

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

**FORMULAZIONI LIPIDICHE PER LA SOMMINISTRAZIONE
ORALE DEI FARMACI**

RELATORE: DOTT.SSA ERICA FRANCESCHINIS

LAUREANDA: MARTINA VENCATO

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

Riassunto	3
1. La somministrazione orale dei farmaci	5
1.1 Sistema LADME	5
1.2 Assorbimento del farmaco: passaggio dei farmaci attraverso le barriere biologiche	6
1.3 Via di somministrazione orale	7
1.3.1 Fattori fisiologici legati all'anatomia e alla fisiologia del tratto gastrointestinale che influenzano l'assorbimento del farmaco	9
1.3.1.1 <i>Area superficiale del tratto gastrointestinale</i>	13
1.3.1.2 <i>pH dei fluidi gastrointestinali</i>	13
1.3.1.3 <i>Transito gastrointestinale</i>	14
1.3.1.4 <i>Flusso ematico in località splancnica</i>	15
1.3.1.5 <i>Effetti del cibo e della dieta</i>	15
1.3.2 Proprietà chimico-fisiche del farmaco che influenzano l'assorbimento gastrointestinale	16
1.3.2.1 <i>Lipofilia</i>	17
1.3.2.2 <i>Solubilità e velocità di dissoluzione</i>	17
1.4 Il metabolismo lipidico	19
1.5 Assorbimento intestinale linfatico dei farmaci	21
2. Strategie per incrementare la biodisponibilità di farmaci poco solubili	25
2.1 Strategie per incrementare la solubilità dei farmaci	25
2.1.1 Strategie che prevedono modifiche di tipo chimico	25
2.1.2 Strategie che prevedono modifiche di tipo fisico	26
2.1.2.1 <i>Riduzione delle dimensioni particellari</i>	26
2.1.2.2 <i>Ricristallizzazione</i>	27
2.1.2.3 <i>Precipitazione controllata</i>	28
2.1.3 Strategie di tipo formulativo	28
2.1.3.1 <i>Introduzione di co-solventi</i>	29
2.1.3.2 <i>Introduzione di sostanze per correggere il pH</i>	29
2.1.3.3 <i>Formazione di complessi del farmaco</i>	30
2.1.3.4 <i>Formazione di dispersioni solide</i>	31
2.1.3.5 <i>Introduzione di tensioattivi</i>	32
2.1.3.6 <i>Formulazioni lipidiche</i>	32

3. Formulazioni lipidiche	35
3.1 Classificazione delle formulazioni lipidiche	35
3.2 Materie prime per le formulazioni lipidiche	38
3.2.1 Fasi oleose	38
3.2.2 Tensioattivi	41
3.2.3 Co-solventi	42
3.2.4 Additivi	42
3.3 Sviluppo e caratterizzazione delle formulazioni lipidiche	43
3.3.1 Selezione dei componenti	43
3.3.2 Caratterizzazione <i>in vitro</i> delle formulazioni	44
3.3.2.1 <i>Velocità di autoemulsione</i>	44
3.3.2.2 <i>Dimensione delle goccioline</i>	45
3.3.2.3 <i>Test di dissoluzione in vitro</i>	45
3.3.2.4 <i>Test di permeazione in vitro e ex-vivo</i>	46
3.3.2.5 <i>Lipolisi</i>	48
3.4 Caratterizzazione <i>in vivo</i>	49
3.5 Formulazioni auto-emulsionanti solide	50
3.5.1 Caricamento su carrier microporosi e/o polimeri reticolati	50
3.5.2 Estrusione e granulazione in <i>high shear mixers</i>	50
3.5.3 <i>Spray congealing</i>	51
3.5.4 <i>Spray drying</i>	51
4. Esempi di sviluppo di formulazioni lipidiche	53
4.1 Ciclosporina	53
4.2 Simvastatina	54
4.3 Atorvastatina	56
4.4 Paclitaxel	59
5 Conclusioni	65
Bibliografia & Sitografia	67

RIASSUNTO

L'impiego di un farmaco avviene dopo averlo trasformato in una forma di dosaggio che ne permetta la somministrazione nella dose adatta attraverso una delle possibili vie di somministrazione. L'entità della risposta terapeutica dipende da quanto farmaco viene ceduto dalla forma farmaceutica prescelta e dalla quantità di farmaco in grado di raggiungere la circolazione sistemica ed il sito d'azione; tutto ciò avviene in una serie di fenomeni che si susseguono: la disaggregazione della forma farmaceutica, la dissoluzione e la permeazione del principio attivo. La via orale costituisce la via di somministrazione più conveniente per accedere alla circolazione sistemica; tuttavia, per ottenere una buona biodisponibilità orale il principio attivo deve possedere una buona solubilità in mezzo acquoso e una buona capacità di permeare attraverso la membrana intestinale. In funzione delle caratteristiche di solubilità e di permeabilità i farmaci vengono suddivisi in quattro classi: i farmaci di classe I sono caratterizzati da una buona solubilità e una buona permeabilità, i farmaci di classe II presentano una bassa solubilità ma una buona permeabilità, viceversa i farmaci di classe III presentano buona solubilità e bassa permeabilità, infine i farmaci di classe IV presentano bassa solubilità e permeabilità.

In letteratura viene riportato che la maggior parte delle nuove molecole candidate a diventare dei farmaci appartengono alla classe II e di conseguenza per queste molecole sarà decisivo lo sviluppo di formulazioni in grado di migliorare la loro solubilità per poter ottenere una biodisponibilità adeguata. In questo lavoro di tesi verranno inizialmente riassunti l'anatomia e la fisiologia del sistema gastrointestinale e successivamente le proprietà chimico-fisiche proprie del farmaco che ne influenzano l'assorbimento.

Nel secondo capitolo della tesi, verranno trattate brevemente le diverse strategie che possono essere messe in atto per aumentare la solubilità di farmaci poco solubili in acqua, tra le quali ricordiamo: strategie di tipo chimico, fisico e formulativo. In particolare, tra le strategie di tipo formulativo ricordiamo: l'utilizzo di co-solventi e tensioattivi, l'introduzione di sostanze per correggere il pH, la formazione di complessi del farmaco, la formazione di dispersioni solide, e le formulazioni lipidiche sulle quali si concentra questo lavoro di tesi. Le formulazioni lipidiche verranno trattate più in dettaglio nel terzo capitolo. Le formulazioni lipidiche presentano numerosi vantaggi, tra i quali ricordiamo l'incremento della biodisponibilità orale e la diminuzione della variabilità intra e inter-soggetto. Esse sono generalmente costituite da un principio attivo disciolto in una miscela di uno o più eccipienti, i quali possono essere trigliceridi, gliceridi parziali, tensioattivi o co-tensioattivi e vengono classificate in funzione delle dimensioni delle gocce disperse, della capacità di emulsionare e delle caratteristiche dei componenti presenti nella formulazione in formulazioni lipidiche di tipo I, tipo II, tipo IIIA e IIIB.

Nel lavoro di tesi verranno descritte le caratteristiche di questi diversi tipi di formulazioni lipidiche oltre che le materie prime utilizzate per la loro realizzazione, le tecniche impiegate per la loro caratterizzazione *in vitro* e la loro valutazione *in vivo* nonché i principali meccanismi alla base del loro assorbimento.

Infine, nel quarto capitolo verranno proposti alcuni esempi di quattro principi attivi (simvastatina, atorvastatina, ciclosporina e paclitaxel) per i quali sono state sviluppate delle formulazioni lipidiche autoemulsionanti.

CAPITOLO 1

LA SOMMINISTRAZIONE ORALE DEI FARMACI

1.1 Sistema LADME

L'acronimo ADME (Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo, Eliminazione) indica l'insieme dei processi che avvengono a carico del farmaco dopo esser stato introdotto nell'organismo attraverso una delle possibili vie di somministrazione e che ne determinano il destino nell'organismo. Le principali vie di somministrazione sistemica del farmaco sono: endovenosa, intramuscolare, sottocutanea, orale, rettale, inalatoria e transdermica. Ad esclusione della via endovenosa, tramite cui il farmaco è introdotto direttamente nel torrente circolatorio, tutte le altre vie di somministrazione prevedono che il farmaco venga assorbito dal sito di somministrazione al circolo sanguigno. L'impiego di un principio attivo avviene quasi sempre dopo averlo trasformato in una forma farmaceutica che ne permetta la somministrazione attraverso la via di somministrazione prescelta e nella dose adatta. L'entità della risposta terapeutica dipenderà dalla quantità di farmaco che verrà ceduta dalla forma farmaceutica e che risulterà in grado di raggiungere la circolazione sistemica e poi il sito d'azione ed è conseguenza di una serie di fenomeni, tra i quali ricordiamo la disaggregazione, la dissoluzione e la permeazione (Amorosa M., 2021). Le forme farmaceutiche orali sono quelle più comunemente impiegate e possono essere distinte in funzione del loro stato fisico in: liquide, solide e semisolide. La più rappresentata è la forma solida, infatti il 50% dei farmaci in commercio sono costituiti da compresse (Colombo P. et al., 2015). I principi attivi somministrati per via orale, prima di raggiungere il circolo sistemico, passano attraverso il fegato nel quale possono subire dei processi metabolici che portano alla formazione di composti inattivi, meno attivi o più attivi. Il farmaco deve essere assorbito in quantità e ad una velocità tali da permettere di raggiungere una concentrazione plasmatica di farmaco tale da ottenere l'effetto terapeutico. Indipendentemente dalla via di somministrazione, dopo essere stato assorbito, il principio attivo si distribuisce nell'organismo o in alcuni distretti di esso e in questo modo raggiunge la sede di azione. Infine, il farmaco ed i suoi metaboliti vengono eliminati dall'organismo principalmente attraverso i reni. La sigla ADME può essere trasformata anche in LADME; infatti, la lettera L sta ad indicare la liberazione del farmaco dalla forma farmaceutica. La sigla LADME indica quindi l'insieme di quei processi che portano il farmaco ad essere presente nel sito di assorbimento in forma molecolare, ovvero l'unica forma in grado di superare le barriere

dell'assorbimento (Amorosa M., 2021).

