, *Suncare products photostability: a key parameter for a more realistic in vitro efficacy evaluation*, Eur. J. Dermatol., (1997); **7**: 226-228.
138. S. Scalia, S. Simeoni, A. Barbieri, S. Sostero, *Influence of hydroxypropyl-cyclodextrin on photo-induced free radical production by the sunscreen agent, butylmethoxydibenzoylmethane*, J. Pharm. Pharmacol., (2002); **54**: 1553-1558.
139. E. Damiani, L. Rosati, R. Castagna, P. Carloni, L. Greci, *Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation*, J. Photochem. Photobiol. B, (2006); **82**: 204-213.
140. N. Lsapidot, O. Gans, F. Biagini, L. Sosonkin, C. Rottman, *Advanced sunscreens: UV absorbers encapsulated in sol-gel glass microcapsules*, J. Sol-Gel Sci. Technol., (2003); **26**: 67-72.
141. COLIPA: *Cosmetic Ingredients. Guidelines for Percutaneous Absorption/ Penetration*, ed 2, August 1997.
142. D. Buchs, H.I. Maibach: *Occlusion does not uniformly enhance penetration in vivo*; in Bronaugh RL, Maibach HI (eds): *Percutaneous Absorption. Drugs – Cosmetics – Mechanisms – Methodology. Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. Boca Raton, Taylor & Francis, (2005); **155**: 65–83.
143. N.S. Agar, G.M. Halliday, R. Barneston, H.N. Ananthaswamy, M. Wheeler, A.M. Jones, *The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: A role for UVA in human skin carcinogenesis.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), (2004); **101**: 4954–4959.
144. S. Scalia, R. Tursilli, N. Sala, V. Iannucceli, *Encapsulation in lipospheres of the complex between butyl methoxydibenzoylmethane and hydroxypropyl- β -cyclodextrin*, Int. J. Pharm., (2006); **320**:79–85.
-

-
145. S. Scalia, M. Mezzena, V. Iannuccelli, *Influence of solid lipid microparticle carriers on skin penetration of the sunscreen agent, 4-methylbenzylidene camphor.*, J. Pharm. Pharmacol., (2007); **59**: 1621–1627.
146. L.R. Gaspar, P.M.B.G. Maia Campos, *Evaluation of the photostability of different UV filter combinations in a sunscreen.*, Int. J. Pharm., (2006); **307**: 123–128.
147. D. Dondi, A. Albini, N. Serpone, *Interactions between different UVB/UVA filters contained in commercial suncreams and consequent loss of UV protection*, Photochem Photobiol Sci, (2006); **5**: 835–43.
148. E. Damiani, W. Baschong, L. Greci, *UV-filter combinations under UV-A exposure: concomitant quantification of overall spectral stability and molecular integrity*, J Photochem Photobiol B, (2007); **87**: 95–104.
149. B. Herzog, S. Mongiat, C. Deshayes, M. Neuhaus, K. Sommer, A. Mantler, *In vivo in vitro assessment of UVA protection by sunscreen formulations containing either butyl methoxydibenzoylmethane, methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol or microfine Zn*, Int J Cosmet Sci, (2002); **24**: 170–85.
150. N. Lapidot, O. Gans, F. Biagini, L. Sosonkin, C. Rottman, *Advanced sunscreens: UV absorbers encapsulated in sol-gel glass microcapsules*, J Sol- Gel Sci Technol., (2003); **26**: 67–72.
151. J.R. Villalobos-Hernandez, C.C. Muller-Goymann, *Sun protection enhancement of titanium dioxide crystals by the use of carnauba wax nanoparticles: The synergistic interaction between organic and inorganic sunscreens at nanoscale*, Int J Pharm., (2006); **322**: 161–170.
152. D. Traini, P.M. Young, *Delivery of antibiotics to the respiratory tract for pulmonary infection: an update.*, Expert Opinion on Drug Delivery, (2009); **6**(9): 897-905
153. G. Scheuch, M.J. Kohlhäufel, P. Brand, R. Siekmeier, *Clinical perspectives on pulmonary systemic and macromolecular delivery.*, Adv Drug Deliv Rev. (2006); **58**(9–10): 996–1008.
-

