



**UNIVERSITA' DI PISA**

**Dipartimento di Farmacia**

Corso di Laurea Specialistica in Farmacia

*“Messa a punto di formulazioni semisolide per il trattamento della psoriasi ungueale”*

Relatore:

Dott.ssa Daniela Monti

Candidata:

Manuela Bartolini

Correlatore:

Dott.ssa Silvia Tampucci

Anno accademico 2013/2014

Dedico questa tesi alla mia  
famiglia

## Indice

<b>Parte introduttiva .....</b>	<b>5</b>
1. La psoriasi ungueale .....	5
1.1 <i>L'unghia umana : aspetti anatomici e funzionali, composizione chimica e funzione</i> .....	5
1.2 <i>La psoriasi e la psoriasi ungueale</i> .....	7
1.3 <i>Caratteristiche dell'unghia psoriasica</i> .....	10
1.4 <i>Trattamento della psoriasi ungueale</i> .....	12
2. Gli idrogli .....	18
2.1 <i>Gli idrogeli</i> .....	18
2.2 <i>Idrogeli: caratteristiche tecnologiche</i> .....	20
2.3 <i>Applicazioni farmaceutiche</i> .....	23
<b>Parte sperimentale.....</b>	<b>25</b>
1. Scopo della tesi.....	25
2. Materiali.....	26
3. Preparazione dell'idrogel non medicato.....	27
4. Preparazione dell'idrogel medicato .....	29
5. Caratterizzazione dell'idrogel medicato.....	31
5.1 <i>Capacità di swelling</i> .....	31
5.2 <i>Bagnabilità ed angolo di contatto</i> .....	32
6. Studio di rilascio del principio attivo dall'idrogel medicato.....	33
7. Metodo analitico della Ciclosporina A.....	35
8. Risultati e conclusioni .....	36
 Grafici e tabelle.....	 38
 Bibliografia.....	 43

## Parte introduttiva

### 1 La psoriasi ungueale

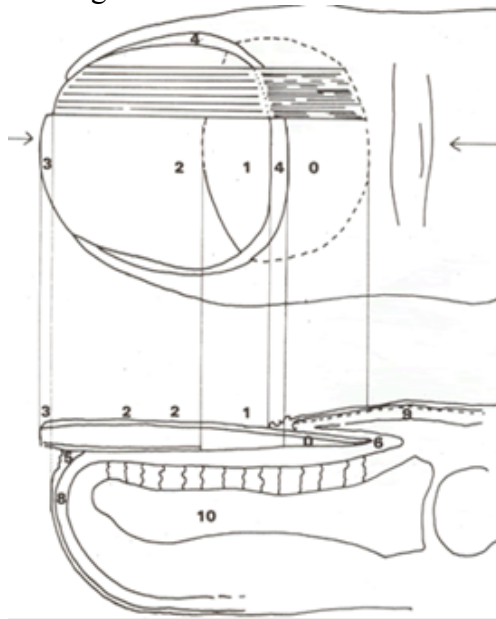
#### 1.1 L'unghia umana: aspetti anatomici e funzionali, composizione chimica e funzione

##### *Aspetti anatomici e funzionali*

L'unghia si può definire una lamina cornea, di derivazione epidermica, semitrasparente, sottile ed elastica, che ha sede sul dorso di ogni falange terminale delle dita di mani e piedi. L'unghia è un'unità complessa dove è possibile distinguere:

0) Radice 1) Lunula 2) Corpo della lamina 3) Margine libero 4) Solco ungueale 5) Solco ungueale distale 6) Matrice 7) Letto ungueale 8) Iponichio 9) Eponichio o cuticola 10) Falange (Fig.1)

Le unghie si formano nella matrice ungueale.



La zona della matrice va dal solco ungueale fino alla lunula. La matrice è costituita da uno strato germinativo di cellule, i cheratinociti, che produce cheratina, una proteina molto resistente. E' posizionata dietro al letto ungueale e grazie al processo di cheratinizzazione porta alla formazione dell'unghia propriamente detta. A causa della scissione cellulare che avviene all'interno della matrice, le cellule cheratinizzate vengono spinte dalla zona posteriore (prossimale) alla zona anteriore (distale). Da questo processo, secondo un criterio topografico, molti autori distinguono una matrice prossimale ed una matrice distale. Al contrario sulla base di un criterio embriologico si distinguono un livello inferiore ed uno superiore, chiamati anche labbro inferiore e superiore. La parte più

giovane della lamina ungueale, prossimale, incuneata profondamente nella tasca ungueale viene detta radice dell'unghia. La matrice determina spessore e dimensione della lamina ungueale. Se la matrice viene danneggiata o traumatizzata può succedere che l'unghia non nasca o non cresca come di norma.

La matrice ha la stessa struttura istologica dell'epitelio superficiale cutaneo e comprende: strato basale, strato intermedio e strato corneo. Essa contiene inoltre melanociti, cellule di Langerhans e cellule di Merkel

- Lo strato basale è costituito da cellule cilindriche ben aderenti le une alle altre e caratterizzate da intensa attività mitotica. Tali cellule presentano micro fibrille intercitoplasmatiche disposte in modo disordinato. La membrana citoplasmatica è molto frastagliata e forma villosità che si intrecciano con quelle delle vicine cellule basali. Attraverso villosità simili, le cellule dello strato basale interagiscono con il derma sottostante formando delle papille di ancoraggio che determinano la formazione di una

vera e propria giunzione. Quest'ultima è responsabile della direzione della crescita delle cellule della matrice.

- Lo strato intermedio, o spinoso, è costituito da 6-10 strati di cellule più voluminose e paragonabili ai cheratinociti dell'epidermide. Il loro nucleo è picnotico, il citoplasma è fortemente eosinofilo e contiene numerosi granuli di misura variabile adiacenti alle pareti cellulari. Le cellule che caratterizzano questo strato sono rotonde o poligonali: sono orientate in direzione della loro migrazione e differiscono dalle cellule epidermiche in quanto sono più ricche di ribosomi, polisomi e vacuoli contenenti lipidi e prodotti di degradazione della citolisi.

- Lo strato superficiale è costituito da diversi strati di cellule appiattite che non possiedono granuli di cheratoialina. Queste cellule cornee presentano talvolta tracce di nucleo. (Prosepio et al., 1991).

La lamina ungueale, viene prodotta dalla matrice. E' costituita da cheratina incorporata in una matrice amorfa ricca di zolfo. La lamina mostra una leggera curvatura longitudinale e una curvatura più accentuata trasversale, un bordo concavo prossimale e un margine libero convesso. Generalmente sono distinguibili tre strati che caratterizzano la lamina: dorsale, intermedio, ventrale.

- la lamina dorsale, lo strato superiore e più duro della lamina, viene prodotto dalla matrice prossimale. E' composto da piccole cellule piatte cheratinizzate saldamente legate fra loro attraverso giunzioni strette. La lamina dorsale è responsabile dell'aspetto lucido dell'unghia.

- la lamina intermedia, è lo strato interno e più spesso. Qui sono presenti fibre di cheratina molli, disposte parallelamente alla radice dell'unghia.

- la lamina ventrale, non deriva dalla matrice ma besì dal letto ungueale per cheratinizzazione delle cellule epidermiche presenti a questo livello. E' costituito da uno o due strati di cellule disposte in maniera irregolare. (Morgan et al., 2001).

La lamina ungueale è saldamente unita nel suo lato inferiore al letto ungueale, distaccandosi solo in prossimità del margine distale che ha poi termine nel margine ungueale libero. In questa sede lo strato corneo è fuso con la membrana fibro-elastica che avvolge la falange: l'epidermide consiste di uno strato basale e di uno strato spinoso, mentre l'unghia sostituisce lo strato corneo. Il letto ungueale è un tessuto ricchissimo di vasi sanguigni e nervi. I vasi sanguigni, nascosti solo dalla lamina ungueale trasparente, conferiscono al letto ungueale la tipica colorazione rosa pallido. Un colore più chiaro, opaco e semitrasparente caratterizza invece il margine ungueale libero e la lunula. La lunula è la zona biancastra a forma di mezzaluna che ritroviamo alla base dell'unghia e rappresenta la parte visibile della matrice dell'unghia, ossia quell'insieme di cellule epiteliali da cui ha origine la lamina ungueale. E' solitamente più accentuata nel pollice, mentre sulle altre unghie la lunula può essere ricoperta dalla cute e quindi invisibile. L'eponichio o cuticola, volgarmente chiamato "pellicina", è un epitelio che ricopre la radice dell'unghia e che sporge per un tratto nel vallo ungueale. In senso più ampio, esso indica l'intera area in prossimità della matrice. L'eponichio ha una consistenza molto resistente e aderisce perfettamente alla lamina ungueale, tanto che questa ne trascina un sottile tratto con sé durante la crescita. Esso, insieme al solco periungueale e al vallo ungueale, svolge una funzione protettiva, rappresentando una sorta di "barriera impermeabile" nei confronti di agenti irritanti esterni, allergeni e patogeni.

L'accrescimento dell'unghia prosegue per tutta la vita ad un ritmo che raggiunge la massima intensità durante la prima infanzia e diminuisce gradualmente con l'età, ma che è, comunque, aumentato o diminuito da alcune condizioni patologiche. Lo sviluppo normale dell'unghia dipende da un'adeguata irrorazione sanguigna ed innervazione

della matrice e del letto ungueale; qualunque interferenza con queste due funzioni incide negativamente sulla crescita regolare. Le fasi della crescita sono molto variabili fra gli individui: in media si valutano in 3 mm mensili nelle unghie delle mani e 1 mm in quelle dei piedi. Mentre la normale crescita delle unghie delle mani si completa in circa 6 mesi, quella dei piedi ha una durata di circa 18 mesi. E' stato inoltre osservato che le unghie crescono più velocemente quando si rigenerano dopo avulsione: questo perché la lamina distaccata porta con sé la zona cheratogena della matrice e l'epitelio del letto ungueale lasciando esposti la matrice basale ed il mesenchima del letto. Immediatamente le superfici libere sono ricoperte da una formazione crostosa e l'epidermide sottostante assicura la riparazione a partire dalle pliche laterali e dall'iponichio; questo tipo di epidermide è iperplastica ed ipercheratosica e contiene uno strato granuloso di cheratoialina. Non appena la nuova lamina si forma e procede in avanti, un epitelio più sottile e privo di strato granuloso avanza caudalmente e sostituisce l'epitelio riparato (Murdan, 2002).

### ***Composizione chimica***

Il costituente principale dell'unghia è rappresentato dalla cheratina, una scleroproteina contenente alte percentuali di solfuri. L'intera porzione cheratinica può essere distinta in una frazione "povera di solfuri" e una frazione amorfa, "ricca di solfuri". La prima è costituita da proteine fibrose in cui tutta la catena polipeptidica presenta un tipo di struttura secondaria ad alfa-elica destrorsa nella quale compaiono spesso sequenze periodiche di aminoacidi. Più catene polipeptidiche si uniscono a formare una struttura più complessa, una super-elica levogira detta "protofibrilla" che è stabilizzata dalla presenza di ponti disolfuro tra le catene. La porzione ad alfa-elica costituisce circa il 33-55% dell'intera cheratina. Le protofibrille sono associate ad una matrice amorfa costituita da proteine aventi una struttura globulare ricca di legami a idrogeno; questi legami catalizzano il legame delle proteine globulari tra loro e con le protofibrille. Le analisi biochimiche hanno dimostrato che le unghie ed i capelli dell'uomo contengono gli stessi tipi di filamenti di cheratina, che non sono però presenti nell'epidermide cutanea (Marshall, 1983; Baden, 1973) perciò l'unghia viene generalmente considerata più simile ai capelli che alla cute. Le unghie umane contengono inoltre una discreta quantità di aminoacidi in prevalenza acido glutammico, glicina, cisteina, arginina acido aspartico, serina e leucina. La presenza di ponti disolfuro, dovuti all'alto contenuto di cisteina, conferisce alla struttura cheratinica un'eccezionale stabilità chimica e fisica. Per quanto riguarda la componente lipidica, essa rappresenta meno del 5% del contenuto totale ed esiste sotto forma di fosfolipidi legati alle membrane cellulari, prevalentemente, della lamina dorsale e ventrale dell'unghia. Le unghie umane contengono inoltre grandi quantità di oligoelementi soprattutto S e N, mentre ridotta è la quantità di Ca, Mg, Na, K, Fe, Cu e Zn (Vellar, 1970).

### ***Funzione***

Le unghie fanno parte degli annessi cutanei; la loro principale funzione è la protezione delle falangi distali. In particolare l'unghia umana svolge la funzione di protezione nei confronti dell'epitelio delle falangi distali delle dita di mani e piedi e delle terminazioni nervose digitali. L'unghia svolge anche un ruolo importante nel migliorare la sensibilità tattile, in quanto agisce come una forza contraria quando la punta del dito tocca un oggetto, andando ad agevolare la sensibilità del polpastrello. Inoltre concorre alla stabilità della presa ed al miglioramento della motilità fine. (Onhuma et al., 2010 e Wang et al., 2010).

## 1.2 La psoriasi e la psoriasi ungueale

La psoriasi è una malattia infiammatoria cronica della pelle, non infettiva né contagiosa, solitamente di carattere cronico e recidivante. Nella sua patogenesi intervengono fattori autoimmunitari, genetici e ambientali. La psoriasi sembra inoltre essere correlata ad un aumentato rischio di malattie cardiovascolari (Boehncke et al., 2000) tra cui l'ictus e l'infarto del miocardio e trattare l'iperlipidemia dei pazienti correlata all'insorgenza di queste patologie può portare a un miglioramento delle manifestazioni psoriasiche. ( Xu et al., 2012; Kimball et al. 2010; Ghazizadeh et al. 2011). Poiché le unghie rappresentano le appendici dell'apparato epidermico, sono comunemente coinvolte nei pazienti affetti da psoriasi. E' dimostrato da dati scientifici che l'80-90% di questi ultimi svilupperà probabilmente psoriasi ungueale come conseguenza della loro condizione patologica (Baran et al., 2010). Uno studio condotto nel 2010 su 3531 pazienti affetti da psoriasi ha mostrato che il coinvolgimento ungueale è prevalente negli uomini (11,2%). (Augustin et al., 2010). Anche fra i pazienti colpiti da artrite psoriasica (infiammazione cronica delle articolazioni colpite da psoriasi) il coinvolgimento delle unghie può essere molto elevato, fino all'80,5% (Brazzelli et al., 2012). Solo l' 1%-5% dei pazienti affetti da psoriasi ungueale non presenterà nessun'altra malattia cutanea conclamata. Le unghie dei piedi e delle mani infatti possono rappresentare talvolta anche l'unica sede interessata dalla malattia: le parti dell'unghia maggiormente colpite da psoriasi sono la matrice, il letto e le pliche ungueali (Del Rosso 1997). Nonostante le sue implicazioni estetiche e funzionali, la psoriasi e ancor più la psoriasi ungueale sono state trattate molto brevemente in letteratura e non sono molti gli studi che hanno indagato riguardo l'epidemiologia e le caratteristiche cliniche (Armesto et al., 2011 e Augustin et al. 2010). L'eziologia della psoriasi è ancora sconosciuta, anche se alcuni dati a disposizione sembrano indicare un'origine polifattoriale. Attualmente sono due le ipotesi principali inerenti lo sviluppo della malattia.