1.2 Assorbimento del farmaco: passaggio dei farmaci attraverso le barriere biologiche

Il farmaco per essere assorbito deve superare delle barriere biologiche rappresentate dalle membrane cellulari. Le membrane cellulari possono essere rappresentate come un doppio strato di materiale lipidico contenente fosfolipidi, glicolipidi e steroidi, in cui sono presenti anche proteine che penetrano nel doppio strato lipidico e hanno la funzione di essere dei veri e propri trasportatori di membrana sia nel verso dell'entrata che in uscita. Inoltre, la membrana cellulare è attraversata da pori acquosi di dimensione variabile tra i 4 e i 10 Å, che si aprono o chiudono e sono spesso i responsabili del trasporto di ioni o molecole organiche di piccole dimensioni attraverso la membrana. Il farmaco, quindi, deve essere trasportato attraverso le membrane biologiche e questo passaggio avviene attraverso vari meccanismi, tra i quali ricordiamo:

- **Trasporto passivo (o per diffusione):** è il meccanismo più utilizzato dalla maggior parte dei farmaci per i processi di assorbimento, distribuzione ed eliminazione. La forza motrice è il gradiente di concentrazione, perciò il farmaco passa attraverso la membrana da un compartimento ad alta concentrazione di farmaco ad uno a bassa concentrazione al fine di uguagliare le concentrazioni nei due dipartimenti; non è saturabile e non richiede energia.
- **Trasporto mediante carrier:**
 - *trasporto attivo:* avviene contro gradiente di concentrazione, richiede un carrier specifico, può essere saturabile e sottostà a fenomeni di inibizione competitiva per il carrier da parte di sostanze chimicamente affini;
 - *trasporto passivo facilitato:* la forza motrice è il gradiente di concentrazione, ma grazie alla presenza di carrier il processo risulta essere più veloce.
- **Trasporto convettivo:** avviene tramite le porosità della membrana ed è utilizzato da molecole idrofile di piccole dimensioni come acqua, urea ed elettroliti.
- **Trasporto per endocitosi:** prevede l'inglobamento di materiale extracellulare entro una invaginazione della membrana in modo da formare una vescicola o un vacuolo (ad esempio la pinocitosi).

I meccanismi di trasporto elencati si esplicano generalmente per via *transcellulare*, cioè il farmaco deve necessariamente attraversare la membrana biologica. Esiste anche la via *paracellulare* che è sfruttabile quando il farmaco è in grado di passare attraverso gli spazi che si trovano tra una cellula l'altra, superando la barriera formata dalle giunzioni

intercellulari che sono diverse a seconda dell'epitelio considerato (ad esempio, nell'intestino sono presenti giunzioni strette, chiamate *tight junctions*, che sono saldamente coese tra loro) (Figura 1.1).

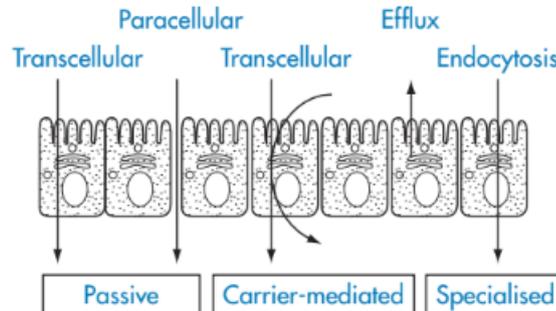


Figura 1.1. Trasporto attraverso la membrana gastrointestinale (Florence A.T e Attwood D., 2006).

1.3 Via di somministrazione orale

La via di somministrazione orale è la più utilizzata per convenienza e accessibilità. La funzione principale dell'apparato gastrointestinale è quella di digerire i cibi e i nutrienti assunti con la dieta. Pertanto, la via orale è la via più naturale per l'introduzione nell'organismo di un farmaco destinato ad essere assorbito ed è la più utilizzata nei casi in cui un farmaco sia in grado di superare in modo inalterato l'ambiente acido dello stomaco e di essere assorbito attraverso le membrane gastrointestinali.

Essa rappresenta numerosi vantaggi, tra i quali ricordiamo:

- possibilità di automedicazione che porta ad una maggiore *compliance* da parte del paziente anche nel caso di patologie croniche o nelle terapie pediatriche grazie alla possibilità di aromatizzare il preparato;
- ampia superficie della mucosa intestinale deputata all'assorbimento del farmaco;
- possibilità di controllare la velocità di rilascio del principio attivo a seconda delle esigenze farmacologiche (forme farmaceutiche a rilascio modificato);
- minor costo del processo produttivo delle forme orali rispetto a quelle parenterali (Colombo P. et al., 2015).

Tuttavia, la somministrazione orale presenta alcuni svantaggi che possono limitarne l'impiego, in particolare possono esserci delle criticità se:

- il farmaco è degradato dall'ambiente acido dello stomaco o dagli enzimi digestivi;
- esso è gastro-lesivo o irritante per la mucosa gastroduodenale;

- le condizioni fisiopatologiche del paziente non sono favorevoli, ad esempio, la presenza di nausea/vomito e nel caso di pazienti con patologie a carico del sistema gastro-intestinale o con fenomeni specifici di intolleranza, come anche pazienti non coscienti o che sono stati sottoposti ad interventi chirurgici al tratto gastrointestinale.

Nonostante la notevole utilità della via orale, il farmaco incontra numerosi ostacoli che ne condizionano l'entrata nel circolo sistemico in forma inalterata. Infatti, se un farmaco viene somministrato in forma solida per via orale, per essere assorbito, devono verificarsi due processi fondamentali e consecutivi:

- Fase 1: disgregazione della forma farmaceutica solida e dissoluzione del farmaco;
- Fase 2: permeazione del farmaco attraverso le membrane gastrointestinali fino al raggiungimento della circolazione sistemica (Amorosa M., 2021).

Dato che la solubilità in ambiente acquoso e la permeabilità attraverso le membrane intestinali rappresentano i due parametri principali che stanno alla base dell'assorbimento per via orale, Amidon ha proposto la suddivisione dei farmaci in quattro classi (*Biopharmaceutics Classification System (BCS)*, Amidon et al., 1995):

- I **farmaci in classe I** sono caratterizzati da alta solubilità e alta permeabilità e possono essere assorbiti più del 90%; lo step limitante nel loro assorbimento è la dissoluzione del farmaco e/o il tempo di svuotamento gastrico.
- I **farmaci in classe II** sono caratterizzati da bassa solubilità e alta permeabilità; essi sebbene abbiano una bassa solubilità, hanno il potenziale di essere completamente assorbiti grazie all'elevata permeabilità di membrana.
- I **farmaci in classe III** hanno alta solubilità e bassa permeabilità e questo comporta un assorbimento incompleto.
- I **farmaci in classe IV** sono caratterizzati da bassa solubilità e bassa permeabilità e perciò sono poco biodisponibili.

La letteratura riporta che la maggior parte delle molecole farmacologicamente attive in fase di sviluppo appartengono alle classi II e IV e di conseguenza la loro biodisponibilità risulta fortemente influenzata dalla loro solubilità (Prajapati B.G., Patel M. M., 2007; Holm R., 2019). Ne consegue che la biodisponibilità orale di queste molecole può essere incrementata migliorandone la solubilità (Papich M.G e Martinez M. N., 2015).

Prima di descrivere le strategie che possono essere messe in atto per aumentare la

biodisponibilità orale di queste molecole, verranno descritti l'anatomia e la fisiologia dell'apparato digerente e i vari fattori che influenzano l'assorbimento gastrointestinale del farmaco.

1.3.1 Fattori fisiologici legati all'anatomia e alla fisiologia del tratto gastrointestinale che influenzano l'assorbimento del farmaco

L'apparato digerente, che si estende dalla bocca all'ano, è responsabile dell'assunzione del cibo, della sua disgregazione in sostanze nutritive (processo definito digestione), dell'assorbimento delle sostanze nutritive nel torrente ematico e dell'eliminazione delle parti indigeribili dal corpo. Il tratto digerente è composto da: bocca, faringe ed esofago, stomaco, intestino tenue, intestino crasso, retto e ano, ma comprende anche organi accessori posti al di fuori del tratto digerente quali: pancreas, fegato e la cistifellea (Ruiz A. R., 2019; Martini F. H. et al., 2019). Il tratto gastrointestinale è un canale muscolare cavo che presenta una parete formata da tessuti organizzati in quattro strati concentrici: mucosa, sottomucosa, strato muscolare e strato fibro-sieroso (**Figura 1.2**).

Lo strato più importante per l'assorbimento di farmaci è la mucosa, lo strato più interno, in quanto il farmaco deve attraversarlo per raggiungere i vasi sanguigni o i dotti linfatici (presenti nella tonaca sottomucosa); essa è formata dall'epitelio di rivestimento, dalla lamina propria e dalla *muscularis mucosae*. La tonaca sottomucosa contiene appunto i vasi sanguigni, i vasi linfatici e i plessi nervosi. La tonaca muscolare è invece costituita da un grosso strato muscolare circolare e da uno sottostante longitudinale. Gli ingrossamenti dello strato muscolare, in determinati punti del canale digerente, formano gli sfinteri che consentono il passaggio del cibo solo in una direzione.

Lo strato muscolare è formato da muscolatura striata volontaria solo nella bocca e nell'ano mentre per le restanti parti è costituito da muscolatura liscia involontaria. La contrazione ritmica dello strato muscolare (onde peristaltiche) permette il mescolamento e l'avanzamento del cibo. Infine, la tonaca sierosa riveste la superficie esterna della muscolatura a fasci longitudinali ed è costituita da tessuto connettivo. Tale rivestimento peritoneale conferisce agli organi del tratto gastroenterico una grande mobilità in rapporto all'ambiente circostante e gli uni rispetto agli altri (Ruiz A. R., 2019). La digestione dei cibi inizia in bocca, dove viene valutato il sapore, la temperatura e la consistenza dei cibi. Il cibo trasformato in bolo alimentare viene deglutito e passa, attraverso l'istmo delle fauci e la faringe, nell'esofago che rappresenta il primo tratto del canale digerente. L'esofago è un tubo flessibile con restringimenti e dilatazioni che attraversa il mediastino posteriore e penetra per un breve tratto nell'addome.

