

EMULSIONI DOPPIE: FORMULAZIONI, CAMPI DI APPLICAZIONE, SISTEMI VEICOLARI.

A. Bernardi, A. Sacchi, S. Laneri, C. Ostacolo,
Centro di ricerca e Sviluppo dei Prodotti Cosmetici
Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica – Facoltà di Farmacia
Università degli Studi di Napoli “Federico II”

SOMMARIO

Scopo di questo lavoro è valutare le diverse caratteristiche di emulsioni multiple (nello specifico emulsioni doppie W/O/W e O/W/O) paragonandole con le equivalenti emulsioni semplici O/W e W/O. Per la scelta degli emulsionanti e degli oli costituenti la fase lipidica, sono state condotte delle analisi di tensione interfacciale $O \rightarrow W$, e grazie ai valori di γ ottenuti è stato possibile scegliere il miglior sistema, cioè quello in cui il valore di γ era minore. Le principali proprietà fisiche di questi differenti tipi di veicoli sono state caratterizzate. Caratterizzazione macroscopica e microscopica, analisi di pH, analisi reologica, test di stabilità, analisi di conducibilità ed infine test di permeazione cutanea *in vitro*.

INTRODUZIONE

Le emulsioni multiple sono sistemi polidispersi, nei quali, nel caso di un sistema W/O/W, microgocce d'acqua sono intrappolate in gocce d'olio e quest'ultime sono disperse in mezzo acquoso, l'inverso accade per un sistema O/W/O [1].

Da un punto di vista teorico, queste emulsioni complesse possono essere considerate sistemi vescicolari, nei quali è possibile incapsulare ingredienti attivi nella fase più interna.

I vantaggi di tale incapsulazione sono molteplici e rendono il sistema veicolare interessante da un punto di vista scientifico. Nel settore cosmetico sono state riscontrate le seguenti proprietà: elevata capacità di incapsulazione, protezione delle sostanze fragili e possibilità di veicolare sostanze incompatibili tra loro in un unico sistema, come per esempio l'incapsulazione, in un'unica matrice, di due sostanze la cui efficienza e stabilità richiedono diversi valori di pH [2-6].

È possibile, ad esempio per un prodotto vaginale, una molecola quale un antisettico con un *optimum* dell'attività intorno alla neutralità (pH \approx 6) potrebbe essere introdotto nella fase esterna ed una differente molecola con un'attività complementare, stabile però a pH acido potrebbe essere inserita nella fase interna.

Possono essere utilizzate, ad esempio, come veicolo per principi attivi (sostanze funzionali, filtri solari, estratti vegetali, ecc.), per realizzare preparati a cessione prolungata, per immobilizzare enzimi, per disperdere e ritenere sostanze con cattivo odore.

È oramai conclamato che la natura del veicolo adibito al trasporto influenza fortemente l'assorbimento per-cutaneo delle droghe. Questa caratteristica può influenzare l'inizio e la durata della risposta biologica e in base al tessuto da trattare è possibile formulare differenti veicoli. Possono essere differenziate in base ai principi attivi, e al livello di penetrazione desiderato. La messa a punto di una formulazione ha quindi un'importanza da non sottovalutare nel processo di trasporto [5,6]. Per le emulsioni multiple, l'attivo prima di giungere nella fase esterna deve attraversare interfacce, ciò rallenta i tempi di rilascio dell'attivo [7]. Questa particolare cinetica è già stata ampiamente dimostrata nell'assorbimento di droghe per via orale [8], peritoneale [9] e topica [10].

Le emulsioni multiple sono peraltro sistemi piuttosto fragili, le cui cause di instabilità sono spesso concomitanti e difficilmente differenziabili.

La stabilità, le dimensioni dei globuli acquosi ed oleosi e il meccanismo di rilascio variano in base al tipo di olio e di emulsionante lipofilo ed in base alla concentrazione di quest'ultimo. Sono effettuate analisi di tensione interfacciale su varie coppie di oli ed emulsionanti per poter scegliere il sistema migliore.

Diversi lavori sono stati condotti sulla natura degli oli in relazione agli emulsionanti selezionati e la loro influenza sulle condizioni di fabbricazione, così come sulla stabilità della doppia emulsione.

Si è notato che gli emulsionanti migrano da un'interfaccia all'altra alterandone le strutture. Sembra che la stabilità possa migliorare, incrementando la concentrazione dell'emulsionante lipofilo, il quale rafforzerebbe il film interfacciale [11].

Come scegliere il giusto sistema SOW (Surfactant-Oil-Water)

Al fine di raggiungere uno stato di minima energia, la superficie di ogni liquido tende a contrarsi nell'area più piccola possibile.

Si parla di tensione superficiale si riferisce ad un liquido in contatto con aria o vapore saturo.

Nel caso di due liquidi immiscibili o di un liquido ed solido esiste una tensione simile detta tensione interfacciale.

Quando un liquido viene depositato su un altro, può spandersi o meno, in conseguenza delle tensioni interfacciali che si stabiliscono tra i due liquidi.

Questo fenomeno non può essere trattato vettorialmente (come per la bagnabilità), in quanto la sua soluzione comporta la conoscenza di due angoli, α e β , formati dalle intersezioni dei vettori corrispondenti alle tensioni interfacciali (figura 1):

- γ olio-aria;
- γ acqua-aria;
- γ olio-acqua;

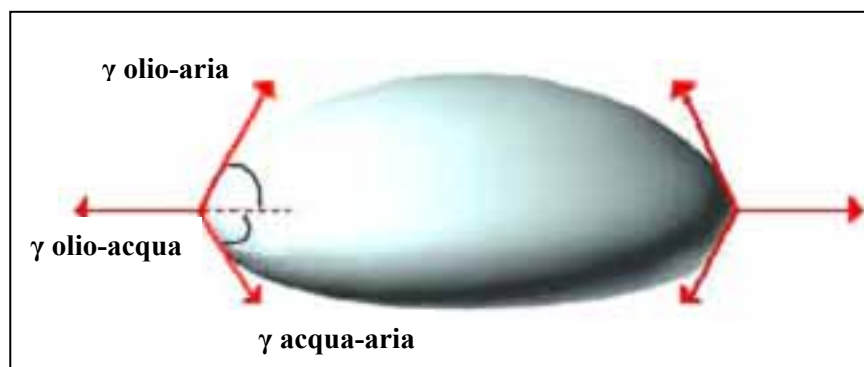


Figura 1

pertanto, ci limiteremo a trattare il fenomeno mediante considerazioni qualitative. A questo scopo, è facile vedere che perché un fluido si sparga su un altro, deve valere la seguente condizione (nell'esempio, ci si riferisce ad una goccia di olio su acqua):

$$\gamma (\text{olio-acqua}) + \gamma (\text{olio-aria}) < \gamma (\text{acqua-aria})$$

praticamente, questa relazione implica che se la tensione superficiale dell'acqua è maggiore delle altre due tensioni interfacciali, la goccia d'olio verrà "stirata" sull'acqua aumentando la sua superficie di contatto.

Il lavoro necessario per ampliare la superficie di contatto di 1 cm^2 fra 2 liquidi immiscibili è detta energia libera interfacciale.

