

Università di Pisa



Facoltà di Farmacia
Corso di Laurea Specialistica in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

Tesi di Laurea:

**Studi formulativi di terbinafina per uso oftalmico:
messa a punto di un collirio e valutazione della stabilità**

Relatori:

Dott.ssa Susi Burgalassi

Dott.ssa Nadia Nicosia

Candidato:

Nicola Miliani

Anno Accademico 2010/2011

A Babbo, Mamma, Giacomo e Valeria

INDICE

PARTE INTRODUTTIVA

1. LA SOMMINISTRAZIONE OCULARE DEI FARMACI.....	1
1.1. Introduzione	1
1.2. Anatomia dell'occhio	2
1.3. Farmaci ad uso oftalmico.....	6
1.3.1. Cinetica dei farmaci nell'area precorneale	6
1.3.2. Veicoli per la somministrazione oculare di farmaci.....	8
1.3.3. Colliri	9
2. SOLUBILIZZAZIONE DEI FARMACI MEDIANTE L'USO DI TENSIOATTIVI	12
3. INFEZIONI FUNGINE.....	13
3.1. Generalità	13
3.2. Infezioni fungine a livello oculare	17
3.2.1. Endoftalmiti fungine endogene	17
3.2.2. Endoftalmiti fungine esogene	18
3.2.3. Cheratiti fungine	18
3.2.4. Infezioni fungine dell'orbita.....	19
4. CLASSI DI FARMACI ANTIFUNGINI	20
4.1. Sostanze che alterano la membrana	20
4.2. Inibitori della biosintesi della parete cellulare.....	20
4.3. Inibitori della biosintesi dell'ergosterolo.....	20
4.4. Farmaci con meccanismi vari	24

PARTE SPERIMENTALE

1. SCOPO DEL LAVORO.....	25
2. MATERIALI UTILIZZATI.....	26
2.1. Terbinafina cloridrato	26
2.1.1. Caratteristiche chimico-fisiche.....	26
2.1.2. Proprietà farmacologiche	27

2.2.	Vitamina E TPGS.....	29
2.3.	Lutrol F127.....	30
2.4.	Cremophor RH40.....	31
2.5.	Tween 80.....	31
2.6.	Kollidon K30.....	32
3.	CONVALIDA DEL METODO ANALITICO	33
3.1.	Precisione.....	34
3.2.	Accuratezza	35
3.3.	Linearità.....	36
3.4.	Range	37
3.5.	LOD (limit of detection)	37
3.6.	LOQ (limit of quantification)	38
3.7.	Selettività/specificità.....	38
4.	STUDI DI SOLUBILITA' SULLA TERBINAFINA.....	40
4.1.	Scelta delle opportune condizioni di pH.....	40
4.2.	Determinazione della solubilità massima della terbinafina.....	40
5.	SOLUBILIZZAZIONE DELLA TERBINAFINA MEDIANTE L'USO DI TENSIOATTIVI	41
5.1.	Solubilizzazione con Lutrol F127	41
5.1.1.	Determinazione della cmc.....	41
5.1.2.	Prove di solubilità	42
5.2.	Solubilizzazione con Cremophor RH40	42
5.2.1.	Determinazione della cmc.....	42
5.2.2.	Prove di solubilità	43
5.3.	Solubilizzazione con Vitamina E TPGS	43
6.	STABILITA' DELLE FORMULAZIONI	44
7.	RISULTATI E DISCUSSIONE	45
	<i>Bibliografia</i>	48
	<i>Tabelle e grafici</i>	50

1. LA SOMMINISTRAZIONE OCULARE DEI FARMACI

1.1. Introduzione

La somministrazione topica di farmaci a livello oculare è un problema molto complesso che rende difficile il trattamento di molti disturbi oculari. L'accesso dei farmaci ai tessuti oculari interni è infatti limitato dalle barriere protettive dell'occhio, essenziali per la sua funzione visiva.

La cornea, a causa della sua particolare struttura, è un'efficace barriera che limita l'accesso dei farmaci alle strutture più interne essendo composta da una parte epiteliale lipofila, che funge da barriera per i farmaci idrofili, e da uno stroma idrofilo, che funge da barriera per i farmaci lipofili. Come risultato, solo quantità minime di principio attivo possono attraversare la cornea e diventare disponibili nell'umor acqueo.

La terapia topica oftalmica, inoltre, risulta complicata da una serie di meccanismi che esistono nell'area precorneale e che sono preposti a proteggere la superficie dell'occhio da sostanze estranee. La biodisponibilità di un farmaco applicato topicamente, ossia la percentuale di dose somministrata che penetra nella camera anteriore, è spesso inferiore all'1% della dose.

Quando una soluzione oftalmica viene instillata nel sacco congiuntivale inferiore, il riflesso di ammiccamento produce una perdita sostanziale di volume attraverso il sistema di drenaggio. Inoltre, si deve valutare anche l'effetto della velocità del turnover lacrimale sulla concentrazione e la quantità di farmaco che rimane nell'occhio: via via che il volume precorneale e lacrimale si riduce, la velocità di turnover del fluido lacrimale ha maggiore importanza sulla quantità di farmaco residuo. Quindi, la quantità di farmaco che raggiunge la camera anteriore dipende da due processi in competizione tra loro: la velocità con cui il farmaco viene allontanato dall'area precorneale e la velocità di penetrazione corneale del farmaco.

In pratica, il successo di una qualsiasi terapia topica oftalmica dipende dalla buona penetrazione corneale e dalla ritenzione al sito di assorbimento del principio attivo.

Un veicolo oculare efficace deve dunque possedere le seguenti caratteristiche:

- ✓ facilità di somministrazione
- ✓ buona compliance da parte del paziente
- ✓ aumentare il tempo di permanenza di un farmaco al sito di assorbimento

1.2. Anatomia dell'occhio

L'apparato visivo è costituito essenzialmente da tre formazioni:

- bulbo o globo oculare (Fig.1.) situato nella cavità orbitaria
- vie ottiche o visive, un insieme di fibre nervose, che dal bulbo oculare si dipartono e raggiungono la corteccia cerebrale
- annessi oculari, strutture accessorie di varia natura e consistenza disposte attorno al bulbo oculare

Il nervo ottico è formato dagli assoni delle cellule gangliari della retina che in corrispondenza del polo posteriore del bulbo oculare attraversano lo strato retinico, si mielinizzano e si riuniscono a formare il nervo ottico. Questo viene avvolto dalle meningi, si porta indietro nella cavità orbitaria e passa nella fossa cranica media attraverso il foro ottico. A questo punto incrocia parzialmente le proprie fibre con quelle del nervo controlaterale formando il chiasma ottico, da cui prosegue come tratto ottico fino ai corpi genicolati laterali del diencefalo, e da qui originano proiezioni corticali verso la corteccia visiva del lobo occipitale.

Gli annessi oculari sono costituiti essenzialmente da tre formazioni:

- le palpebre
- la congiuntiva
- l'apparato lacrimale

Le palpebre sono formazioni muscolo-cutanee in numero di due per lato, una superiore e più estesa ed una inferiore. Esse sono dotate di spiccata mobilità e consentono di occludere la parte anteriore dell'orbita.

La congiuntiva è una membrana mucosa che contrae rapporti stretti sia con gli altri organi annessiali che con il bulbo; infatti anteriormente riveste la superficie interna delle palpebre (congiuntiva palpebrale), quindi si continua posteriormente per poi riflettersi verso il globo, formando un ampio fornice e infine si distende sulla porzione anteriore della sclera (congiuntiva bulbare).

L'apparato lacrimale consiste in due parti nettamente distinte, una destinata alla produzione delle lacrime (ghiandole lacrimali), l'altra destinata al loro drenaggio (vie lacrimali). Il sistema secretivo è costituito da una ghiandola principale situata nell'angolo supero-esterno dell'orbita e da varie ghiandole accessorie (di Krauss, di Ciacco, di Mornz). Queste ghiandole hanno la funzione di secernere continuamente il fluido lacrimale, il quale facilita lo scorrimento delle palpebre sul globo oculare, asporta le particelle estranee che si depositano sulla superficie di questo, ed elimina gli effetti dannosi che sarebbero causati agli epiteli congiuntivale e sclerale dall'evaporazione degli umori.

Il fluido lacrimale si raccoglie presso l'angolo mediale dell'occhio, e attraverso i puntini lacrimali penetra nel dotto naso-lacrimale e sbocca nel meato nasale inferiore.

Il bulbo oculare è contenuto nell'orbita, la quale è scavata tra le ossa del cranio e quelle della faccia e rappresenta un sistema proiettivo per tale organo. Ha una parte costituita da tre tonache sovrapposte, all'interno delle quali sono contenuti i mezzi diottrici: la più esterna è di natura fibrosa, ed è rappresentata per i 5/6 dalla sclera e per la restante

parte dalla cornea. La sclera si presenta come una membrana opaca, bianca, assai resistente ma dotata di una certa elasticità e povera di vasi sanguigni. Nella sua porzione posteriore presenta un orifizio (canale intrasclerale) che permette il passaggio del nervo ottico, mentre anteriormente e attraverso una limitata area di transizione (lembo sclero-corneale) si continua con la cornea. Questa rappresenta la parte trasparente della tonaca fibrosa; è dotata di elevata resistenza e flessibilità, non è vascolarizzata, ed è formata da cinque strati strutturalmente ben differenziati. Lo strato corneale più esterno (epitelio), generalmente a contatto con l'aria, in condizioni di chiusura palpebrale viene a trovarsi a contatto con la congiuntiva palpebrale, con l'interposizione di un sottile film lacrimale; lo strato più interno (endotelio), invece, delimita anteriormente la camera anteriore.

La camera anteriore è delimitata posteriormente da un brevissimo tratto del corpo ciliare, dall'iride e dalla porzione del cristallino che si affaccia nel forame pupillare, e contiene umor acqueo. Quest'ultimo è un liquido limpido, incolore, a contenuto proteico estremamente scarso, prodotto per la maggior parte a livello dell'epitelio che ricopre il corpo ciliare. Esso attraversa il forame pupillare per poi venire drenato a livello dell'angolo della camera anteriore, formato dal congiungimento della cornea con l'iride. A questo livello l'umor acqueo, sollecitato da una pressione intraoculare che generalmente si aggira intorno ai 14-20 mmHg, si immette nel canale di Schlemm, dal quale fuoriesce per mezzo delle vene acquose o episclerali.

La tonaca media è riccamente vascolarizzata e pigmentata, e comprende dall'avanti all'indietro: iride, corpo ciliare e coroide.

L'iride rappresenta il sistema capace di regolare l'intensità luminosa e la profondità di campo; il colore della sua superficie anteriore varia da soggetto a soggetto, mentre lo strato più profondo è nero o molto scuro in tutti i soggetti normali. Al centro, l'iride presenta un foro (la pupilla) il cui diametro può aumentare (midriasi) o diminuire (miosi), regolando in questo modo l'intensità luminosa e la profondità del campo.

La tonaca interna, di natura nervosa, è rappresentata dalla retina, la quale tappezza la faccia profonda dell'intera uvea e si estende dalla papilla ottica ai confini con il corpo ciliare, continuandosi poi nei due strati epiteliali di questo. E' una membrana molto sottile, con spessore massimo di 0.4 mm a livello della papilla ottica, ed in condizioni normali è trasparente.

La retina è formata da dieci strati, costituiti da elementi differenziati sia dal punto di vista morfologico che funzionale. I recettori sono raggruppati nello strato dei coni (più numerosi nell'area retinica centrale) e dei bastoncelli (più numerosi alla periferia). L'area della visione distinta è situata posteriormente e al centro, dove la retina riduce notevolmente il suo spessore (macula o fovea)

All'interno del globo oculare ci sono i mezzi diottrici, dei quali il più importante è il cristallino o lente.

Il cristallino è un organo privo di vasi e di nervi, dotato di una certa elasticità, con aspetto di lente biconvessa, disposto ortogonalmente rispetto all'asse ottico e racchiuso in una capsula connessa con il corpo ciliare mediante un legamento sospenditore. Buona parte della sua superficie è bagnata dall'umor acqueo, dal quale riceve nutrimento per diffusione. Il cristallino prosegue il suo sviluppo anche nella vita post-natale e pertanto va incontro, con l'età, a modificazioni importanti dello spessore, della trasparenza e dell'elasticità.

L'ampia cavità che si estende dalla superficie posteriore del cristallino fino alla coppa retinica è interamente occupata da una formazione di sostanza gelatinosa, trasparente: il corpo vitreo. Esso deve essere considerato, così come l'umor acqueo, una struttura diottrica, nutritizia, ma anche morfostatica, in quanto contribuisce ad assicurare la normale forma del bulbo oculare. E' costituito essenzialmente da una sostanza con contenuto elevato di mucopolisaccaridi (acido ialuronico) e da cellule connettivali.