La prima ipotesi considera la psoriasi come un disturbo di eccessiva crescita e riproduzione delle cellule della pelle. Il problema è semplicemente visto come un disturbo dell'epidermide e dei cheratinociti. La seconda ipotesi vede la malattia come un disordine immuno-mediato in cui l'eccessiva riproduzione delle cellule della pelle è secondaria a fattori prodotti dal sistema immunitario. I linfociti T, che assumono un ruolo centrale nell'immunità cellulo-mediata, si attivano e migrano verso il derma, innescando il rilascio di citochine (in particolare il fattore di necrosi tumorale- TNF- $\alpha$ ) che a loro volta causano infiammazione e riproduzione rapida di cellule della pelle. Non è ancora chiaro quale siano i fattori che innescano l'attivazione delle cellule T (Chandran et al., 2010; Zenz et al., 2005; de Cid et al., 2009). Poiché la psoriasi è una malattia cronica caratterizzata da periodi di remissione alternati a fasi di riacutizzazione, riconoscerne i fattori scatenanti è importante anche al fine di evitare abitudini e comportamenti che possano aggravare o indurre una ripresa della malattia. Sono stati riconosciuti come fattori scatenanti traumi, irritazione (Fiumara et al., 1976), esposizione prolungata agli UV-A e/o scottature solari, infezioni (Rosenberg et al. 1988; Rosen et al. 1991), uso di determinati farmaci ed altri fattori come stress emotivi (Raychaudhuri et al. 2000) e fisici (Jankovic et al. 2009), xerosi, consumo di alcool e tabacco (Behnam et al., 2005; Naldi L. et al., 2006, Della valle et al. 2005), obesità (Peserico et al. 2005), fattori psicosomatici (Gupta et al., 1990), cambiamenti di stagione o cambiamenti climatici e raramente l'ipocalcemia (Lee et al. 2005; Aksoylar et al., 2004; Maeda et al., 2003). Sono state condotte inoltre varie ricerche per individuare un metodo scientifico e universalmente applicabile per identificare la gravità e l'estensione della psoriasi ungueale. A questo scopo è stato elaborato il NAPSI: Nail

psoriasis severity index (Rich and Sher, 2003). Il metodo prevede che l'unghia sia suddivisa in 4 quadranti: I segni relativi al coinvolgimento della matrice-1) pitting,2) leuconichia,3) emorragie a livello della lunula e 3) faticenza dell'unghia- e del letto-1) onicolisi, 2) macchie a goccia d'olio,3) ipercheratosi subungueale,4) emorragie a scheggia- siano valutati separatamente. In base al coinvolgimento dei quadranti si può avere sia per la matrice che per il letto un punteggio che va da 0 a 4: 0, quando non compaiono segni in nessun quadrante, 1 quando si ha il coinvolgimento di un solo quadrante, 2 quando siano coinvolti due quadranti ecc. fino a 4 quando i segni compaiono in tutti e quattro i quadranti. In questo modo, ad ogni unghia viene assegnato un NAPS, che sarà la somma del punteggio relativo al letto e alla matrice, che può andare da 0 a 8. Per un punteggio massimo, considerando le unghie sia delle mani che dei piedi, di 160. Per ottenere una valutazione più accurata, vengono valutati anche i singoli quadranti con l'assegnazione a ciascuna unghia di un punteggio da 0 a 32 e ognuno degli 8 segni presi in esame dal metodo, che possono comparire, a cui viene attribuito un punteggio da 0 a 3 a seconda che siano assenti, lievi, moderati o gravi (Radtake, 2011).



▣

### 1.3 Caratteristiche dell'unghia psoriasica

La matrice, il letto e le pliche delle unghie possono essere tutte zone colpite da psoriasi e l'area colpita influisce sui sintomi della malattia, che includono infossature, decolorazione, onicolisi, ipercheratosi subungueale dovuta alla deposizione e al raggruppamento di cellule che non hanno subito desquamazione sotto la lamina ungueale, anomalie della lamina ungueale, emorragie a scheggia e paronichia (Del Rosso, 1997).

I sintomi più comuni che identificano l'unghia psoriasica sono i seguenti:

- Pitting:

caratterizzato dalla comparsa sulla lamina ungueale di piccole depressioni cupoliformi, conseguenti ad un alterato processo di cheratinizzazione della lamina ungueale., Tale manifestazione clinica viene comunemente chiamata *unghia a ditale da cucito* (Praveen et al., 2013).



Fig.2

- Linee di Beau:

caratterizzata dalla presenza di solcature trasversali ben definite conseguenti ad una ridotta attività della matrice prossimale. La solcatura trasversale non è altro che l'unione di tante singole depressioni cupoliformi (pitting) disposte quasi tutte sulla stessa linea orizzontale. Queste manifestazioni sono tipiche dei soggetti con psoriasi ma possono comparire anche in seguito a episodi febbrili insorti bruscamente.(Freedberg, et al. 2003).



Fig.3

- Leuconichia:

nota anche con il nome di unghia di Bean, caratterizzata dalla comparsa a livello della lamina ungueale di una o più chiazze di colore bianco (Freedberg, et al. ,2003).



Fig.4

- Ipercheratosi:

caratterizzata da un ispessimento dell'unghia di colore bianco-giallastro conseguente all'accumulo di squame al di sotto della lamina ungueale in prossimità del margine distale. L'ipercheratosi può essere parziale e localizzata oppure totale con conseguente scollamento dell'unghia dal letto. (Del rosso, 1997).

- Onicolisi:

caratterizzata da un'area di colorito giallastro, localizzata in prossimità del margine distale e laterale dell'unghia, spesso confusa con un'onicomicosi conseguente allo scollamento dell'unghia dal letto ungueale.(Freedberg; et al. 2003).



Fig.5

- Emorragie a scheggia:

manifestazione che insorge in seguito a eventi traumatici con presenza di striature lineari e longitudinali all'asse maggiore della lamina ungueale, di colore rosso-porpora.(Cindy, 2011).

- Macchie di Gottron:

caratterizzata dalla comparsa sulla lamina ungueale di chiazze singole o multiple, simili ad una macchia d'olio, di colore giallo o color salmone, proprio per questo chiamate *macchie color salmone*,(Baran & Haneke, 2007).

Le manifestazioni ungueali sono quindi molteplici e differenti, possono essere presenti singolarmente oppure combinate tra loro nello stesso soggetto. Il polimorfismo clinico delle lesioni ungueali della psoriasi dipende dalla sede in cui insorge il problema. Una disfunzione transitoria e limitata della matrice ungueale risulta visibile dalle infossature, dalle macchie bianche e dai solchi trasversali, mentre una disfunzione più importante della matrice causa fragilità, fatiscenza e perdita dell'unghia.

La psoriasi del letto ungueale invece produce una decolorazione a “macchia d’olio” ovale, color salmone, della lamina, ipercheratosi subungueale, emorragie a scheggia e onicolisi. Quest’ultimo sintomo può essere causato anche dalla psoriasi dell’iponichio. L’unghia affetta da psoriasi a livello delle pliche ungueali si manifesta invece attraverso la comparsa della paronichia che conduce alla rinalzata della lamina ungueale. Quando la paronichia raggiunge una certa gravità, può essere danneggiata anche la matrice con conseguenti anomalie dell’unghia.(Del Rosso, 1997 e Augustin et al.2010).

#### 1.4 Trattamento della psoriasi ungueale

La psoriasi ungueale viene spesso trascurata e le sue manifestazioni passano frequentemente inosservate o vengono confuse con altre patologie dell'unghia quando in realtà questa malattia impatta fortemente sulla qualità di vita dei malati. Studiare un appropriato approccio terapeutico è quindi molto importante, anche se la cura della psoriasi e in particolare del disturbo limitato alle unghie non risulta facile. In generale i trattamenti sistemici a cui si ricorre per la cura della psoriasi della pelle vanno ad agire anche a livello dei tessuti ungueali, mentre più difficile è la messa a punto di terapie topiche efficaci. La particolare composizione e struttura dell'unghia spesso rendono complesso l'approccio terapeutico topico per la difficoltà dei farmaci di permeare attraverso tale barriera. E' difficile mettere a punto una terapia standardizzata visto che dipende molto dalle parti dell'unghia coinvolte dalla patologia, dall'estensione e della gravità delle lesioni psoriasiche. La scelta della terapia topica o della terapia sistemica dipende dallo stadio della patologia e si ricorre alla via sistemica quando la malattia si manifesta in forma estremamente grave (Nast et al., 2011 e Cassel e Kavanaugh, 2007).

### *Terapia locale*

La terapia locale consiste nell'applicazione sull'unghia e nella zona periungueale del principio attivo veicolato in opportune formulazioni. Le forme farmaceutiche più rappresentate sono creme, unguenti, geli, lozioni, lacche, mousse, spray, paste e patches da applicare a seconda della localizzazione della lesione psoriasica sulla lamina e/o sulle pliche e/o sul letto dell'unghia. Ogni tipo di veicolo ha i suoi lati positivi e negativi: creme, unguenti e geli, le tradizionali formulazioni, necessitano applicazioni frequenti e ripetute e tempo affinché la formulazione si asciughi e si assorba; le lacche e gli smalti hanno invece il vantaggio di asciugare rapidamente appena applicati sulla lamina, lasciando un film sottilissimo, solitamente trasparente, a lunga tenuta e resistente all'acqua, esteticamente ben accettato (Iorizzo et al., 2005). Le lozioni invece sono soluzioni o dispersioni concentrate che possono contenere uno o più farmaci in un veicolo acquoso o idroalcolico che a loro volta possono produrre un film sulla lamina ungueale per evaporazione del solvente permettendone una maggior permanenza sull'unghia (Remington, 2006). I films e i patches adesivi invece costituiscono un vero e proprio sistema terapeutico in grado di rilasciare concentrazioni terapeutiche di farmaco in modo controllato limitando fortemente la necessità di applicazioni ripetute, peculiarità delle formulazioni tradizionali (Susilo et al., 2006). Quindi una formulazione ungueale ideale dovrebbe essere cosmeticamente accettabile ad esempio non creando disagi estetici o non interferendo con l'attività lavorativa, facile da applicare e da rimuovere ma allo stesso tempo deve permanere a lungo a livello della lamina in modo tale che non siano richieste frequenti applicazioni e soprattutto deve rilasciare il farmaco ed agevolare la permeazione all'interno dell'unghia (Murdan, 2007). A questo proposito spesso le formulazioni ungueali possono contenere sostanze chiamate enhancer o promotori di permeazione in grado di aumentare la penetrazione/permeazione del farmaco all'interno dell'unghia (Jiaravuthisan et al. 2007; Edwards and de Berker 2009). Il trattamento terapeutico della psoriasi ungueale è spesso reso difficoltoso dal fatto che le lesioni psoriasiche non sono esposte, ma sono protette dai tessuti sovrastanti, ad esempio le lesioni che colpiscono la matrice intermedia sono nascoste dalla lamina e dalla plica ungueale prossimale, così come le lesioni a livello del letto sono coperte dalla lamina. Queste barriere rappresentano un notevole ostacolo al passaggio dei farmaci (Kruger et al., 2006). E' pratica comune per agevolare la guarigione dell'unghia, effettuare alcune operazioni prima di applicare la formulazione: per esempio se è

presente onicolisi, la lamina viene tagliata nel punto in cui si separa dal letto; talvolta la lamina ungueale viene avulsa mediante trattamento chimico e la formulazione viene applicata direttamente sul letto dell'unghia. Nella maggior parte dei casi il trattamento terapeutico viene effettuato in condizioni occlusive vale a dire si copre la formulazione applicata localmente con guanti di plastica o applicando dei cerotti occlusivi con l'unico obiettivo di alterare le proprietà di barriera della lamina ungueale (Jiaravuthisan et al. 2007; Edwards and de Berker 2009).

Per quanto riguarda i principi attivi più comunemente usati nella terapia topica della psoriasi ungueale possiamo ricordare:

- Glucocorticosteroidi, come betametasone, clobetasolo, proprionato, fluocinolone acetone e triamcinolone acetone. Sono stati e continuano ad essere i più comuni farmaci utilizzati nel trattamento della psoriasi per la loro azione antiinfiammatoria e immunosoppressiva. Sono disponibili in commercio numerose formulazioni a base di soli steroidi (DIPROSONE® crema, unguento, gel e soluzione, Clobesol® crema o unguento, Localyn® crema, un'associazione di fluocinolone e neomicina), oppure in associazione con calcipotriolo (Dovobet® gel e unguento) (Jiaravuthisan et al. 2007; Edwards and de Berker 2009). Numerosi studi sono stati eseguiti per la messa a punto di uno smalto ungueale a base di clobetasolo a partire dal 2005 quando Sanchez Regana et al. dimostrarono che l'applicazione di uno smalto all'8% di clobetasolo sull'unghia psoriasica di 10 pazienti provocava una forte riduzione del pitting, dell'onicolisi e delle macchie ad olio dopo 3 mesi di trattamento. Gli studi sono proseguiti anche valutando l'influenza della concentrazione del farmaco (0.05, 1.0 e 8.0%) sull'effetto terapeutico (Nakaruma et al., 2012) confermando l'efficacia e la sicurezza dello smalto contenente clobetasolo all'8% nel trattamento topico della psoriasi ungueale. Queste ricerche hanno dimostrato l'efficace penetrazione transungueale del farmaco e l'effetto terapeutico rivolto sia al letto ungueale che alle lesioni della matrice (Nakamura et al., 2012).

- Vitamina D3 e analoghi, come calcipotriolo (Daivonex®, 0,005%, unguento), tacalcitolo e calcitriolo (Silkis® unguento) (Jiaravuthisan et al. 2007; Edwards and de Berker 2009). L'applicazione di calcipotriolo 2 volte al giorno per 3-6 mesi nel trattamento della psoriasi ungueale si è dimostrato efficace soprattutto nella risoluzione dell'ipercheratosi con minimi effetti collaterali (Piraccini et al. 2001; Rigopoulos et al., 2002).