Nella preparazione di un'emulsione, la superficie di contatto deve essere considerevolmente aumentata cosicché se la tensione interfacciale è alta, occorre spendere una considerevole energia per formare l'emulsione. Questa energia può essere conservata nel sistema come energia potenziale, il che porta ad instabilità termodinamica.

Ogni fenomeno che intervenga a ridurre la tensione interfacciale può facilitare la formazione di una dispersione acqua-olio, riducendone l'instabilità termodinamica.

Il primo a dimostrare l'esistenza di una relazione tra formazione di emulsione e riduzione della tensione interfacciale fu, all'inizio del secolo, *Quincke*, in uno studio di un'emulsione O/W stabilizzata da sapone e gomma arabica. Successivamente, *Donnan* ha studiato l'abbassamento della tensione interfacciale fra olio minerale ed acqua, prodotto dalla formazione *in situ* di sali sodici di tutta una serie di acidi grassi.

Mentre i membri più bassi della serie producevano piccole riduzioni, a partire dal caprilato sodico (C8) in su, si osservavano riduzioni sempre più marcate.

Donnan concluse che l'abbassamento della tensione interfacciale risultava da un assorbimento dei saponi di acidi grassi superiori all'*interfacies* olio-acqua ed a questo assorbimento, egli collegava la formazione di emulsioni stabili.

Successivamente altri ricercatori pensarono che il film che veniva assorbito all'*interfacies* potesse essere considerato come una fase a sé, presentante due facce, una a contatto con olio ed una con l'acqua. Queste superfici-limite sarebbero quindi sottoposte a due tensioni interfacciali e tenderebbero ad assumere una forma concava dalla parte della tensione interfacciale più forte, circondando così una fase dispersa.

Per esempio, se la tensione interfacciale del film interfacciale-acqua fosse più alta di quella del film interfacciale-olio, si otterrebbe una emulsione O/W.

In tema di affinità è stato altresì precisato che se un emulsionante ha più affinità per l'acqua produce emulsioni O/W, se l'affinità è maggiore per l'olio, produce emulsioni W/O.

Sono state fatte anche altre ipotesi per spiegare la formazione di un tipo di emulsione.

Ad esempio può essere citata la teoria di *Harkin* basata sul concetto delle «aste orientate» (*oriented wedge*) teoria che spiega perché saponi monovalenti producano emulsioni O/W e saponi polivalenti emulsioni W/O (Fig.2). La teoria presuppone la formazione di pacchetti monostratificati di sapone, cosicché le aree sezionali relative dei terminali idrofili e lipofili della molecola del sapone possono determinare la muratura del monostrato. Se il terminale idrofilo ha una area sezionale più larga di quella del terminale lipofilo, il monostrato si curva a chiudere le gocce di olio e viceversa. Così la facilità di emulsione è spesso funzione della tensione interfacciale esistente tra 2 liquidi.

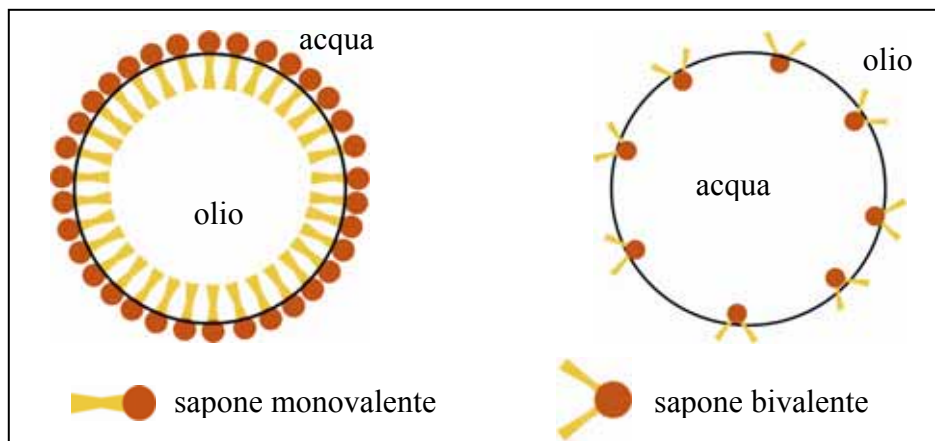


Figura 2

I liquidi con bassa tensione interfacciale, di norma, si emulsionano con facilità, quelli con alta tensione interfacciale con più difficoltà, in ogni caso per tutti occorre l'applicazione di considerevole energia meccanica.

Questa tensione interfacciale può essere modificata dall'introduzione in una o in entrambe le fasi liquide, di sostanze che vengono assorbite all'*interfacies*. Tali sostanze abitualmente contengono un gruppo polare collegato ad una catena esterna idrocarburica in modo tale da presentare sia caratteristiche idrofile che idrofobe.

Le sostanze che hanno la proprietà di ridurre la tensione interfacciale e di produrre film interfacciali all'interfacies meccanicamente stabili sono dette emulsionanti. In un'emulsione si verifica un ben definito orientamento; i gruppi polari si dispongono verso l'acqua, le porzioni idrocarburiche verso l'olio in modo da formare un film emulsionante tutto intorno alle particelle disperse.

Per prevenire fenomeni di coalescenza, l'emulsionante deve avviluppare completamente i globuli della fase dispersa ed il film di emulsionante deve essere tenace e permanente.

La carica elettrica alla superficie delle goccioline disperse è importante in quanto, in presenza di tale carica, le goccioline si respingono evitando fenomeni di coalescenza. Se oltre all'emulsionante primario idrofilo, in un'emulsione O/W è presente uno stabilizzatore lipofilo capace di interagire con l'emulsionante idrofilo all'interfacies si forma un film complesso, in cui sia l'emulsionante che lo stabilizzante sono ben associati e ciò rende ancora più stabile l'emulsione.

Differenti metodi sono stati sviluppati per la scelta di un'emulsionante o una miscela di emulsionanti per preparare il desiderato tipo di emulsione.

Il primo metodo fu proposto nel 1949 da *Griffin* [12], il quale introdusse la scala ben nota scala HLB acronimo di "Hydrophilic-Lipophilic Balance". Tale valore, però non tiene conto dell'effetto di altre variabili o della temperatura ed è spesso inaccurato.

Davies [13] completò questa definizione considerando il peso dei singoli gruppi funzionali sulla molecola di surfattante. Comunque, questo sistema dipende solo ed esclusivamente dalla struttura del surfattante e non tiene conto della natura dell'olio e della salinità dell'acqua. Il secondo tentativo di caratterizzare numericamente il concetto di formulazione è il cosiddetto PIT (*Phase Inversion Temperature*) introdotto da *Shinoda* ed *Aray* [14] nel 1964. Questa è la temperatura alla quale l'emulsionante cambia la sua affinità per la fase acquosa, ottenendo così un cambiamento nel tipo di emulsione. Il PIT è, comunque, limitato a sistemi con surfattanti etossilati non ionici, e il suo range di attendibilità è spesso insufficiente. *Beerbower and Hill* [15] hanno poi introdotto nel 1971 un nuovo approccio detto CER (*Cohesive Energy Ratio*) il quale considera il rapporto tra l'energia coesiva dello strato di emulsionante con la fase oleosa e con la fase acquosa. Sfortunatamente, l'energia coesiva corrispondente all'interfaccia con l'acqua non è facile da calcolare e il valore numerico finale del CER è inaccurato come il numero HLB.