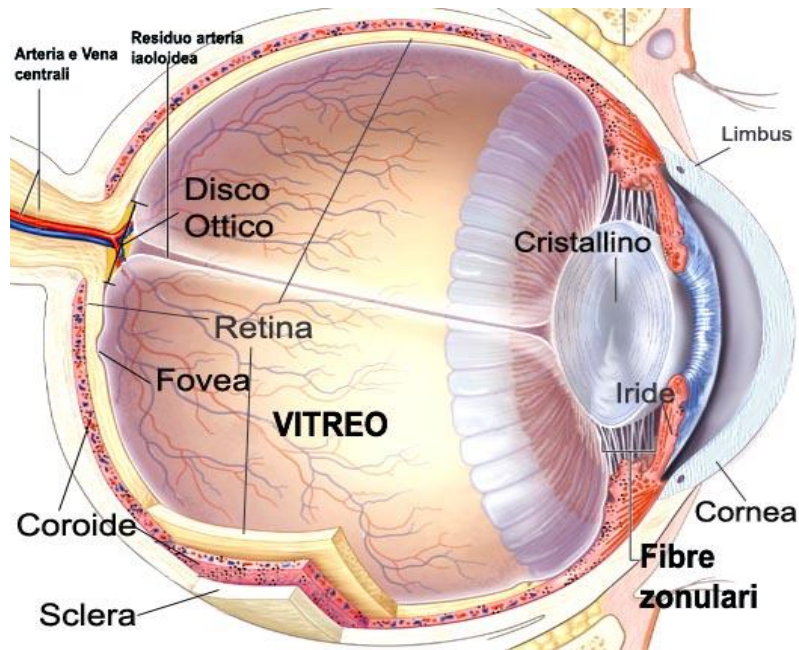


Fig. 1. Sezione del bulbo oculare

Il bulbo oculare è mantenuto in sede ed è messo in movimento da un apparato muscolare costituito da muscoli retti (laterali, superiore, mediale e inferiore) e obliqui (superiori e inferiori). Questi muscoli originano, ad eccezione dell'obliquo inferiore, dall'anello di Zinn, una formazione fibrosa posta all'apice dell'orbita, e si inseriscono direttamente sulla sclera. I muscoli estrinseci sono avvolti, insieme a parte del bulbo, dalla capsula di Tenone, una guaina fibrosa che consente e limita allo stesso tempo i movimenti oculari di verticalità, lateralità e torsione [1,2].

1.3. Farmaci ad uso oftalmico

1.3.1. Cinetica dei farmaci nell'area precorneale

I farmaci oftalmici agiscono generalmente su siti di azione posti all'interno dell'occhio, e la loro attività è determinata dall'efficacia

dell'assorbimento transcorneale e della quantità di principio attivo che raggiunge la camera anteriore [3,4].

Non tutto il farmaco somministrato è disponibile per il passaggio transcorneale, in quanto intervengono diversi fattori precorneali che determinano la perdita del principio attivo, tra cui:

- Eliminazione per drenaggio
- Eliminazione per ammiccamento
- Turnover lacrimale
- Diluizione da lacrimazione indotta
- Scarsa permeabilità corneale e sclerale alle sostanze estranee
- Binding con le proteine lacrimali
- Assorbimento congiuntivale e sclerale
- Evaporazione lacrimale
- Metabolismo

Per quanto riguarda il turnover lacrimale, la velocità di ricambio del fluido lacrimale è uguale al 16% al minuto, ossia una velocità di circa 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ [5]. Esiste ovviamente una certa variabilità individuale, ad esempio nei soggetti anziani il flusso lacrimale è ridotto e questo può portare ad un maggior assorbimento corneale [6].

Anche a livello oculare, così come nel torrente circolatorio, il farmaco può legarsi alle proteine, non riuscendo in questo modo ad attraversare la cornea. Questo fattore però non porta ad una notevole perdita, perché la quantità di proteine presente nelle lacrime è abbastanza bassa, circa lo 0.2% [7], ed è ulteriormente ridotta dallo stesso volume di soluzione instillato.

Un altro meccanismo che ostacola la permanenza del farmaco nel sacco congiuntivale è l'assorbimento non produttivo, cioè l'aliquota di farmaco che viene assorbito a livello della congiuntiva palpebrale e sclerale. L'elevata area superficiale della congiuntiva (circa 5 volte maggiore rispetto a quella della cornea) e la sua buona permeabilità nei confronti di diversi farmaci possono favorire l'assorbimento sistemico [8,9].

Tra i fattori che possono determinare una perdita di principio attivo ci sono anche enzimi in grado di metabolizzare i farmaci e fenomeni di evaporazione.

Tutti questi meccanismi costituiscono fattori di perdita che influenzano la concentrazione di farmaco nell'umor acqueo.

Per migliorare in maniera significativa la biodisponibilità di un farmaco applicato topicamente, è necessario perciò ridurre i processi di perdita o aumentare la permeabilità corneale.

1.3.2. Veicoli per la somministrazione oculare di farmaci

I farmaci oftalmici sono somministrati per via topica, mediante applicazione nel sacco congiuntivale, e permettono di evitare l'uso orale, che comporterebbe pesanti effetti collaterali a causa delle alte dosi richieste per ottenere una concentrazione attiva a livello oculare.

Le possibili forme farmaceutiche impiegate per la somministrazione oftalmica di principi attivi sono:

- soluzioni o sospensioni acquose (colliri)
- soluzioni o sospensioni oleose
- forme semisolide (unguenti, geli acquosi)
- forme solide (inserti, lenti a contatto medicate, ecc.)
- sistemi particellari a rilascio controllato (liposomi, microsfe, nanoparticelle)
- sistemi oftalmici mucoadesivi
- uso di agenti complessanti

Di seguito verranno trattate esclusivamente le soluzioni acquose (colliri), in quanto oggetto di questa tesi.

1.3.3. Colliri

La preparazione oftalmica più diffusa è il collirio. Secondo la **F.U.** “ i colliri sono soluzioni oppure sospensioni sterili, acquose o oleose, contenenti uno o più medicinali, destinate ad essere applicate nel sacco congiuntivale o sulla cornea”.

Qualsiasi collirio rappresenta per l'occhio un corpo estraneo, potendo provocare sensazione dolorosa, arrossamento della congiuntiva e lacrimazione. La formulazione dei colliri deve essere condotta in modo da ridurre al minimo queste reazioni; in particolare non deve determinare una abbondante lacrimazione e quindi un rapido allontanamento del farmaco. Particolare attenzione deve quindi essere posta ad alcuni parametri, quali: sterilità, preservazione dell'inquinamento microbico, tonicità e pH.

Per quanto riguarda la tonicità, di norma i colliri devono essere isotonici con il fluido lacrimale, ma l'occhio tollera senza danno apparente soluzioni di tonicità equivalente a soluzioni di NaCl con concentrazione variabile tra 0.5 e 1.8 %.

Per quanto riguarda il pH invece, i colliri acquosi contengono spesso sistemi tampone che mantengono il pH uguale a 7.4; si può seguire il concetto di “isoidria”, quando il pH della preparazione è allo stesso valore di quello del fluido lacrimale, o di “euidria”, che consiste nel realizzare condizioni di pH che siano il meno possibile irritanti per la superficie oculare e allo stesso tempo consentano la migliore stabilità ed efficacia della preparazione.

Il pH della preparazione può influenzare la penetrazione oculare dei farmaci:

- effetto sulla lacrimazione, causato da valori di pH non fisiologici
- effetto sulla ionizzazione del farmaco

Valori estremi di pH causano irritazione ed intensa lacrimazione, mentre valori minimi di irritazione sono stati riscontrati tra pH 8 e 10. E' stato osservato che un collirio con basso valore di pH non causa necessariamente bruciore o irritazione: sarà la lacrimazione riflessa a

provvedere alla diluizione e alla neutralizzazione. Il tempo necessario per la neutralizzazione e il ritorno del pH al valore fisiologico varia tra 2-3 e 20 minuti, a seconda del pH, del volume e della capacità tamponante della soluzione instillata.

Oltre a dare ai colliri acquosi la stessa tonicità e lo stesso pH del fluido lacrimale, si è cercato di dare loro anche la stessa viscosità; in questo modo viene diminuita l'azione irritante del collirio ma, soprattutto, si prolunga il tempo di contatto tra farmaco ed occhio. Ad evitare il pericolo di occlusione del canale lacrimale la viscosità non deve essere superiore a 40-50 cP, e le sostanze impiegate come viscosizzanti devono avere, come requisito particolare, un indice di rifrazione il più possibile vicino a quello delle lacrime [10].

La concentrazione del farmaco nel liquido lacrimale in funzione del tempo, dopo applicazione topica di una soluzione acquosa, presenta un rapido aumento seguito da una altrettanto rapida diminuzione: questo porta alla necessità di eseguire somministrazioni ripetute, le quali tuttavia provocano picchi di concentrazione del farmaco elevati, con possibili effetti tossici collaterali seguiti da periodi in cui la concentrazione del farmaco è inferiore alla dose terapeutica.

Sono stati eseguiti diversi studi tecnologici per migliorare la biodisponibilità dei farmaci applicati mediante instillazione, aumentando da una parte la permeabilità dei farmaci attraverso l'epitelio corneale, e dall'altra i tempi di residenza dei principi attivi al sito di assorbimento [11-14].

L'aggiunta di viscosizzanti (polimeri idrofili naturali, semisintetici o sintetici, quali ad esempio derivati della cellulosa e PVP) alle soluzioni acquose è un possibile metodo per ottenere, mediante l'aumento della viscosità delle soluzioni, un aumento della saturazione del film lacrimale, dovuto probabilmente ad una riduzione della velocità di drenaggio e ad un aumento del tempo di ritenzione del film lacrimale viscosizzato. Ne consegue un aumento della penetrazione intraoculare e dell'effetto farmacologico [15].

Per aumentare la biodisponibilità oculare dei farmaci sono stati utilizzati anche polimeri mucoadesivi, in grado di interagire con lo strato di mucina che ricopre la superficie corneale e stabilizza il film lacrimale.

Un aumento di biodisponibilità può essere ottenuto anche quando il farmaco è salificato con un polimero ad alto peso molecolare; infatti, dalla salificazione della pilocarpina con polimeri naturali acidi come l'acido ialuronico, si ottengono derivati che, somministrati in soluzione acquosa, mostrano un miglior effetto miotico rispetto ad una soluzione standard di pilocarpina nitrato [16].

2. SOLUBILIZZAZIONE DEI FARMACI MEDIANTE L'USO DI TENSIOATTIVI

La solubilizzazione di farmaci mediante l'uso di tensioattivi utilizzati ad una concentrazione al di sopra della concentrazione micellare critica (cmc) offre buone prospettive nella preparazione di formulazioni liquide.

La disposizione delle molecole di farmaco all'interno delle micelle dipende dalle proprietà polari e da quelle non polari della molecola di tensioattivo. Le molecole di farmaco non polari, quando solubilizzate in sistemi acquosi contenenti tensioattivi ionici, si dispongono all'interno della porzione idrocarburica delle micelle del tensioattivo, mentre quelle polari sono adsorbite sulla superficie delle micelle stesse. Viceversa, molecole con caratteristiche sia polari che apolari, tendono ad allinearsi in una porzione intermedia, ma sempre all'interno delle micelle. Con micelle formate da tensioattivi non ionici, alcuni composti (ad esempio fenoli o sostanze con gruppi ossidrilici capaci di legarsi con l'ossigeno etero del gruppo poliossietilenico) sono trattenuti tra le catene poliossietileniche.

La molecola di tensioattivo può essere considerata come un nucleo idrocarburico circondato dalle catene poliossietileniche protese all'interno della fase continua acquosa.

Per potere utilizzare il tensioattivo nelle formulazioni è essenziale che esso sia atossico, miscibile con i liquidi biologici, privo di odori sgradevoli, e poco volatile. Inoltre, è importante la concentrazione di tensioattivo utilizzata: un largo eccesso è indesiderato, in quanto potrebbe essere tossico e ridurre sia l'assorbimento che l'attività del principio attivo; viceversa, una quantità insufficiente può portare alla precipitazione del materiale solubilizzato. La quantità di sostanza che può essere solubilizzata da una data quantità di tensioattivo è funzione delle caratteristiche polari-apolari del tensioattivo (HLB o bilancio idro-lipofilo).

Nelle formulazioni contenenti agenti solubilizzanti si possono osservare variazioni nell'assorbimento, nella biodisponibilità, nell'attività e nella stabilità del farmaco. Inoltre, la formulazione può risultare più tossica sia per la presenza del tensioattivo sia per l'effetto solubilizzante del tensioattivo stesso sugli additivi.

3. INFEZIONI FUNGINE

3.1. Generalità

Fino a non molto tempo fa la terapia farmacologica delle infezioni fungine è rimasta molto arretrata rispetto a quella delle infezioni batteriche. Questo mancato sviluppo è in parte derivato dal fatto che molte infezioni fungine comuni nell'uomo sono infezioni relativamente superficiali della pelle e delle mucose, mentre le infezioni fungine profonde e potenzialmente letali sono molto rare. La richiesta di miglioramento della terapia antifungina è stata limitata, perchè la maggior parte delle persone con un sistema immunitario attivo sono in grado di combattere facilmente i funghi patogeni. I pazienti immunocompromessi invece, sono spesso soggetti ad infezioni fungine invasive; la diffusione dell'AIDS in combinazione con l'aumento dell'uso di potenti farmaci immunosoppressivi utilizzati per il trapianto di organi e per la terapia anticancro, hanno avuto come conseguenza un aumento dell'incidenza delle infezioni fungine gravi e quindi un corrispondente aumento nella domanda di nuovi composti capaci di curare queste infezioni. Il numero di antifungini efficaci disponibili è abbastanza ridotto se confrontato a quello di farmaci disponibili per trattare le infezioni batteriche, anche se la ricerca in questo ambito è abbastanza attiva. Infatti proprio negli ultimi anni sono stati introdotti molti nuovi agenti.