E' comune usare questi due gruppi di sostanze in associazione usando ad esempio, analoghi della vitamina D3 durante la settimana e steroidi nel week-end. Il trattamento combinato con calcipotriolo crema e clobetasolo ha dimostrato di ridurre la cheratosi subungueale del 72% in 6 mesi e del 81% dopo 12 mesi (Rigopoulos et al., 2008).

Altri farmaci come, 5-fluorouracile, antralina, tazarotene e ciclosporine ad azione locale hanno mostrato effetti benefici:

- Il 5-fluorouracile (5-FU) è stato usato nel trattamento della psoriasi ungueale con risultati contrastanti. Appare efficace soprattutto quando il "pitting" e l'ipertrofia appaiono come i sintomi principali ed è da evitare quando è presente onicolisi. E' stato dimostrato che l'applicazione di una soluzione all'1% due volte al giorno per 6 mesi ha ridotto enormemente i sintomi dell'ipercheratosi (Jiaravuthisan et al. 2007; Edwards and de Berker 2009). Le limitazioni di questa terapia sono connesse ad una rapida perdita del principio attivo dall'unghia ed un fenomeno collaterale di iperpigmentazione ed irritazione cutanea.

- L'antralina appare più adatta quando i sintomi psoriasici sono dovuti a lesioni a livello del letto e dell'iponicchio, piuttosto che alla matrice. La sua azione si esplica nella soppressione della proliferazione cellulare, nell'inibizione dei monociti e della migrazione dei neutrofili esercitando una forte azione antiproliferativa sui cheratinociti, motivo per cui viene impiegata nella cura della psoriasi ungueale. Generalmente esistono unguenti in concentrazioni dallo 0.2 al 2% (Antrhanol® 0.2% e 4%) utilizzati come coadiuvante nelle terapie antipsoriasiche. L'antralina infatti ha come principale effetto collaterale quello di essere molto irritante e di macchiare la pelle, motivo per cui viene utilizzata a basse concentrazioni e vi si ricorre solo nei casi più estremi (Jiaravuthisan et al. 2007; Edwards and de Berker 2009).
- Il tazarotene, un retinoide di terza generazione impiegato nella cura dell'acne e della psoriasi, viene usato per la sua capacità di regolare la proliferazione e la differenziazione epidermica alterata nella patologia e lo stato infiammatorio associato ad essa. Numerosi studi sono stati effettuati su tazarotene applicato come gel o come unguento idrofilo nel trattamento della psoriasi periungueale e ungueale. I test hanno riportato grandi miglioramenti del pitting e dell'onicolisi nel caso del gel (Shert al., 2006) e dell'ipercheratosi subungueale, onicolisi, emorragie a scheggia, chiazze a macchie d'olio e pitting nel caso dell'unguento idrofilo (Fischer-levancini et al, 2012).
- L'urea e l'acido salicilico, talvolta vengono inseriti in formulazioni topiche come agenti cheratolitici che possono aiutare la permeazione del farmaco. L'urea, in particolare, viene tipicamente utilizzata nella cura della psoriasi ungueale a concentrazioni diverse e in diverse formulazioni: Onyster® pasta al 40% viene utilizzata per ammorbidire l'unghia fino al punto che la sua rimozione risulti facile ed indolore, può essere usato in associazione ad altri trattamenti agevolando la permeazione nei tessuti sottostanti; uno smalto al 15 %, come l' Onypso®, viene frequentemente prescritto nella psoriasi per la cura dell'ipercheratosi subungueale. L'acido salicilico invece si trova generalmente in associazione con altri farmaci dei quali facilita la permeazione per azione cheratolitica, ad esempio il Diprosalic® (associazione acido salicilico/ betametasone dipropionato) che può essere applicato sottoforma di unguento o di soluzione in base alle esigenze terapeutiche del paziente (Kruger et al. 2006).
- Ciclosporina e similari. La ciclosporina è un peptide naturale estratto dai funghi *Trichoderma polysporum* e *Cylindrocarpon lucidum* che, grazie alle sue proprietà immunosoppressive, da oltre trenta anni è stata adottata come trattamento delle reazioni di rigetto dei trapianti d'organo ed in numerose malattie immuno-mediate. La ciclosporina, infatti, agisce principalmente sui linfociti T, inibendone la proliferazione attraverso l'inibizione della produzione di molecole pro-infiammatorie quali l'interleuchina 2. Numerosi studi clinici nel corso degli anni hanno confermato gli effetti benefici nei confronti delle manifestazioni psoriasiche ed oggi l'efficacia della ciclosporina nel trattamento della psoriasi è ormai ampiamente consolidata, sia nel trattamento locale che in quello sistemico. La ciclosporina è una molecola fortemente idrofobica e questa caratteristica chimico-fisica rende difficoltosa la formulazione e la permeazione attraverso l'unghia, substrato con proprietà prettamente idrofile. Le formulazioni più comuni sono unguenti o creme. L'applicazione topica ha portato al miglioramento della patologia soprattutto per quanto riguarda il pitting e l'onicolisi quando la ciclosporina veniva somministrata in soluzione oleosa al 70%. In ogni modo la terapia topica non è risultata efficace quanto quella sistemica. Le limitazioni maggiori riguardano la difficoltà di formulare la ciclosporina, di natura lipofila, in un veicolo appropriato che permetta la penetrazione del farmaco attraverso l'unghia. Alcuni studi hanno mostrato che il tacrolimus, molecola analoga alla ciclosporina sia per le

caratteristiche chimico-fisiche che per quelle farmacologiche, in unguento poteva penetrare nella pelle periungueali e quindi poteva essere usato nel trattamento della distrofia ungueale causata dal lichen planus o dalla paronichia cronica (Dehesa e Tosti, 2012). E' stata inoltre dimostrato che l'applicazione topica di tacrolimus in unguento allo 0.1% per 12 settimane era efficace nei confronti della psoriasi sia del letto ungueale che delle lesioni della matrice senza avere importanti effetti collaterali (Sánchez-Regana et al., 2011; De Simone et al, 2012).

L'impiego di questi agenti ad azione locale, seppur efficace, può portare comunque all'insorgenza di alcuni effetti collaterali che includono eritemi, atrofia della pelle e possibile atrofia dell'osso sottostante l'unghia trattata con potenti corticosteroidi, irritazione cutanea in caso di trattamento con calcipotriolo, dolore, gonfiore e onicolisi con 5-fluorouracile, comparsa di macchie cutanee con antralina, eritema locale e irritazione a seguito dell'utilizzo di tazarotene (Jiaravuthisan et al.2007; Edwards and Berker 2009).

### *Terapia sistemica*

Il trattamento sistemico è raccomandato nella psoriasi ungueale avanzata quando la terapia topica o intralesionale non ha dato risultati oppure nel trattamento della psoriasi vulgaris da moderata a severa accompagnata con il coinvolgimento dell'unghia (De Simone et al, 2012). I retinoidi sono molti utilizzati, Vitamina A e derivati sono impiegati soprattutto per ridurre i problemi inerenti la cheratinizzazione (Tosti et al.,2009). La ciclosporina per via orale viene prescritta nei casi più gravi, in quanto ad essa sono associati numerosi effetti collaterali come sintomi gastrointestinali, aumento della pressione arteriosa, crampi, affaticamento, ridotta attività del sistema immunitario (Sanchèz-Regana et al., 2011). Nell'ultima decade l'introduzione di agenti biologici usati per il trattamento della psoriasi a placche e dell'artrite psoriasica ha portato una ulteriore alternativa sicura e altamente efficace per il trattamento delle patologie del letto ungueale e della matrice. Sono state introdotte terapie in grado di agire a livello di specifici targets come TNF- $\alpha$ , cellule T e B, varie citochine e enzimi chiave nei processi infiammatori ed autoimmuni utili per la psoriasi ungueale severa refrattaria. Alcuni esempi sono: infliximab, adalimumab, etanercept, golimumab alefacept, ustekinumab. (Smolen and Emery, 2011; Oram e Akkaya, 2013).

### *Altri tipi di trattamento*

- Terapia intralesionale: la tecnica di iniettare corticosteroidi a lunga durata d'azione, quali triamcinolone acetonide, nelle pliche ungueali ripetutamente per settimane o mesi è considerata da molti medici il più efficace trattamento per le manifestazioni psoriasiche che colpiscono la matrice come "pitting", rinalzata ungueale, ispessimento, ipercheratosi subungueale. (Fernandez-Guarino et al. 2009).

Fotochemioterapia (PDT) e trattamento laser (PDL): da sempre è stata riconosciuta l'efficacia della fototerapia nella cura della psoriasi. E' infatti nota l'azione immunosoppressiva degli UV sia attraverso un effetto locale diretto che un effetto sulle cellule circolanti del sistema immunitario. Per questo motivo sono state testate varie terapie a base di UV-A e UV-B associate all'applicazione locale di agenti fotosensibilizzanti come lo Psoralene. Sono stati evidenziati benefici per le distrofie ungueali derivanti da lesioni a livello del letto dell'unghia ma non per quelle causate da psoriasi della matrice. Il "pitting" non viene migliorato da questo tipo di trattamento mentre l'onicolisi, l'ipercheratosi subungueale, le chiazze a macchie d'olio, la

faticenza della lamina e la sintomatologia a livello della plica prossimale sono attenuate (Stern et al., 2011). Vari studi hanno dimostrato anche l'efficacia della terapia laser nel trattamento della psoriasi, in particolare la tecnica del pulsed dye laser che colpisce prevalentemente targets a livello ematico riducendo l'angiogenesi, che è stata identificata come uno dei fattori chiave dello sviluppo della psoriasi. Fernandez-Guarino et al. (2009) hanno valutato per la prima volta entrambi i trattamenti nella psoriasi ungueale. Gli autori hanno studiato 61 unghie trattate con PDT e 60 con PDL in un gruppo di 14 pazienti. Sono state mensilmente ripetute sessioni di trattamento, provando su una mano il PDT e sull'altra il PDL. Sulla mano trattata con PDT veniva applicata una crema al metil-aminolevulinato e un cerotto adesivo. Le unghie trattate sono state poi valutate dopo 3 e 6 mesi sulla base del punteggio NAPS (Nail Psoriasis Severity Index). È stata osservata una riduzione del punteggio NAPS sia per quanto riguarda la matrice che il letto ungueale con entrambi i trattamenti. L'impressione soggettiva dei pazienti è risultata buona, soprattutto per quanto riguarda la riduzione del dolore. Gli autori hanno concluso che PDL sembra avere una certa efficacia nel trattamento della psoriasi e migliora il coinvolgimento della matrice e del letto ungueale.

- Climatoterapia: la climatoterapia e in particolare la balneoterapia, sono molto popolari soprattutto in quelle zone dove l'illuminazione e le temperature sono ridotte. È frequente che i pazienti dichiarino un effetto positivo sia a livello fisico, con un buon miglioramento della condizione delle unghie sia a livello emotivo (Stern et al., 2011).



## 2 Gli idrogeli

### 2.1 Gli idrogeli

Gli idrogel sono una classe di materiali polimerici idratati (il loro contenuto d'acqua è maggiore del 30% del peso) che vengono utilizzati per varie applicazioni in campo biomedico. Essi sono composti da catene polimeriche idrofile, che possono essere di origine naturale o sintetica. L'integrità strutturale degli idrogeli dipende da legami incrociati (cross-linking) formati da catene polimeriche (covalenti) e da interazioni fisiche (non covalenti). Il processo di reticolazione del polimero in soluzione, che porta alla formazione di compartimenti rigonfi di acqua (pori) e quindi alla formazione dell'idrogel vero e proprio, può essere innescato da agenti esterni. Esistono due principali metodi di polimerizzazione: crosslinking fisico e cross linking chimico. Il primo prevede la regolazione di parametri quali pressione, la temperatura, il volume, al fine di innescare particolari processi grazie a cui viene a formarsi una reticolazione senza aggiunta di agenti chimici (cross-linkers). Un notevole svantaggio di questo metodo però è il fatto che gli idrogeli presentano delle disomogeneità interne, dovute alla creazione di domini determinati da interazioni idrofobiche o ioniche. Il cross-linking chimico invece prevede la formazione di legami covalenti fra le catene del polimero. Per ottenere ciò vengono usate varie metodologie quali le reazioni indotte da reagenti chimici, e ben più rilevanti, l'irraggiamento gamma e l'irraggiamento ultravioletto che garantiscono brevi tempi di reticolazione e risultano convenienti in quanto conferiscono all'idrogel ottime proprietà meccaniche. In breve, la sostanziale differenza fra idrogeli chimici e fisici (comuni gel), sta nel diverso comportamento assunto in soluzioni acquose: quelli fisici in acqua per interazione con il solvente diventano solubili mentre quelli chimici sono insolubili a causa dei legami covalenti. I materiali che possono essere usati per formare idrogel sono molto vari, alcuni di questi fanno parte dei polimeri sintetici: l'acido poliacrilico (PAA), il polivinilpirrolidone (PVP), il polivinil alcol (PVA) altri di quelli semisintetici e naturali: sodio alginato, agar-agar, gomme (arabica, adragante e altre), gelatina, amido, glucomannani, derivati della cellulosa (metilcellulosa, idrossietilcellulosa, carbosimetil cellulosa sodica, idrossipropilmetilcellulosa). In generale, le tre componenti che sono parte integrante nella sintesi degli idrogeli sono il monomero, l'iniziatore e l'agente reticolante. Per controllare la velocità della polimerizzazione e le proprietà finali dell'idrogel, può essere sfruttata l'azione dell'acqua o di altri solventi compatibili con l'acqua. Le proprietà degli idrogeli possono essere modulate variando il tempo di reazione, la temperatura, il tipo di monomero e di agente reticolante, il rapporto reticolante-monomero, la concentrazione del monomero e tipo e quantità di iniziatore. I processi di polimerizzazione possono essere classificati come omogenei o eterogenei. Nella polimerizzazione omogenea, monomero, iniziatore e solvente sono solubili e compatibili con il polimero; rientrano in questa categoria la polimerizzazione in massa ed in soluzione. Sono invece esempi di polimerizzazione eterogenea i processi in sospensione e in emulsione. La polimerizzazione in massa avviene in seguito all'introduzione di iniziatore nel sistema reagente formato da solo monomero senza solventi dando prodotti privi di impurezze. Gli aspetti negativi di questa tecnica riguardano lo sviluppo di calore che può comportare degenerazione dei prodotti e un aumento di viscosità che può rendere ancora più difficoltoso il controllo termico. La polimerizzazione in soluzione prevede l'aggiunta di un solvente che da un lato permette di limitare l'aumento di viscosità ma dall'altro dà problemi di purezza del prodotto finale per difficoltà nella separazione del solvente. Nella polimerizzazione per

sospensione il monomero viene finemente disperso all'interno della soluzione acquosa nella quale è insolubile. Sia il monomero che il polimero che si forma in seguito all'aggiunta dell'iniziatore rimangono insolubili all'interno della fase acquosa. Il processo in emulsione prevede che il monomero sia solubilizzato all'interno di micelle, sospese tramite agitazione in una soluzione acquosa, dentro la quale è presente un tensioattivo in concentrazione al di sopra della concentrazione micellare critica. Dopo l'aggiunta dell'iniziatore si formano i primi radicali che migrano all'interno delle micelle dove avviene la polimerizzazione. L'avanzare della reazione comporta l'ingrossamento delle micelle all'interno delle quali si trova il prodotto e questo comporta l'utilizzo di tutto il tensioattivo presente per la formazione di altre micelle. Il processo prosegue fino alla completa conversione del monomero con l'ottenimento di un prodotto sotto forma di lattice.