Winsor [16] fu in grado di associare al sistema di fase le proprietà chimico-fisiche dell'interfaccia. La costante *R* di *Winsor* segue gli effetti di tutte le variabili che confluiscono all'interno di una formulazione collegandole ad una singola variabile. Comunque, poiché le interazioni molecolari non possono essere calcolate con sufficiente accuratezza, la costante *R* è ottenibile solo per trend già previsti.

Davies [13] usò il coefficiente di partizione del surfattante tra la fase oleosa e quella acquosa, per stimare il trasferimento di energia libera dall'acqua all'olio:

$$\Delta G = RT \ln \left(\frac{C_w}{C_o} \right)$$

Dove C_w e C_o sono le concentrazioni del surfattante nella fase acquosa e oleosa rispettivamente, ed *R* è la costante dei gas. Il coefficiente di partizione può essere misurato tra le fasi in eccesso di un sistema costituito da tre fasi detto Winsor III all'optimum della formulazione. Misurando questo coefficiente di partizione con differenti sistemi contenenti una varietà di oli, diverso contenuto in alcohol e diversa salinità, e valutandoli con diversi surfattanti e diversi valori della temperatura, è possibile correlare linearmente il termine $RT \ln(C_w/C_o)$ con le variabili della formulazione.

Il coefficiente di *Winsor R* dell'energie di interazione è un concetto teorico estremamente utile, per comprendere le nozioni basilari, sebbene non sia facilmente quantificabile. Verso la metà degli anni settanta, la ricerca accademica e industriale era mirata verso le tecniche per il recupero del petrolio mediante l'utilizzo di tensioattivi sfruttando correlazioni empiriche per abbassare la tensione interfacciale [17-19].

La correlazione così detta “optimum“ della formulazione serve a rappresentare i contributi delle differenti variabili formulative per costruire una legge generale indicata come SAD [20]. Tale valore è correlato all’energia libera dovuta al trasferimento della molecola di tensioattivo dall’olio all’acqua, chiamata *Surfactant Affinity Difference* (SAD), cioè la differenza tra i potenziali chimici standard dell’emulsionante nella fase oleosa e acquosa.

$$SAD = \mu_w^* - \mu_o^* = \Delta G_{oil \rightarrow water} = RT \ln K_p \quad (\text{eqn. 1})$$

Dove K_p è il coefficiente di ripartizione della molecola di emulsionante tra l’acqua e l’olio ad una data temperatura (C_o/C_w) il quale è sperimentalmente attendibile [21]. Il valore del coefficiente di ripartizione all’”optimum formulativo”, si ottiene quando il sistema SOW (*surfactant-oil-water*) si presenta come un sistema di tre fasi, ed è preso come riferimento (K_{pRef}) al corrispondente valore di SAD, il quale è detto SAD_{Ref} , ed è spesso vicino allo zero, in particolare in sistemi con emulsionanti ionici, ma non sempre come ad esempio per gli emulsionanti non ionici etossilati. La deviazione del valore adimensionale SAD dal valore di riferimento viene chiamato *Hydrophilic-Lipophilic Deviation*, HLD [22].

$$HLD = (SAD - SAD_{Ref}) / RT = \ln(K_p / K_{pRef}) \quad (\text{eqn. 2})$$

L’HLD è una misura dell’energia libera che serve a raggiungere l’”optimum formulativo” il quale presenta un sistema di tre fasi.

Misurando questo coefficiente di partizione con differenti sistemi contenenti una varietà di oli, diverso contenuto in alcohol e diversa salinità, e valutandoli con diversi surfattanti e diversi valori della temperatura, è possibile correlare linearmente il termine $RT \ln(C_w/C_o)$ con le variabili della formulazione.

Il valore dell’HLD è direttamente correlato al comportamento del sistema SOW (*Surfactant-Oil-Water*), e l’espressione numerica per l’HLD è riportata come funzione delle variabili formulative come mostrano le equazioni, che seguono, per sistemi di emulsionanti ionici e non ionici rispettivamente:

$$HLD = \ln(S) - k CAN + f(A) + \sigma - a_T \Delta T \quad (\text{eqn. 3})$$

$$HLD = \alpha - EON + b S - k ACN + f(A) + c_T \Delta T \quad (\text{eqn.4})$$

dove

S rappresenta la salinità della fase acquosa.

ACN è il numero di carboni per la fase lipidica

$f(A)$ è funzione del tipo di alcohol e della concentrazione, σ e α sono parametri caratteristici della struttura dell’emulsionante. EON è il grado medio di etossilazione per molecola di emulsionante non-ionico, ΔT è la deviazione della temperatura dal valore di riferimento ($25^\circ C$) e b , k , a_T e c_T sono costanti empiriche positive che dipendono soltanto dalla natura del sistema. L’espressione analizzata più in dettaglio e i valori delle costanti sono comunque presenti in letteratura [20,23-24].

Primo approccio fenomenologico

All’inizio del ventesimo secolo, *Brancoft* [25,26] propose un regola che si basava sulla solubilità dell’emulsionante, in pratica un emulsionante idrosolubile porterà alla formazione di un emulsione O/W mentre un emulsionante liposolubile avrebbe formato un’emulsione W/O.

Da anni, però, è evidente che la solubilità dell’emulsionante la regola valida per descrivere un’emulsione, ma bensì l’ormai comune concetto dell’HLD. Valori negativi di HLD vengono associati ad emulsioni O/W, mentre valori positivi ad emulsioni W/O e le emulsioni cambiano quando il valore di HLD tende allo zero, cioè dove la tensione interfacciale è estremamente bassa, e dove il sistema esibisce un comportamento di tipo Winsor III. Le proprietà delle emulsioni mostravano un modello sistematico quando la formulazione era esaminata dai valori negativi a quelli positivi di HLD o viceversa, qualsiasi era la variabile seguita negli esperimenti. Per valori di

HLD vicini allo zero l'emulsione risulta davvero instabile [27-32] e la viscosità del sistema tende a zero [33,34]

Secondo approccio fenomenologico

Il tipo di emulsione dipende anche dalle variabili relative alla sua composizione, generalmente vengono prese la concentrazione dell'emulsionante e il rapporto WOR (*Water-to-Oil Ratio*) per i più semplici sistemi ternari *Surfactant-Oil-Water* [33,34].

La concentrazione dell'emulsionante influenza sia la viscosità dell'emulsione sia il meccanismo di rilascio di un eventuale attivo, ma non è un fattore molto importante, quindi tale variabile è essenzialmente limitata all'applicazione. È il rapporto WOR che è la variabile più significativa. Così come aveva già intuito *Ostwald* 100 anni fa con la sua teoria sulla fase-volume. Nel grafico bidimensionale che segue sono riportate in ordinate l'HLD, il quale può essere alterato da cambiamenti di una delle variabili della formulazione quale la concentrazione del sale nell'acqua, il valore ACN dell'olio, i valori della temperatura alla quale si opera, e tutti gli altri termini che appaiono nelle equazioni (eqn.3 e eqn.4).