-
154. X.M. Zeng, G.P. Martin, C. Marriott, *The controlled delivery of drugs to the lung*, Int J Pharm. (1995); **124**(2): 149–64.
 155. R. Salama, D. Traini, H.K. Chan, P.M. Young, *Recent advances in controlled release pulmonary therapy.*, Curr Drug Discov., (2009); **6**: 404–14.
 156. R. Brattsand, A. Thalen, K. Roempke, L. Kallstrom, E. Gruvstad, *Development of new glucocorticosteroids with a very high ratio between topical and systemic activities*, Eur. J. Respir. Dis., (1982); **122**: 62-73.
 157. A. Dalpiaz, M. Mezzena, A. Scatturin, S. Scalia, *Solid lipid microparticles for the stability enhancement of the polar drug N-6-cyclopentyladenosine.*, Int J Pharm., (2008); **355**(1–2): 81–6.
 158. L. Tajber, D.O. Corrigan, O.I. Corrigan, A.M. Healy, *Spray drying of budesonide, formoterol fumarate and their composites—I. Physicochemical characterisation*, Int J Pharm., (2009); **367**(1–2): 79–85.
 159. S.P. Velaga, R. Berger, J. Carlfors, *Supercritical fluids crystallization of budesonide and flunisolide*, Pharm Res., (2002); **19**(10): 1564–71.
 160. J.B. Brubach, V. Jannin, B. Mahler, C. Bourgaux, P. Lessieur, P. Roy, et al. *Structural and thermal characterization of glyceryl behenate by X-ray diffraction coupled to differential calorimetry and infrared spectroscopy*, Int J Pharm., (2007); **336**(2): 248–56.
 161. E.B. Souto, W. Mehnert, R.H. Muller, *Polymorphic behaviour of Compritol888 ATO as bulk lipid and as SLN and NLC*, J Microencapsul., (2006); **23**(4): 417–33.
 162. T. Eldem, P. Speiser, H. Altorfer, *Polymorphic behavior of sprayed lipid micropellets and its evaluation by differential scanning calorimetry and scanning electron microscopy*, Pharm Res., (1991); **8**(2): 178–84.
 163. M. Rao, A. Ranpise, S. Borate, K. Thanki, *Mechanistic evaluation of the effect of sintering on Compritol 888 ATO matrices*, AAPS PharmSciTech., (2009); **10**(2): 355–60.
-

-
164. S. Pham, T.S. Wiedmann, *Note: dissolution of aerosol particles of budesonide in Survant, a model lung surfactant*, J Pharm Sci., (2001); **90**(1): 98–104.
165. Appendix XII B. *Dissolution guidance on dissolution testing*. British Pharmacopoeia Volume 2009. Norwich, UK: TSO; 2009.
166. J.W. Moore, H.H. Flanner, *Mathematical comparison of dissolution profiles*, Pharm Tech., (1996); **20**: 64–75.
167. Guidance for industry; *Dissolution testing of immediate release solid dosage forms*. In: Administration FaD, editor. August 1997.
168. Section 2.9.18—appendix XII C. *Consistency of formulated preparations for inhalation*. British Pharmacopoeia, 2009.
169. J. Zhang, S. Ebbens, X. Chen, Z. Jin, S. Luk, C. Madden, et al., *Determination of the surface free energy of crystalline and amorphous lactose by atomic force microscopy adhesion measurement.*, Pharm Res., (2006); **23**(2): 401–7.
170. H.E. Newell, G. Buckton, D.A. Butler, F. Thielmann, D.R. Williams, *The use of inverse phase gas chromatography to measure the surface energy of crystalline, amorphous, and recently milled lactose*, Pharmaceut Res., (2001); **18**(5): 662–6.
171. J.N. Pritchard, *The influence of lung deposition on clinical response 1.*, J Aerosol Med. (2001); **14**: S19–26.
-

8. ABBREVIAZIONI

API : Ingredienti farmaceutici attivi

BD: Budesonide

BHA : Butilidrossianisolo

BMDBM : Butilmetossidibenzoilmetano

BSA : Albumina di siero bovino

COPD : Ostruzione polmonare cronica

DCS : Calorimetria a scansione differenziale

DPI : Inalatori a polvere secca

DPPC : Dipalmoilfosfatidilcolina

FEV : Volume di forza espiratoria

FPF : Frazione particellare fine

FT : Fluticasone propinato

HPLC : Cromatografia liquida ad alta prestazione

MBC : Metilbenzolidencanfora

MDI : Inalatori pressurizzati a dose controllata

MED : Minima dose erimatogena

ML : Microparticelle lipidiche

MMAD : Diametro della massa media aerodinamica

MSLI : Impattatore liquido a stage multipli

OCR : Octocrilene

OMC : Octilmetossicinnamato

PBS : Soluzione di tampone fosfato

SEM : Microscopio a scansione elettronica

SLF : Fluido polmonare simulato

SPF: Fattore di protezione solare

TA: Triamcinolone Acetonide

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il Prof. Santo Scalia per avermi seguito nel corso di questi anni di dottorato, periodo nel quale ho avuto modo di apprezzarlo sia dal punto di vista scientifico che umano.

Ringrazio inoltre la Prof. Daniela Traini e il Prof. Paul Young per avermi dato la possibilità di svolgere il periodo all'estero, presso l'Università di Sydney, seguendomi con interesse e disponibilità.