Nella polimerizzazione per precipitazione il polimero è insolubile nel mezzo che costituisce l'ambiente di reazione e si separa spontaneamente.

## 2.2. Idrogeli: Caratteristiche tecnologiche

Una caratteristica fondamentale dell'idrogel è la capacità di trattenere il liquido con cui viene messo a contatto (nel caso di idrogel il liquido è costituito da acqua) e quindi può essere considerato come una soluzione polimerica che possiede le proprietà coesive di un solido e le proprietà di trasporto diffusivo di un liquido. Una schematizzazione di idrogel è rappresentata in figura 1.

La capacità degli idrogeli di assorbire acqua è dovuta ai gruppi funzionali idrofili (-OH, -COOH) legati allo scheletro polimerico, mentre l'insolubilità deriva principalmente dai legami crociati tra le catene della maglia polimerica e dalla presenza di impedimenti fisici come incatenamenti (Ahmed, 2013).

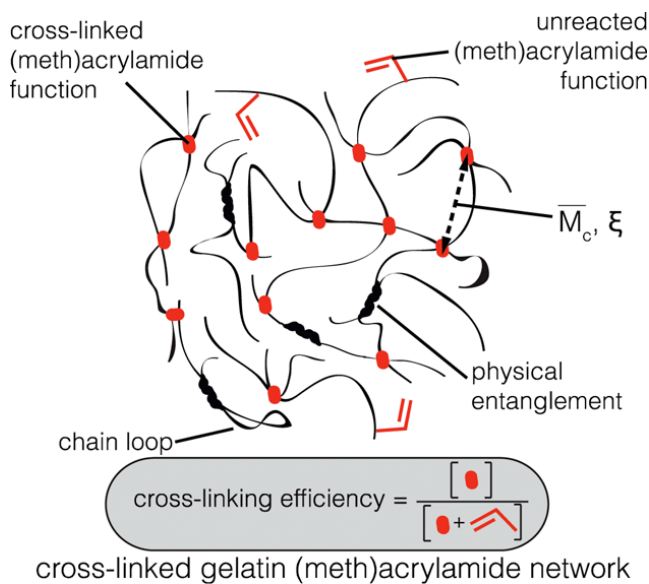


Fig.6 Rappresentazione schematica della reticolazione di un idrogel di gelatina metacrilammide

Questi materiali sono stati oggetto di numerosi studi negli ultimi 50 anni, potendo nutrire in essi eccezionali aspettative per il loro utilizzo in una vasta gamma di settori e in particolare in quello farmaceutico e biomedico. Nel corso degli anni gli idrogeli naturali sono stati gradualmente sostituiti da quelli di sintesi, è infatti possibile sintetizzare idrogeli in grado di rispondere a numerosi stimoli biologici come pH, forza ionica e temperatura (Ahmed, 2013). La struttura di un idrogel può essere pianificata per una specifica applicazione selezionando i materiali di partenza e le tecniche di lavorazione, inoltre poiché lo swelling degli idrogeli è il risultato del bilanciamento di forze di rigonfiamento e di forze elastiche possono essere progettati geli con capacità di swelling diverse andando a modulare il contributo di queste due forze e le caratteristiche finali per ottenere un prodotto che possa adempiere al meglio alle funzione per cui è stato progettato.

L'acqua ospitata nella struttura degli idrogeli può essere classificata in quattro diversi tipi:

- l'acqua che si trova nello strato più esterno viene definita "free water" e può essere facilmente allontanata dal gel mediante trattamenti blandi;
- l'acqua definita invece "interstitial water" che non è legata alla struttura reticolare ma è fisicamente intrappolata tra le catene polimeriche idratate;
- l'acqua definita "bound water" che è direttamente legata alle catene polimeriche attraverso l'idratazione di

gruppi funzionali o di ioni. Quest' ultima rimane come parte integrante della struttura dell'idrogel e può essere allontanata solo mediante l'applicazione di temperature molto elevate.

- la "semi-bound water" infine, che ha proprietà intermedie tra la "bound water" e la "free water". L'acqua libera e quella interstiziale possono potenzialmente essere allontanate dalla struttura del gel attraverso centrifugazione e compressione meccanica.

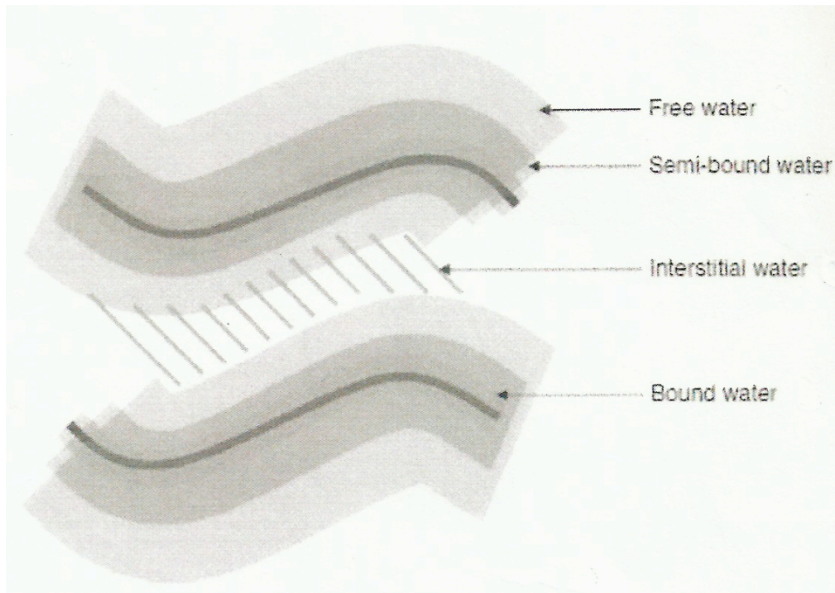


Fig. 7

Andando a caratterizzare un idrogel è possibile distinguere due strutture, una chimica ed una fisica. La struttura chimica dipende dal grado di polimerizzazione che a sua volta è influenzato dai monomeri di partenza e tecniche come FTIR e NMR ci permettono di caratterizzare la struttura chimica dell'idrogel risultante. Per quanto riguarda la struttura fisica invece, questa è correlata alla natura della miscela. Un idrogel non poroso ad esempio è costituito di due fasi, un polimero solido e l'acqua mentre uno poroso presenta tre fasi, una solida, una liquida (acqua) e l'aria. Ognuna di queste fasi influenza le proprietà fisiche di un idrogel come la densità, l'indice di rifrazione, le proprietà meccaniche e la porosità. L'aria, grazie alle proprietà dei gas che la caratterizzano, può fornire un percorso molto efficiente per l'assorbimento dell'acqua quando i pori siano interconnessi. Le particolari proprietà di swelling degli idrogeli superporosi sono da attribuirsi infatti al grande contenuto di aria (circa il 30%) nella loro struttura. L'estensione della porosità, la grandezza dei pori e la distribuzione granulometrica sono in grado di influenzare in maniera significativa lo swelling e le proprietà meccaniche di un idrogel.

Gli idrogeli sono in grado di assorbire grandi quantitativi di acqua grazie al processo di swelling. La capacità di swelling di un idrogel è in gran parte determinata dallo spazio che, all'interno della rete polimerica, può accogliere l'acqua. Il processo che determina l'inizio dello swelling è l'interazione tra l'acqua e il polimero dell'idrogel. Fondamentalmente, più la struttura dell'idrogel è idrofila, più forte diviene l'interazione acqua-polimero. Gli idrogeli con gruppi funzionali idrofili nella loro struttura, si rigonfiano esclusivamente in funzione delle forze di interazioni acqua-polimero. Se un idrogel contiene invece gruppi ionici, i contro-ioni generano osmosi, che permette lo swelling, in funzione della differenza di concentrazione ionica tra idrogel e soluzione

esterna. Maggiore è la differenza di concentrazione ionica, maggiore è la pressione osmotica che si crea. Complessivamente, le interazioni polimero-acqua, le forze elettrostatiche e l'osmosi, permettono l'espansione della struttura dell'idrogel, mentre l'elasticità, dovuta alla formazione di legami crociati nella rete polimerica, vi si oppone. Quando queste forze si bilanciano, si raggiunge l'equilibrio di swelling, al quale l'idrogel non incorpora più acqua (Ottembrite et al.,2010). Il fenomeno di swelling o grado di rigonfiamento può essere quantificato monitorando la variazione in peso, volume e dimensioni dell'idrogel quando l'idrogel è messo in contatto con acqua. Il metodo ponderale è il più comunemente usato per valutare il grado di ringonfiamento e può essere espresso come:

-rapporto tra il volume del campione allo stato rigonfiato e il volume allo stato secco  
-rapporto tra il peso del campione allo stato rigonfiato e il peso allo stato secco  
utilizzando la seguente relazione:

$$Q_t = ( m_{st} - m_d / m_d ) \times 100$$

dove  $Q_t$  è lo grado di swelling al tempo "t",  $m_{st}$  è il peso dell'idrogel rigonfiato al tempo "t" e  $m_d$  è il peso dell'idrogel asciutto.

I derivati della cellulosa, l'alcool polivinilico, il polivinilpirrolidone, il polietilenglicol danno origine a idrogeli altamente rigonfiabili mentre i poliidrossietilmetacrilati producono idrogeli poco rigonfiabili. E' possibile copolimerizzare un monomero altamente idrofilo con altri monomeri meno idrofili per raggiungere il grado di rigonfiamento desiderato.

Altrettanto importante è andare a valutare le proprietà meccaniche di un idrogel che dipendono dalla reticolazione delle catene polimeriche. Infatti per molte applicazioni, un requisito essenziale è come l'idrogel riesce a mantenere la sua forma allo stato rigonfiato o bagnato. Con l'aumento della densità della reticolazione, vengono aumentate le proprietà meccaniche a scapito del rigonfiamento. Il processo di "deswelling" è anch'esso correlato alle proprietà meccaniche. L'acqua assorbita in idrogeli deboli viene desorbita in misura maggiore. Gli idrogeli deboli quando si trovano al culmine della loro idratazione possono inoltre, sotto azione di stress blandi, spezzarsi in particelle più piccole che vanno ad aumentare l'area di contatto dell'idrogel rigonfiato con l'ambiente asciutto circostante causando un più rapido desorbimento (Ottembrite et al. 2010)

### 2.3 Applicazioni farmaceutiche degli idrogeli

Le proprietà fisiche, chimiche e di risposta all'ambiente circostante dei polimeri idrofili reticolati hanno reso l'utilizzo degli idrogeli inestimabile in numerosissimi settori come l'igiene, l'agricoltura, il campo biomedico e farmaceutico. Un idrogel può essere personalizzato per rispondere a particolari esigenze in determinate discipline grazie alla vasta gamma di strutture sia sintetiche che naturali esistenti e alla variegata disponibilità di processi tecnologici (Ottembrite et al. 2010). Il grado di flessibilità e di contenuto di acqua degli idrogeli li rende estremamente simili e compatibili con i tessuti umani e pertanto trovano grandi applicazioni nel campo biomedico. Molti tipi di idrogeli sono progettati in modo da essere in grado di rispondere ai cambiamenti dell'ambiente circostante e mostrano significative variazioni delle caratteristiche di swelling, della struttura reticolare, della permeabilità e della resistenza meccanica in risposta ai cambiamenti di temperatura, di pH e della forza ionica dei liquidi circostanti. Altri idrogeli hanno la capacità di rispondere all'applicazione di campi magnetici o elettrici o ai cambiamenti di concentrazione di molecole come il glucosio. In virtù di tali caratteristiche, questi materiali possono trovare numerose applicazioni come nella preparazione di lenti a contatto, come biosensori, nella rigenerazione tissutale, e nella messa a punto di sistemi terapeutici a rilascio controllato (Pal et al., 2009) che liberano il farmaco in seguito a stimoli ambientali: ad esempio idrogeli pH e temperatura-sensibili sono stati progettati per rispondere a piccoli cambiamenti nel sangue regolando il rilascio di agenti antitrombotici come streptochinasi ed eparine nel punto in cui si è formato il coagulo di sangue (Vakkalanka et al., 1996). Gli idrogeli termosensibili trovano invece applicazione in sistemi in cui il rilascio del farmaco avviene per collasso dell'idrogel in seguito a cambiamenti termici, ne sono un tipico esempio le microcapsule con sistema di rilascio del farmaco pulsatile on-off termoregolato. La struttura chiave di questo sistema risiede nel rivestimento della microcapsula che è costituito da nanoparticelle in poli N-isopropilacrilamide (NIPAAm) termosensibili disperse in una matrice di etilcellulosa. Ad alte temperature la NIPAAm collassa con formazione di numerosi pori a livello del rivestimento della microcapsula che determinano una ingente fuoriuscita di farmaco come mostrato schematicamente nella figura seguente:

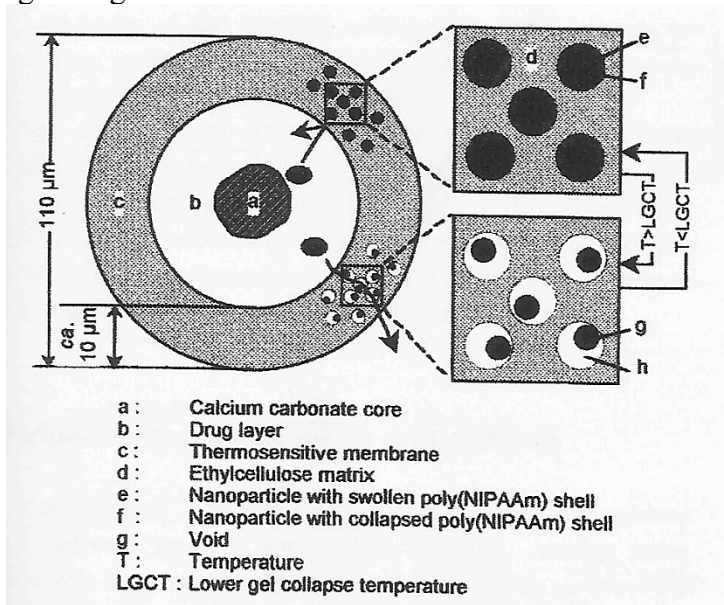


Fig. 8 ( Ichikawa et al., 1999).