Nel grafico 1 che segue è possibile seguire la formazione delle emulsioni, riportando in ascissa la composizione del sistema e in ordinata il valore HLD. La linea nera, spesso indicata come linea di inversione, delimita sei regioni nel grafico bidimensionale. La zona centrale, in cui il valore del rapporto WOR è vicino all'unità, è indicata con A, a destra, nella zona in cui l'ammontare di acqua è maggiore è indicata con la lettera C e a sinistra in cui è l'olio il costituente principale è indicata con B. I valori positivi o negativi si riferiscono al valore dell'HLD. Nella regione centrale A per valori di HLD > 0 domina l'affinità dell'emulsionante per la fase oleosa e si nota un comportamento tipico di un'emulsione W/O l'inverso per valori di HLD < 0 . Invece, le variabili formulative rappresentate dall'HLD non hanno alcun tipo di effetto sul tipo di emulsione, nelle regioni B e C, dove la fase più esterna dell'emulsione è la fase più abbondante. In realtà quest'ultima affermazione non è corretta, in quanto pur essendo zone di alta instabilità nelle regioni C^+ e B^- si ritrovano delle strutture vescicolari che sono dette emulsioni multiple. In effetti, nelle aree C^+ e B^- , dette regioni anormali, esiste un conflitto tra la prevista morfologia delle emulsioni (regola di *Brancroft*) e la morfologia attesa dall'eccesso di fase (regola di *Ostwald*) in queste due regioni un'emulsione multipla si forma sotto miscelazione del sistema SOW [36].

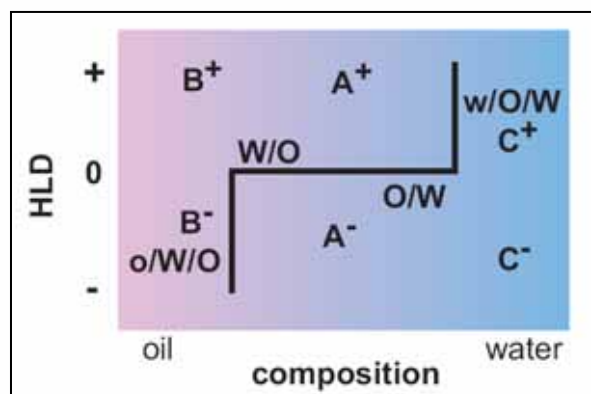


Grafico 1

Le emulsioni stabili si ritrovano nelle regioni “normali” A^+B^+ e A^-C^- , cioè nelle zone in cui il valore di HLD si ritrova alla stessa distanza dallo zero. Le emulsioni instabili si ritrovano a valori di HLB vicini allo zero qualsiasi sia la composizione del SOW. Nelle regioni anormali, l'emulsione più interna, per esempio o/W in B^- e w/O in C^+ , è stabile, mentre è la fase più esterna, W/O in B^- e O/W in C^+ , ad essere instabile. La viscosità di un'emulsione dipende principalmente da due fattori: il rapporto della fase interna e la formulazione espressa come HLD.

Terzo approccio fenomenologico

Se si prende in considerazione una terza variabile che è l'energia di miscelazione, si può notare che per maggiori valori dell'energia di miscelazione si ha un ampliamento delle regioni

stabili, mentre le regioni più instabili risultano più piccole nel diagramma tridimensionale (Grafico 2). In tal caso però si va, facilmente incontro a fenomeni di inversione di fase per piccole variazioni di una qualche variabile formulativi o per il semplice incremento della concentrazione di emulsionante.

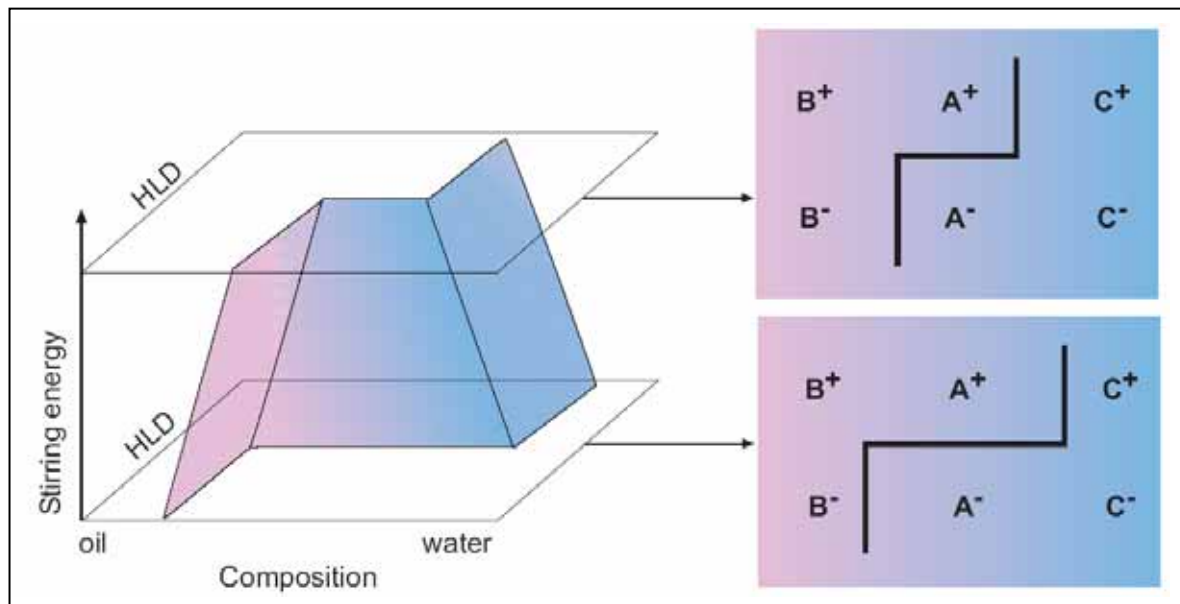


Grafico 2

Meccanismi di rilascio

Due importanti meccanismi di rilascio sono spesso citati in letteratura: la rottura delle goccioline multiple e la diffusione del soluto senza rottura dell'emulsione multipla. La diffusione attraverso la barriera lipidica e la rottura dei globuli oleosi che si verifica in seguito ad una diluizione in una soluzione ipo-osmotica (rispetto alla fase acquosa interna).

MATERIALI E METODI

Misure di tensione superficiale e interfacciale

Tali analisi sono state condotte con un tensiometro nello specifico con una bilancia di torsione di *du Nouy*, che si basa sulla forza richiesta per ottenere una deformazione controllata dell'interfaccia (Fig 3). Il tensiometro di *du Nouy* è costituito da un anello di platino-iridio, supportato da un'asta collegata ad una bilancia di torsione. La buona riproducibilità e la sensibilità alla bagnabilità di questo metodo lo rendono adatto per le applicazioni ordinarie. Le misurazioni vengono fatte immergendo un anello di platino orizzontalmente nel liquido che forma l'interfaccia tra i due liquidi o alla superficie di un liquido con l'aria. L'anello viene sollevato lentamente finché non si ha la rottura delle forze adesive con il primo liquido e l'anello si sposta nel secondo liquido o nell'aria.