La maggior parte dei funghi sono saprofiti, il che significa che essi vivono su materia organica morta nel suolo, su foglie cadute o su legno. Alcuni di questi funghi possono causare infezioni opportunistiche se sono introdotti nell'organismo attraverso ferite oppure per inalazione, e alcune di queste infezioni possono rivelarsi letali.

Tra i funghi ci sono relativamente pochi parassiti animali obbligati, cioè microorganismi che possono vivere solo come ospiti di mammiferi, sebbene *Candida albicans* si trovi comunemente nella flora del tratto gastrointestinale e della vagina. I parassiti obbligati sono limitati ai dermatofiti che si sono evoluti in modo tale da vivere in peli, capelli e sulla

pelle di mammiferi (quindi in zone ricche di cheratina), dove causano malattie come la tricofizia o il piede d'atleta.

La maggior parte delle infezioni fungine sono causate soprattutto da diversi lieviti e muffe; i lieviti come il patogeno opportunistico *Candida albicans* e il lievito di birra *Saccharomyces cerevisiae* crescono tipicamente come singole cellule ovali e si riproducono per gemmazione. La *C.albicans* e altri funghi patogeni possono anche crescere sotto forma di catene multicellulari dette ife. I siti di infezione possono contenere sia il lievito sia le ife del microorganismo.

Le muffe, come per esempio il *Trichophyton rubrum*, uno dei patogeni che causano la tricofizia, crescono in gruppi di ife detti micelio [17].

Tutti i funghi producono spore che possono essere trasmesse per contatto diretto o trasportate dall'aria.

- Dermatofiti: i dermatofiti sono funghi che causano infezioni della pelle, dei capelli e delle unghie. Sono diverse specie del genere *Trichophyton*, *Microsporium* e *Epidermophyton*; si nutrono attaccandosi alla cheratina, e le infezioni che causano prendono il nome di "tinea". Avremo perciò diversi tipi di tinea, a seconda del sito di infezione; ad es. "tinea pedis" riferita alle infezioni del piede, o "tinea capitis" riferita ai capelli e al cuoio capelluto.
- Lieviti: il più comune agente che causa infezioni da lieviti è la *Candida albicans*, che è presente nella normale flora del cavo orofaringeo, del tratto gastrointestinale, della vagina e della pelle circostante. Tali infezioni si manifestano comunemente nella mucosa quando la normale popolazione della flora è alterata a causa del trattamento antibiotico di un'infezione batterica, oppure quando le condizioni di crescita cambiano a causa di variazioni ormonali come quelle che si verificano in gravidanza. *C. albicans*, nelle persone con un sistema immunitario sano, provoca infezioni che sono limitate a infezioni superficiali della pelle e della mucosa, mentre in persone con un sistema immunitario compromesso può provocare gravi infezioni sistemiche che possono risultare mortali.

Un altro lievito pericoloso è il *Cryptococcus neoformans*, che si trova normalmente negli escrementi degli uccelli, e che nei soggetti immunocompromessi può provocare infezioni gravi a livello dei polmoni e del sistema nervoso centrale, ma in generale in moltissimi organi del corpo.

Anche altri lieviti possono provocare infezioni nell'uomo, come il *Malassezium furfur*, il *Trichosporon beigeli*, e il *Blastoschizomyces capitatus*.

- Funghi dimorfi termofili: sono saprofiti che crescono in una forma a temperatura ambiente e in una forma diversa alla temperatura corporea di 37°C. I più comuni sono *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum*. Essi vivono nel suolo e possono infettare l'individuo attraverso l'inalazione di polvere contaminata. Le infezioni polmonari risultanti sono spesso autolimitanti, ma possono progredire anche fino ad infezioni polmonari serie, ed essere trasportati in altre zone dell'organismo attraverso il sistema circolatorio.
- Muffe: sono varie specie di *Aspergillus*, come *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus* e *A. nidulans*. Le specie di *Aspergillus* raramente causano malattie in persone con il sistema immunitario normale, ma sono molto pericolose in persone con il sistema immunitario depresso; la via di inoculazione più comune è la via inalatoria, ma si può contrarre l'infezione anche attraverso ferite, scottature e dispositivi medici [17].

La chemioterapia antifungina dipende dalle differenze biochimiche tra funghi e mammiferi; a livello cellulare la differenza più grande tra le cellule fungine e le cellule di mammifero è che quelle fungine hanno la parete cellulare, a differenza di quelle di mammifero. Quindi la parete cellulare fungina può essere un bersaglio e si può andare ad inibire la biosintesi della parete stessa. Altri target di agenti antifungini sono la biosintesi del DNA, il fuso mitotico e l'interferenza con il metabolismo intermedio.

Comunque, la differenza più rilevante tra le cellule fungine e quelle dei mammiferi è che le loro membrane cellulari contengono steroli differenti. Gli steroli sono componenti strutturali importanti delle membrane cellulari fungine e di mammifero e sono critici per un adeguato funzionamento di molti enzimi di membrana, nonché delle proteine che costituiscono i canali ionici. Come sterolo di membrana, le cellule fungine hanno l'ergosterolo, mentre quelle mammifere hanno il colesterolo.

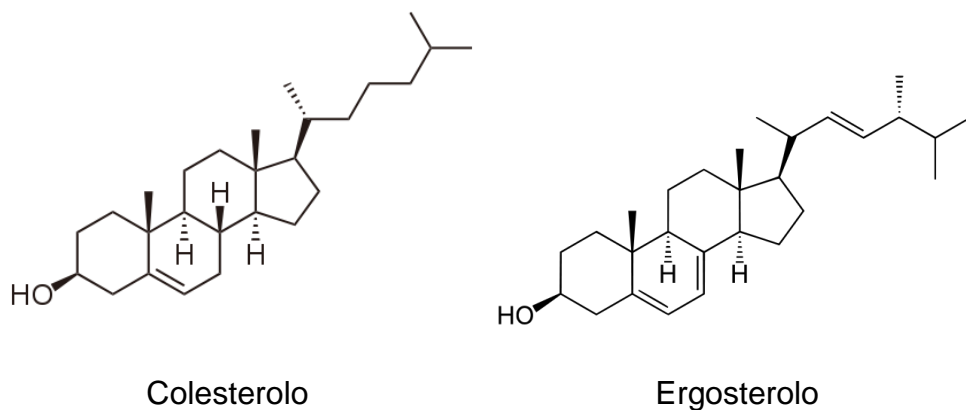


Fig. 2. Struttura di colesterolo ed ergosterolo

Le catene degli acidi grassi nei doppi strati delle membrane plasmatiche possono essere in uno stato ordinato e rigido (cristallino) o in uno stato disordinato e fluido. Le funzioni della membrana richiedono che il suo stato sia fluido, ma relativamente ordinato; la transizione dallo stato fluido allo stato ordinato avviene ad una particolare temperatura (temperatura di transizione), che dipende dal tipo di catene che formano il doppio strato. Catene tutte sature favoriscono l'ordine e la cristallizzazione, catene insature con doppi legami cis favoriscono il disordine e la fluidità.

I procarioti regolano la fluidità delle membrane variando il numero di doppi legami cis e la lunghezza delle catene, mentre negli eucarioti è lo sterolo di membrana ad avere un ruolo fondamentale nella regolazione della fluidità e dell'ordine della membrana stessa. Il gruppo OH dello

sterolo forma un legame idrogeno con un atomo di ossigeno carbonilico della testa polare di un fosfolipide, mentre la parte policiclica e la coda idrocarburica si dispongono nella parte polare del doppio strato. In questo modo lo sterolo impedisce la cristallizzazione del doppio strato, ed ha anche la funzione di dare ordine agli elementi costitutivi della membrana, in virtù della caratteristica rigidità della parte policiclica.

Sebbene i due steroli siano simili, le catene laterali sono leggermente diverse, e quando si costruiscono i modelli tridimensionali il sistema di anelli dell'ergosterolo si trova ad assumere una disposizione più planare rispetto a quella del colesterolo; questo perché c'è un doppio legame in più nel sistema di anelli dell'ergosterolo. Questa piccola differenza nella composizione sterolica fornisce, con rare eccezioni, la base biochimica della tossicità selettiva per la maggior parte dei farmaci antifungini attualmente in uso [17].

3.2. Infezioni fungine a livello oculare

Le infezioni fungine a livello oculare si dividono principalmente in:

- Endoftalmiti endogene
- Endoftalmiti esogene
- Cheratiti fungine
- Infezioni fungine dell'orbita

3.2.1. Endoftalmiti fungine endogene

L'infezione nell'occhio è in questo caso un'infezione secondaria risultante da un'infezione primaria situata in un sito distante dall'occhio, ad esempio a livello delle valvole cardiache o del tratto urinario.

Le specie di *Candida* sono la causa più comune di endoftalmiti endogene, che possono provocare lesioni a carico della retina, della

coroide e anche della cavità vitreale, e si sviluppano generalmente in pazienti immunocompromessi.

Il trattamento di prima scelta per questo tipo di infezioni è la somministrazione intravenosa di amfotericina B, che è stata recentemente sostituita, a causa della tossicità sistemica e degli effetti collaterali, con fluconazolo per via orale, e ancora più recentemente con voriconazolo. Efficace risulta anche la vitrectomia, in quei pazienti che non rispondono ai trattamenti farmacologici [18].

3.2.2. Endoftalmiti fungine esogene

Questo tipo di endoftalmiti possono verificarsi in seguito all'ingresso nell'occhio di agenti patogeni in seguito ad un trauma o ad un intervento intraoculare, e generalmente fanno seguito alle cheratiti. Pazienti con endoftalmiti esogene sono raramente immunocompromessi. Le endoftalmiti esogene possono essere causate da ciascuno dei funghi saprofiti presenti in natura, tra cui specie di *Candida* (nei pazienti reduci da un intervento chirurgico) *Fusarium* (nei pazienti reduci da traumi e/o cheratiti), ma anche specie di *Paecilomyces*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Exophiala*, *Pseudallescheria*, *Scytalidium*, *Sporothrix* e *Penicillium* [18].

3.2.3. Cheratiti fungine

Le infezioni fungine della cornea sono relativamente poco frequenti nei paesi sviluppati, mentre rappresentano una larga parte delle cheratiti nei paesi in via di sviluppo, soprattutto in quelli tropicali.

Le cheratiti fungine rappresentano la principale causa di cecità in Cina, mentre in Gran Bretagna e nel Nord degli Stati Uniti, la loro incidenza rimane bassa.

Ci sono quattro fattori di rischio principali per questo tipo di infezioni: trauma, uso di lenti a contatto contaminate (che possono

provocare abrasioni che espongono il soggetto all'attacco da parte di specie *Fusarium*), condizioni sistemiche pre-esistenti e problemi a livello della superficie oculare.

Nelle fasi iniziali l'infezione resta silente e non visibile per giorni o settimane, fino a che diventa identificabile, e questo periodo di latenza, durante il quale non viene praticata alcuna somministrazione di farmaci, può portare poi al fallimento della terapia farmacologica. Se la terapia farmacologica fallisce, l'unica soluzione è un intervento chirurgico, in modo da salvare l'occhio e preservare la vista prima che il danno diventi irreparabile [18].

3.2.4. Infezioni fungine dell'orbita

Le infezioni a livello dell'orbita generalmente rappresentano delle infezioni secondarie generate da infezioni presenti nelle strutture circostanti, come i seni paranasali, la pelle e la cavità naso-faringea.

Le condizioni infiammatorie che colpiscono l'occhio si dividono in: celluliti periorbitali e celluliti orbitali. Le celluliti orbitali micotiche si presentano nei pazienti con diabete mellito non controllato o con altri stati immunocompromessi, ad esempio in seguito ad AIDS o all'uso di steroidi. Questo tipo di celluliti sono sempre invasive, e sono causate da Zigomiceti come specie di *Mucor*, *Rhizopus* e *Absidia*, nonché da specie di *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Sporothrix* e *Bipolaria*.

Il principale trattamento farmacologico consiste nella somministrazione di amfotericina B liposomiale, da preferirsi (salvo che nei casi più gravi) agli interventi chirurgici [18].

4. CLASSI DI FARMACI ANTIFUNGINI

4.1. Sostanze che alterano la membrana (nistatina, amfotericina B, natamicina)

Sono molecole complesse, lattoni macrociclici che si inseriscono nelle membrane, alterandone la funzionalità: in questo modo le membrane diventano permeabili, e alla fine le cellule muoiono per la perdita di costituenti essenziali come ioni e piccole molecole organiche. La selettività di questi farmaci nei confronti delle membrane fungine è data appunto dalla natura degli steroli di membrana.

4.2. Inibitori della biosintesi della parete cellulare

- **Echinocandine** (ad es. caspofungina)

Sono farmaci che interferiscono con la biosintesi della parete fungina inibendo l'enzima β -1,3-glucano sintetasi; il β -glucano è un importante componente polimerico della parte cellulare di molti funghi, e la diminuzione del suo quantitativo indebolisce fortemente la parete cellulare, portando a lisi della cellula fungina.

4.3. Inibitori della biosintesi dell'ergosterolo

Meccanismo d'azione generale

La biosintesi dell'ergosterolo inizia a partire dallo squalene, che per intervento dell'enzima squalene-2,3-epossidasi si trasforma in squalene-2,3-epossido, il quale per intervento della squalene-2,3-epossido ciclasi va incontro ad una serie di ciclizzazioni e modifiche che lo convertono in lanosterolo. L'ultima tappa di questa via biosintetica prevede la conversione del lanosterolo in ergosterolo o colesterolo, a seconda che ci si trovi all'interno di una cellula fungina o in una cellula di mammifero.