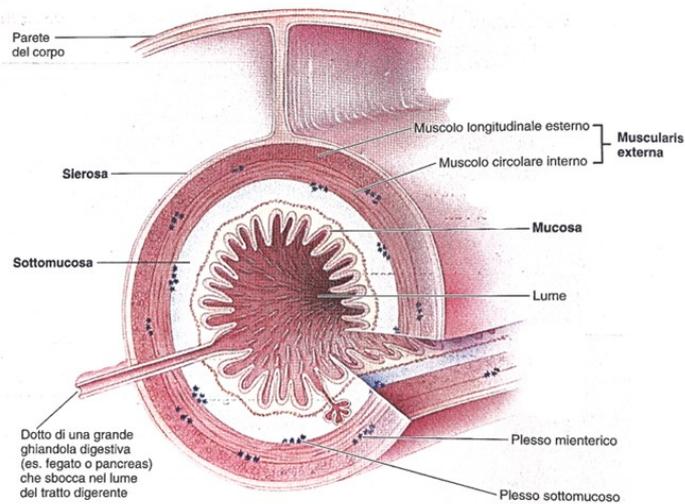


Figura 1.2. Strati della parete del tratto digerente: la parete del tratto digerente è costituita da quattro strati principali che dall'interno verso l'esterno sono la mucosa, la sottomucosa, la muscularis externa e la sierosa (Sherwood, 2012).

Tramite contrazioni peristaltiche, l'esofago spinge il bolo alimentare attraverso lo sfintere per giungere nello stomaco. Nell'esofago non hanno luogo processi digestivi e di assorbimento dato il breve tempo di permanenza del cibo (2-30 secondi). Successivamente vi è lo stomaco che appare come una dilatazione del canale alimentare ed è il primo distretto in cui sosta il farmaco assunto per via orale. Nello stomaco avviene la trasformazione del bolo in poltiglia semiliquida definita chimo. Una volta formato il chimo, le contrazioni dello stomaco lo spingono verso il piloro e quindi nell'intestino tenue. Il tempo di permanenza varia in base al tipo pasto e può variare da pochi minuti per un liquido a 1-2 ore per i carboidrati, 2-3 ore per le proteine, 5 o più ore per i grassi. Lo stomaco secreta il succo gastrico, contenente acido cloridrico e pepsina, necessario per la digestione degli alimenti ed inoltre agita e mescola il contenuto tramite contrazioni dello strato muscolare. Nello stomaco l'epitelio di rivestimento della mucosa è sollevato in numerose pieghe, chiamate pliche della mucosa, che ne aumentano l'area superficiale ed inoltre sono presenti le fossette gastriche dove sboccano i dotti delle ghiandole gastriche, le quali secernono enzimi digestivi e muco per poi riversarli nel lume gastrico. Lo stomaco non è la sede principale dell'assorbimento ma in certi casi può verificarsi un assorbimento passivo in quanto è presente una ricca irrorazione sanguigna ed inoltre il farmaco può risiedervi per un periodo variabile da pochi minuti a diverse ore favorendo l'assorbimento (Ruiz A. R., 2019).

L'intestino tenue è anatomicamente suddiviso in tre sezioni: duodeno, digiuno e ileo; fa seguito allo stomaco e rappresenta la porzione più lunga del canale alimentare. In realtà non vi è una netta demarcazione tra digiuno e ileo e pertanto vengono anche considerati un tutt'uno definito intestino mesenteriale. Convenzionalmente si attribuisce al digiuno la porzione superiore e all'ileo la porzione inferiore. Nel mesentere decorrono i vasi sanguigni, linfatici e i nervi del sistema simpatico che ne regolano la funzionalità. Come vedremo nel dettaglio in seguito, i vasi linfatici sono particolarmente sviluppati in quanto portano quantità di liquidi e drenano, nel digiuno prossimale, i prodotti dell'assorbimento lipidico, incluse le vitamine liposolubili, tramite i capillari chiliferi. La superficie interna dell'intestino tenue è ripiegata in pliche circolari da cui sporgono microscopiche estroflessioni allungate, chiamate villi, i quali contengono un'arteriola, una venula e un vaso linfatico ciascuno. La superficie dei villi è coperta da uno strato di enterociti da cui hanno origine estroflessioni filiformi ancora più piccole, dette orletto a spazzola o microvilli; il tutto contribuisce ad ampliare notevolmente l'area superficiale disponibile all'assorbimento (**Figura 1.3**). Tra gli enterociti dell'epitelio di rivestimento e delle pliche si trovano in gran numero le cellule caliciformi secernenti muco.

Inoltre, la parete dei microvilli è separata dal lume intestinale da altri due strati, uno strato mucoso protettivo e il cosiddetto "strato acquoso stazionario". La membrana cellulare di ogni enterocita è strettamente legata a quella delle cellule adiacenti mediante delle giunzioni serrate (*tight junctions*) che in parte possono essere allentate.

Nella maggior parte dei casi, un farmaco raggiunge la circolazione sistemica per via transcellulare, ovvero attraversando gli enterociti. La maggior parte dei farmaci raggiunge la corrente sistemica tramite la corrente sanguigna del reticolo di capillari presenti nei villi. Una struttura tipica localizzata nella mucosa intestinale è quella costituita dalle placche di Peyer che sono degli ammassi di noduli linfoidi deputati principalmente alla difesa immunitaria ma che hanno anche un ruolo nell'assorbimento di particelle mediante pinocitosi. L'intestino crasso è l'ultima porzione del canale digerente e dell'intestino e si suddivide in cieco, colon e retto. La sua principale funzione è quella di riassorbire l'acqua persa con le secrezioni gastrointestinali, ma è comunque possibile un assorbimento per diffusione passiva. La mucosa dell'intestino crasso è strutturata in base alle sue funzioni primarie che sono: recupero/assorbimento di acqua e sali minerali e solidificazione, immagazzinamento ed espulsione del residuo intestinale tramite le feci. Non sono presenti pliche circolari e villi ma le cellule presentano microvilli (che hanno il ruolo di assorbire acqua e sali minerali) e cellule mucipare (atte a proteggere il sensibile epitelio dell'intestino crasso dai disturbi meccanici delle feci solidificate).

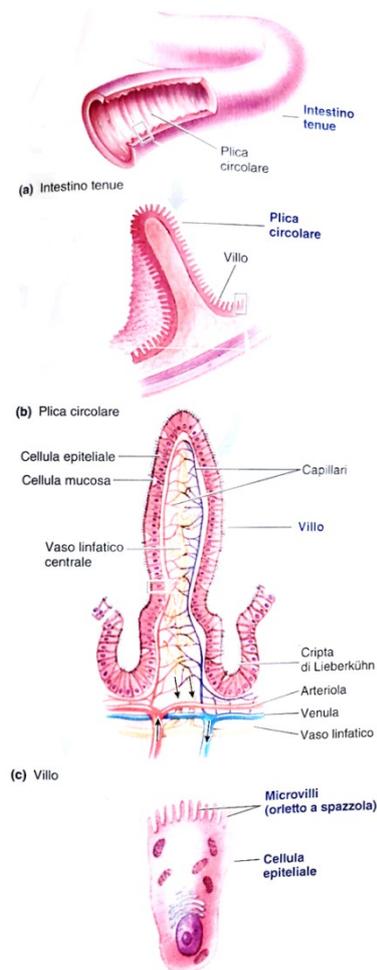


Figura 1.3. Superficie assorbente dell'intestino tenue. a) struttura macroscopica dell'intestino tenue. b) le pliche circolari della mucosa dell'intestino tenue fanno aumentare l'area della superficie di tre volte. c) microscopiche estroflessioni allungate note come villi fanno aumentare l'area della superficie di altre dieci volte. d) ogni cellula epiteliale di un villo presenta microvilli sul proprio margine luminale; i microvilli fanno aumentare l'area della superficie di altre 20 volte. Nel complesso, queste modificazioni della superficie fanno aumentare l'area della superficie assorbente dell'intestino tenue di 600 volte (Sherwood, 2012).

La mucosa intestinale, infatti, produce un secreto alcalino ricco di mucina e privo di enzimi digestivi. Nel colon è contenuta un'abbondante flora batterica che effettua la demolizione delle molecole residue dando origine a vari prodotti catabolici e, tramite processi fermentativi, a gas. Oltre a questi fattori legati all'anatomia e alla fisiologia del tratto gastrointestinale sopra riportati, altri fattori fisiologici che possono influenzare l'assorbimento del farmaco somministrato per via orale sono: l'area superficiale del tratto gastrointestinale e il pH dei fluidi gastrointestinali a cui vanno aggiunti la modalità e la velocità di transito gastrointestinale, in minor misura il flusso ematico in zona splanchnica ed infine l'influenza del cibo/della dieta.

Anche gli effetti dei fluidi gastrointestinali sulla stabilità dei farmaci sono da tenere in considerazione. Inoltre, tutti questi fattori sono ampiamente correlati tra loro e con fattori chimico-fisici propri del farmaco che influenzano l'assorbimento delle varie molecole.

1.3.1.1 Area superficiale del tratto gastrointestinale

Come già accennato precedentemente, le superfici dello stomaco, dell'intestino tenue e del colon differiscono significativamente; ciò produce una variazione nella velocità e nella quantità di farmaco assorbito a seconda delle diverse regioni anatomiche. Nonostante l'area superficiale dello stomaco non sia favorevole all'assorbimento, il suo pH permette l'assorbimento di alcuni farmaci quali gli acidi deboli che si trovano in forma non ionizzata a pH acido. L'intestino tenue, grazie alle sue caratteristiche, è la sede principale dell'assorbimento, in particolar modo è la regione più importante per l'assorbimento mediante trasporto attivo grazie all'elevata presenza di *carriers*. Il colon invece è importante per l'assorbimento di profarmaci, che devono essere degradati dalla flora batterica di questa regione prima che possa avvenire l'assorbimento; si vede impiegare questo accesso per la somministrazione di farmaci a rilascio modificato.