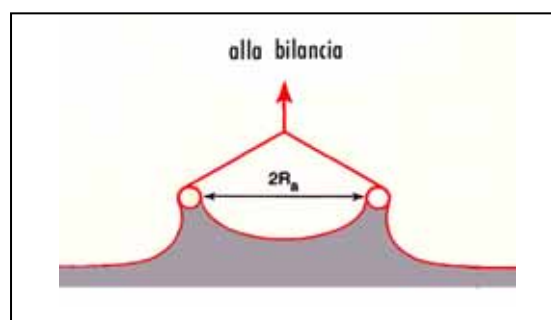


Figura 3. Anello di *du Nouy*

La forza richiesta per spostare l'anello dall'interfaccia liquido/liquido o liquido/aria è direttamente proporzionale alla tensione di superficie. La geometria dell'anello è definita dal suo raggio principale (R_a) e il raggio del filo di platino da cui è costituito (R_b) e determina la lunghezza bagnata. La tensione interfacciale γ deriva dalla forza massima " F_{max} " richiesta per immergere l'anello attraverso l'interfaccia in accordo con l'equazione mostrata nella figura 4.

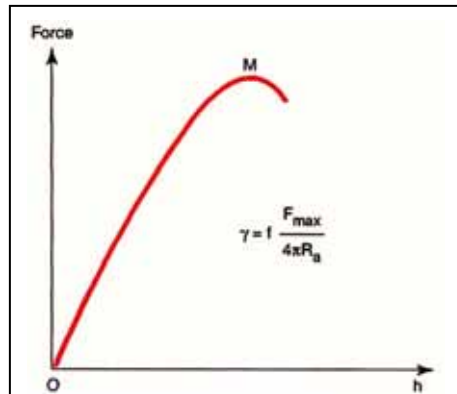


Figura 4. F_{max}

Sono state condotte delle analisi di tensione interfacciale tra diverse fasi lipidiche e l'acqua in assenza e in presenza di emulsionanti lipofili.

Le analisi di tensione interfacciale sono state condotte con un tensiometro basato sul metodo dell'anello di *du Nouy* della Sigma.

Le analisi sono state condotte alla temperatura di 25 °C.

È stata misurata prima la tensione interfacciale tra l'acqua bidistillata e la fase oleosa pura.

Successivamente la tensione interfacciale per il sistema acqua/olio è stata misurata in funzione della concentrazione di emulsionante lipofilo (1-15%).

Le due fasi lipidiche paragonate presentano differenti valori di ACN e li indichiamo come OLIO1 E OLIO2 (ACN OLIO1 = 12,2; ACN OLIO2 = 22)

Formulazioni e metodi di preparazione

L'emulsionante lipofilo utilizzato è stato un cetyl dimeticone copolyol, l'emulsionante idrofilo è stato un copolimero etossilato dell'ossido di propile.

Il solfato di magnesio eptaidrato intrappolato nella fase più interna dell'emulsione multipla è stato usato come traccia per gli studi di rilascio cinetico e di stabilità.

Le emulsioni multiple sono state ottenute con il processo di emulsione in due stadi.

W/O/W

Nel primo stadio l'emulsione W/O è stata preparata aggiungendo l'acqua contenente l'elettrolita all'olio usando un'elevata velocità di agitazione (3000 rpm) per 45 minuti. Nel secondo stadio l'emulsione primaria W/O è stata incorporata nella fase acquosa contenente l'emulsionante idrofilo con una bassa velocità di agitazione (800 rpm) per 15 minuti.

O/W/O

Le emulsione o/W/O è invece stata preparata utilizzando un *peg-60 hydrogenated castor oil* come emulsionante della prima emulsione o/W un *cetyl dimeticone copolyol* nel secondo step dell'emulsione per la formazione dell'emulsione finale o/W/O Nel primo stadio l'emulsione o/W è stata preparata aggiungendo l'acqua contenente l'elettrolita all'olio usando un'elevata velocità di agitazione (6000 rpm) per 10 minuti. Nel secondo stadio l'emulsione primaria o/W è stata incorporata nella fase acquosa contenente l'emulsionante lipofilo con una bassa velocità di agitazione (5000 rpm) per 15 minuti.

Analisi microscopiche

Tale analisi è stata condotta per seguire i cambiamenti nel tempo dell'emulsione multipla.

È stata effettuata su campioni delle emulsioni W/O/W diluiti 1:20 in condizioni iposmotiche, con un microscopio ottico (1000 x) (OPTIKA) ad immersione sul quale è stata montata una fotocamera.

Analisi macroscopiche

Le principali proprietà organolettiche di tutte le formulazioni subito dopo la preparazione erano abbastanza simili. Microscopicamente tutte le emulsioni erano creme bianche ed omogenee e presentavano una buona consistenza. Le emulsioni sono state controllate ogni giorno per valutare eventuali separazioni di fase o contaminazioni microbiologiche.

Studi di stabilità

La stabilità è stata testata a $4 \pm 1^\circ\text{C}$, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e $40 \pm 1^\circ\text{C}$. le prove in centrifuga sono state eseguite a 3000 rpm per 15 minuti sulle formulazioni appena preparate e dopo 24 ore dalla preparazione.

Misure di conducibilità

Queste analisi sono state effettuate per misurare direttamente il rilascio dell'elettrolita intrappolato nella fase interna acquosa. Le misure effettuate a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ su campioni delle emulsioni multiple diluite (1/20 in acqua distillata) sotto agitazione magnetica con un conduttimetro (Conductimeter GLP, Crison)

La frazione, $\beta(t)$, di elettrolita rilasciata nella fase acquosa esterna ad un dato tempo t può essere calcolata dalla seguente relazione:

$$\beta(t) = M_t/M_0$$

dove M_0 è la massa iniziale incorporata e M_t è la massa presente nella fase esterna acquosa al dato tempo t . M_t è stato calcolato dopo aver effettuato la curva di calibrazione.

$$Y = 1 - \beta$$

Il valore β può darci un'idea della capacità di intrappolare (Y) un principio attivo dell'emulsione multipla, o più precisamente la capacità di rilascio controllato.

Studi di assorbimento percutaneo

Sono in corso analisi di assorbimento per cutaneo in vitro utilizzando pelle di orecchio di coniglio montate su celle di diffusione di Franz. Per l'emulsione W/O/W sarà valutato l'assorbimento della caffeina, incorporata nella fase acquosa più interna, confrontandolo con quello relativo ad una emulsione simile O/W. Mentre per l'emulsione o/W/O è stata utilizzata come traccia per le analisi di assorbimento la Vitamina E acetato (ACEF, Fiorenzuola d'Arda, ITA), paragonandolo sempre con l'assorbimento ottenuto con una matrice simile qualitativamente e quantitativamente W/O.