Altri tipi di idrogeli sensibili a stimoli diversi come la corrente elettrica, l'applicazione

di un campo magnetico, specie ioniche, ultrasuoni trovano applicazioni in sistemi di rilascio transdermico tra cui elettroporazione, ionoforesi e sonoforesi. Trovano grandi applicazioni anche idrogeli sensibili alla presenza di determinate molecole biologiche. A questo proposito sono stati messi a punto dei sistemi terapeutici bioerodibili calcio-responders costituiti da una matrice in amido o cellulosa contenente  $\alpha$ -amilasi in forma non attiva. L'  $\alpha$ -amilasi in forma non attiva si lega al calcio presente nel sito d'azione convertendosi nella corrispondente forma attiva; il rilascio di farmaco è regolato dalla degradazione della matrice che dipende dalla concentrazione dello ione (Goldbart et al., 1999). Un altro esempio è un idrogel antigene-responder che presenta all'interno legami antigene-anticorpo che ne determinano la contrazione. In presenza di antigene libero nell'ambiente circostante, l'idrogel rigonfia per dissociazione dall'antigene legato in favore dell'antigene libero (Miyazaki et al., 1999). Il meccanismo di rigonfiamento/contrazione è reversibile e la caratteristica principale è l'elevata specificità nel riconoscimento molecolare che li rende un dispositivo di rilevamento con un ampio raggio di applicazione nei saggi immunologici e di rilevamento degli antigeni. Per queste caratteristiche, gli idrogeli hanno ricevuto considerevoli attenzioni come eccellenti candidati nella messa a punto di sistemi terapeutici a rilascio controllato. I sistemi terapeutici basati sugli idrogeli possono essere utilizzati per somministrazioni orali, rettali, oculari, epidermiche e sottocutanea. Sono stati ad esempio messi a punto sistemi di idrogeli bioadesivi come Loramyc<sup>®</sup>, una compressa mucoadesiva a base di miconazolo usata nella la terapia topica della candidosi orofaringea (Gligorov et al., 2010) ,sono stati progettati "lipogel" (nanoparticelle costituite da un sistema in cui si ha un idrogel appositamente sintetizzato inserito all'interno di un liposoma) come veicoli per l'incapsulazione del farmaco antitumorale 17-DMAPG (Yang et al., 2013), idrogeli pH-sensibili vengono utilizzati come veicoli per il rilascio orale di insulina ed altri peptidi (Chaturvedy et al., 2013). Idrogeli con sistemi di gelificazione in situ hanno trovato numerose applicazioni nel campo oftalmico come ad esempio un idrogel a base di PEG recentemente messo a punto per il rilascio di Avastin<sup>®</sup> per l'inibizione della neovascolarizzazione corneale (Yu et al., 2014). Numerose sono anche le applicazioni nel campo dermatologico: Idrogeli a base di acido ialuronico, estremamente biocompatibili e non tossici, sono stati oggetto di molti studi per loro possibili applicazioni come filler e rigeneranti cutanei in grado di aumentare notevolmente lo spessore dermico e la densità del collagene (Junseok et al., 2010), nuove forme di idrogeli come proniosomali gel ed emulgel ,sono state messe a punto nell'ambito dei trattamenti topici. I "proniosomi" sono delle vescicole basate su tensioattivi non ionici che possono essere idratate immediatamente prima dell'uso per generare i niosomi (strutture lamellari microscopiche costituite da un tensioattivo non ionico unito o meno a colesterolo ed altri lipidi,utilizzati come alternativa ai liposomi). I proniosomes vengono utilizzati per favorire il rilascio di farmaco a livello cutaneo venendo convertiti in niosomi applicandoli sulla pelle precedentemente bagnata. I proniosomi esistono sotto forma di cristalli semisoli e di polvere (Gupta et al., 2007). Questi sistemi sono utilizzati molto in campo cosmetico ma trovano numerose applicazioni anche in campo farmaceutico come veicoli per il rilascio di farmaci a livello cutaneo e transdermico, un esempio sono i proniosomi a base di clorfeniramina maleato per il trattamento locale di orticarie ed altre affezioni allergiche della pelle (Saroha et al 2010). Gli emulgel invece, sono delle emulsioni principalmente O/A che si formano per aggiunta di un opportuno agente gelificante e che presentano vari vantaggi come veicoli per il rilascio di farmaci a livello cutaneo essendo formulazioni molto stabili e permettendo l'incorporazione di principi attivi sia idrofili che con minore affinità per l'acqua(Voltaren Emulgel <sup>®</sup> diclofenac), (Ajazuddin et al.,2013).

## **Parte sperimentale**

### **1. Scopo della tesi**

La presente tesi ha avuto come obiettivo la messa a punto e caratterizzazione di un idrogel contenente Ciclosporina A da applicare a livello ungueale e periungueale per il trattamento della psoriasi. Il lavoro si è articolato nelle seguenti fasi:

- messa a punto con una metodica riproducibile e standardizzata di un idrogel non medicato da applicare a livello ungueale sotto forma di un film sottile, uniforme ed adesivo;
- preparazione dell'idrogel medicato contenente ciclosporina A;
- messa a punto della metodica analitica HPLC per la determinazione quantitativa della CyA;
- valutazione delle caratteristiche tecnologiche dell'idrogel preparato: determinazione dell'indice di swelling e dell'angolo di contatto; studio di rilascio in vitro.



## 2. Materiali

Sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- Chitosano polvere fine (CH, ACEF, Italia): polisaccaride composto da D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina legate tramite legami  $\beta(1-4)$ . La sua non tossicità, buona biocompatibilità e antigenicità hanno aumentato notevolmente l'interesse verso questo materiale per possibili applicazioni in campo biomedico, nell'ingegneria dei tessuti e nei sistemi di rilascio di farmaci (Hoemann et al., 2007).
- Polivinilpirrolidone (Kollidon 12 PF, BASF, Germania): Il PVP è un polimero idrofilo utilizzato come plasticizzante.
- Polietilenglicole 400 (PEG 400, APPLICHEM, Germania): tensioattivo non ionico idrofilo. Il PEG 400 si presenta in forma liquida e nella formulazione ha azione plasticizzante, per conferire maggiore flessibilità alla matrice preparata.
- Acido Lattico 80% E 270 (ACEF, Italia).
- Ciclosporina A (CyA, Poli Industria Chimica s.p.a, Italia): La ciclosporina A è un peptide ciclico costituito da 11 aminoacidi prodotto dal metabolismo fungino. Essa rappresenta il capostipite di una serie di molecole tra loro chimicamente correlate (ciclosporina A, B, C, D, E, G ed H).
- Polivinil alcool 26-88 (PVA, Merck, Germania): il PVA è uno dei pochi polimeri vinilici solubili in acqua che è stato approfonditamente studiato per le sue possibili applicazioni in campo medico grazie alla sua elevata idrofilicità, lavorabilità, buona capacità di formare film e non tossicità.
- Etanolo assoluto anidro (Carlo Erba, Italia).
- Gliossale soluzione acquosa 40 % p/p (Sigma-Aldrich, Germania): Il gliossale è la più piccola fra le di-aldeidi alifatiche. Nel presente lavoro è stato utilizzato come agente reticolante.
- Olio di ricino idrogenato polioossietilenato (Cremophor RH 40, ACEF S.p.A., Italia).
- Polioossietilen sorbitan monolaurato (Tween 20, Sigma-Aldrich, Germania).
- Dietilenglicol monoetiletere (Transcutol P, Gattefossè, Francia).
- PEG-8 Caprylic/capric glycerides (Labrasol, Gattefossè, Francia)

Tutti i solventi utilizzati erano di grado analitico.

### 3. Preparazione dell'idrogel non medicato

Le prove formulative hanno portato alla messa a punto degli idrogeli la cui composizione è riassunta in Tabella 1.

Gli idrogeli sono stati preparati miscelando una dispersione acquosa al 10% di PVA con PEG 400 ed acidificando con acido lattico per permettere la solubilizzazione del chitosano. Il chitosano ed il polivinilpirrolidone venivano aggiunti successivamente e mantenuti sotto agitazione per 12 ore a temperatura ambiente fino a completa idratazione e gelificazione. La reazione di reticolazione è stata indotta dall'aggiunta di un'opportuna quantità di una soluzione al 40% di gliosale dopo aver riscaldato la miscela a 60 °C a bagnomaria. Dopo circa 5 minuti si otteneva la formazione di una matrice compatta ed elastica che veniva sottoposta per 40 minuti ad una forza di compressione di 1Kg per dare un film di spessore 1,5 mm .

Le prove formulative sono continuate procedendo a cambiare la quantità di agente reticolante nel range tra 0.2 e 2.0 ml con lo scopo di avere una completa reticolazione senza eccessive proprietà elastiche.

Gli idrogeli risultanti avevano le seguenti caratteristiche:

A: L'idrogel risultava troppo resistente e non facilmente modellabile.

B: La quantità di gliosale non era sufficiente da permettere la reticolazione.

C: L'idrogel era poco compatto, si rompeva facilmente e la reticolazione era risultata parziale

D: L'idrogel tendeva a rompersi e risultava appiccicoso e poco elastico.

E: l'idrogel risultava sufficientemente elastico, resistente e modellabile sotto l'azione della pressa con una buona reticolazione, permettendo di ottenere un film dallo spessore e dalle caratteristiche desiderate. Tale formulazione, quindi, è stata scelta per gli studi successivi.

La reazione di reticolazione era innescata dalla interazione tra il chitosano e il gliosale scelto come agente reticolante. Esperienze pregresse nel nostro laboratorio avevano dimostrato come il gliosale, molecola di piccole dimensioni con la presenza di 2 gruppi funzionali aldeidici, fosse molto attiva nella formazione di legami covalenti fra catene proteiche legandosi ai gruppi amminici, ammidici e idrossilici presenti nel chitosano (Hoemann et al., 2007). I legami che si vengono a formare per aggiunta del gliosale al chitosano sono illustrati nello schema sottostante (Rohindra et al., 2004). La caratterizzazione era stata effettuata con l'aiuto della spettroscopia FTIR (Fourier Transform Infrared spectroscopy)

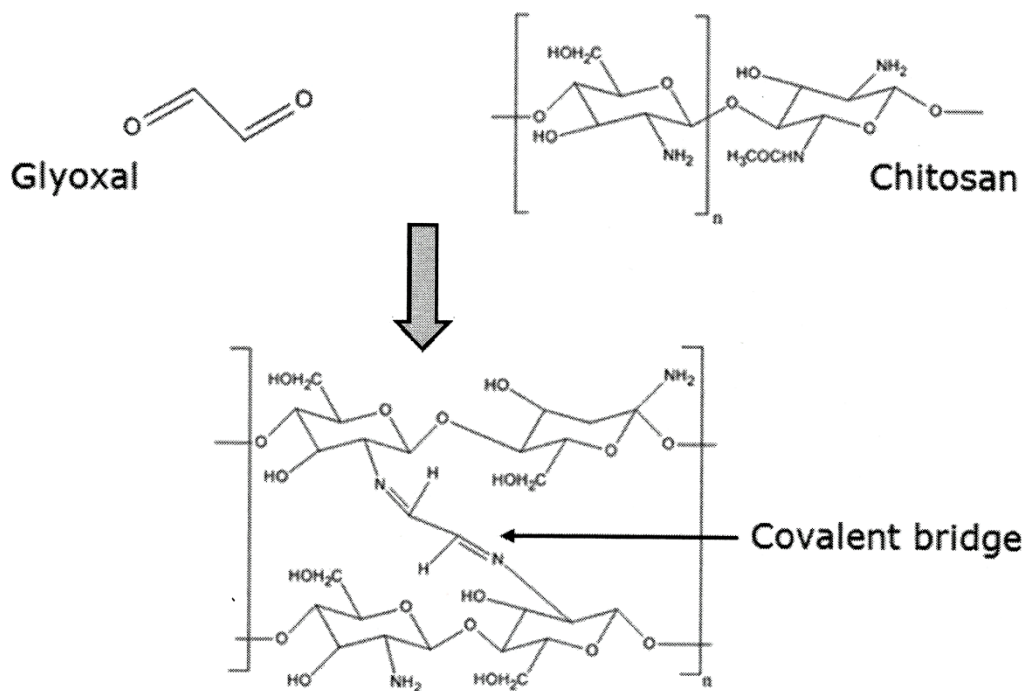


Fig.9

#### 4. Preparazione dell'idrogel medicato

La scelta della ciclosporina come agente attivo ha comportato diverse problematiche legata alla sua scarsa solubilità in acqua.

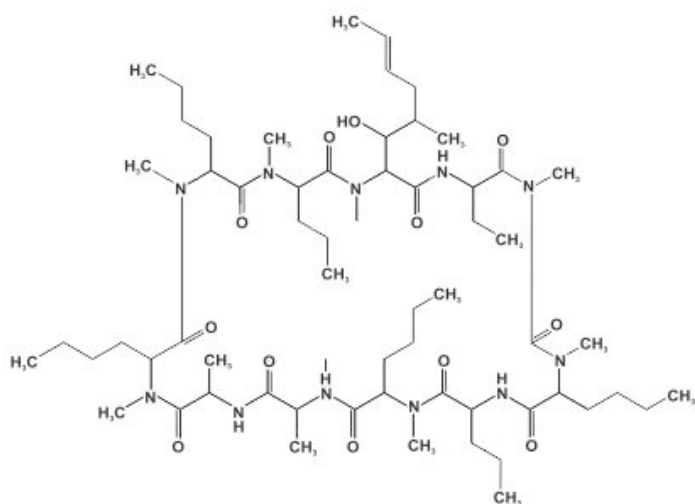


Fig. 10

Per ottenere un idrogel in cui la CyA sia solubilizzata od omogeneamente dispersa sono state effettuate diverse prove. La concentrazione usata in questo studio è stata il 5.0%.