Nei funghi, il lanosterolo viene convertito in ergosterolo attraverso 2 passaggi: il primo catalizzato dall'enzima 24-metil-transferasi (che lo converte in 24-metilen-lanosterolo) e il secondo da vari enzimi tra cui 14 α -demetilasi, 14-reduttasi e 8-isomerasi (che lo convertono in ergosterolo), mentre nei mammiferi è presente solamente il secondo passaggio.

Il processo biosintetico è raffigurato in **fig.3**.

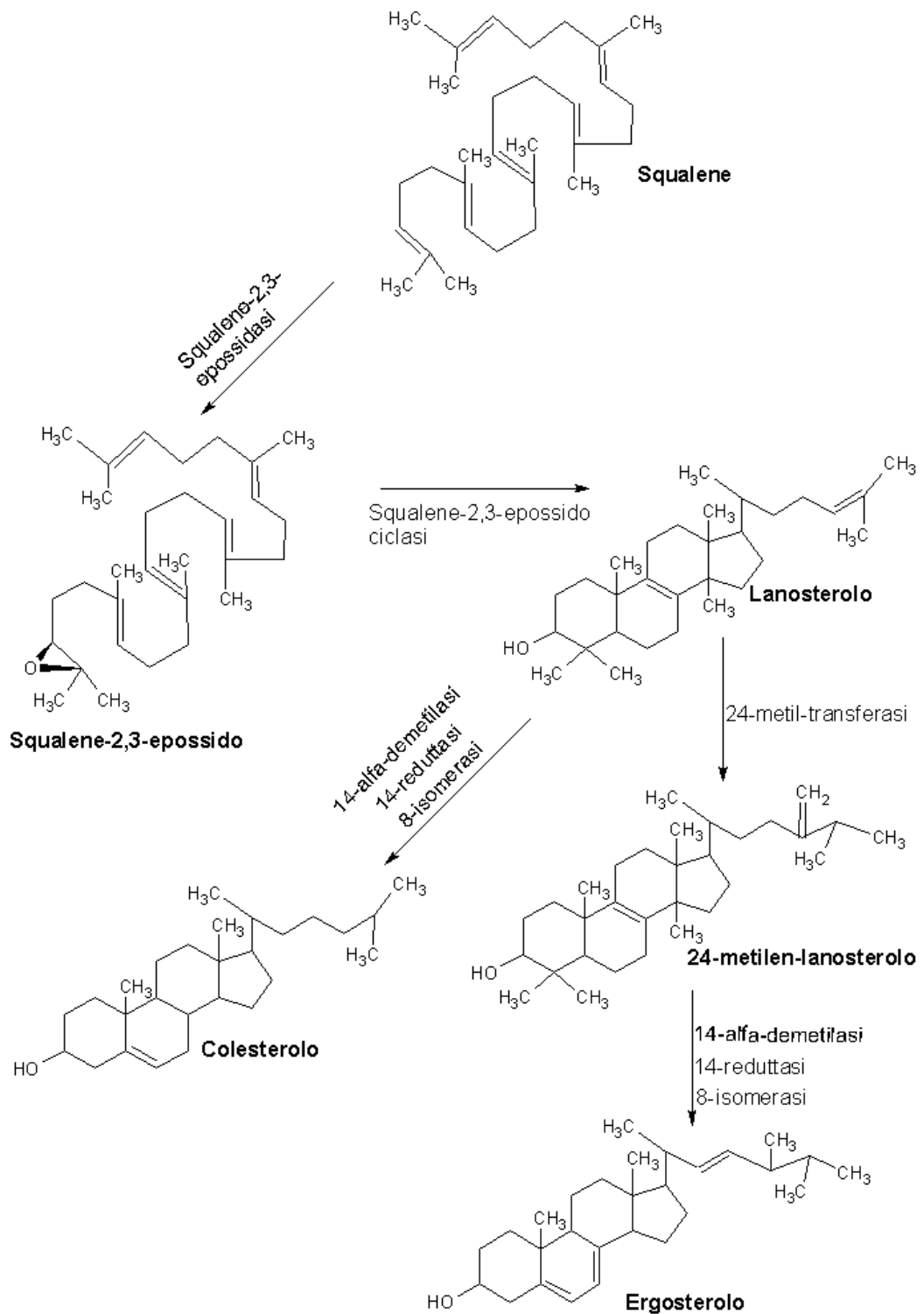


Fig.3. Biosintesi di colesterolo ed ergosterolo.

- **Azoli:** (chetoconazolo, econazolo, fluconazolo, voriconazolo, posaconazolo, clotrimazolo, ecc.)

Sono farmaci che inibiscono la biosintesi dell'ergosterolo andando ad inibire nello specifico l'enzima 14 α -demetilasi.

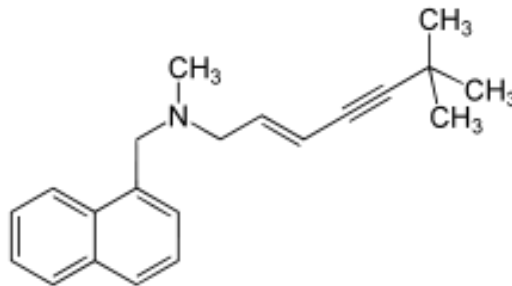
L'inibizione della demetilasi nella membrana della cellula fungina provoca un accumulo di steroli che contengono ancora il gruppo -CH₃ 14 α ; questi steroli non hanno la stessa struttura tridimensionale e le stesse proprietà fisiche dell'ergosterolo che è normalmente contenuto nella membrana. Questo genera un cambio di permeabilità, rende la membrana pervia e produce malfunzionamento delle proteine di membrana. Questi effetti, sommati, portano alla morte della cellula fungina.

L'azione di inibizione di questi farmaci sulla demetilasi fungina è molto maggiore rispetto a quella sulla demetilasi umana; ad esempio, il valore di IC₅₀ per il chetoconazolo nei confronti della 14 α -demetilasi di *Candida albicans* è di circa 10⁻⁹ M, mentre è di circa 10⁻⁶ M verso lo stesso enzima umano.

- **Morfoline:** amorolfina

Le morfoline inibiscono la biosintesi dell'ergosterolo agendo sugli enzimi 14-reduttasi ed 8-isomerasi; l'inibizione di questi enzimi provoca l'incorporazione nelle membrane cellulari fungine di steroli anomali, nessuno dei quali ha la stessa forma e le stesse proprietà chimico-fisiche dello sterolo naturale, l'ergosterolo. Questo provoca alterazione delle proprietà delle membrane e quindi il malfunzionamento delle proteine transmembrana.

- **Allilammine:** terbinafina



La terbinafina va ad inibire l'enzima squalene epossidasi, che catalizza la prima reazione del processo biosintetico dell'ergosterolo.

Anche i mammiferi utilizzano la squalene epossidasi per la biosintesi del colesterolo, ma poiché l'enzima fungino è molto più sensibile al farmaco rispetto a quanto non lo sia quello mammifero, si ha come effetto un elevato indice terapeutico [17].

4.4. Farmaci con meccanismi vari

Ad es. flucitosina: Potente antifungino usato per il trattamento di infezioni fungine sistemiche gravi, come per esempio quelle causate da *Cryptococcus neoformans* e da specie di *Candida*. Non è tossica di per sé, ma ad opera dell'enzima citosina-deaminasi viene metabolizzata a 5-fluorouracile, il quale viene poi convertito in 5-fluorodesossiuridina, inibitore della timidilato sintetasi che interferisce sia con la sintesi dell'RNA che delle proteine. La flucitosina non è tossica per l'uomo, perché le cellule umane non contengono l'enzima citosina deaminasi.

PARTE SPERIMENTALE

1. SCOPO DEL LAVORO

Le infezioni fungine a livello oculare sono molto pericolose in pazienti immunocompromessi, e sono estremamente difficili da trattare.

L'ideale sarebbe utilizzare un farmaco antifungino somministrabile localmente; tuttavia attualmente ne esiste in commercio solo uno in forma di prodotto oftalmico, e la somministrazione di un antifungino per via sistemica può portare a gravi effetti collaterali (o comunque ad una scarsa penetrazione corneale). Perciò, oggi, parte della ricerca è incentrata nello sviluppo di nuove forme farmaceutiche oftalmiche a base di farmaci antifungini.

Lo scopo della presente tesi è stata la preparazione e la valutazione di un collirio a base di terbinafina cloridrato, antifungino allilamminico inibitore della squalene epossidasi dei miceti, attualmente presente in commercio in forma di compresse e in crema, ed utilizzata per infezioni cutanee.

La prima parte del lavoro ha riguardato la messa a punto del metodo analitico, con convalida dello stesso.

Sono state effettuate prove di solubilità in varie condizioni di pH utilizzando un opportuno sistema tamponante (tampono Sorensen fosfato). Dopo aver scelto il pH ottimale per la soluzione sono stati addizionati diversi tensioattivi (quali Lutrol F127, Cremophor RH40, Vitamina E TPGS, Polivinilpirrolidone K30 e Tween 80) a diverse concentrazioni, con lo scopo di ottenere una formulazione con una più elevata quantità di farmaco in soluzione.

Le formulazioni migliori dal punto di vista delle caratteristiche chimico-fisiche, quali solubilità, pH ed osmolarità, sono state confezionate in flaconi chiusi, mantenute a temperatura ambiente ed a 4 °C, ed analizzate a vari intervalli di tempo per valutarne la stabilità.

2. MATERIALI UTILIZZATI

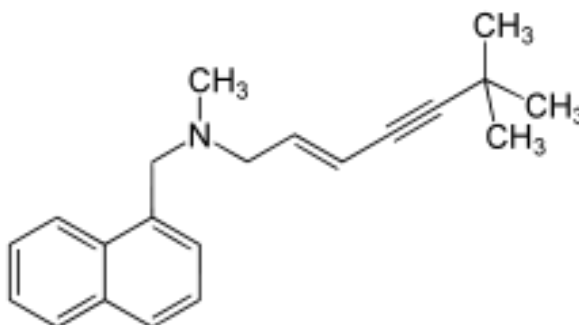
- Terbinafina cloridrato (ABATRA Technology Co., Ltd , Cina)
- Vitamina E TPGS (VIT E, Eurochem Asia Ltd, Cina)
- Lutrol[®] F127 (BASF, Ludwigshafen, Germania)
- Cremophor[®] RH40 (A.C.E.F. S.p.A. , Fiorenzuola d'Arda)
- Tween[®] 80 (Riedel-de Haen, Svizzera)
- Kollidon[®] K30 (Polivinilpirrolidone K30), (BASF, Ludwigshafen, Germania)

2.1. Terbinafina cloridrato

2.1.1. Caratteristiche chimico-fisiche

E' un antifungino allilamminico messo in commercio sottoforma di cloridrato. La sua formula empirica è $C_{21}H_{25}N \cdot HCl$ ed il peso molecolare è 327.90; si presenta come una polvere bianca, con punto di fusione compreso tra 204 e 208 °C.

La formula di struttura è la seguente:



E' solubile nei solventi organici quali etanolo (≈ 30 mg/mL), DMSO (≈ 10 mg/mL) e DMF (≈ 10 mg/mL), ed è moderatamente solubile in soluzioni acquose.

2.1.2. Proprietà farmacologiche

- Farmacodinamica

La Terbinafina va ad inibire l'enzima squalene epossidasi, enzima che catalizza la prima reazione del processo biosintetico dell'ergosterolo.

L'inibizione di questo enzima ha due effetti, entrambi coinvolti nella sua azione tossica sui funghi. Per prima cosa, l'inibizione dell'enzima squalene epossidasi provoca una diminuzione del contenuto totale di steroli nella membrana della cellula fungina. Questa diminuzione altera le proprietà chimico-fisiche della membrana provocando il malfunzionamento delle proteine transmembrana coinvolte nel trasporto di nutrienti e nella regolazione del pH. In secondo luogo, l'inibizione dell'enzima produce all'interno della cellula un accumulo tale di squalene da divenire tossico per la cellula. Anche i mammiferi utilizzano la squalene epossidasi per la biosintesi del colesterolo, ma poiché l'enzima fungino è molto più sensibile al farmaco rispetto a quanto non lo sia quello mammifero, si ha come effetto un elevato indice terapeutico.

Ha effetto batteriostatico o battericida a seconda della concentrazione; inoltre è molto sicura perché né inibisce il CYP450, né influenza la secrezione endocrina.

- Farmacocinetica

E' ampiamente metabolizzata da enzimi appartenenti alla famiglia del CYP450.

Dal momento che esistono tante vie per il metabolismo della terbinafina, l'inibizione di una sola di esse ha poco effetto sulla clearance globale del farmaco, sebbene composti che inibiscono un'ampia gamma di enzimi CYP450 (ad es. la cimetidina) possano aumentarne i livelli plasmatici. Una dose singola orale di 250 mg di terbinafina determina concentrazioni plasmatiche con picco medio 0,97 mg/ml nell'arco di 2 ore dalla somministrazione.

L'emivita di assorbimento è di 0.8 ore, quella di distribuzione di 4,6 ore; si lega strettamente (99%) con le proteine plasmatiche e diffonde rapidamente attraverso il derma, concentrandosi nello strato corneo. Viene escreta anche col sebo e, pertanto, si presenta in concentrazioni elevate nei follicoli piliferi, nei capelli e nelle cuti ricche di sebo. È stato inoltre provato che il farmaco si distribuisce nel letto ungueale nelle prime settimane dopo l'inizio del trattamento.