1.3.1.2 pH dei fluidi gastrointestinali

Il pH dei fluidi gastrointestinali varia in modo considerevole sia in funzione delle diverse regioni anatomiche, sia in relazione al ritmo circadiano: di notte il pH si abbassa e varia durante il giorno in relazione all'ingestione di cibo, ma si mantiene compreso tra 1.5 e 5 a livello dello stomaco (ciò a causa delle secrezioni di acido cloridrico da parte delle cellule parietali delle ghiandole gastriche) e in un intervallo tra 5 ed 8 nell'intestino tenue e colon. Inoltre, la presenza di condizioni patologiche localizzate nel tratto gastrointestinale come ulcere gastriche e duodenali, il tipo di dieta e le terapie farmacologiche possono causare considerevoli variazioni a livello interindividuale; perciò, il pH gastrointestinale influenza l'assorbimento di farmaci in vari modi. Infatti, la maggior parte dei farmaci sono elettroliti deboli e il loro grado di ionizzazione è funzione del pH oltre che della pK_a del farmaco. In generale, la forma non ionizzata, ovvero quella più liposolubile, di un farmaco in soluzione viene assorbita più velocemente rispetto alla forma ionizzata; ma un farmaco per essere assorbito deve prima passare in soluzione, quindi, dato che la solubilità in acqua di un elettrolita debole è influenzata dal pH, la velocità di dissoluzione di un principio attivo da una forma farmaceutica solida sarà pH dipendente, non sarà facilmente prevedibile e potrebbe limitarne l'assorbimento. Generalmente, si può affermare che gli acidi deboli sono più ionizzati in ambienti basici, mentre le basi deboli sono maggiormente ionizzate in

ambiente acido; perciò, in termini molto generali, ci si dovrebbe aspettare che gli acidi vengano assorbiti dallo stomaco e le basi dall'intestino. Ci si attende che farmaci acidi deboli scarsamente solubili che presentano un'elevata velocità di dissoluzione in ambiente basico vengano rapidamente assorbiti da forme farmaceutiche solide quando il farmaco passa dall'ambiente acido dello stomaco e raggiunge i fluidi intestinali alcalini dove può avvenire una rapida dissoluzione, nonostante il farmaco si trovi in forma indissociata (e quindi più assorbibile) a pH gastrico. Infatti, bisogna ricordare che a mano a mano che la forma indissociata (in soluzione) viene rapidamente assorbita, si ristabilisce di nuovo l'equilibrio dissociativo e parte della porzione dissociata passa allo stato indissociato, viene assorbita e così via. Viceversa, i farmaci basi deboli scarsamente solubili, caratterizzati da un'elevata velocità di dissoluzione in ambiente acido, si sciolgono nel fluido gastrico e quindi raggiungono l'intestino in forma indissociata per essere eventualmente assorbiti. Se però nell'ambiente intestinale la solubilità della forma indissociata è bassa, questa può precipitare dando luogo ad una riduzione o un ad un ritardo nell'assorbimento. Il pH gastrointestinale può inoltre influenzare negativamente l'assorbimento di farmaci a bassa stabilità chimica, principalmente in ambiente acido ma anche in ambiente basico. Di conseguenza, sia che il farmaco sia acido o basico, la maggior parte dell'assorbimento avviene nell'intestino tenue essendo maggiore la superficie deputata all'assorbimento e le membrane più permeabili (Florence A.T. e Attwood D.,2006; Vertzoni M. et al., 2019).

1.3.1.3 Transito gastrointestinale

Il transito gastrointestinale si compone di transito esofageo, gastrico e intestinale. La motilità gastrointestinale è responsabile della progressione del farmaco somministrato per via orale; essa varia a seconda delle condizioni di digiuno o di recente assunzione di cibo. Poiché la maggior parte dei farmaci viene assorbita nell'intestino tenue, ogni riduzione della velocità di svuotamento gastrico si traduce in una diminuzione della velocità di assorbimento e può ritardare la comparsa dell'effetto terapeutico; essa è influenzata da un gran numero di fattori ed è infatti un parametro molto variabile sia fra individui diversi che nello stesso individuo. Tra i fattori che possono promuovere la velocità di svuotamento gastrico è annoverato lo stato di digiuno, l'ansia, la posizione del corpo, l'assunzione di liquidi e di farmaci antiemetici, mentre essa è diminuita dalla presenza di grassi, dalla depressione mentale e in caso di gastroenterite. È da sottolineare il fatto che la velocità di svuotamento gastrico di forme farmaceutiche sotto forma di soluzioni e sospensioni di particelle fini è generalmente più veloce e meno variabile di quella di forme solide non disgregabili e di voluminosi aggregati particellari. Una volta transitato dallo stomaco

all'intestino tenue, il farmaco si trova esposto ad un ambiente totalmente diverso da quello dello stomaco. Essendo l'intestino tenue la sede primaria di assorbimento, è chiaro che più tempo esso permane in questa regione maggiore sarà la possibilità di un assorbimento efficace (in genere 3-5 ore), purché il farmaco sia stabile nei fluidi intestinali e non reagisca con sostanze endogene per formare complessi insolubili. Inoltre, la permeabilità intestinale di un farmaco può variare da una regione all'altra del tenue e generalmente diminuisce passando dal digiuno all'ileo al colon e di conseguenza, per un farmaco somministrato per via orale può esistere una regione del tratto gastrointestinale maggiormente deputata al suo assorbimento, per cui il tempo dell'attivo in questa regione è determinante ai fini del suo assorbimento (Colombo P. et al., 2015).

1.3.1.4 Flusso ematico in località splancnica

Riguardo l'influenza del flusso sanguigno in zona splancnica è da attendersi che un aumento dello stesso favorisca l'assorbimento perché aumenta il gradiente di concentrazione del farmaco ai due lati della membrana deputata all'assorbimento. Tale influenza è maggiore nel caso di sostanze molto permeabili e quindi liposolubili che sono in grado di passare facilmente attraverso i pori della membrana assorbente e per le quali lo "step" limitante l'assorbimento è la perfusione sanguigna; viceversa, l'influenza è molto minore nel caso di sostanze polari, per le quali lo "step" limitante l'assorbimento è il passaggio attraverso la membrana deputata all'assorbimento (Colombo P. et al., 2015).

1.3.1.5 Effetti del cibo e della dieta

L'assunzione di cibo in concomitanza con la somministrazione di un farmaco può variare positivamente o negativamente la velocità e l'entità dell'assorbimento. In primo luogo, il cibo può influenzare positivamente l'assorbimento di farmaci perché:

- ha un ruolo protettivo nei confronti dell'effetto irritante che un certo farmaco può possedere;
- un pasto ricco di grassi e la successiva secrezione di bile promuove l'assorbimento di farmaci poco solubili in quanto i sali biliari agiscono da tensioattivi.

In secondo luogo, il cibo può influenzare negativamente l'assorbimento dei farmaci perché:

- ci può essere una competizione fra i componenti della dieta e alcuni farmaci che presentano una struttura chimica analoga a quella di nutrienti per i quali esistono meccanismi di assorbimento specializzati;
- ci può essere la complessazione di alcuni farmaci con componenti della dieta e la seguente formazione di complessi insolubili e non assorbibili;

- ci può essere un effetto dei nutrienti sul metabolismo pre-sistemico di alcuni farmaci aumentando o inibendo enzimi deputati alla metabolizzazione di farmaci. Ad esempio, il cibo solido e ad alto contenuto di grassi, può rallentare lo svuotamento gastrico e ritardare la comparsa dell'effetto terapeutico oltre al fatto che la digestione comporta variazioni di pH dello stomaco che a loro volta influenzano la dissoluzione del farmaco stesso.
- la presenza di cibo solido nel tratto gastrointestinale impedisce l'accesso fisico vero e proprio dei farmaci alla mucosa assorbente e rallenta quindi la dissoluzione e la diffusione necessarie per la liberazione del farmaco.

Facendo riferimento al sistema di classificazione BCS, in generale si può affermare che:

- la biodisponibilità dei farmaci di classe I è ottima e di conseguenza non viene influenzata significativamente dall'assunzione concomitante di pasti ricchi; però, l'assunzione di cibi molto grassi potrebbe provocare dei ritardi nello svuotamento gastrico e quindi causare un aumento del tempo necessario a raggiungere la concentrazione plasmatica massima;
- la biodisponibilità dei farmaci di classe II è invece notevolmente aumentata dall'assunzione di pasti molto grassi in quanto si ha la formazione di micelle mediata dai sali biliari e una possibile inibizione dell'efflusso di farmaco nell'intestino. Di conseguenza, il tempo necessario a raggiungere la concentrazione plasmatica massima potrebbe aumentare a causa del rallentamento dello svuotamento gastrico o scendere a causa dell'inibizione dell'efflusso;
- la biodisponibilità di farmaci di classe III può diminuire in presenza di pasti molto ricchi di grassi: questo si può verificare a causa dell'inibizione dell'*uptake* dei trasportatori nell'intestino normalmente utilizzati da questo tipo di farmaci;
- per i farmaci di classe IV l'effetto provocato dalla presenza di cibo è difficile da prevedere, in generale sarà più facile che si verifichi un aumento della loro biodisponibilità, dato della combinazione della solubilizzazione del farmaco nell'intestino e dell'inibizione dell'efflusso (Colombo P. et al., 2015).

1.3.2 Proprietà chimico-fisiche del farmaco che influenzano l'assorbimento gastrointestinale

Le proprietà chimico-fisiche di un farmaco rilevanti ai fini del processo di diffusione passiva attraverso le membrane intestinali sono fortemente correlate tra loro e con i fattori fisiologici. Esse comprendono: la lipofilia, il coefficiente di ripartizione, la

solubilità/velocità di dissoluzione, la pK_a , le dimensioni molecolari e la stabilità chimica (Colombo P. et al., 2015).

1.3.2.1 Lipofilia

Come già descritto in precedenza, data la composizione lipidica della membrana cellulare, la molecola deve possedere un'adeguata affinità per le fasi lipidiche in modo da poter diffondere attraverso di essa secondo gradiente di concentrazione.