RISULTATI E DISCUSSIONI

Analisi di tensione interfacciale

Dalle analisi di tensione interfacciale condotte con un tensiometro Sigma 700 sulla interfaccia acqua/fase oleosa sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Fase lipidica	Densità (g/cm^3)	mN/m
Olio1	0.782	41.73
Olio2	0,912	52.93

Si può notare che la tensione interfacciale è minore per il sistema acqua distillata/olio1. I risultati riportati sono la media di tre misurazioni.

È stato quindi scelto olio1 come fase lipidica, in virtù della sua minore tensione interfacciale.

Successivamente si è analizzata la tensione interfacciale per il sistema acqua/olio1 in funzione della concentrazione di emulsionante lipofilo (1-15%).

I risultati ottenuti hanno dimostrato un abbassamento della tensione interfacciale all'aumentare della concentrazione di emulsionante lipofilo.

I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle e grafici che seguono:

%EMU1	mN/m (25 °C)
1	11,57
2	10,12
3	9,21
4	7,23
5	5,21
6	5,26
7	5,21
8	5,24
9	5,28
10	5,26
11	5,27
12	5,29
13	5,28
14	5,25
15	5,26

Tab. 1

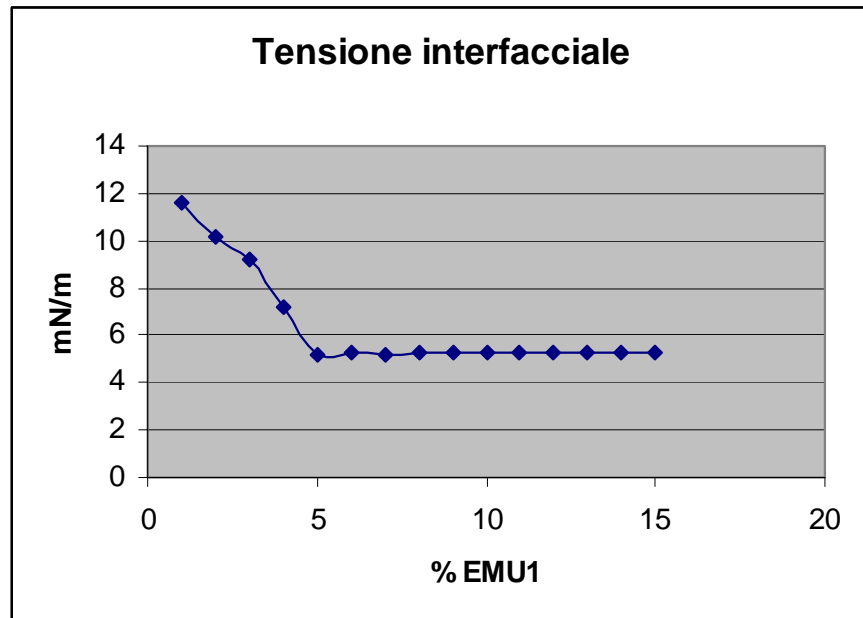


Grafico 3. Andamento della tensione interfacciale in funzione della concentrazione dell'emulsionante lipofilo (EMU1)

Dall'andamento del grafico si evince che basta il 5 % di emulsionante lipofilo per saturare l'interfaccia A/O.

L'aumento della concentrazione di emulsionante lipofilo ha effetto solo sulla viscosità dell'emulsione e sul meccanismo di rilascio del sale.

Principali caratteristiche delle emulsioni multiple

Viscosità

La viscosità di tutte le formulazioni incrementa in maniera proporzionale con la concentrazione dell'emulsionante lipofilo. Seguono i dati di viscosità:

W/O/W 1 (EMU 5 %)

$$\eta = 7000 \text{ cP s [R7 (35 %) 100 RPM]}$$

W/O/W 2 (EMU1 10 %)

$$\eta = 9500 \text{ cP s [R7 (33.8 %) 100 RPM]}$$

W/O/W 3 (EMU1 15 %)

$$\eta = 12200 \text{ cP s [R7 (34.3 %) 100 RPM]}$$

Riportando in grafico i valori di viscosità in funzione della concentrazione di EMU1 si può notare un andamento lineare (Grafico 4).

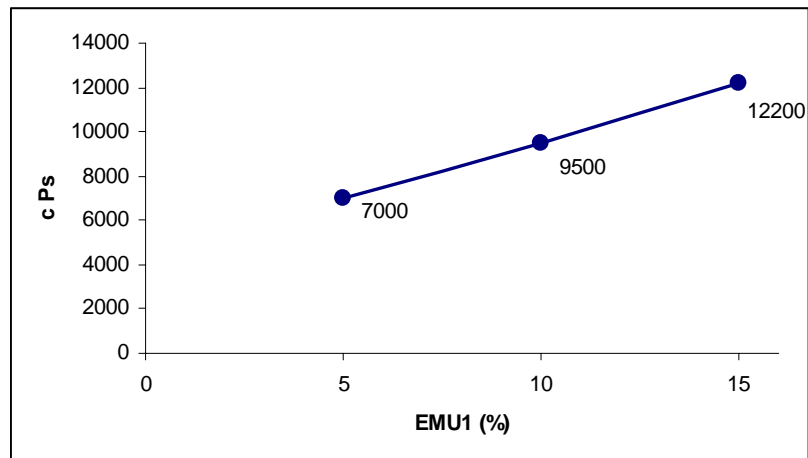


Grafico 4. Andamento della viscosità in funzione della concentrazione dell'emulsionante lipofilo (EMU1).

Analisi microscopica

L'analisi al microscopio ha mostrato la presenza di globuli di olio contenenti vescicole di acqua.

Nelle immagini 1 e 2 che seguono si nota l'aspetto dell'emulsione multipla, contenente il 10% di EMU1, subito dopo la diluizione 1:20 in condizioni ipo-osmotiche e due ore dopo.

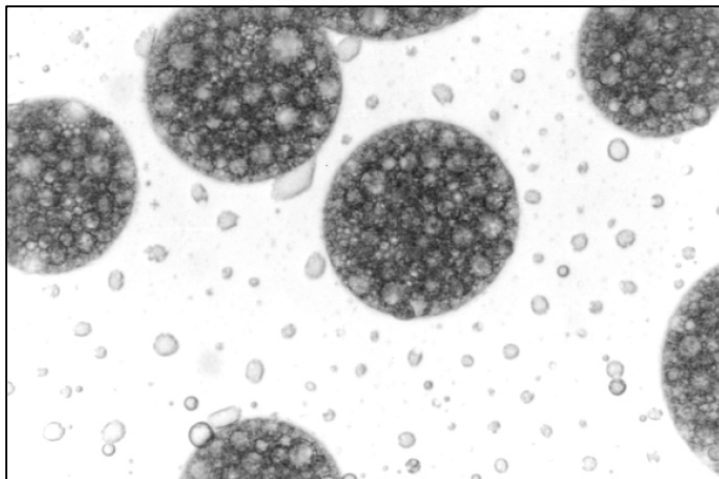


Immagine 1. Aspetto microscopico dell'emulsione multipla, la quale contiene il 10 % di EMU1, visualizzata appena dopo la diluizione 1:20 in condizioni ipo-osmotiche (x 1000)