I Prova. La ciclosporina è stata addizionata alla miscela PVA/PEG acidificata per acido lattico mantenendo gli stessi rapporti usati nella preparazione dell'idrogel. Risultato: Il farmaco rimane completamente insolubile.

II Prova: come sopra ma aumentando la quantità di acido lattico. Risultato: la solubilità della CyA non varia.

III – IV – V Prova: Una serie di agenti solubilizzanti/tensioattivi (Tween 20, labrasol, cremophor) sono stati inseriti nella formulazione Risultato: nessuna variazione significativa della solubilità della ciclosporina.

VI Prova: un ulteriore tentativo è stato fatto introducendo un cosolvente in cui il farmaco era più solubile. In questo caso è stato usato l'etanolo che ha agevolato la solubilizzazione del farmaco.

Da queste prove preliminari è stato selezionato l'etanolo come agente solubilizzante del farmaco, per cui il lavoro è proseguito con la preparazione dell'idrogel aggiungendo etanolo. L'idrogel preparato aveva la composizione riportata in tabella 2; si otteneva solubilizzando dapprima la CyA in etanolo ed introducendo la soluzione idroalcolica nella miscela PVA/PEG acidificata con acido lattico. Alla dispersione acquosa acidificata venivano aggiunti il chitosano e PVP e mantenuti sotto agitazione per 12 ore a temperatura ambiente fino a completa idratazione e gelificazione dei polimeri. L'aggiunta della soluzione acquosa di gliosale alla miscela riscaldata a 60 °C a bagnomaria innescava la reazione di reticolazione. Dopo circa 5 min si formava una matrice compatta ed elastica con la ciclosporina uniformemente distribuita tra le maglie dell'idrogel finale che, sottoposta ad una forza di compressione di 1 Kg, dava origine ad un film di spessore di 1,5 mm traslucido, biancastro, elastico ed adesivo che appariva adatto alla applicazione ungueale.



Fig.11

## 5. Caratterizzazione dell'idrogel medicato

### 5.1. Capacità di swelling

In questo studio è stata valutata dal punto di vista quali-quantitativo la capacità dell'idrogel realizzato di idratarsi in mezzo acquoso. I test sono stati sempre eseguiti a T ambiente e utilizzando il cestello descritto in F.U. per il saggio di dissoluzione di ovuli e supposte (Fig. ). Una quantità esattamente pesata di idrogel (circa 413 mg) veniva collocata sull'apposito cestello. Il cestello veniva posto in un becker dalla capienza di circa 200ml riempito con acqua in modo tale che la superficie inferiore dell'idrogel fosse completamente a contatto con il liquido. Ad intervalli di tempo prestabiliti per 25 ore (ogni 30 minuti per 6 ore, a 23 e 25 ore) il cestello contenente l'idrogel veniva rimosso dalla soluzione, accuratamente asciugato con carta da filtro e pesato. Ad ogni prelievo ci si accertava che l'acqua bagnasse completamente la formulazione. La quantità di acqua assorbita dall'idrogel è stata determinata calcolando l'indice di swelling (SI%) secondo la seguente formula:

$$SI_t \% = [(P_t - P_i)/P_i] * 100$$

dove  $P_t$  è il peso dell'idrogel al tempo  $t$ , e  $P_i$  è il peso iniziale dell'idrogel (Yeşim Karasulu et al. 2003, El-Kamel et al. 2002). Con i dati ottenuti è stato costruito un grafico che mostra la variazione di SI% in funzione del tempo.

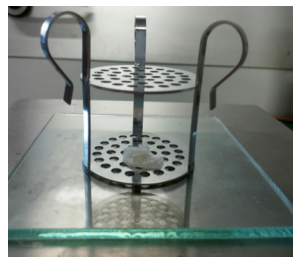


Fig.12

### 5.2. Bagnabilità ed angolo di contatto

Si definisce come bagnabilità la capacità di un liquido di distribuirsi sulla superficie di un solido tenendo conto della tensione superficiale del liquido, del solido e della tensione interfacciale. La bagnabilità di un solido si esprime in funzione dell'angolo di contatto ( $\theta$ ), che si forma tra il piano della superficie solida e la tangente al liquido all'interfaccia liquido/aria nel punto di contatto con la superficie solida. L'equazione di Young mette in relazione l'angolo di contatto con la tensione superficiale solido/aria ( $\gamma_{sa}$ ), la tensione superficiale liquido/aria ( $\gamma_{ls}$ ) e la tensione interfacciale tra solido e goccia ( $\gamma_{sl}$ ):

$$\gamma_{sa} = \gamma_{sl} + \gamma_{la} \cos\theta$$

dalla quale si ricava

$$\cos\theta = (\gamma_{sa} - \gamma_{sl}) / \gamma_{la}$$

L'angolo di contatto può variare da  $0^\circ$  ( $\cos\theta = 1$ ) a  $90^\circ$  ( $\cos\theta = 0$ ) fino a  $180^\circ$  ( $\cos\theta = -1$ ). Dalla formula risulta che per avere una buona bagnabilità si devono avere angoli di contatto vicini a zero: più è acuto l'angolo, maggiore sarà la bagnabilità, mentre un angolo ottuso corrisponde ad una bagnabilità molto bassa; possiamo quindi avere:

- bagnabilità completa, se è bassa la tensione superficiale del liquido e la tensione interfacciale, ed è grande la tensione superficiale del solido;
- bagnabilità parziale, se è troppo grande la tensione interfacciale o troppo bassa la tensione superficiale del solido;
- non bagnabilità, se il liquido non si spande completamente sul solido, che possiede un'elevata tensione superficiale. In questo caso si eguagliano le tensioni interfacciali solido/aria e liquido/aria.

La bagnabilità dell'idrogel ottenuto è stata determinata misurando l'angolo di contatto statico. Le misure dell'angolo di contatto statico sono state eseguite utilizzando il sistema OCA20 (Dataphysics, Filderstadt) ed i risultati sono stati analizzati tramite software SCA22 (Dataphysics, Filderstadt). Lo strumento è costituito da una telecamera mobile che inquadra il piano su cui viene fatta cadere la goccia di liquido ed è dotato di un sistema di dosaggio a controllo elettronico della quantità di sostanza erogata. Il software calcola il valore di angolo di contatto prendendo come riferimento la misura del diametro esterno dell'ago della siringa attraverso cui viene erogato il liquido. Le misure sperimentali sono state effettuate ritagliando delle strisce di idrogel delle dimensioni di 3cm x 1cm sulla cui superficie veniva fatta adagiare una goccia di 8 $\mu$ l di acqua.

## 6. Studio di rilascio del principio attivo dall'idrogel medicato

Il rilascio del principio attivo dall'idrogel è stato determinato mediante due differenti metodiche: una utilizzando le celle di diffusione verticali tipo Gummer (Fig. 13) , (Gummer et al.1987), l'altro facendo uso del cestello per il saggio di dissoluzione delle forme farmaceutiche solide.

La cella di diffusione verticale è composta da un compartimento ricevente avente un volume pari a 5 ml ed area diffusionale pari a 1.23 cm<sup>2</sup>, sottoposto ad agitazione con un agitatore magnetico ad una velocità costante di 600 giri/minuto, e la temperatura del compartimento ricevente veniva controllata mediante circolazione di acqua termostata a 37 °C nella doppia parete della cella. Nel presente studio sono state usate le seguenti condizioni:

Fase donatrice: Idrogel a base di CyA 5% bagnato con 200  $\mu$ l di acqua

Fase ricevente: 5 ml di acqua.

Membrana di diffusione: Membrana da dialisi (SpectraPor, Canada, MW Cut off 3500) idratata.

Temperatura: 37 °C

In tutti i casi, ad opportuni intervalli di tempo, venivano prelevati dal compartimento ricevente 5 ml circa di soluzione ricevente, sostituendoli con ugual volume di soluzione fresca. I prelievi venivano effettuati ogni ora per 5 ore e gli esperimenti venivano eseguiti in duplicato.

I campioni delle fase ricevente prelevati venivano filtrati attraverso un filtro di cellulosa con pori da 0,45  $\mu$ m (filtri Ministart non sterili con membrana filtrante in acetato di cellulosa, Sartorius). 200  $\mu$ l della soluzione ricevente ottenuta venivano sottoposti ad

essiccamento sotto vuoto e successivamente ripresi con 200 µl di acetonitrile, sottoposti a sonicazione e centrifugazione. La quantità di farmaco presente era determinata mediante analisi HPLC.

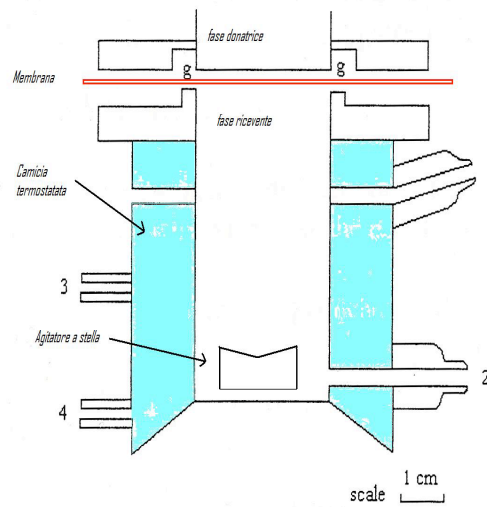


Fig. 13 - Cella verticale tipo Gummer

Nel caso del metodo del cestello per i saggi di dissoluzione per forme farmaceutiche solide una sezione di idrogel (area 1,23 cm<sup>2</sup>; peso 183 mg; spessore 1.5 mm) viene introdotto all'interno del cestello costituito da una rete metallica (maglie del cestello: 0,36-0,44 mm) collegato ad un'asta e ad un motore con velocità di rotazione di 45 rpm. Il sistema era immerso in un appropriato mezzo di dissoluzione.

Il test era eseguito nelle seguenti condizioni:

Mezzo di dissoluzione: acqua

Volume della fase ricevente: 15 ml

Temperatura: 25 °C

Volume del prelievo: 5 ml

Ad intervalli di tempo standardizzati (ogni ora) un'aliquota del mezzo di dissoluzione è stata prelevata e sottoposta ad analisi HPLC per determinare la quantità di CyA rilasciata dall'idrogel dopo opportuno trattamento come riportato sopra. Dopo ogni prelievo il mezzo di dissoluzione veniva reintegrato con lo stesso volume di mezzo fresco per mantenere le condizioni di sink. La durata dell'esperimento era di 5 ore e i test erano effettuati in triplicato.

## 7. Metodo analitico della Ciclosporina A

L'analisi quantitativa del farmaco veniva eseguita mediante metodica HPLC per confronto con una retta di taratura esterna.

L'apparecchiatura era costituita da una pompa Shimadzu LC-20AD, un rivelatore UV-VIS SPD-10A, un iniettore automatico SIL-10AD VP (20 $\mu$ l) e un sistema di integrazione C-R4A. La colonna utilizzata è stata una LiChroCART® di dimensioni 250 x 4.0 mm, impaccata con una fase C18 avente porosità di 5  $\mu$ m termostata a 80°C in un apposito regolatore di temperatura per colonne (Termasphere™, Phenomenex).

La fase mobile consisteva di una miscela di acetonitrile:acqua:tert-metil-butil-etero:acido fosforico 85% (52:43:5:0.1). Il flusso era di 1 ml/min, la lunghezza d'onda di rilevazione di 210 nm e il tempo di ritenzione di 21 minuti.

La retta di taratura è stata ottenuta preparando soluzioni a titolo noto di farmaco in acetonitrile e determinando l'area sottesa alla curva del picco cromatografico (AUC).

L'equazione era ottenuta per regressione lineare utilizzando il metodo dei minimi quadrati della concentrazione di farmaco (mg/100ml) in funzione della AUC.

Il valore del coefficiente di correlazione ( $R^2$ ) è un indicatore compreso tra 0 e 1 che indica il grado di corrispondenza tra i valori stimati per la linea di tendenza e i valori reali: tanto più il valore si avvicina ad 1 e tanto maggiore è la corrispondenza.

In figura 14 è riportata la retta di taratura per l'analisi della ciclosporina A. I risultati mostrano una buona linearità ( $R^2 = 0.9922$ ) e il limite di determinazione (LOD) e di quantificazione (LOQ) calcolati sulla base della risposta ottenuta sono rispettivamente di 20.0 e 34.0 ng/ml.

## 8. Risultati e conclusioni

Le prove formulative preliminari hanno portato alla preparazione di un idrogel in cui il principio attivo, la ciclosporina A, si trova uniformemente dispersa. L'idrogel ha mostrato buona proprietà bagnanti con un valore di angolo di contatto pari a  $70.92 \pm 2.01^\circ$ . Tale proprietà è interessante dal momento che può permettere un'interazione migliore della formulazione con il substrato (pelle e soprattutto unghia) aumentando la biodisponibilità della forma farmaceutica.

I risultati ottenuti dalle misure della capacità di swelling dell'idrogel medicato sono riassunti in tabella 4 e in forma grafica in Fig.15 come variazione dell'indice di swelling (SI%) nel tempo. SI% aumenta gradualmente nel tempo fino a raggiungere un massimo di 1540% a 23 ore. L'idrogel arriva ad incorporare in media una quantità di acqua pari a 93,87% del peso finale. La figura 17 mostra le condizioni dell'idrogel al  $t=0$ , dopo 1 ora di contatto con l'acqua e all'equilibrio dopo 23 ore.

Il rilascio della ciclosporina A dall'idrogel è stato il successivo step della presente tesi. Il principale ostacolo al rilascio del farmaco dall'idrogel è senza dubbio la limitata solubilità della CyA in acqua (26.67  $\mu$ g/ml a 25 C, Ran et al, 2001); quindi l'idratazione dell'idrogel, la capacità di swelling, la successiva solubilizzazione del farmaco in acqua influenzeranno la velocità di rilascio della CyA e la sua diffusione attraverso la matrice idratata.

La valutazione del rilascio del farmaco dall'idrogel è stata effettuata mediante due tecniche. La prima utilizzava la cella di diffusione verticale di Gummer applicando l'idrogel su una membrana sintetica che simulava la barriera, con un'area di contatto di



1.23 cm<sup>2</sup> e un volume di liquido ricevente di 5 ml. L'esperienza non ha dato risultati. L'idratazione dell'idrogel in queste condizioni avveniva lentamente, di conseguenza tutto il processo (solubilizzazione del farmaco e diffusione attraverso la matrice) procedeva lentamente portando ad un rilascio di una quantità di CyA non apprezzabile, al di sotto della concentrazione minima rilevabile con la nostra metodica analitica.