Però, la regola che una maggior liposolubilità comporti una maggior permeabilità/assorbibilità non è valida, in realtà è più importante un adeguato rapporto tra la liposolubilità e l'idrosolubilità della molecola. Infatti, un'elevata solubilità nei lipidi non favorisce la diffusione attraverso la membrana se la solubilità in acqua non assicura il passaggio del farmaco dalla membrana al compartimento acquoso ricevente; inoltre, se l'affinità del farmaco per la membrana fosse troppo elevata esso potrebbe rimanere nella membrana e non permetterne il passaggio attraverso di essa. Il rapporto tra la liposolubilità e l'idrosolubilità della molecola è espresso dal coefficiente di partizione olio/acqua che è il rapporto tra le concentrazioni che il farmaco assume in due fasi immiscibili tra loro: una fase idrofila (acqua o tampone) ed una fase lipofila (cicloesano, etere, olio) che simula la frazione lipidica delle membrane biologiche. La maggior parte dei farmaci sono elettroliti deboli in grado di dissociarsi in ambiente acquoso e quindi se un soluto è ionizzabile esisterà in forma dissociata ed indissociata che risulta essere la sola in grado di ripartirsi tra la fase acquosa e la fase oleosa. È quindi di fondamentale importanza che la struttura di un farmaco permetta quanto più possibile la diffusione passiva attraverso le membrane lipidiche, in modo che possa sfruttare al massimo l'area utile per l'assorbimento. Anche il trasporto attivo mediante carrier rappresenta una possibilità, ma soggetta a molte variabili. In ogni caso il farmaco non dovrebbe essere substrato di sistemi di efflusso, come la glicoproteina P, che riducono la permeabilità effettiva attraverso la barriera gastrointestinale (Liu X. Et al., 2011; Amorosa M., 2021, Florence A.T. e Attwood D.,2006).

1.3.2.2 Solubilità e velocità di dissoluzione

Un'altra proprietà chimico-fisica di un farmaco rilevante ai fini dell'assorbimento intestinale è la solubilità nei fluidi biologici (pH compreso tra 1 e 7.5) che, sfortunatamente, è inversamente correlata alla lipofilia. I farmaci somministrati in una forma farmaceutica solida devono innanzitutto disciogliersi nei fluidi biologici per poter essere assorbiti. La velocità di dissoluzione rappresenta quindi, insieme alla permeabilità e alla solubilità, un

altro fondamento su cui si regge la biodisponibilità di un farmaco somministrato per via orale. Nel caso in cui farmaci scarsamente solubili siano somministrati in forma di sospensione, compressa o capsula, la velocità di dissoluzione delle particelle solide di farmaco può essere il passaggio limitante per la comparsa di farmaco immodificato nel circolo sistemico. In tali casi, la biodisponibilità dipende da quanto velocemente il farmaco si discioglie nei fluidi gastrointestinali, cioè è limitata dalla velocità di dissoluzione. Pertanto, i fattori che influenzano la velocità di dissoluzione del farmaco nei fluidi gastrointestinali, ne influenzano anche la biodisponibilità.

Il processo di dissoluzione di una particella sferica di farmaco nei fluidi gastrointestinali può essere descritto dall'equazione di Noyes-Whitney (1.1):

$$\frac{dm}{dt} = \frac{DA}{h}(C_s - C) \quad (1.1)$$

dove:

$\frac{dm}{dt}$ = velocità di dissoluzione del farmaco;

D = coefficiente di diffusione del farmaco;

A = area superficiale effettiva delle particelle di farmaco a contatto con il fluido gastrointestinale;

h = spessore dello strato di diffusione intorno a ciascuna particella di farmaco;

C_s = concentrazione di saturazione, solubilità del farmaco (concentrazione del farmaco all'interfaccia solido-liquido);

C = concentrazione del farmaco nel bulk della soluzione.

Tale equazione spiega l'influenza di vari fattori chimico-fisici e fisiologici sulla velocità di dissoluzione di farmaci nel tratto gastrointestinale, tra questi fattori annoveriamo le dimensioni particellari e le proprietà dello stato solido (struttura e *habitus* cristallino) del farmaco (Amorosa M., 2021).

Prendiamo ora in considerazione le condizioni fisiologiche del tratto gastrointestinale che influenzano alcuni parametri dell'equazione di Noyes-Whitney e, di conseguenza, anche la velocità di dissoluzione:

- il coefficiente di diffusione *D* del farmaco nei fluidi gastrointestinali può diminuire a causa della presenza di sostanze che aumentano la viscosità del fluido gastrointestinale come, per esempio, la presenza di cibo nel tratto gastrointestinale;

- lo spessore dello strato di diffusione h è influenzato dal grado di agitazione a cui è sottoposta ogni particella di farmaco nel tratto gastrointestinale: un aumento nella motilità gastrica e/o intestinale può portare a un aumento della velocità di dissoluzione di farmaci;
- la concentrazione C del farmaco in soluzione nei fluidi gastrointestinali sarà influenzata da fattori quali: la velocità di rimozione del farmaco dissolto, dovuta all'assorbimento, e il volume dei fluidi disponibili alla dissoluzione che nello stomaco sarà a sua volta influenzato dall'ingestione di fluidi con la dieta.

Questo processo sopradescritto è un passaggio limitante per l'assorbimento di farmaci poco solubili in acqua e altamente lipofili. Per ovviare a questa limitazione, si è studiata la biodisponibilità di questi farmaci quando vengono somministrati in formulazioni lipidiche che di fatto rappresentano una delle strategie attuabili per aumentare la solubilità di questi farmaci. È importante quindi analizzare il metabolismo dei lipidi per poter successivamente apprendere i fenomeni che ne stanno alla base e il modo con il quale essi migliorino l'assorbimento gastrointestinale di questi farmaci altamente lipofili (Florence A.T. e Attwood D., 2006).

1.4 Il metabolismo lipidico

Molecole lipofile possono sfruttare il metabolismo lipidico per il loro assorbimento. La digestione dei lipidi prevede tre processi sequenziali che comprendono:

- 1) la dispersione dei globuli di grasso in un'emulsione grossolana avente un'elevata area superficiale;
- 2) l'idrolisi enzimatica dei trigliceridi all'interfaccia olio/acqua;
- 3) la dispersione dei prodotti di digestione lipidica in una forma assorbibile.

La digestione lipidica inizia ad opera delle lipasi linguali e gastriche, secrete rispettivamente dalle ghiandole salivari e dalla mucosa gastrica. Questi enzimi provvedono all'idrolisi di una limitata quantità di trigliceridi, portando alla formazione del corrispondente di-gliceride e dell'acido grasso all'interno dello stomaco. Il passaggio di questi prodotti nel duodeno promuove la formazione di un'emulsione grezza. In questo sito, la presenza di lipidi stimola la secrezione di sali biliari, lipidi biliari e succhi pancreatici, che possono alterare marcatamente la forma chimica e fisica dell'emulsione di di- e trigliceridi. I lipidi biliari ed i chilomicroni secreti si legano alla superficie dei di- e trigliceridi emulsionati, incrementando la stabilità e riducendo le dimensioni delle gocce di

emulsione. La digestione viene completata dall'azione della lipasi pancreatiche, un enzima interfacciale in grado di agire sulla superficie delle gocce di trigliceridi emulsionate, per produrre il corrispondente 2-monogliceride e due acidi grassi. Dato che né i lipidi non digeriti né i loro prodotti di scissione, prevalentemente acidi grassi liberi, sono idrosolubili, l'attività solvente dei sali biliari risulta essenziale. Questi ultimi infatti sono in grado di sostenere l'emulsione dei grassi, un processo importante dato che la superficie relativamente elevata delle goccioline di emulsione favorisce la lipolisi ed inoltre rappresentano il presupposto della formazione di micelle a partire dai prodotti della lipolisi. Più precisamente i prodotti di digestione producono una struttura liquida cristallina, che in presenza di una quantità sufficiente di sali biliari forma strutture micellari unilamellari e multilamellari. I sali biliari e le terminazioni polari dei monogliceridi, dei fosfolipidi e del colesterolo si orientano all'esterno verso la fase acquosa, mentre i lipidi apolari, le vitamine liposolubili e gli esteri del colesterolo costituiscono il nucleo delle micelle (**Figura 1.4**).

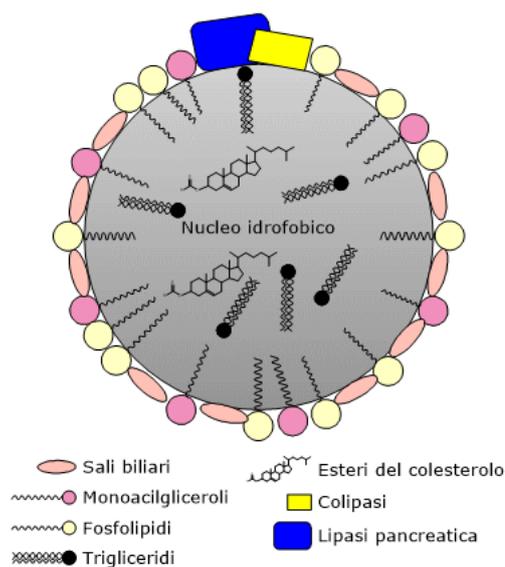


Figura 1.4. Struttura delle micelle che si formano durante la digestione lipidica.

Con un diametro inferiore a 50 nm le micelle sono in grado di passare fra i microvilli dell'orletto a spazzola del duodeno e dell'ileo, per poi posizionarsi in prossimità della membrana luminale. Il pH acido presente in prossimità della superficie dell'enterocita, a livello della parete intestinale, provoca la dissociazione delle micelle ed il rilascio dei monomeri lipidici, che si trovano in una fase intermicellare facilmente assorbibile

(O'Driscoll C. M., 2002). I sali biliari non vengono introdotti nella cellula, ma vengono liberati nel lume, dove saranno nuovamente disponibili per la formazione di nuove micelle, oppure saranno assorbiti in corrispondenza dell'ileo terminale (Klinke R. e Silbernagl S.,1999).