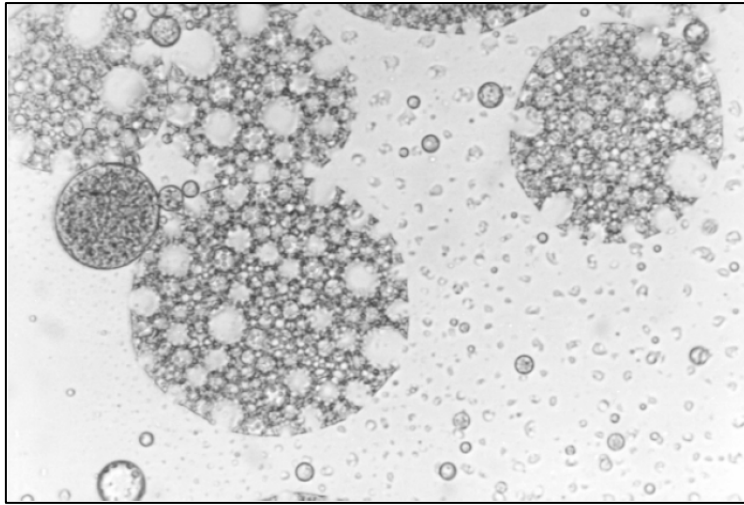


Immagine 2. Aspetto microscopico dell'emulsione multipla, la quale contiene il 10 % di EMU1, visualizzata 2 ore dopo la diluizione 1:20 in condizioni ipo-osmotiche (x 1000)

Si può notare che in condizioni ipo-osmotiche, cioè, dopo diluizione in acqua pura, il gradiente della concentrazione (ΔC) del solfato di magnesio è maggiore di 0.

Ciò significa che la concentrazione dell'elettrolita nella fase acquosa più interna è maggiore della concentrazione presente nella fase più esterna:

$$C_{\text{int}} - C_{\text{ext}} = \Delta C > 0$$

Ciò causa l'incremento della dimensione delle goccioline di acqua interne e quindi dei globuli oleosi che le contengono, fino ad una dimensione critica (stadio di crescita, *swelling step*). Dopo aver raggiunto questa dimensione critica, la membrana oleosa si rompe, e il sale intrappolato nella fase interna acquosa viene rilasciato verso quella esterna (stadio di rottura, *breakdown step*).

Il meccanismo di *swelling-breakdown* è molto più evidente per la formulazione contenente il 5% di EMU1.

Questo comportamento potrebbe trovar giustificazione nella saturazione della prima interfaccia W1/O (senza alte concentrazioni di EMU1), che porta ad un minor rigonfiamento del globulo ma ad un maggior rilascio dell'elettrolita. Tutti questi risultati indicano che più aumenta la percentuale di EMU1, più cresce la capacità di rigonfiarsi del globulo oleoso, più lento è il rilascio del solfato di magnesio.

Analisi di conducibilità

Dalle analisi di conducibilità, effettuate sempre in condizioni ipo-osmotiche, si può evincere che la correlazione esistente tra le concentrazioni di EMU1 e il tempo di rilascio dell'elettrolita è quella ipotizzata dall'analisi microscopica.

Il [grafico 5](#) mostra l'andamento nel tempo della frazione dell'elettrolita, $\beta(t)$, rilasciato nella fase acquosa più esterna.

Si può notare che le formulazioni contenenti il 10 % e il 15 % di EMU1 rilasciano una minor quantità di elettrolita nel tempo, rispetto alla formulazione in cui è presente il 5 % di EMU1.

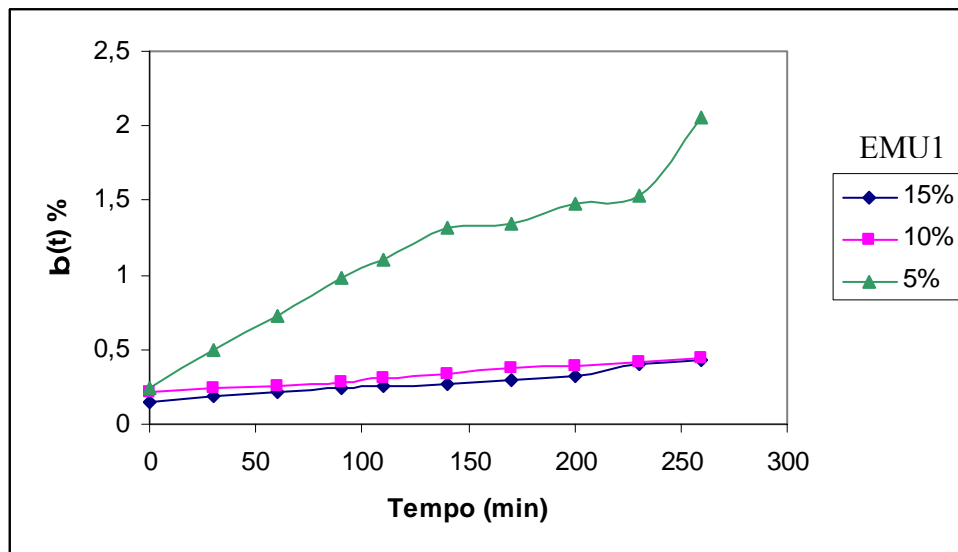


Grafico 5. Andamento nel tempo della frazione dell'elettrolita rilasciato nella fase acquosa esterna, in condizioni ipo-osmotiche.

CONCLUSIONI

Lo scopo di questo studio era comparare i risultati del meccanismo di rilascio delle diverse formulazioni e correlare questi risultati alla stabilità delle emulsioni e ai valori di tensione interfacciale.

Sono state analizzate delle emulsioni W/O/W in cui l'emulsionante lipofilo era presente in differenti concentrazioni (5 %, 10 % e 15 %).

Dalle analisi di tensione interfacciale si evince che esiste una concentrazione limite per l'emulsionante lipofilo (5%) alla quale si ottiene la saturazione dell'interfaccia W1/O. Aumentando la concentrazione di EMU1 la tensione interfacciale non varia ma si ha un aumento della viscosità e una diminuzione della velocità di rilascio dell'elettrolita.

Dai risultati ottenuti appare che il rilascio dell'attivo idrosolubile avviene ad opera di un meccanismo di *swelling-breakdown* (rigonfiamento-rottura) dei globuli di olio.

In condizioni ipo-osmotiche, l'emulsionante lipofilo stabilizza la prima interfaccia (W1/O) ed è in grado di migrare verso la seconda interfaccia (O/W2) incrementando le dimensioni dei globuli di olio (*swelling*).

Aumentando la concentrazione dell'emulsionante lipofilo, la viscosità aumenta e la velocità di rilascio dell'attivo idrosolubile diminuisce.

Una elevata capacità di rigonfiamento e una maggiore viscosità sono associate ad una migliore stabilità del sistema.

Cambiando la concentrazione dell'emulsionante è possibile modulare e prolungare il rilascio e la stabilità della formulazione.