Questi risultati ci hanno indotto a cambiare la metodica e le condizioni sperimentali usando la tecnica del cestello in cui l'idrogel veniva messo a contatto con 15 ml di mezzo di dissoluzione. Queste condizioni permettono una graduale e costante incorporazione di acqua, il rigonfiamento del gel e la parziale solubilizzazione del farmaco. La quantità di farmaco in mg rilasciata dall'idrogel nel tempo è mostrata in Fig.16 . Il profilo appare lineare con una velocità di rilascio di 10.9 µg/h ed una quantità di CyA rilasciata dopo 5 ore di 61 µg. Il sistema sembra capace di controllare il rilascio del farmaco e probabilmente lo stadio limitante la velocità è rappresentato dalla solubilizzazione del principio attivo, ipotesi che sarà confermata con ulteriori studi in cui il rilascio del farmaco sarà monitorato per tempi più lunghi.

Nonostante la bassa percentuale ceduta (0.65%), la CyA liberata dalla forma farmaceutica potrebbe essere sufficiente a determinare una risposta terapeutica visto che il farmaco viene veicolato direttamente nel sito di azione.

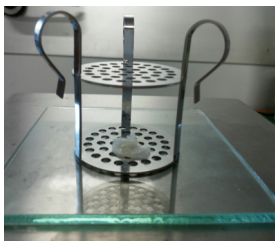
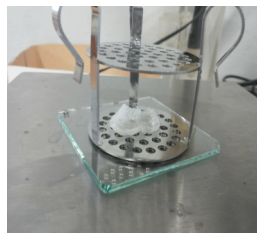


Fig .17 t = 0



t = 1 ora



t = 23 ore

## Grafici e tabelle

**Tabella 1** - Composizione degli idrogeli non medicati

Componenti	Formulazioni				
	A	B	C	D	E
PVA 10% (g)	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7
PEG 400 (g)	1	1	1	1	1
Ac lattico 80% (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Chitosano (g)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
PVP (g)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Gliossale (ml)	2	0,2	0,5	0,75	1

**Tabella 2** – Composizione dell'idrogel contenente ciclosporina A

Componenti	Quantità
PEG 400 (g)	0,41
Ac lattico 80% (ml)	0,08
Etanolo (ml)	2
Chitosano (g)	0,12
PVP (g)	0,08
Gliossale (ml)	0,41
CyA (g)	0,26

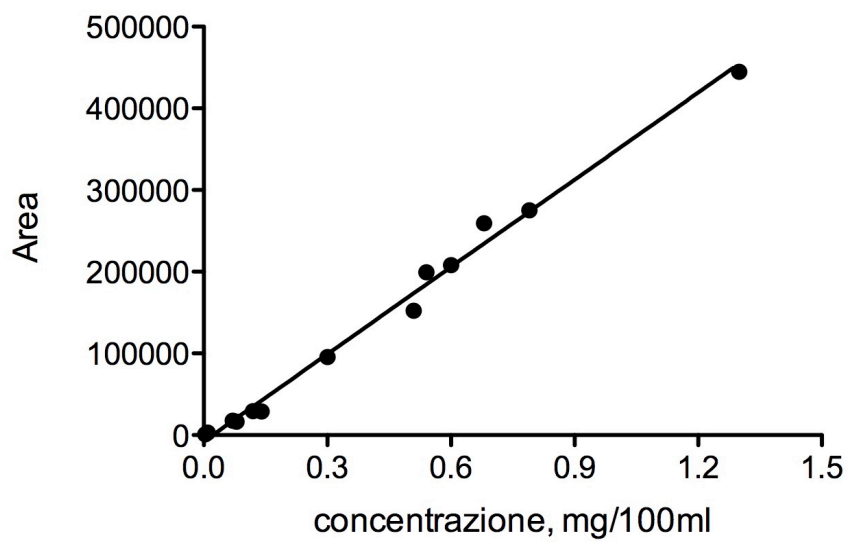
**Tabella 3** - Dati relativi al rilascio di CyA mediante l' utilizzo del cestello per il test di dissoluzione (n=3)

tempo (ore)	Quantità (mg) $\pm$ ES
1	0,017 $\pm$ 0,007
2	0,029 $\pm$ 0,008
3	0,040 $\pm$ 0,009
4	0,048 $\pm$ 0,007
5	0,062 $\pm$ 0,010

**Tabella 4** - Variazione nel tempo del SI %  $\pm$  ES, (n=3)

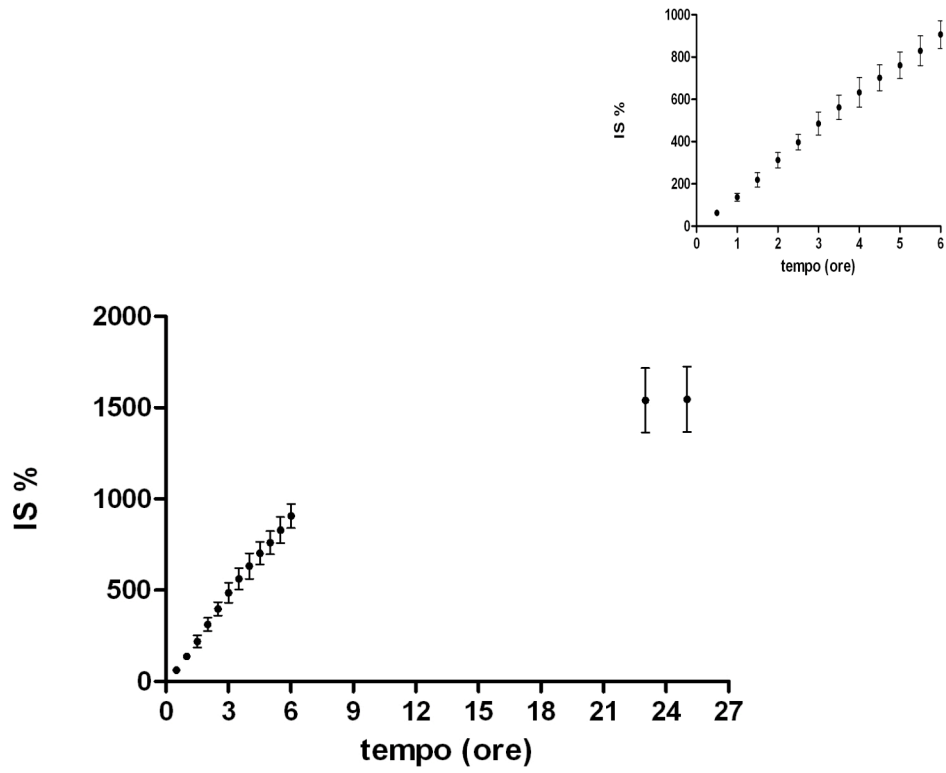
Tempo	Media $\pm$ ES
0,5	63,24 $\pm$ 12,67
1	137,05 $\pm$ 18,51
1,5	219,43 $\pm$ 33,74
2	312,63 $\pm$ 36,41
2,5	396,90 $\pm$ 36,72
3	485,61 $\pm$ 54,4
3,5	562,38 $\pm$ 58,08
4	633,12 $\pm$ 70,09
4,5	701,98 $\pm$ 61,59
5	761,01 $\pm$ 63,19
5,5	829,86 $\pm$ 70,47
6	906,89 $\pm$ 65,53
23	1540,33 $\pm$ 176,74
25	1546,17 $\pm$ 179,03

**Figura 14** - Retta di taratura della CyA mediante HPLC.

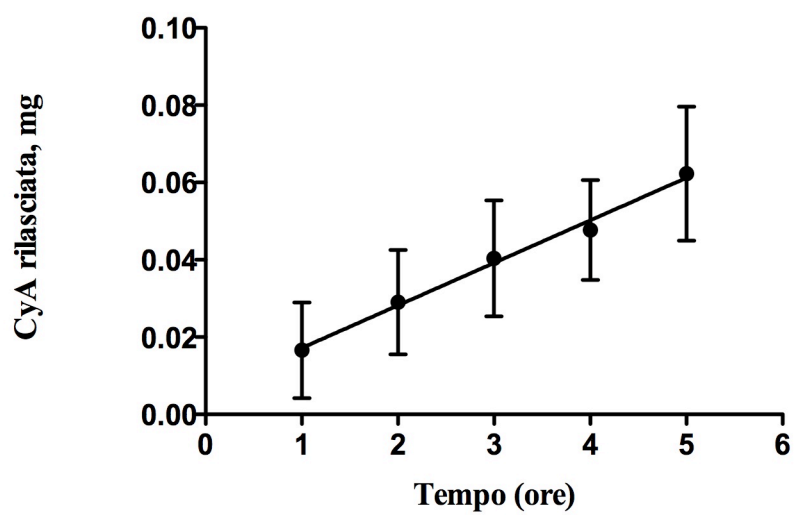


Equazione della retta:  $y = 355784 x - 7616,5$  ,  $R^2 = 0,9922$

**Figura 15** - Variazione dell'Indice di swelling nel tempo dell'idrogel a base di CyA in acqua



**Figura 16** - Quantità di CyA rilasciata dall'idrogel (mg) in funzione del tempo utilizzando il cestello.



Equazione della retta:  $y = 0,0109x + 0,0065$  ,  $R^2 = 0,9944$

## Bibliografia

- Banga A.K, S. Bose, T.K. Ghosh, “Iontophoresis and electroporation: comparisons and contrasts”, *Int. J. Pharm.* 179 1999, 1-19.
- Behnam SM, SE. Behnam; JY. Koo, “Alcohol as a risk factor for plaque-type psoriasis.” in *Cutis*, vol. 76, n. 3, settembre 2005,181-5.
- Bettiol F., *Manuale delle preparazioni galeniche*,iii ed. Giugno 2010,p.495.
- Blanco M.D., O. GarcõÂa, R.M. Trigo, J.M. TeijoÂn, I. Katime, “5-Fluorouracil release from copolymeric hydrogels of itaconic acid monoester.”,in *Biomaterials* 17 1996,17, 1061-1067.
- Carlfors J., K. Edsman, R. Petersson, K. JoÈrnving, “Rheological evaluation of Gelritew in situ gels for ophthalmic use”, in *Eur. J. Pharm. Sci.* 1998,6, 113±119.
- Chandran V, SP. Raychaudhuri, “Geoepidemiology and environmental factors of psoriasis and psoriatic arthritis.”, in *J Autoimmun*, vol. 34, n. 3, maggio 2010
- Chen L.L.H, Y.W. Chien, “Transdermal iontophoretic permeation of luteinizing hormone releasing hormone: characterization of electric parameters”, in *J. Control. Release* 40, 1996, 187-198.
- Cho C.S., S.Y. Han, J.H. Ha, S.H. Kim, D.Y. Lim, N.A. Peppas et al. “Clonazepam release from bioerodible hydrogels based on semi-interpenetrating polymer networks composed of poly( $\epsilon$ -caprolactone) and poly(ethyleneglycol) macromer”, in *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*,2000,Vol. 50 ,27-46,45.
- Cindy Li,”Nail Psoriasis: Overview of Nail Psoriasis”, In *Medscape Retrieved*, 7 January 2012.
- Cohen, E. Lobel, A. Trevigoda, T. Peled, “A novel in situ-forming ophthalmic drug delivery system from alginates undergoing gelation in the eye.”, in *J. Control. Release* 44, 1997, 201-208.
- Conaghey O.M., J. Corish, O.I. Corrigan, “Iontophoretically assisted in vitro membrane transport of nicotine from a hydrogel containing ion exchange resins”, *Int. J. Pharm.* 170, 1998, 225-237.
- de Cid R., E. Riveira-Munoz; PL. Zeeuwen; J. Robarge; W. Liao; EN. Dannhauser; E. Giardina; PE. Stuart; R. Nair; C. Helms; G. Escaramís, “Deletion of the late cornified envelope LCE3B and LCE3C genes as a susceptibility factor for psoriasis.” in *Nat Genet*, vol. 41, n. 2, febbraio 2009, 211-5.
- Fang J.Y., Y.B. Huang, H.H. Lin, Y.H. Tsai, “Transdermal iontophoresis of sodium nonivamide acetate. IV. Effect of polymer formulations”, *Int. J. Pharm.*, (1998) 173, 127-140.
- Gayet J.C., G. Fortier, “High water content BSA±PEG hydrogel for controlled release device: evaluation of the drug release properties”, in *J. Control. Release* 38 1996,38, 177-184.
- Giammona G., G. Pitarresi, V. Tomarchio, S. Spampinato, P. Govoni, T. Campana,

- “New hydrogel matrices based on chemical crosslinked a,b-polyasparthydrazide: synthesis, characterization and in vivo biocompatibility studies”, *Int. J. Pharm.* 127 1996, 165-175.
- Goldbart R., J. Kost, “Calcium responsive bioerodible drug delivery system”, in *Pharm. Res.* 16,1999, 1483-1486.
  - Gupta MA., AK. Gupta, CN. Ellis, JJ. Voorhees, “Some psychosomatic aspects of psoriasis”. in *Adv Dermatol*, vol. 5, 1990, 21-30.
  - Ichikawa H. , Y. Fukumori, “A novel positively thermosensitive controlled-release microcapsule with membrane of nano-sized poly(N-isopropylacrylamide) gel dispersed in ethylcellulose matrix”, in *J. Control. Release* 63, 1999, 107-119.
  - J.Yu , Xu X, Yao F., Jin L, Xie B., Shi S., Ma H., Li X., Chen H., “In situ covalently cross-linked PEG hydrogel for ocular drug delivery applications.”, in *International Journal of Pharmaceutics* ,April ,2014.
  - Jankovic, M. Raznatovic; J. Marinkovic; J. Jankovic; N. Maksimovic, “Risk factors for psoriasis: A case-control study.”, in *J Dermatol*, vol. 36, n. 6, giugno 2009, 328-34.
  - Kahl C., B. Hansen; K. Reich, “Nail psoriasis--an ignored disorder. Pathogenesis, diagnosis and therapy”, in *Hautarzt*, vol. 63, n. 3, marzo 2012.
  - Lee Y., YH. Nam; JH. Lee; JK. Park; YJ. Seo, “Hypocalcaemia-induced pustular psoriasis-like skin eruption.”, in *Br J Dermatol*, vol. 152, n. 3, marzo 2005, 591-3.
  - Lowman A.M, M. Morishita, M. Kajita, T. Nagai, N.A. Peppas, “Oral delivery of insulin using pH-responsive complexation gels”, *J. Pharm. Sci.* 88 1999, 933-937.
  - Miyazaki T., N. Asami, T. Urgami, “A reversibly antigen-responsive hydrogel”, in *Nature* 399, 1999, 765-769.
  - Miyazaki, F. Suisha, N. Kawasaki, M. Shirakawa, K. Yamatoya, D. Attwood, “Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for rectal drug delivery”, in *J. Control. Release* 56,1998, 75-83.
  - Patel V.R, M.M. Amiji, “Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly(ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach”, in *Pharm. Res.* 13, 1996, 588-593.
  - Peppas N.A., “Physiological responsive gels” in *J. Bioact. Compat. Polym.*, 1991, 6, 241-246.
  - Peppasa N.A., P. Buresa, W. Leobandunga, H. Ichikawab, in *Biomaterials and Drug Delivery Laboratories*, January 2000.
  - Raychaudhuri SP., J. Gross, “Psoriasis risk factors: role of lifestyle practices.”, in *Cutis*, vol. 66, n. 5, novembre 2000, 348-52.
  - Rosen RM, “Annular pustular psoriasis induced by UV radiation from tanning salon use.”, in *J Am Acad Dermatol*, vol. 25, n. 2 Pt 1, agosto 1991, 336-7.
  - Rosenberg EW., PW. Noah, “The Koebner phenomenon and the microbial basis of psoriasis”, in *J Am Acad Dermatol*, vol. 18, n. 1 Pt 1, gennaio 1988, pp. 151-8.
  - Ryu J.M., S.J. Chung, M.H. Lee, C.K. Kim, C.K. Shim, “Increased bioavailability of propranolol in rats by retaining thermally gelling liquid suppositories in the rectum”, in *J. Control. Release*, 1999, 59 163-172.