1.5 Assorbimento intestinale linfatico dei farmaci

Il sistema linfatico è una rete di vasi nella quale avviene il drenaggio di liquidi provenienti dai diversi distretti dell'organismo. La linfa non segue il sistema circolatorio, non è spinta dall'attività cardiaca, ma scorre nei vasi grazie al continuo afflusso di liquidi dagli spazi interstiziali e dalla contrazione della muscolatura scheletrica e viscerale che ne permettono lo scorrimento anche contro gravità. La linfa, quindi, non scorre in un sistema a circuito chiuso ma in una via a senso unico che drena il liquido proveniente dagli spazi interstiziali per riportarlo dalla periferia verso il centro, bypassando il fegato. La linfa è un liquido simile al plasma contenente zuccheri, proteine, sali, lipidi, amminoacidi, ormoni, vitamine, globuli bianchi e, rispetto al sangue è particolarmente ricca di lipoproteine. La sua composizione è variabile in base al distretto dal quale proviene e dalla concentrazione di soluti presenti nel sangue e nei tessuti in un determinato momento. Le radici dell'apparato vascolare linfatico si trovano in corrispondenza degli spazi interstiziali dei vari tessuti e sono rappresentate da piccole digitazioni dalle quali originano i capillari linfatici. La linfa che deriva dall'intestino è particolarmente ricca di chilomicroni, i quali per la loro natura lipidica permeano negli spazi interstiziali per essere poi drenati dal sistema linfatico. Lungo il decorso dei vasi collettori sono intercalati i linfonodi nei quali i vasi collettori sono organizzati in una fitta rete di sinusoidi a struttura reticolare, nelle cui maglie si trovano numerosi fagociti. I linfonodi sono la sede di purificazione da particelle di rifiuto, agenti infettivi e microrganismi patogeni, nonché deputati alla produzione di linfociti. Le principali funzioni di questo apparato sono:

- regolare la distribuzione della massa liquida nell'organismo opponendosi ad eccessivi accumuli di fluidi nei tessuti;
- contribuire alle difese organiche grazie dell'attività fagocitaria dei linfonodi e della produzione di anticorpi da parte di linfociti che sono espressi lungo le vie linfatiche;
- intervenire nel trasporto di lipidi provenienti dall'assorbimento intestinale.

La via linfatica intestinale ha un ruolo fondamentale nell'assorbimento di sostanze lipidiche (es. acidi grassi a lunga catena, vitamine liposolubili) e quindi può risultare importante anche per farmaci lipofili. Infatti, mentre principi attivi idrofili, somministrati oralmente,

hanno accesso alla circolazione sistemica tramite la via portale, quelli altamente lipofili possono giungere direttamente alla circolazione utilizzando la via linfatica (Humberstone A.J. e Charman W.N., 1997). Il vantaggio dell'assorbimento del farmaco attraverso il sistema linfatico intestinale è quello di poter bypassare il meccanismo di primo passaggio epatico. Tuttavia, ciò che limita maggiormente questa via è il fatto che il flusso attraverso i vasi linfatici, rispetto a quelli sanguigni, è molto più basso. I requisiti fondamentali perché un farmaco possa raggiungere il sistema linfatico dopo somministrazione orale sono: possedere un $\log P > 5$ e una solubilità nei trigliceridi di almeno 50 mg/ml (Khan A.A., et al., 2013).

Le vie d'accesso per raggiungere il sistema linfatico intestinale sono tre:

- la via paracellulare in quanto la struttura porosa dei capillari linfatici rende possibile il passaggio di macromolecole idrofiliche e coniugati macromolecolari;
- il passaggio attraverso il tessuto linfoepiteliale (GALT);
- la via transcellulare che utilizza sistemi di trasporto lipidici.

Quest'ultima è la più importante per l'assorbimento linfatico di composti di natura lipofila ed il grado di assorbimento attraverso questa via è influenzato dal tipo di trasportatore lipidico utilizzato.

I trigliceridi a media catena (MCT) possono essere assorbiti direttamente, mentre quelli a catena lunga (LCT) prevedono un passaggio a stadi intermedi, fino ad essere inglobati nelle micelle e solo a questo punto entrano nella circolazione linfatica (**Figura 1.5**).

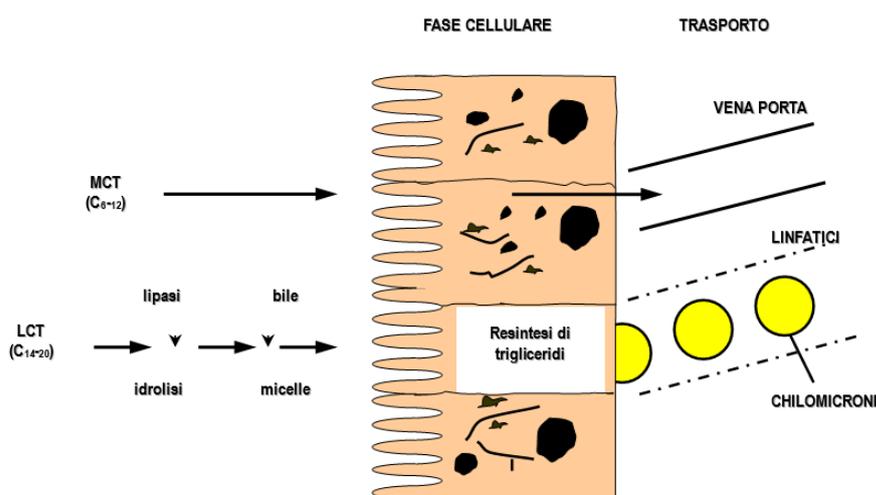


Figura 1.5. Fasi coinvolte nell'assorbimento di trigliceridi a media (C6-C12) (MCT) e lunga catena (C14-C20) (LCT).

Le ipotesi di penetrazione dei lipidi micellari nelle cellule della mucosa, per il raggiungimento della circolazione linfatica, sono due: l'intera micella può essere assorbita, con il ritorno al lume dei sali biliari; alternativamente, solo i lipidi possono essere assorbiti e i sali biliari trattenuti nel lume intestinale (Florence A.T. e Attwood D., 2006).

CAPITOLO 2

STRATEGIE PER INCREMENTARE LA BIODISPONIBILITA' DI FARMACI POCO SOLUBILI

È stato stimato che circa il 60-70% dei medicinali sono costituiti da molecole non sufficientemente solubili in mezzi acquosi e/o hanno una permeabilità molto bassa per consentire un adeguato e riproducibile (alta variabilità intra- e inter-soggetto) assorbimento nel tratto gastrointestinale dopo somministrazione orale e presentano spesso anche una mancanza di rapporto proporzionale dose-effetto terapeutico (Gupta S. et al., 2013; Gershanik T. e Benita S., 2000; Kommuru T.R. et al., 2001).

Ne consegue che la formulazione di queste molecole richiede una particolare attenzione da parte dei formulatori che dovranno adottare delle strategie per migliorarne la biodisponibilità.

La biodisponibilità di farmaci poco solubili in acqua può essere migliorata innanzitutto evitando, almeno parzialmente, il lento processo di dissoluzione degli stessi. A tale scopo possono essere impiegati diversi approcci che possono essere distinti in tre principali gruppi che prevedono:

- modifiche di tipo chimico;
- modifiche di tipo fisico;
- strategie di tipo formulativo (Zhao J. et al., 2019; Passerini N. et al., 2012; Khadka P. et al, 2014).

Questi diversi approcci verranno trattati brevemente nei paragrafi successivi.

2.1 Strategie per incrementare la solubilità dei farmaci

2.1.1 Strategie che prevedono modifiche di tipo chimico

La solubilità in mezzo acquoso di alcune molecole può essere incrementata apportando delle modifiche chimiche a regioni della molecola diverse dal gruppo farmacoforo. Questo approccio risulta essere quello più dispendioso in termini di tempo e risorse e comporta generalmente:

- l'inserimento di gruppi ionizzabili o polari all'interno della struttura;

- la formazione di sali;
- la realizzazione di pro-farmaci.

I gruppi chimici generalmente introdotti sono: ammine, ammidi, gruppi alcolici, acidi carbossilici, acidi sulfonici, gruppi fosfato. Questi gruppi sono ionizzabili oppure sono in grado di formare legami idrogeno relativamente forti; i gruppi acidi e basici sono utili per la formazione di sali. Il tipo di gruppo selezionato dipende anche dal tipo di legame chimico richiesto. Gruppi che sono direttamente legati a scheletri carboniosi del composto di base tramite legami poco reattivi di tipo C-C, C-O, C-N, sono difficilmente scindibili, invece gruppi legati tramite legami esterei, amidici, fosfato, solfato o glicosidici sono più facilmente metabolizzati per riformare il composto di partenza nel momento in cui il derivato è trasferito dal sito di somministrazione al sito d'azione. Composti con questo tipo di gruppi solubilizzanti sono veri e propri profarmaci, che sono in genere inattivi o significativamente meno attivi del composto di partenza. Una volta somministrati, i profarmaci sono metabolizzati *in vivo* nella forma attiva del composto. La velocità di ricostituzione del composto di partenza dipende, oltre che dal tipo di legame chimico, anche dalla via di somministrazione, che può influenzare in maniera significativa l'attività del farmaco. Al fine di mantenere l'attività mostrata dal composto di riferimento, il gruppo solubilizzante dovrebbe essere inserito in una parte della molecola non implicata nell'attività farmacologica, non coinvolta cioè nell'interazione farmaco-recettore. Di conseguenza, il metodo utilizzato per introdurre un nuovo gruppo solubilizzante e la sua posizione all'interno della molecola dipenderanno dalle reattività relative del farmacoforo e della restante porzione della molecola (Vietti B., 2009).

2.1.2 Strategie che prevedono modifiche di tipo fisico

La solubilità in mezzo acquoso di alcune molecole può essere incrementata apportando delle modifiche di tipo fisico, tra le quali si ricordano:

- la riduzione delle dimensioni particellari;
- la ricristallizzazione;
- la precipitazione controllata (Khadka P. et al, 2014).

2.1.2.1 Riduzione delle dimensioni particellari

La biodisponibilità di un farmaco scarsamente solubile può essere migliorata aumentando la sua solubilità apparente e la sua velocità di dissoluzione. Un modo per raggiungere questo scopo è rappresentato dalla riduzione delle dimensioni particellari, che inducono un significativo aumento dell'area superficiale e, di conseguenza, della velocità di

dissoluzione. La micronizzazione è il metodo maggiormente utilizzato a questo scopo e viene effettuata mediante riduzione meccanica delle dimensioni ad opera di molini. Tuttavia, l'incremento di area superficiale che si ottiene spesso non è sufficiente per assicurare una completa dissoluzione del farmaco in seguito a somministrazione orale e non è adatta a farmaci che necessitano di un elevato dosaggio. Inoltre, il processo di micronizzazione comporta una elevata dispersione di energia principalmente sotto forma di calore, deformazione elastica, attrito e frizione e di conseguenza si possono verificare:

- Interconversioni polimorfe del farmaco;
- Degradazione del farmaco;
- Formazione di cariche elettrostatiche sulla superficie del materiale;
- Peggioramento delle caratteristiche di bagnabilità;
- Peggioramento delle caratteristiche di scorrevolezza;
- Formazione di particelle che possono disperdersi nell'aria aumentando il rischio di contaminazione (Krishnaiah Y. S. R., 2010).