La biotrasformazione determina la produzione di metaboliti privi di attività antimicotica, che vengono escreti prevalentemente con l'urina. L'emivita di eliminazione è di 17 ore, e non c'è evidenza di accumulo del farmaco.

Non si sono osservate variazioni correlate all'età dei parametri farmacocinetici, anche se il tasso di eliminazione può risultare ridotto nei pazienti con compromissione della funzione renale o epatica, il che implica un conseguente aumento dei livelli ematici di terbinafina.

La sua biodisponibilità non è influenzata in maniera significativa dal cibo.

- Efficacia terapeutica

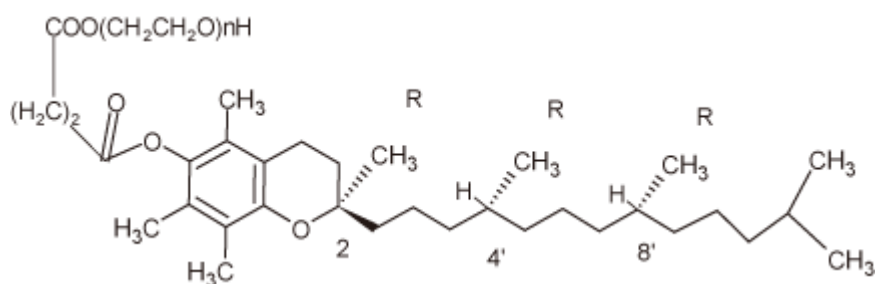
La terbinafina è disponibile in commercio in formulazioni per uso topico e orale, ed è efficace contro varie infezioni sia quando è applicata localmente che quando è assunta per via sistemica.

Una sua caratteristica peculiare è l'efficacia nella cura di onicomicosi (infezioni fungine delle unghie): è altamente lipofila e dopo somministrazione orale si ridistribuisce dal plasma alle unghie, dove risiede l'infezione.

Dal 1990 sono stati effettuati diversi studi sull'efficacia di colliri a base di terbinafina HCl per il trattamento delle cheratiti fungine. Questi studi hanno dimostrato che la terbinafina possiede uno spettro d'azione ampio e che, se somministrata localmente, può penetrare in maniera efficace attraverso la cornea, raggiungendo livelli che sono effettivamente in grado di contrastare l'infezione fungina, senza effetti collaterali a livello oculare. Quindi, questi studi hanno suggerito che un collirio a base di

terbinafina HCl può effettivamente rappresentare una terapia alternativa per il trattamento delle cheratiti fungine. In questi studi, la terbinafina si è dimostrata essere attiva *in vitro* su specie di *Fusarium* e di *Aspergillus*, mentre *in vivo* si è dimostrata attiva nel 90% dei casi dopo somministrazione topica [19, 20].

2.2. Vitamina E TPGS



La vitamina E TPGS (D-alfa-tocoferolo polietilenglicole succinato) è un derivato della vitamina E naturale: nello specifico è una forma di esterificazione della vitamina E naturale con acido succinico e polietilene glicole 1000.

Ha formula empirica $C_{33}O_5H_{54}(CH_2CH_2O)_n$, ed un peso molecolare medio di 1513. Ha un aspetto ceroso da bianco a giallo pallido, con un punto di fusione compreso tra i 37 e i 41 °C.

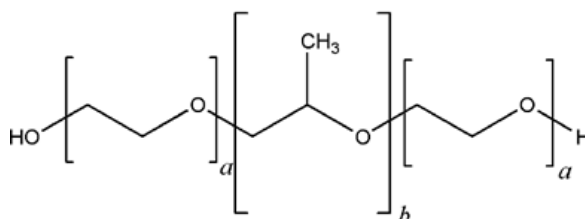
E' stabile quando viene esposto all'aria, alla luce, al calore e ad agenti ossidanti.

Questo prodotto si è dimostrato molto utile nelle formulazioni farmaceutiche, potendo essere impiegato come:

- solubilizzante
- promotore di permeazione, in quanto inibitore della glicoproteina P
- emulsionante
- agente legante nei processi di granulazione a umido

- protettore della pelle e dei tessuti, in quanto ne riduce la sensibilità ai farmaci
- fonte idrosolubile di vitamina E

2.3. Lutrol F127



Fa parte di un gruppo di tensioattivi che strutturalmente sono costituiti da un blocco centrale idrofobico di polipropilene ossido legato a due blocchi idrofilici di polietilene ossido.

Data la possibilità di combinare blocchi di diverso peso molecolare, le proprietà dei polimeri risultanti sono molto varie.

Il Lutrol F127 ha un peso molecolare di circa 12200, e le unità di polioossietilene rappresentano circa il 70% del peso molecolare, quindi questo gli conferisce una elevata solubilità in acqua.

La più importante proprietà per il suo utilizzo nelle forme farmaceutiche è la capacità di formare geli termo-reversibili le cui proprietà dipendono dalla concentrazione. Soluzioni acquose diluite mostrano un flusso Newtoniano, mentre intorno alla concentrazione del 10%, esso diventa plastico, con un forte cambiamento della sua scorrevolezza e viscosità.

La temperatura di transizione soluzione-gel di soluzioni acquose a base di Lutrol F127, va dai 15 ai 25 °C a concentrazioni di Lutrol maggiori del 16%, ed è influenzata anche dalla contemporanea presenza di sali organici e inorganici, PEG, solventi, ecc.

2.4. Cremophor RH40

E' un derivato peghilato etossilato dell'olio di ricino. Il prodotto viene ottenuto facendo reagire 40 moli di ossido di etilene con 1 mole di olio di ricino idrogenato. A 20 °C è una pasta con colore che va dal bianco al giallo chiaro ed ha un valore di HLB compreso tra 14 e 16.

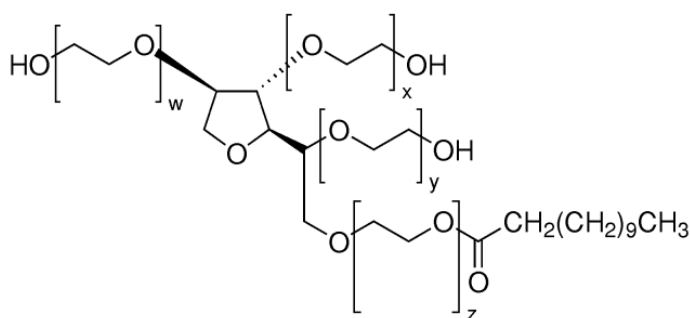
Forma soluzioni limpide in acqua, etanolo, 2-propanolo, n-propanolo, cloroformio, tetracloruro di carbonio, acetato di etile e toluene, e queste soluzioni diventano torbide via via che aumenta la temperatura.

Il Cremophor RH40 puro è chimicamente molto stabile; una esposizione prolungata a temperature elevate può causare una separazione fisica reversibile in una fase solida ed una liquida.

E' stabile in soluzioni idroalcoliche e in soluzioni acquose; tuttavia, non dovrebbero essere aggiunte basi o acidi forti, che potrebbero andare a saponificare le sue porzioni esteree.

E' in grado di aumentare la solubilità in acqua della maggior parte dei prodotti insolubili in essa ed aumenta anche la compatibilità di ingredienti altrimenti incompatibili, rappresentando perciò un valido aiuto nei processi formulativi.

2.5. Tween 80



Dove $w+x+y+z = 2$

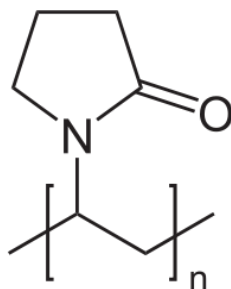
Poliossietilene sorbitanmonoleato; è un tensioattivo ed emulsionante non ionico, i cui gruppi idrofili sono i gruppi poliossietilenici; il numero 80 sta ad indicare il gruppo lipofilo, in questo caso l'acido oleico.

Si presenta come un liquido viscoso, giallo e solubile in acqua, il cui HLB è pari a 15.

E' miscibile con l'acqua, così come con l'alcool, acetato di etile, olio di mais, metanolo e toluene, mentre risulta essere insolubile in olii minerali; il pH di una soluzione acquosa all'1% di Tween 80 è compreso tra 5.5 e 7.2.

E' spesso utilizzato per solubilizzare le proteine, per isolare il nucleo da cellule in coltura, per la crescita del *Mycobacterium tuberculosis*, per solubilizzare e disperdere sostanze nelle formulazioni di tipo farmaceutico e nei prodotti alimentari e per stabilizzare formulazioni farmaceutiche acquose destinate alla somministrazione parenterale.

2.6. Kollidon K30



Polivinilpirrolidone K30; polimero idrofilo con formula molecolare $(C_6H_9NO)_n$.

Allo stato anidro è una polvere bianca mentre dà origine a soluzioni acquose con colori da bianco a giallo chiaro.

E' solubile in acqua e in molti solventi organici, ed in campo formulativo viene utilizzato come: filmante, agente sospendente, agente complessante, legante e stabilizzante.

3. CONVALIDA DEL METODO ANALITICO

La prima fase del lavoro ha riguardato la messa a punto e la convalida di un opportuno metodo analitico per la terbinafina, la quale è stata analizzata mediante spettrofotometria UV (UV-VIS 2101 PC, Shimadzu) a 222 nm.

La convalida di un metodo analitico è una procedura volta a confermare sperimentalmente l'abilità del metodo stesso di dare risultati che siano caratterizzati dalla giusta accuratezza e precisione, e che siano perciò affidabili e riproducibili quando vengono utilizzati da diversi operatori con le stesse attrezzature negli stessi o in laboratori diversi.

Tutte le tecniche analitiche utilizzate per lo sviluppo di sostanze farmaceutiche e per la determinazione della loro qualità devono essere sottoposte a convalida.

Nel caso in cui si utilizzi un metodo descritto in Farmacopea, la convalida non è necessaria, purché le analisi vengano condotte sotto stretta osservanza dei parametri stabiliti in Farmacopea stessa; in tutti gli altri casi, specialmente nei casi in cui si va a modificare la composizione di un medicamento, lo schema di sintesi o la procedura analitica, è necessario sempre effettuare una convalida statistica [21].

I parametri determinati sono stati:

- Precisione (Ripetibilità e Riproducibilità)
- Accuratezza
- Linearità
- Range
- LOD/LOQ
- Selettività/Specificità

3.1. Precisione

Rappresenta il grado di discostamento tra loro di una serie di misure ottenute analizzando uguali soluzioni provenienti dallo stesso campione nelle stesse condizioni. Deve essere considerata a 2 livelli:

- *ripetibilita'*: rappresenta la precisione alle stesse condizioni operative in diversi ma brevi intervalli di tempo. Dovrebbe essere determinata effettuando un minimo di 9 determinazioni che ricoprono uno specifico range di concentrazioni (ad esempio 3 livelli di concentrazione - alto, basso e medio - 3 ripetizioni ciascuno).
- *riproducibilita'*: rappresenta la riproducibilità dei risultati ottenuti all'interno dello stesso laboratorio cambiando però alcune condizioni, ad esempio analista, periodo di tempo prolungato (non meno di 2 giorni) strumenti diversi (ad esempio Spettrofotometro UV diverso). Dovrebbe essere determinata effettuando un minimo di 6 determinazioni (ad esempio 3 livelli di concentrazioni - alto, medio e basso - 2 ripetizioni ciascuno).

La precisione è espressa come deviazione standard relativa (rsd), la cui formula è:

$$RSD = \sigma_r = \frac{\sigma_x}{|\bar{x}|}$$

Dove : $\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$ → deviazione standard (sd)

e: $\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$ → media aritmetica, che nell'espressione dell'rsd è espressa sottoforma di valore assoluto (modulo).

In genere comunque si usa la deviazione standard relativa % (rsd%) , ottenuta moltiplicando per 100 il valore di rsd ottenuto [21].

Affinchè la precisione sia accettabile, i valori di rsd% devono essere ≤ 2.0 .

In questo caso la ripetibilità e la riproducibilità sono state calcolate nel seguente modo: sono state preparate 3 soluzioni madre in MeOH, a 3 livelli di concentrazione (alto, medio e basso), e per ogni madre è stata effettuata una diluizione nell'opportuno tampone, in triplicato, per un totale quindi di 9 determinazioni, analizzate poi allo spettrofotometro UV. Infine, per ogni madre è stata calcolata la rsd% .

Per calcolare la riproducibilità, tali soluzioni madre sono state diluite nello stesso modo due giorni dopo, e rianalizzate all'UV. Anche in questo caso è stata calcolata la rsd%.

3.2. Accuratezza

Rappresenta la differenza tra il valore vero e il valore trovato, ed è una combinazione dell'errore sistematico e dell'errore random.

Gli errori sistematici (o determinati) sono legati alle capacità dell'operatore, all'organizzazione del laboratorio, al metodo analitico adottato. Possono essere facilmente eliminati eliminando le sostanze interferenti, migliorando la pulizia dei recipienti, tarando periodicamente gli apparecchi di misura. Devono comunque essere assenti da qualsiasi misura, e quindi anche da un'analisi chimica.

Gli errori casuali (o indeterminati o random) sono invece non prevedibili e non eliminabili. Sono dovuti ad esempio a piccole fluttuazioni dell'ambiente del laboratorio (piccole variazioni di temperatura, umidità, ecc.).

L'Accuratezza % può essere definita in termini di differenza % tra le concentrazioni osservate e le concentrazioni attese.