Aspettiamo i risultati dei test di assorbimento percutaneo *in vitro*, utilizzando le celle di Franz, per aver maggiori informazioni sui meccanismi di rilascio delle emulsioni O/W/O e sul ruolo degli emulsionanti e della tensione interfacciale in questi sistemi complessi.

BIBLIOGRAFIA

- [1]. Denine, R., Jager-Lezer, N., Grossiord, J.L., F. and Seiller, M. Influence de la formulation d'une emulsion multiple cosmétique sur la liberation des actifs encapsulés. *Int. J. Cosmet. Sci.* **18**, 103-22 (1996).
- [2]. Tadros, T.F. Future developments in cosmetic formulations. *Int. J. Cosmet. Sci.* **14**, 93-111 (1992).
- [3]. Yazan, Y., Aralp, U., Seiller, M. and Grossiord, J.L. PVP in multiple emulsions. *Cosm. & Toil.* **110**, 53-7 (1995).
- [4]. Luca, M., Rocha-Filho, P., Grossiord, J.L., Rabaron, A., Vaution, C. and Seiller, M. Review: les emulsion multiples. *Int. J. Cosmet. Sci.* **13**, 1-21 (1991).
- [5]. Zatz, J.L. Modification of skin permeation by solvents. *Cosm. & Toil.* **106**, 91-8 (1991).
- [6]. Schaefer, H., Zesch, A. and Stuggen, G. Skin permeability. *Springer*, Berlin (1982).
- [7]. Fredo-Kumbaradzi, E., Stupar, M., Vuleta, G. and Simov, A. Release of sulfacetamide sodium from multiple W/O/W emulsion. *Pharmazie*. **46**, 607-8 (1991)
- [8]. Mishra, B. and Pandit, J.K. Prolonged tissue levels of pentazocine from multiple W/O/W emulsions in mice. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* **16**, 1073-8 (1990).
- [9]. Miyakawa, T. Zhang, W., Uchida, T., Kim, N.S. and Goto, S. *In vitro* release of water-soluble drugs from stabilized water-in oil-water (W/O/W) type multiple emulsions following intravenous administration using rats. *Biol. Pharm. Bull.* **16**, 268-72 (1993).
- [10]. Attia, M.A. and Habib, F.S. Pilocarpine delivery from multiple emulsions. *STP Pharma* 2, 636-40 (1986).
- [11]. Ozer, O., Baloglu, E., Ertan, G., Muguet, V., Yazan, Y. The effect of the type and concentration of the lipophilic surfactant on the stability and release kinetics of the W/O/W multiple emulsions. *Int. J. Cosmet. Sci.* **22**, 459-470 (2000).
- [12]. Griffin, W., *J Soc Cosm Chem* **1**:131 (1949).
- [13]. Davies, J., Proceedings of the 2nd International Congress on Surface Activity, Butterworth, London (1959).
- [14]. Shinoda, K. and Arai, H. *J. Phys. Chem.* **68**:3485 (1964).
- [15]. Beerbower A, Hill, M-W., MacCutcheon's Detergents and Emulsifiers, *Allured Publishing*, New York(1971).
- [16]. Winsor, P., Solvent properties of amphiphilic compounds, Butterworth, London (1954).
- [17]. Shah, D.O. and Schechter, R.S. Improved oil recovery by surfactant and polymer flooding, Academic Press, New York (1977).
- [18]. Johansen, R.T. and Berg, R.L. (Eds), Chemistry of Oil Recovery, ACS, *Symposium Series* Nr 91, American Chemical Society, Washington, DC (1979).
- [19]. Shah, D.O. (Ed), Surface Phenomena in Enhanced Oil Recovery, *Plenum Press*, New York (1981).
- [20]. Bourrel, M. and Schechter, R.S. Microemulsions and Related Systems, *M Dekker*, New York (1988).
- [21]. Marquez, N., Antòn, R.E., Graciaa, A., Lachaise, J. and Salager, J.L., Partitioning of ethoxylated alkylphenol surfactants in microemulsion-oil-water systems. *Colloids Surf A* **100**:225 (1995).
- [22]. Salager, J.L., Márquez, N., Graciaa, A. and Lachaise, J., Partitioning of ethoxylated octylphenol surfactants in microemulsion-oil-water systems. Influence of temperature and relation between partitioning coefficient and physicochemical formulation. *Langmuir* **16**:553 (2000).
- [23]. Salager J.L., Microemulsions, in Handbook of Detergents—Part A: Properties, ed by Broze G, *Surfactant Science Series*, Vol 82, **Chapter 8**, M Dekker, New York (1999).
- [24]. Salager, J.L., Antòn, R.E., Andérez, J.M. and Aubry, J.M., Formulation des micro-émulsions par la méthode HLD, Techniques del'Ingénieur, Vol: Génie des Procédés, article **J2 157**, *Techniques de l'Ingénieur*, Paris, p 1–20. Paris (2001).
- [25]. Bancroft, W.D., The theory of emulsification V. *J Phys Chem* **17**:501 (1913).
- [26]. Bancroft, W.D., The theory of emulsification VI. *J Phys Chem* **19**:275 (1915).
- [27]. Friberg, S. and Mandell, L. Influence of phase equilibria on properties of emulsions. *J Pharmaceutical Sci* **59**:1001 (1970).
- [28]. Saito, H. and Shinoda, K. The stability W/O type emulsion as a function of temperature and of the hydrophilic chain length of the emulsifier. *J Colloid Interface Sci* **32**:647 (1970).
- [29]. Bourrel, M., Graciaa, A., Schechter, R.S. and Wade, W.H., The relation of emulsion stability to phase behavior and interfacial tension of surfactant systems. *J Colloid Interface Sci* **72**:161 (1979).
- [30]. Salager, J.L., Quintero, L., Ramos, E. and Andérez, J.M., Properties of surfactant-oil-water emulsified systems in the neighbourhood of three-phase transition. *J Colloid Interface Sci* **77**:288 (1980).
- [31]. Vinatieri, J.E., Correlation of emulsion stability with phase behaviour in surfactant systems for tertiary oil recovery. *Soc Petrol Engng J* **20**:402 (1980).
- [32]. Milos, F.S. and Wasan, D.T., Emulsion stability of surfactant systems near the three phase region. *Colloids Surf A* **4**:91 (1982).
- [33]. Vijayan, S., Ramachandran, C., Doshi, H. and Shah, D.O., Porous media rheology of emulsions in tertiary oil recovery, 3rd Internat Conf Surface Colloid Science, Stockholm, Sweden (1979).
- [34]. Salager, J.L., Minana-Pérez, M., Andérez, J., Grosso, J., Rojas, C. and Layrisse, I. Surfactant-oil-water systems near the affinity inversion—Part II: Viscosity of emulsified systems. *J Dispersion Sci Technol* **4**:161 (1983).
- [35]. Matsumoto, S. and Kang, W.W., Formation and applications of multiple emulsions. *J Dispersion Sci Technol* **10**:455 (1989).
- [36]. Grossiord, J.L. and Sellier, M. (Eds), Multiple Emulsions: Structure, Properties and Applications, Editions La Santé, Paris (1998).