2.1.2.2 Ricristallizzazione

La tendenza di una sostanza a cristallizzare in differenti stati cristallini (polimorfi) è detta polimorfismo. Nello stato solido, infatti, le differenti disposizioni di molecole o ioni nel reticolo comportano energie di interazione differenti; il polimorfo più stabile sarà rappresentato dalla forma a più bassa energia e gli altri polimorfi tenderanno a trasformarsi in esso. Una fase solida cristallina può organizzarsi in un reticolo cristallino in modo diverso, dando luogo a forme cristalline dette polimorfe. Circa i 2/3 delle sostanze organiche presentano il fenomeno del polimorfismo. Le varie forme cristalline differiscono per l'attività termodinamica e sono considerate polimorfe le forme che hanno elevata attività termodinamica. Polimorfi di una stessa molecola possono avere differenti proprietà chimiche e fisiche quali punto di fusione, reattività chimica, solubilità apparente, velocità di dissoluzione, proprietà ottiche ed elettriche, pressione di vapore e densità. Queste proprietà hanno conseguenze dirette sulle caratteristiche del prodotto farmaceutico quali stabilità, dissoluzione e biodisponibilità. Ovviamente ciò si riferisce alle forme farmaceutiche solide, ma può interessare anche le soluzioni, soprattutto quelle sature, in quanto, per esempio, per una variazione di temperatura, queste possono produrre precipitati polimorfi poco solubili rallentando così l'assorbimento.

Per studiare il polimorfismo di una sostanza è necessario valutare:

- numero di forme cristalline possibili ed intervallo di temperatura in cui sono stabili;
- esistenza di uno stato non cristallino (amorfo) e sua possibile utilizzazione in una forma

farmaceutica;

- esistenza di forme metastabili e possibilità di stabilizzarle;
- solubilità di ciascuna forma e studio della possibilità di ottenere cristalli puri di ciascuna forma;
- qualora la forma più solubile sia metastabile, occorre valutare se questa si mantiene tale anche dopo particolari processi di fabbricazione (micronizzazione, compressione, ecc.);
- studio della reattività con gli altri componenti la forma farmaceutica.

La selezione di un polimorfo altamente solubile dovrebbe essere fatta in accordo con le sue caratteristiche di stabilità fisica e chimica. Quindi, non può essere esclusa la possibilità di conversione di un polimorfo metastabile ad elevata energia in una forma cristallina a bassa energia scarsamente solubile, promossa da variazioni nelle condizioni ambientali, nei processi di fabbricazione o per effetto del tempo (Florence A.T. e Attwood D.,2006).

2.1.2.3 Precipitazione controllata

La precipitazione controllata è una tecnologia particolare con la quale si creano strutture cristalline dell'ordine dei nanometri che possiedono elevata velocità di dissoluzione. Questa tecnica viene realizzata sciogliendo il farmaco in un opportuno solvente e poi precipitandolo in presenza di una soluzione di inibitori della crescita dei cristalli. Le strutture nanoparticolate che si formano hanno dimensioni ridotte rispetto a quelle ottenute con tecnologie meccaniche di riduzione delle dimensioni. Il livello dei solventi residui è basso, e gli eccipienti utilizzati sono farmacologicamente accettati.

2.1.3 Strategie di tipo formulativo

Quando non è possibile introdurre un gruppo ionizzabile o polare all'interno della struttura di un composto farmacologicamente attivo, produrre un polimorfo più solubile o ottenere un incremento di solubilità sufficiente mediante micronizzazione, è necessario ricorrere a delle strategie formulative per incrementarne la solubilità.

A tale scopo è possibile impiegare diversi approcci formulativi che comprendono:

- l'introduzione di co-solventi;
- l'introduzione di sostanze per correggere il pH;
- la formazione di complessi del farmaco;
- la formazione di dispersioni solide;
- l'introduzione di tensioattivi;

- l'impiego di formulazioni lipidiche.

2.1.3.1 Introduzione di co-solventi

L'utilizzo di co-solventi può aumentare la solubilità del farmaco di diversi ordini di grandezza. In questo tipo di approccio, il farmaco poco solubile è prima dissolto in un solvente organico miscibile con l'acqua e successivamente viene aggiunto il mezzo acquoso. Alcuni dei più comuni co-solventi utilizzati in campo farmaceutico sono: propilene glicole, polietilene glicole ed etanolo. Principale problema correlato con l'uso di co-solventi risulta essere la precipitazione del farmaco con la diluizione dopo somministrazione. Inoltre, la tossicità dei co-solventi ne limita l'utilizzo a basse concentrazioni nella formulazione liquida finale (Vietti B., 2009).

2.1.3.2 Introduzione di sostanze per correggere il pH

Accanto ai processi di salificazione, la correzione del pH della formulazione rappresenta il più comune approccio per aumentare la solubilità di un farmaco; un intervallo di pH tra 2 e 11 è generalmente accettato per le formulazioni orali.

Per composti che possiedono gruppi ionizzabili come un acido carbossilico (HA), la solubilità varia in funzione del pH. Il pH di una soluzione di un acido debole è correlato al pK_a di tale gruppo e alla concentrazione delle forme ionizzata e non ionizzata, come espresso dall'equazione di Handerson-Hasselbach (2.1):

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{A^-}{HA}\right) \quad (2.1)$$

Se la molecola è solubilizzata ad un valore di pH diverso dal suo pK_a , la sua solubilità sarà modificata in quanto nuove forze intermolecolari, principalmente attrazioni ioniche, sono introdotte. Per esempio, un gruppo acido carbossilico (-COOH) ha un pK_a intorno a 4 e se il pH è portato al di sopra di 4 il gruppo -COOH è convertito nella forma -COO⁻. La carica negativa interagisce con le parziali cariche positive degli atomi di idrogeno delle molecole d'acqua.

L'effetto del pH sulla solubilità di acidi deboli può essere descritto dall'eq. 2.2:

$$pH_p = pK_a + \log\left(\frac{S-S_0}{S_0}\right) \quad (2.2)$$

dove pH_p è il pH al di sotto del quale l'acido in forma indissociata precipita dalla soluzione, S è la solubilità totale ed S_0 è la solubilità dell'acido indissociato. Si assume generalmente che la forma ionizzata sia completamente solubile.

Lo stesso concetto può essere descritto per una base debole dove pK_w è il pK dell'acqua, pK_b quello della base, pH_p è il valore di pH al di sopra del quale la base libera precipita

dalla soluzione (2.3) (Vietti B., 2009).

$$pH_p = pK_w + pK_b + \log\left(\frac{s_0}{s-s_0}\right) \quad (2.3)$$

2.1.3.3 Formazione di complessi del farmaco

Per aumentare la solubilità apparente del farmaco si può usare il metodo della complessazione in cui il farmaco viene complessato con delle sostanze mediante formazione di legami ad idrogeno e interazioni idrofobiche. Gli agenti complessanti più comunemente impiegati sono riassunti in **Tabella 2.1**.

Tabella 2.1. Principali complessi utilizzati e agenti complessanti.

Tipo di complesso	Esempio di complessante
Chelati	EDTA
Inclusione	Ciclodestrine
Complessi molecolari	Polimeri
Coordinazione	Clorurodiesaamino cobalto III
Metallo-olefine	Ferrocene

I complessi di inclusione con ciclodestrine sono sicuramente i più comuni e trovano impiego in molti prodotti già commercio. Le ciclodestrine (CD) sono prodotti di degradazione enzimatica dell'amido di patata o mais, ad opera della ciclodestrina-glicosil-transferasi. Chimicamente sono oligosaccaridi costituiti da unità di glucosio unite con legame α -1,4-glucosidico, formanti una struttura troncoconica (**Figura 2.1**) (Rowe R.C. et al., 2009).

Tutti gli ossidrili della struttura si trovano nella superficie esterna della molecola impartendole carattere idrofilo- invece la cavità interna è piuttosto idrofobica per la presenza di gruppi -CH- e per gli O glucosidici che con i loro doppietti liberi determinano alta densità elettronica conferendo alla sostanza un carattere di base di Lewis. Derivati delle ciclodestrine, quali l'idrossipropil- β -ciclodestrina, sono stati sviluppati per aumentare la loro solubilità o diminuirne la tossicità. Oltre alla loro capacità di aumentare la solubilità e la velocità di dissoluzione, le ciclodestrine trovano ulteriori applicazioni in campo farmaceutico, in quanto possono essere impiegate per aumentare la stabilità dei composti, ridurre l'evaporazione, trasformare liquidi ed oli in polveri scorrevoli o mascherare sapori e odori che risultano sgradevoli (Aulton M.E., Taylor K.M.G., 2018).

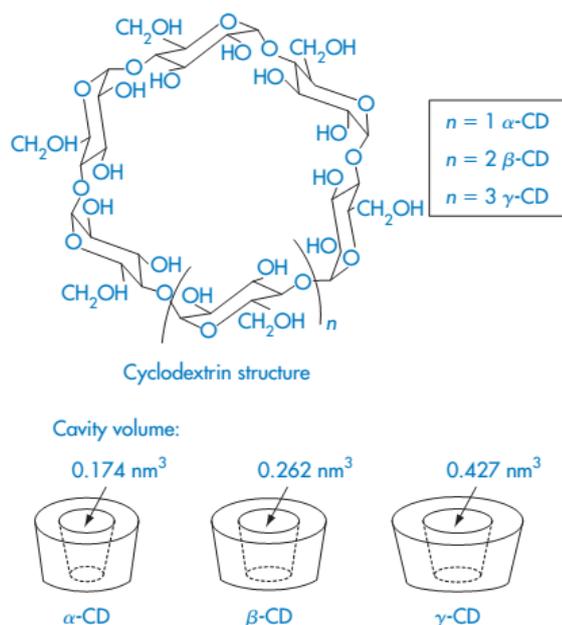


Figura 2.1: Struttura delle ciclodestrine α , β e γ (Aulton M.E. e Taylor K.M.G., 2018).

Tra le limitazioni nell'uso delle ciclodestrine ricordiamo:

- per avere l'inclusione del farmaco questo deve avere dimensioni idonee ad entrare nella cavità;
- non è una strategia adatta alla veicolazione di farmaci alto dosati;
- non sono adatte all'uso parenterale;
- le ciclodestrine naturali sono poco solubili e questo può portare ad una possibile instabilità dei complessi;
- hanno un costo relativamente elevato.