Dovrebbe essere determinata effettuando un minimo di 9 determinazioni (ad esempio 3 livelli di concentrazione - alto, medio e basso - 3 ripetizioni ciascuno).

Quindi: $\%acc = (\text{contenuto trovato} / \text{contenuto reale}) \times 100$

Affinchè l'accuratezza sia accettabile, i valori di %acc devono essere compresi tra 98.0 e 102.0 [21].

In questo caso l'Accuratezza è stata calcolata nel seguente modo: è stata preparata una soluzione madre di terbinafina (→ contenuto reale) in MeOH, della quale sono state effettuate 3 diluizioni (a 3 livelli di concentrazione - alto, medio e basso -) in triplicato, per un totale quindi di 9 determinazioni.

Per ogni terna di determinazioni è stata calcolata la media aritmetica e il valore risultante è stato sostituito all'equazione della corrispondente retta di taratura, permettendo così di trovare il contenuto di terbinafina nel campione (→ contenuto trovato).

3.3. Linearità

E' la capacità del metodo analitico di ottenere risultati che siano direttamente proporzionali alla concentrazione dell'analita all'interno di un certo range.

E' determinata calcolando il coefficiente di correlazione r^2 direttamente dalla retta di taratura; affinché ci sia linearità, il valore di r^2 deve essere almeno di 0.99.

Il valore di questo coefficiente dovrebbe essere determinato direttamente dalla retta di taratura, costruita con un minimo di 5-6 punti [21].

3.4. Range

E' l'intervallo tra la concentrazione più bassa e quella più alta di analita all'interno del campione, per il quale è stato dimostrato che la procedura analitica è precisa, accurata e lineare.

E' espresso generalmente nelle stesse unità di misura dei risultati dell'analisi [21] (in questo caso mg/100 mL).

3.5. LOD (limit of detection)

E' la più bassa concentrazione dell'analita nel campione che può essere registrata, ma non necessariamente quantificata.

La formula utilizzata per calcolare il LOD è la seguente:

$$\text{LOD} = 3.3 \times (\sigma/S)$$

Dove:

σ → deviazione standard delle intersezioni con l'asse Y di varie linee di regressione della retta di taratura, costruite utilizzando varie serie di soluzioni standard con concentrazioni in prossimità del LOD, quindi basse concentrazioni

S → pendenza della retta di taratura [21]

Per calcolare "**S**", sono state preparate delle soluzioni madre (sempre in MeOH), diluite in modo da ottenere concentrazioni basse ed analizzate allo spettrofotometro UV. I risultati sono stati utilizzati per costruire 2 rette Assorbance vs Concentrazione Terbinafina, la cui pendenza è "**S**".

Per calcolare " σ " invece, per ognuna delle precedenti soluzioni madre è stata tracciata una retta, ed è stata poi calcolata la deviazione standard delle intercette con l'asse Y di queste rette; almeno 2 soluzioni

madre, 3 concentrazioni per ogni madre (concentrazioni comunque basse).

Per determinare la pendenza, è raccomandabile utilizzare soluzioni standard con concentrazioni in prossimità del LOD (basse concentrazioni).

3.6. LOQ (limit of quantification)

E' la più bassa concentrazione dell'analita nel campione che può essere quantificata.

$$\text{LOQ} = 10 \times (\sigma/S)$$

Dove:

σ → deviazione standard delle intersezioni con l'asse Y di varie linee di regressione della retta di taratura, costruite utilizzando varie serie di soluzioni standard con concentrazioni in prossimità del LOQ, quindi basse concentrazioni

S → pendenza della retta di taratura [21]

Il procedimento che è stato utilizzato per calcolare il LOQ è lo stesso visto precedentemente per il LOD.

3.7. Selettività/specificità

E' la capacità di misurare accuratamente e specificamente l'analita in presenza di componenti che potrebbero essere presenti.

Per un metodo di identificazione la specificità è spesso analizzata comparando le risposte di campioni di riferimento contenenti solo l'analita, con le risposte di campioni in cui sono state aggiunte potenziali interferenze [21].

In questo caso per valutare eventuali interferenze, è stato effettuato uno spettro UV ogni volta che alla terbinafina veniva aggiunta una possibile sostanza interferente, al fine di verificare che non vi fossero sovrapposizioni o spostamenti del picco del farmaco. In ogni caso, per eliminare le eventuali interferenze le soluzioni di terbinafina sono state analizzate contro bianchi che contenevano tutte le sostanze contenute nel veicolo del farmaco (es.: tampone, tensioattivo).

4. STUDI DI SOLUBILITA' SULLA TERBINAFINA

4.1. Scelta delle opportune condizioni di pH

La prima fase del lavoro ha riguardato la scelta delle opportune condizioni di pH alle quali lavorare. Per fare ciò sono state innanzitutto eseguite delle rette di taratura, che sono servite poi per indagare sulla solubilità della terbinafina ai vari valori di pH.

Le tarature sono state eseguite in: H₂O per HPLC e soluzioni tampone fosfato Sørensen (TFS) a diversi valori di pH e concentrazione salina (v. Tab. 1).

Le soluzioni tampone così ottenute sono state utilizzate per diluire soluzioni madre di terbinafina in MeOH.

4.2. Determinazione della solubilità massima della terbinafina

Per determinare la solubilità massima della terbinafina nelle varie condizioni di pH sono state preparate delle soluzioni sovrasature del suddetto farmaco nelle opportune soluzioni tampone, le quali sono state mantenute in agitazione su agitatore magnetico per circa 12 ore. Successivamente le soluzioni sono state filtrate attraverso filtri 0.2 µm in cellulosa rigenerata (RC, Sartorius) ed analizzate allo spettrofotometro UV.

5. SOLUBILIZZAZIONE DELLA TERBINAFINA MEDIANTE L'USO DI TENSIOATTIVI

Per cercare di aumentare la solubilità della terbinafina sono stati utilizzati diversi tensioattivi ed un agente complessante, da soli od in miscela: Lutrol F127, Cremophor RH40, Vitamina E TPGS, Lutrol F127 + Tween80, Lutrol F127 + Kollidok K-30.

5.1. Solubilizzazione con Lutrol F127

5.1.1. Determinazione della cmc

Le soluzioni di Lutrol F127 sono state preparate fondendo il tensioattivo a bagnomaria a 50°C, aggiungendo opportune quantità di soluzione tampone e mantenendo in agitazione su agitatore magnetico a temperatura ambiente per 12 ore. La soluzione preparata è stata diluita più volte con TFS isotonic, pH 5.8, 66.7 mM in modo tale da ottenere varie soluzioni a concentrazione decrescente di Lutrol da impiegare per la determinazione della tensione superficiale mediante l'uso di un tensiometro di Du Nouy (KRUSS, K6, Germania).

Sono state preparate anche altre soluzioni aggiungendo al Lutrol 2.5% il Tween 80 e il Kollidon K-30, ed è stata analizzata l'influenza di questi due prodotti sulla cmc del Lutrol. Queste soluzioni sono state preparate allo stesso modo, aggiungendo una volta il Tween e l'altra il Kollidon al Lutrol a caldo, portando successivamente a peso con il tampone.

5.1.2. Prove di solubilità

Per valutare la capacità solubilizzante del Lutrol nei confronti della terbinafina sono state preparate soluzioni con concentrazioni crescenti di Lutrol.

Le suddette soluzioni sono state preparate fondendo un esatto quantitativo di Lutrol a bagnomaria a 50 °C, al quale è stata aggiunta, sotto agitazione, un eccesso di terbinafina. Successivamente è stato aggiunto TFS isotonic a pH 5.8, 66.7 mM, e le soluzioni così ottenute sono state mantenute in agitazione su agitatore magnetico per 12 ore a temperatura ambiente, filtrate attraverso filtri RC 0.2 µm ed analizzate allo spettrofotometro UV.

Per evitare interferenze da parte del Lutrol, le soluzioni sono state analizzate contro bianchi contenenti tampone + Lutrol alle stesse concentrazioni presenti in ciascuna delle soluzioni stesse.

Nel tentativo di migliorarne il potere solubilizzante, al Lutrol è stato aggiunto anche un altro prodotto con attività tensioattiva o complessante, Tween 80 o Kollidon K30, rispettivamente.

5.2. Solubilizzazione con Cremophor RH40

5.2.1. Determinazione della cmc

E' stata preparata una soluzione di Cremophor RH40 in TFS isotonic pH 5.8, 66.7 mM, che è stata mantenuta in agitazione su agitatore magnetico a temperatura ambiente per 12 ore e successivamente filtrata attraverso un filtro RC 0.2 µm. Questa soluzione è stata diluita più volte in modo tale da ottenere varie soluzioni a concentrazione decrescente di Cremophor, e per ciascuna di queste soluzioni è stata determinata la tensione superficiale.

5.2.2. Prove di solubilità

Per valutare la capacità solubilizzante del Cremophor nei confronti della terbinafina sono state preparate soluzioni con concentrazioni crescenti di Cremophor.

Le suddette soluzioni sono state preparate sciogliendo un esatto quantitativo di Cremophor nell'opportuna quantità di TFS isotonic pH 5.8, 66.7 mM, al quale è stata aggiunta, sotto agitazione, un eccesso di terbinafina. Le soluzioni così ottenute sono state mantenute in agitazione su agitatore magnetico a temperatura ambiente per 12 ore, filtrate attraverso filtri RC 0.2 µm ed analizzate allo spettrofotometro UV.

Per evitare interferenze da parte del Cremophor, le soluzioni sono state analizzate contro bianchi contenenti tampone + Cremophor alle stesse concentrazioni presenti in ciascuna delle soluzioni stesse.

5.3. Solubilizzazione con Vitamina E TPGS

Per la solubilizzazione della terbinafina è stata preparata una soluzione di VIT.E all'1% in TFS isotonic pH 5.8, 66.7 mM: la vitamina è stata fusa a b.m. a 50 °C, è stato aggiunto, sotto agitazione, lo 0.2% di terbinafina e quindi la soluzione tampone. La soluzione così ottenuta è stata mantenuta in agitazione su agitatore magnetico a temperatura ambiente per 12 ore, filtrata attraverso un filtro RC 0.2 µm, ed analizzata allo spettrofotometro UV. Per eliminare le eventuali interferenze di VIT E, le soluzioni sono state analizzate contro bianchi contenenti tampone + vitamina alle stesse concentrazioni presenti in ciascuna delle soluzioni stesse.

6. STABILITA' DELLE FORMULAZIONI

Le formulazioni più promettenti dal punto di vista del pH, dell'osmolarità e della quantità di terbinafina disciolta, sono state poste in flaconi chiusi a temperatura ambiente e in frigo a 4-5 °C, e sono state periodicamente rianalizzate, valutandone: titolo di terbinafina, pH ed osmolarità.

Prima dell'analisi ogni campione è stato centrifugato (12000 giri per 10 minuti) ed il surnatante trasferito in un contenitore pulito.

7. RISULTATI E DISCUSSIONE

I valori dei parametri di convalida del metodo analitico di terbinafina in TFS pH 5.8, sia 66.7 che 20 mM, sono riportati nelle tabelle 2 e 3. Dai dati ottenuti è possibile notare che il metodo analitico prescelto risulta preciso e accurato e presenta limiti di quantificazione dell'analita compatibili con il lavoro che è stato svolto.

I risultati ottenuti dalle prove di solubilizzazione di terbinafina nei diversi solventi, H₂O e TFS, sono riportati numericamente in tabella 4. Può essere notato che terbinafina presenta una solubilità maggiore in H₂O piuttosto che nelle soluzioni tampone impiegate nello studio, anche se la soluzione acquosa del farmaco presenta un valore di pH di 3. D'altra parte, esiste l'esigenza di dare ad una formulazione oftalmica un valore di pH compatibile con il sito di somministrazione, da cui la scelta di operare in ogni caso in ambiente tamponato, anche a scapito della solubilità massima raggiungibile.

In base ai risultati ed a queste considerazioni, è stato scelto di lavorare a pH 5.8, utilizzando soluzioni tampone a diversa concentrazione, 66.7 e 20 mM, isotoniche e non. In figura 4 (a e b, per TFS 66.7 e 20 mM rispettivamente) sono riportate le curve di taratura convalidate impiegate per la parte successiva del lavoro di analisi.

L'andamento della tensione superficiale in funzione della concentrazione del tensioattivo è riportata, a titolo di esempio, nelle figure 5 e 6 per Lutrol e Cremophor, rispettivamente. I valori di cmc delle soluzioni dei tensioattivi impiegati nello studio, da soli o in associazione sono elencati in tabella 5. Per quanto riguarda le associazioni di sostanze con potere solubilizzante è stato osservato che con aggiunta di Kollidon alla soluzione di Lutrol si ha un incremento del valore di tensione superficiale, che comunque rimane costante per tutte le concentrazioni di Kollidon impiegate. Con l'aggiunta di Tween, invece, si assiste ad una ulteriore diminuzione della tensione superficiale ed anche del valore di cmc, che scende da 45 a 42.25 mN/m.

Nel tentativo di massimizzare la solubilizzazione di terbinafina in TFS, la concentrazione minima di tensioattivo impiegata negli studi di solubilizzazione è sempre stata superiore ai valori di cmc trovati.

Gli studi di solubilizzazione hanno permesso di ricavare le concentrazioni massime di terbinafina ottenibili con i prodotti solubilizzanti impiegati (v. Tab. 6).