- Sinha V.R, L. Khosla, “Bioabsorbable polymers for implantable therapeutic systems”, in *Drug Dev. Ind. Pharm.* 24, 1998, 1129-1138.
- Vakkalanka S.K, C.S. Brazel, N.A. Peppas, “Temperature and pHsensitive terpolymers for modulated delivery of streptokinase”, in *J.Biomed. Mater. Sci. Polym. Ed.* 8, 1996, 119-129.
- Xu, Y. Zhang, “Association Of Psoriasis With Stroke And Myocardial Infarction: Meta Analysis Of Cohort Studies.”, in *Br J Dermatol*, agosto 2012.
- Zenz R., R. Eferl; L. Kenner; L. Florin; L. Hummerich; D. Mehic; H. Scheuch; P. Angel; E. Tschachler; EF. Wagner, “Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins.” in *Nature*, vol. 437, n. 7057, settembre 2005,369-75.
- . Aksoylar, Y. Aydinok; E. Serdaroğlu; M. Coker; F. Ozdemir; F. Ozkinay, “HDR (hypoparathyroidism, sensorineural deafness, renal dysplasia) syndrome presenting with hypocalcemia-induced generalized psoriasis.” in *J Pediatr Endocrinol Metab*, vol. 17, n. 7, luglio 2004, 1031.
- . Fiumara NJ., “Psoriasis of the penis: Koebner reaction. Following oral genital exposure”, in *J Am Vener Dis Assoc*, vol. 3, n. 2 Pt 1, dicembre 1976, 59-60.
- .Nakaumura R.C, L.D.Abreu, B.Duque-Estrada, C.Tamler and A.P.Leverone, “Comparison of nail lacquer clobetasol efficacy at 0.05%,1% e 8% in nail psoriasis treatment:prospective, controlled and randomized pilot study”, in *Anais Brasileiros de Dermatologia e Sifilografia*,vol.87,203-211,2012.
- .Sun Y., J.-J. Huang, F.-C. Lin, J.-Y. Lai, “Composite poly(2-hydroxyethyl methacrylate) membranes as rate-controlling barriers for transdermal applications”, in *Biomaterials* 18,1997, 527-533.
- Ahmed EM, “Hydrogel: Preparation, characterization, and applications”,in *J Adv Res* 8 July, 2013.
- Ajazuddin L., Alexander A, Khichariya A, Gupta S, Patel RJ, Giri TK, Tripathi DK, “Recent expansions in an emergent novel drug delivery technology” in *J Emulgel Control Release.* 2013 Oct 28;171,122-32.
- Akiyama Y., H.L. Lueûen, A.G. de Boer, J.C. Verhoef, H.E. Junginger, “Novel peroral dosage forms with protease inhibitory activities. II. Design of fast dissolving poly(acrylate) and controlled drugreleasing capsule formulations with trypsin inhibiting properties”, *Int. J. Pharm.* 138, 1996, 13-23.
- Baran R, Haneke E., “The Nail in Differential Diagnosis.”, in *Informa Healthcare*, 2007.
- Bettiol F., *manuale delle preparazioni galeniche*, iii Ed. Giugno 2010, p. 324.
- Boehncke WH, S. Boehncke, “Research in practice: the systemic aspects of psoriasis. “,in *J Dtsch Dermatol Ges*, vol. 6, n. 8, agosto 2000.
- Chaturvedy K., Ganguly K. , Nadagouda MN, Aminabhavi TM, “Polymeric Hydrogels for oral insulin delivery” in *J Control Release* 23 ,May, 2014.
- Chetoni P., G.D. Colo, M. Grandi, M. Morelli, M.F. Saettone, S.Darougar, “Silicone rubber/hydrogel composite ophthalmic inserts: preparation and preliminary in

- vitro/in vivo evaluation”, in Eur. J. Pharm. Biopharm. 46, 1998, 125-132.
- De Simone, A. Maiorino, F. Tassone, M. D'agostino and G. Caldarola, “Tacrolimus 0,1% ointment in nail psoriasis: a randomized controlled open-label study”, in Journal of the European Academy of dermatology and Venereology, 2012.
  - Dehesa L. e A. Tosti, “ Treatment of inflammatory nail disorders”, Dermatology and Therapy, vol. 25, 525-534, 2012.
  - Del Rosso, J.Q., P.J. Basuk, R.K. Scher, and A.R. Ricci. “Dermatologic Disease of the Nail Unit”. In Nails : Therapy, Diagnosis, Surgery, edited by R.K. Scher and C.R. Daniel, Philadelphia : WB Saunders., 1997.
  - Della valle R.P., K.R. Johnson, “Do smoking, obesity, and stress cause psoriasis?” in J Invest Dermatol, vol. 125, n. 1, luglio 2005, 6-7.
  - Edwards, F., and D. de Berker, “Nail Psoriasis: Clinical Presentation and Best Practice Recommendations.” in Nail Drugs, 2009, 69(17): 2351-61.
  - Fang J.Y., L.R. Hsu, Y.B. Huang, Y.H. Tsai, “Evaluation of transdermal iontophoresis of enoxacin from polymer formulations: in vitro skin permeation and in vivo microdialysis using Wistar rat as an animal model”, Int. J. Pharm. (1999) 180, 137-149.
  - Fernández-Guarino, M., A. Harto, M. Sánchez-Ronco, I. García-Morales, and P. Jaèn. 2009. “Pulsed Dye Laser vs. Photodynamic Therapy in the Treatment of Refractory Nail Psoriasis: A Comparative Pilot Study.” in Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2009, 23: 891-5.
  - Fischer-levancini, M. Sánchez-Regana, F. Llambí, H. Collgros, V. Expòsito-Serrano and P. Umberto-Millet, “Nail psoriasis: treatment with tazarotene 0,1% hydrophilic ointment,” Actas Dermo-Sifiligráficas, vol. 103, 725-728, 2012.
  - Freedberg, Lowell A. Goldsmith, Stephen I. Katz, Barbara A. Gilchrist, Amy S. Paller, David J. Leffell, Klaus Wolff., in Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. vi ed., 2003.
  - Ghazizadeh R., M. Tosa; M. Ghazizadeh, “Clinical improvement in psoriasis with treatment of associated hyperlipidemia.”, in Am J Med Sci, vol. 341, n. 5, maggio 2011, 394-8.
  - Gligorov J, Bastit L, Gervais H, “The Candidoscope Study Group Prevalence and treatment management of oropharyngeal candidiasis in cancer patients: results of the french candidoscope study.” Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2010.
  - Hennink W.E., H. Talsma, J.C.H. Borchert, S.C. De Smedt, J. Demeester, “Controlled release of proteins from dextran hydrogels”, in J. Control. Release 39, 1996, 47-55.
  - Hoemann C.D., Chenite A., Sun J., Hurting M., Serreqi A., Lu Z., Rossomacha E., Bushmann M.D., “Cytocompatible gel formation of chitosan-glycerol phosphate solutions supplemented with hydroxyl ethyl cellulose is due to the presence of glyoxal”, in J. Biomed. Mater. Res A., 2007, 83 (2), 521-9.
  - Jiaravuthisan, M.M., D. Sasseville, R.B. Vender, F. Murphy and C.Y. Muhn, “Psoriasis of the Nail: Anatomy, Pathology, Clinical Presentation, and a Review of the Literature on Therapy”. in Journal of the American Academy of Dermatology, 2007,

57,1-27 .

- Junseuk Yeom, Suk Ho Bahng, Byung Soo- Kim, Jung Kyu Park , Eui Jin Hwang, “Effect of Cross-Linking Reagents for Hyaluronic Acid Hydrogel Dermal Fillers on Tissue Augmentation and Regeneration” in *Bioconjugate Chem.*, 2010, 21-2,240–247.
- Kaetsu, K. Uchida, H. Shindo, S. Gomi, K. Sutani, “Intelligent type controlled release systems by radiation techniques”, in *Radiat. Phys.Chem.*, 1999,59, 193-201.
- Kimball AB., A. Guerin; D. Latremouille-Viau; AP. Yu; S. Gupta; Y. Bao; P. Mulani, “Coronary heart disease and stroke risk in patients with psoriasis: retrospective analysis”, in *Am J Med*, vol. 123, n. 4, aprile 2010, 350-7.
- Kitano M, Y. Mitani, K. Takayama, T. Nagai, “Buccal absorption of golden hamster cheek in vitro and in vivo of 17b-estradiol from hydrogels containing three types of absorption enhancers”, *Int. J. Pharm.* ,1998, 174, 19-28.
- Lawry,M., “Biological Therapy and Nail Psoriasis”,in *Dermatologic Therapy*, 2007, 20 (1), 60-70.
- Maeda T., H. Hasegawa; A. Matsuda; M. Kinoshita; O. Matsumura; T. Mitarai, “Severe hypocalcemia compatible with idiopathic hypoparathyroidism associated with psoriasis vulgaris.”,in *Nihon Naika Gakkai Zasshi*, vol. 92, n. 12, dicembre 2003, 2412-4.
- Marshall, R.C., “Characterization of the proteins oh human hair and nail by electrophoresis”,in *J. Inv. Dermatol.*1983, 80, 519-524.
- Muller,W.and Herrmann “Cyclosporin A for Psoriasis .”, in *New England Journal of Medicine*,1979 301(10):555.
- Murdan, S., “Drug delivery to the nail following topical application.”, *Int. J. Pharm.*,2002, 236, 1-26.
- Nagai T. , Y. Machida, “Buccal delivery systems using hydrogels”, in *Adv. Drug Deliv. Rev.* 11, 1993, 179-191.
- Naldi L., Rebora A., in *Dermatologia basata sulle prove di efficacia*, 2006,118 (6),417.
- Naldi, L. Chatenoud; D. Linder; A. Belloni Fortina; A. Peserico; AR. Virgili; PL. Bruni; V. Ingordo; G. Lo Scocco; C. Solaroli; D. Schena, “Cigarette smoking, body mass index, and stressful life events as risk factors for psoriasis: results from an Italian case-control study”, in *J Invest Dermatol*, vol. 125, n. 1, luglio 2005, 61-7.
- Ottenbrite R.M., Park K., Okano T.,in *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*, ed. Springer, 2010, 1-16.
- Pall K. , A. K. Banthia, D. K.Majumbdar, Kashyap N, Kumar N, Ravi Kumar M., “Hydrogels for Pharmaceutical and Biomedical Applications, Critical Reviews” in *Therapeutic Drug Carrier Systems*, 2005, 22,107–150.
- Paul CF, Ho VC, McGeown C, Christophers E, Schmidtman B, Guillaume JC, Lamarque V, Dubertret L. “Risk of malignancies in psoriasis patients treated with cyclosporine: a 5 y cohort study”, *J Invest Dermatol.* 2003;120 (2): 211-6.
- Petelin M, M. Sentjurc, Z. Stolic, U. Skaleric, “Mucoadhesive ointments for delivery of liposomes into the oral mucosa”, in *European Journal of Pharmaceutics and*

- Biopharmaceutics,2000, 50, 27-46.
- Praveen Kumar, P. Narayana Raju, “Transungual Drug Delivery: A Promising Route to Treat Nail Disorders” in International Journal of Pharma Research & Review, April 2013; 2(4):22-33.
  - Qiang Chen, Lin Zhu, Chao Zhao, Qiuming Wang, Jie Zheng, “A Robust, One-Pot Synthesis of Highly Mechanical and Recoverable Double Network Hydrogels Using Thermoreversible Sol-Gel Polysaccharide” in Advanced Materials, 2013;
  - Ran Y., Zaho L., Xu Q., Yalkowsky SH, “Solubilization of Cyclosporin A.” in AAPS PharmSciTech 2001; 2 (1) article 2
  - Rich P, Scher RK. “Nail Psoriasis Severity Index: a useful tool for evaluation of nail psoriasis.”,in J Am Acad Dermatol. 2003,49,206–212.
  - Rohindra D.R., Nand A.V., Khurma J.R. “Swelling properties of chitosan hydrogels.” in The South Pacific Journal of Natural Science,2004, 22(1), 32-35.
  - Samman,in The Nails in Disease. iii Ed.,1978.
  - Saroha K, Nanda S and Yadav N., “ Proniosome Gel: Potential Carrier System in Topical/Transdermal Delivery for Drugs and Cosmetics/Cosmeceuticals.” in Adv Drug Deliv Rev. 2010, 54,131-155.
  - Vellar, “Composition of the human nail substance.”,in Am. J. Clin. Nutrit. 23, 1970, 1272-1274.
  - Wang, Quincy C; Johnson, Brett A., “Fingertip Injuries”, in American Family Physician. Retrieved, March 2010.
  - Woehncke, S. Boehncke, “Cardiovascular mortality in psoriasis and psoriatic arthritis: epidemiology, pathomechanisms, therapeutic implications, and perspectives.”, in Curr Rheumatol Rep, vol. 14, n. 4, agosto 2012, 343-8. 2
  - [www.Bio-Optica.it](http://www.Bio-Optica.it)
  - Yan Wang, Sheng Tu, Anatoly N. Pinchuk, May P. Xiong,”Active drug encapsulation and release kinetics from hydrogel-in.liposome nanoparticles” in Journal of colloid and interface science, June 2013.