A questo proposito sono da precisare due cose, la prima che l'aggiunta di Kollidon alla soluzione di Lutrol e terbinafina ha portato ad un intorbidamento della soluzione stessa che si è mantenuto nonostante agitazione per 24 ore e filtrazioni successive, per cui è stato deciso di abbandonarne l'utilizzo. Questo fenomeno potrebbe essere dovuto all'innalzamento della tensione superficiale della soluzione dopo aggiunta di Kollidon; la γ della soluzione finale risulta infatti intorno a 56 mN/m, valore ben superiore alla cmc di Lutrol (v. Fig. 5): l'aggiunta di Kollidon potrebbe quindi inibire la formazione di micelle da parte di Lutrol e risultare in una meno efficace solubilizzazione di terbinafina. La seconda che le formulazioni in TFS 20 mM presentavano valori di pH troppo acidi per essere impiegate a livello oculare, per cui le formulazioni selezionate successivamente avevano tutte come solvente TFS, isotonico, pH 5.8, 66.7 mM.

Le formulazioni con un più alto contenuto in terbinafina, scelte con veicoli diversi fra quelli preparati (Tab. 7), sono state sottoposte a prove di stabilità, a temperatura ambiente e 4 °C. I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle 8 e 9, come titolo in terbinafina, pH ed osmolalità delle soluzioni a vari intervalli di tempo, alle due temperature di conservazione. La serie di dati è stata riportata graficamente per valutare la cinetica di degradazione dell'attivo nelle varie soluzioni: questa si è dimostrata di primo ordine in tutti i casi. Dalle equazioni delle rette ottenute riportando in grafico Log conc. terbinafina nel tempo, per ciascuna temperatura, è stato possibile estrapolare il tempo di conservazione a tale temperatura al quale il titolo di terbinafina scendeva al 90 %. Dai risultati, riportati in tabella 10, è emerso che soltanto la formulazione 5, contenente VIT E 1%, aveva una stabilità ragionevole, che arrivava a superare l'anno di vita ad entrambe le

temperature di conservazione: 1.76 e 1.32 anni per la t.a. e 4 °C, rispettivamente.

La formulazione 5 sarà in futuro sottoposta a prove di tollerabilità oculare su coniglio e, in caso di risultati positivi, a studi farmacocinetici.

BIBLIOGRAFIA

1. **Bucci, M.**, *Occhio: anatomia*, in: Enciclopedia Medica Italiana, USES ed. scientifiche, **1983**.
2. **Miglior, M.**, *Anatomia clinica*, in: Oftalmologia clinica, pp. 5-14, Monduzzi Ed., **1989**.
3. **Maurice, D.M.**, *Structures and fluids involved in the penetration of topically applied drugs*, in International Ophthalmology Clinics, vol. 20 (Holly, F.Ed.), Little, Brown, Boston, pp. 7-20, **1980**.
4. **Doane, M.G.**, Jensen, A.D., Dohlman, C.H., *Penetration routes of topically eye medications*, Amer. J. Ophthalmol. **85**: 383-386, **1978**.
5. **Mishima, S.**, *Some physiological aspects of the precorneal tear film*, Arch. Ophthalmol, **73**: 233-241, **1965**.
6. **Barendsen, H.**, Oosterhuis, J.A., Van Haeringer, N.J., *Concentration of fluorescein in tear fluid after instillation as eye drops*, Ophthalmic Res., **11**: 73-82, **1979**.
7. **Milder, B.**, *The lacrimal apparatus*, in: Adler's physiology of the eye (Moses, R.A. ed.) C.V. Mosby Company, Saint Louis, Toronto, London, p.20, **1981**.
8. **Patton, T.F.**, *Ocular drug disposition*, in Ophthalmic Drug Delivery Systems, (Robinson, J.R. ed.) APhA Academy of Pharmaceutical Sciences, Washington, pp. 28-54, **1980**.
9. **Lee, V.H.L.**, Robinson, J.R., *Mechanistic and quantitative evaluation of precorneal pilocarpine disposition in albino rabbits*, J. Pharm. Sci., **68**: 673, **1979**.
10. **Amorosa, M.**, *Principi Di Tecnica Farmaceutica*, Libreria Universitaria L. Tinarelli, p. 383-389, **1978**.
11. **Buri, P.**, *Voie Oculaire. Formes pharmaceutiques nouvelles*, (Buri, P., Puisieux, F., Doelker, E., Benoit, J.P., ed.Lavoisier), **1985**.
12. **Shell, J.W.**, *Ophthalmic Drug Delivery Systems*, Surv. Ophthalmol., **2**: 117-128, **1984**.
13. **Lee, V.H.L.**, Wulf Carson, L., Takemoto, K.A., *Macromolecular drug absorption in the albino rabbit eye*, Int. J. Pharm., **29**: 43, **1986**.
14. **Plazonnet, B.**, Grove, J., Durr, M., Mazuel, C.C., Quint, M., Rozier, A., *Pharmacokinetics and Biopharmaceutical Aspects of some Antiglaucoma Drugs*, in: Ophthalmic drug delivery, Biopharmaceutical Technological and clinical aspects, (Saettone, M.F., Bucci, M., Speiser, P., ed.) vol **11**, Fidia Research Series, Liviana Press, Springer Verlag, **1987**.
15. **Krohn, D.L.**, Ronel, S.M., *U.S. Patent 4, 003, 991*, National Patent Development Corp., **1977**.

- 16. Saettone, M.F.**, Giannaccini, B., Monti, D., Torracca, M.T., Chetoni, P., *Muco-adhesive liquid ophthalmic vehicles. Evaluation of macromolecular ionic complexes of pilocarpine*, Drug Dev. Ind. Pharm., 52 (14-16): 2475-2489, **1989**.
- 17. Lemke, T.L.**, Williams, D.A., *Foye's Principi Di Chimica Farmaceutica*, Piccin, p. 1213-1226, **2010**.
- 18. Kalcanci A.**, Sengul O., *Ocular Fungal Infections*, Informa Healthcare USA Inc., **2011**.
- 19. Liang, Q.**, Jin, X., Wang., Sun, X., *Effect of topical application of terbinafine on fungal keratitis*, Chinese Medical Journal, 122(16): 1884-1888, **2009**.
- 20. Kumar, N.**, Jain, A.K., Singh, C., Kumar, R., *Development, characterization and solubility study of solid dispersion of terbinafine hydrochloride by solvent evaporation method*, Asian Journal of Pharmaceutics, **2008**.
- 21. Ephstein, N.A.**, *Validation of HPLC Techniques For Pharmaceutical Analysis*, Pharmaceutical Chemistry Journal, Vol.38, No. 4, **2004**.

Tabelle e grafici

Tabella 1 – Composizione soluzioni tampone

Soluzione A mL	Soluzione B mL	H ₂ O mL	pH	NaCl g
92.1	7.9	/	5.8	0.53
85	15	/	6.1	/
20	80	/	7.4	0.44
30.7	2.63	77.67	5.8	0.15

Soluzione A: NaH₂PO₄ · H₂O (9.2 g/L)

Soluzione B: Na₂HPO₄ (9.47 g/L)

Tabella 2 – Parametri validazione statistica in tampone Sörensen fosfato isotonico pH 5.8, 66.7 mM

Precisione (rsd%)	Ripetibilità	Riproducibilità	Conc. terbinafina (mg/100 mL)
	1.296	0.97	0.185
	0.437	0.77	0.588
	0.72	0.23	0.93
Accuratezza (%)	101.54		0.39
	101.54		0.78
	98.8		1.17
Linearità (r^2)	0.999		
Range (mg/100 mL)	0.037 – 1.24		
LOD (mg/100 mL)	0.01		
LOQ (mg/100 mL)	0.032		

Tabella 3 – Parametri validazione statistica in tampone Sörensen fosfato pH 5.8, 20 mM

Precisione (rsd%)	Ripetibilità	Riproducibilità	Conc. terbinafina (mg/100 mL)
	1.40	0.693	0.172
	1.247	1.304	0.426
	0.965	1.28	0.598
Accuratezza (%)	101.7		0.167
	100.0		0.501
	99.47		1.169
Linearità (r^2)	0.9976		
Range (mg/100 mL)	0.026 – 1.196		
LOD (mg/100 mL)	0.014		
LOQ (mg/100 mL)	0.042		

Tabella 4 - Solubilità massima terbinafina nei vari solventi

Solvente	terbinafina (mg/100 mL)
pH 7.4, 66.7 mM	0.402
pH 6.1, 66.7 mM	1.215
pH 5.8, 66.7 mM	2.345
pH 5.8, 20 mM	2.177
H2O HPLC	595.95

Tabella 5 – Cmc prodotti solubilizzanti

Sostanza	Cmc (% p/p)
Lutrol F127	0.001
Cremophor RH40	0.01
Lutrol F127 + Kollidon K-30	/
Lutrol F127 + Tween 80	0.001/0.2
VIT.E TPGS	0.02*

* ottenuta da un altro studio

Tabella 6 – Concentrazioni massime di terbinafina ottenibili con i vari prodotti solubilizzanti

Prodotto solubilizzante (% p/p)	Solvente	Conc. terbinafina (mg/100 mL)
Lutrol 0.2	TFS 66.7 mM	76.46
Lutrol 1.5	TFS 66.7 mM	142.56
Lutrol 2.0	TFS 66.7 mM	155.53
Lutrol 2.5	TFS 66.7 mM	157.88
Lutrol 3.5	TFS 66.7 mM	276.76
Lutrol 3.5	TFS 20mM	202.43
Cremophor 0.05	TFS 66.7 mM	25.59
Cremophor 0.09	TFS 66.7 mM	35.86
Cremophor 0.2	TFS 66.7 mM	53.72
Cremophor 0.4	TFS 66.7 mM	52.45
Cremophor 0.6	TFS 66.7 mM	57.52
Cremophor 0.75	TFS 66.7 mM	56.93
Cremophor 1.0	TFS 66.7 mM	61.58
Cremophor 1.0	TFS 20 mM	61.31
Vit. E TPGS 1.0	TFS 66.7 mM	218.09
Lutrol 2.5 + Tween 0.3	TFS 66.7 mM	228.23

Tabella 7 - Formulazioni poste in stabilità

	Contenuto	Conc. terbinafina (mg/100 mL)	pH	Osmolalità (mOsm/Kg)
Formulazione 1	Cremophor 1%	61.58	5.17	287
Formulazione 2	Lutrol 2.5%	156.49	4.72	298
Formulazione 3	Lutrol 2.5% + Tween 0.3%	198.23	5.25	310
Formulazione 4	Lutrol 3.5%	201.40	5.24	315
Formulazione 5	Vit.E 1%	201.09	5.25	291

Tabella 8 – Stabilità delle formulazioni a temperatura ambiente

tempo		0	14	30	45	65	80	105	130
Formul.1	• Titolo terbinafina (mg/100 mL)	61.58	39.05	31.61	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	• pH	5.17	5.28	5.37					
	• Osmolalità (mOsm/Kg)	287	292	298					
Formul.2	• Titolo terbinafina (mg/100 mL)	156.49	n.a.	135.96	150.87	129.21	84.74	n.a.	53.93
	• pH	4.72		4.64	5.2	4.75	5.12		5.17
	• Osmolalità (mOsm/Kg)	298		298	304	305	306		300
Formul.3	• Titolo terbinafina (mg/100 mL)	198.23	62.06	73.81	n.a.	93.06	n.a.	54.44	n.a.
	• pH	5.25	5.22	5.27		5.17		5.32	
	• Osmolalità (mOsm/Kg)	310	308	308		436		377	
Formul.4	• Titolo terbinafina (mg/100 mL)	201.40	29.88	57.3	n.a.	185	n.a.	139.86	n.a.
	• pH	5.24	5.21	5.31		5.26		5.36	
	• Osmolalità (mOsm/Kg)	315	316	328		327		317	
Formul.5	• Titolo terbinafina (mg/100 mL)	201.09	196.25	197.88	n.a.	194.72	n.a.	196.15	n.a.
	• pH	5.25	5.25	5.32		5.30		5.28	
	• Osmolalità (mOsm/Kg)	291	291	290		295		300	

Tabella 9 – Stabilità delle formulazioni a 4 °C

tempo		0	14	30	45	65	80	105	130
Formul.1	• Titolo terbinafina (mg/100 mL)	61.5	56.7	57.7	54.75	54.03	n.a.	50.57	n.a.
	• pH	5.17	5.37	5.43	5.37	5.37		5.46	
	• Osmolalità (mOsm/Kg)	287	308	308	319	325		331	
Formul.2	• Titolo terbinafina (mg/100 mL)	156.49	n.a.	103.35	101.95	106.02	59.13	n.a.	46.9
	• pH	4.72		4.64	4.64	5.03	4.97		4.85
	• Osmolalità (mOsm/Kg)	298		297	302	321	330		325
Formul.3	• Titolo terbinafina (mg/100 mL)	198.23	26	25.8	n.a.	31	n.a.	31.3	n.a.
	• pH	5.25	5.23	5.30		5.26		5.32	
	• Osmolalità (mOsm/Kg)	310	308	312		313		319	
Formul.4	• Titolo terbinafina (mg/100 mL)	201.40	131.2	87.67	n.a.	77.48	n.a.	75.03	n.a.
	• pH	5.24	5.25	5.24		5.31		5.38	
	• Osmolalità (mOsm/Kg)	315	315	392		397		340	
Formul.5	• Titolo terbinafina (mg/100 mL)	201.09	194.31	189.83	n.a.	199.31	n.a.	200.74	n.a.
	• pH	5.25	5.25	5.33		5.08		5.29	
	• Osmolalità (mOsm/Kg)	291	287	287		289		295	

Tabella 10 – Dati di stabilità delle formulazioni

Formulazioni	Tempo necessario per raggiungere il 90% della conc. iniziale (giorni)
Formul.1, t.a.	3.13
Formul.1, 4 °C	47.62
Formul.2, t.a.	34.75
Formul.2, 4 °C	12.32
Formul.3, t.a.	n.c.
Formul.3, 4 °C	n.c.
Formul.4, t.a.	n.c.
Formul.4, 4 °C	n.c.
Formul.5, t.a.	644.28 (1.76 anni)
Formul.5, 4 °C	482.5 (1.32 anni)

Fig. 4a. Retta di taratura in TFS pH 5.8, 66.7 mM

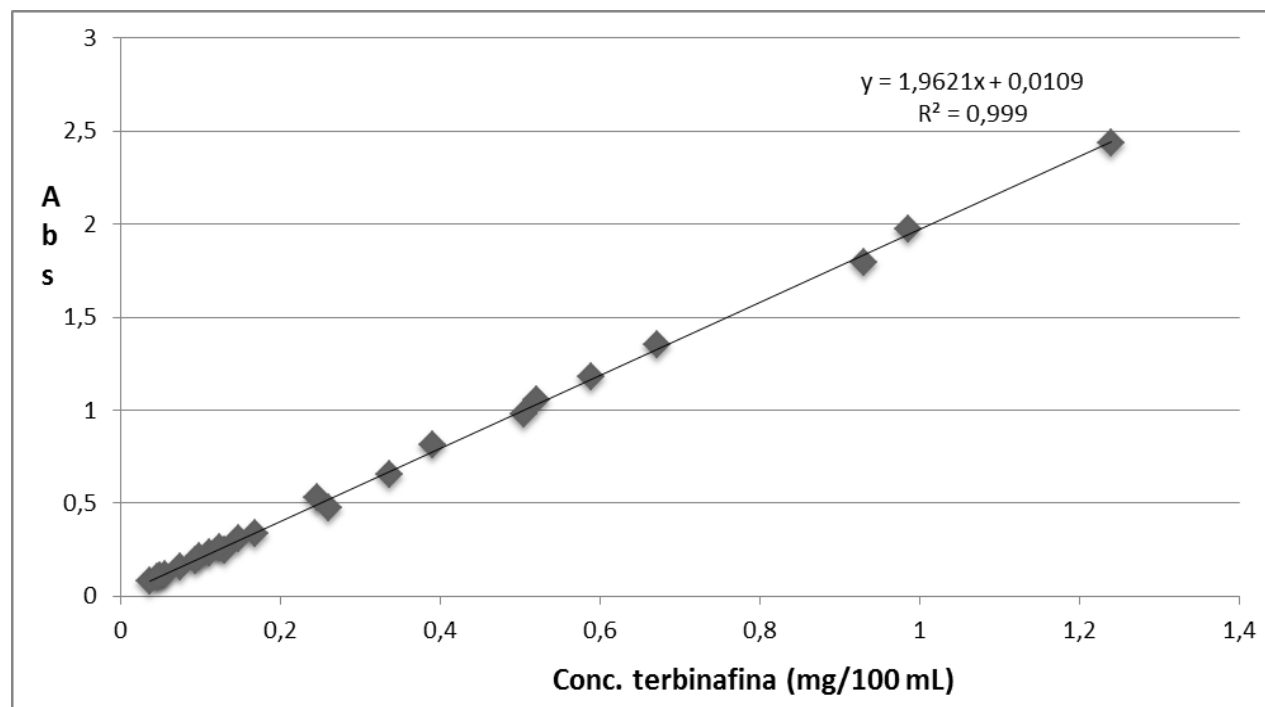


Fig. 4b. Retta di taratura in TFS pH 5.8, 20 mM

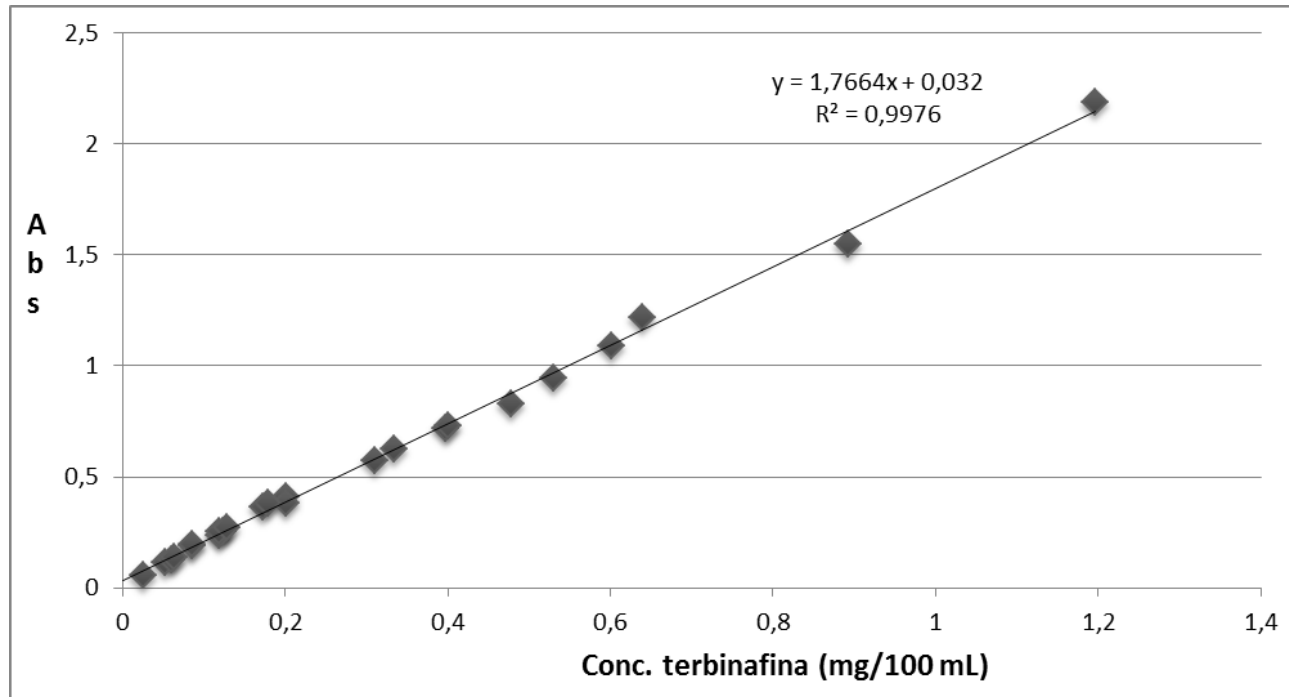


Fig. 5. Tensione superficiale del Lutrol F127

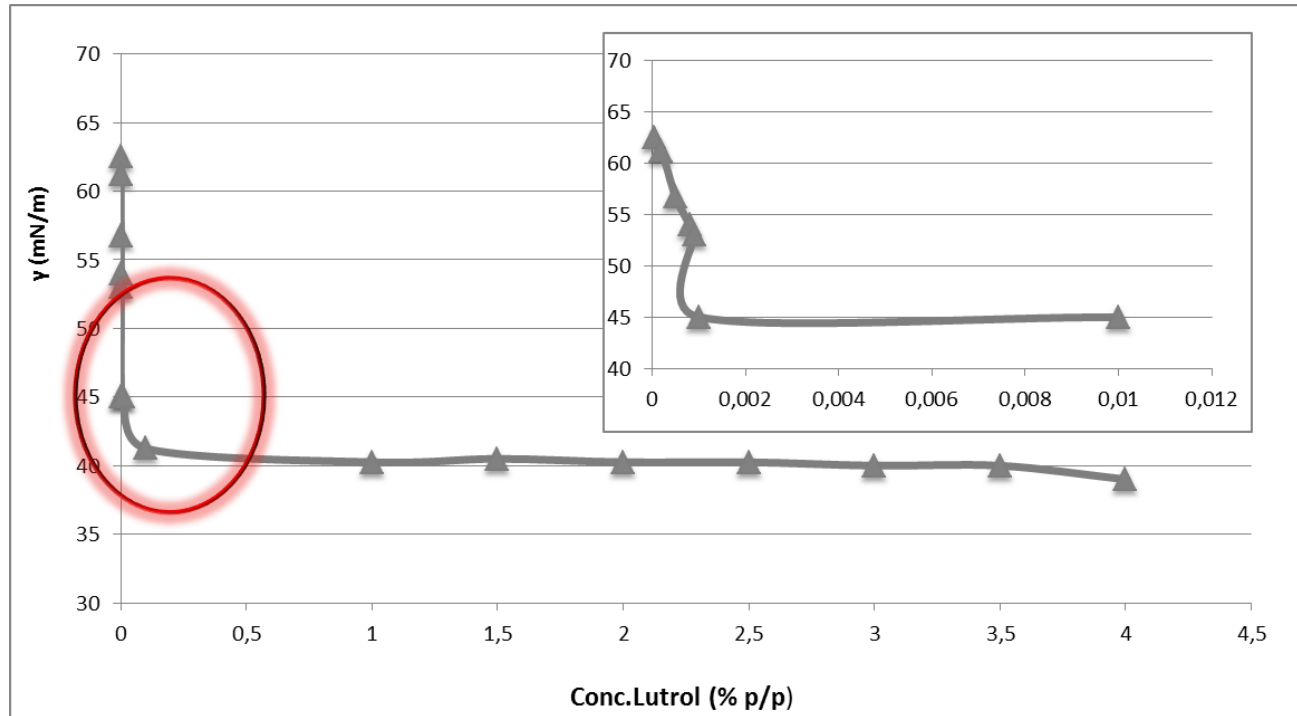
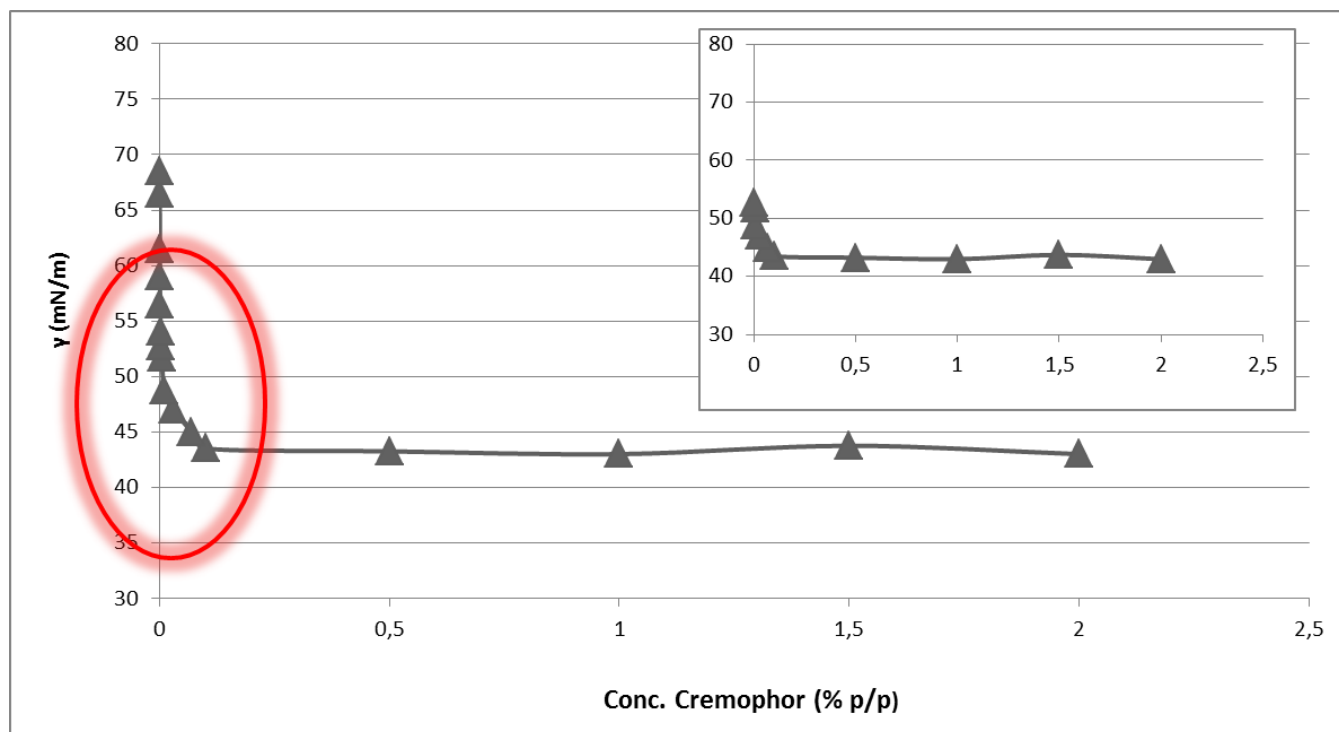


Fig. 6. Tensione superficiale del Cremophor RH40



Giunto al termine della mia carriera universitaria mi sembra doveroso fare dei ringraziamenti.

Ringrazio la Dott.ssa Burgalassi per avermi fornito preziosi consigli ed avermi aiutato durante il lavoro di tesi, e anche la Prof. Chetoni e la Dott.ssa Monti per avermi dato l'opportunità di svolgere questo progetto, che spero sia risultato utile.

Ringrazio anche il Dott. Egiziano, e le Dott. sse Tampucci e Nicosia, sempre presenti in laboratorio per aiutare noi tesisti.