2.1.3.4 Formazione di dispersioni solide

Un altro approccio implica la formulazione di dispersioni solide del principio attivo in presenza di polimeri idrofili. Questo metodo fu sviluppato per la prima volta da Sekiguchi e Obi nel 1961 e consiste nella dispersione di uno o più ingredienti attivi in un carrier inerte, determinando la formazione di complessi a maggiore idrofilia accompagnati da riduzione del particle size del principio attivo e la sua completa amorfizzazione (Sekiguchi K. e Obi N., 1961). I principali metodi di allestimento delle dispersioni solide sono tre: il metodo della fusione, del solvente e della fusione-solvente. Nel metodo per fusione il principio attivo viene disperso/sciolto nel carrier precedentemente portato a fusione, seguito dal raffreddamento della miscela che poi viene macinata e setacciata per ottenere una polvere

con la granulometria desiderata. Questo metodo risulta semplice ed economico, ma presenta alcuni svantaggi come la temperatura di esercizio che, se alta, può determinare la decomposizione del principio attivo incorporato. Nel metodo del solvente invece il principio attivo e il carrier vengono prima solubilizzati in un solvente in cui entrambi sono solubili e poi co-precipitati. Anche questa tecnica presenta però delle limitazioni dovute all'alto costo di lavorazione, alla difficoltà di identificare un solvente comune, alla difficoltà di rimuovere completamente il solvente. Infine, nel metodo della fusione solvente si prevede la preventiva dissoluzione del principio attivo in una minima quantità di solvente, che successivamente viene incorporato nel carrier fuso (Craig D.Q., 2002; Le-Ngoc Vo C. et al., 2013). Tra gli eccipienti impiegati come *carriers* per la loro formulazione vanno ricordati: il polietilenglicole (PEG), il polivinilpirrolidone (PVP), il polivinilalcol (PVA), il polivinilacetato copolimero (PVP-PVA), l'idrossipropilmetil cellulosa (HPMC) e l'idrossipropil cellulosa (HPC) (Bhupendra G. P. e Madhabhai M. P., 2007).

2.1.3.5 Introduzione di tensioattivi

I tensioattivi sono composti anfifilici naturali o sintetici che agiscono all'interfaccia tra una fase acquosa e una lipofila. Molti tensioattivi possono anche assemblarsi in soluzione formando aggregati noti come micelle. La concentrazione alla quale i tensioattivi iniziano a formare micelle è detta concentrazione micellare critica (CMC). Quando le micelle si formano in acqua, le code apolari dei tensioattivi si assemblano a formare un core idrofobico, mentre le teste idrofiliche costituiscono un guscio esterno a contatto con l'acqua. I tensioattivi sono spesso classificati in quattro gruppi principali: anionici, cationici, non ionici, zwitterionici. Questi composti anfifilici possono essere impiegati per formare differenti tipi di formulazioni, permettendo la solubilizzazione di composti scarsamente solubili. I più utilizzati per la somministrazione orale sono i tensioattivi idrofilici non-ionici ad alto HLB come i Tween (esteri del sorbitano poliossietilenato) (Vietti B. 2009).

2.1.3.6 Formulazioni lipidiche

Le formulazioni lipidiche per la somministrazione orale di farmaci sono generalmente costituite da un principio attivo disciolto in una miscela di uno o più eccipienti, i quali possono essere trigliceridi, gliceridi parziali, tensioattivi o co-tensioattivi. Le formulazioni a base di lipidi comprendono diversi sistemi, comprese soluzioni, emulsioni, sistemi micellari, SEDDS e sistemi di somministrazione di farmaci auto-microemulsionanti (SMEDDS) (Holm R., 2019). Per un loro ottimale assorbimento questi sistemi sfruttano il

metabolismo lipidico e la via linfatica, ed in particolare, i processi di digestione lipidica che si verificano all'interno dell'intestino e che interessano non solo i grassi introdotti con la dieta, ma anche quelli utilizzati come carrier per farmaci lipofili. Un trattamento dettagliato di queste formulazioni sarà effettuato nel capitolo successivo.

CAPITOLO 3

FORMULAZIONI LIPIDICHE

3.1 Classificazione delle formulazioni lipidiche

Le formulazioni lipidiche per la somministrazione orale di farmaci sono generalmente costituite da un principio attivo disciolto in una miscela di uno o più eccipienti, i quali possono essere trigliceridi, gliceridi parziali, tensioattivi o co-tensioattivi. Il principale meccanismo d'azione mediante il quale una formulazione lipidica porta a una migliore biodisponibilità è solitamente quello di evitare il lento processo di dissoluzione che limita la biodisponibilità di farmaci idrofobici da forme di dosaggio solide. La formulazione consente al farmaco di rimanere in uno stato disciolto durante il suo transito nel tratto gastrointestinale (Holm R., 2019).

Pouton ha proposto un sistema di classificazione per le formulazioni lipidiche basato sia sulle dimensioni delle particelle disperse sia sulle caratteristiche chimico-fisiche dei componenti presenti nella formulazione (**Tabella 3.1**) (Pouton C.W., 2006; Pouton C.W., 2000).

Tabella 3.1. Classificazione delle formulazioni lipidiche (Pouton C.W., 2006; Pouton C.W., 2000).

Componente (%)	Formulazione lipidica			
	Tipo I	Tipo II	Tipo IIIA	Tipo IIIB
Fase lipofila	100	40-80	40-80	<20
Tensioattivo	-	20-60 (HLB<12)	20-40 (HLB>12)	20-50 (HLB>11)
Co-solvente idrofilico	-	-	0-40	20-50
Dimensioni particelle disperse (nm)	Grossolane	100-250	100-250	50-100

Le “formulazioni lipidiche di tipo I” sono quelle costituite dal farmaco solubilizzato in trigliceridi e/o miscele di gliceridi. Questi sistemi semplici vengono utilizzati come carrier per i farmaci lipofili ed i lipidi sono generalmente rappresentati da oli vegetali o trigliceridi a media catena, come per esempio le frazioni dell’olio di cocco, olio di girasole e semi di soia. La biodisponibilità dei principi attivi somministrati in questo tipo di soluzioni oleose è generalmente buona perché i trigliceridi sono rapidamente degradati ad acidi grassi liberi

e 2-monogliceridi che vengono facilmente solubilizzati per formare dispersioni colloidali all'interno di micelle costituite da sali biliari e lecitina. In questo modo le micelle possono costituire un sistema *reservoir* per il farmaco solubilizzato. Ciò nonostante, la bassa capacità solvente dei trigliceridi spesso ostacola la formulazione di queste soluzioni, che rimangono una scelta valida solo per farmaci attivi a basso dosaggio e, di conseguenza, ad eccezione di un ampio utilizzo nella somministrazione delle vitamine liposolubili A e D, pochi farmaci sono stati formulati con questo tipo di sistemi. Queste formulazioni semplici trovano impiego per la veicolazione di farmaci potenti o con un $\log P > 4$. Un incremento della capacità solvente dei trigliceridi può essere ottenuto addizionando altri eccipienti lipofili, come per esempio sostituendo i trigliceridi con miscele di mono e di-gliceridi (Pouton C.W., 2006; Holm R., 2019). L'inserimento nelle formulazioni lipidiche di un tensioattivo è legato alla sua natura anfifilica, espressa in termini di equilibrio fra porzioni idrofobiche ed idrofiliche presenti nella molecola, la quale conferisce le seguenti proprietà alle formulazioni lipidiche:

- un aumento della quantità di farmaco lipofilo solubilizzato;
- la capacità di formare delle emulsioni nel tratto gastro-intestinale;
- la capacità di interagire con le membrane biologiche con variazione dell'integrità e conseguente aumento della permeabilità o interazione con le glicoproteine P. Questa perturbazione di membrana ad opera dei tensioattivi è dovuta alla probabile solubilizzazione e successiva precipitazione dei fosfolipidi. Una consistente variazione della permeabilità incide notevolmente sull'assorbimento, e quindi anche sull'attività farmacologica della formulazione lipidica;
- un effetto a livello del legame con il recettore sul metabolismo enzimatico del farmaco modificandone l'eliminazione.

Le "formulazioni lipidiche di tipo II" sono costituite da una miscela di trigliceridi a media catena e/o mono- o di-gliceridi e tensioattivi con HLB generalmente inferiore a 12. Queste formulazioni lipidiche generano un'efficiente dispersione iniziale della fase oleosa di diametro compreso tra 100 e 250 nm; ciò fornisce una superficie più ampia in cui la lipasi pancreatico può interagire, portando a una velocità di digestione più rapida rispetto alle formulazioni lipidiche di tipo I e una biodisponibilità maggiore di quella ottenibile da una semplice soluzione oleosa. Questa classe fa riferimento soprattutto a sistemi auto-emulsionanti, i cosiddetti *self-emulsifying drug delivery systems* (SEDDS), che sono in grado di emulsionarsi in presenza di un mezzo acquoso in condizioni di blanda agitazione. Al contrario delle emulsioni normali, queste microemulsioni si formano spontaneamente

perché sono termodinamicamente stabili grazie ad un ridotto volume della fase oleosa dispersa ed uno stretto range di distribuzione delle dimensioni delle goccioline. Infatti, in seguito ad una somministrazione orale, i sistemi auto-emulsionanti si disperdono nello stomaco dove formano un'emulsione fine; in questo caso la motilità dello stomaco e dell'intestino può provvedere all'agitazione necessaria per la loro auto-emulsione. I principali fattori in grado di controllare la velocità di rilascio del principio attivo dalla fase oleosa alla fase acquosa sono:

- capacità della formulazione di formare emulsioni con distribuzione uniforme delle dimensioni (<5 μm);
- la polarità delle goccioline di olio risultanti che promuovono un rilascio rapido del farmaco nella fase acquosa; la polarità delle goccioline sarà funzione del tensioattivo ed in particolare dipenderà dal suo HLB, dalla lunghezza della catena e dal grado di insaturazione dell'acido grasso coinvolto, dal peso molecolare della porzione idrofila e dalla concentrazione.

Le “formulazioni lipidiche di tipo III” si suddividono in IIIA e IIIB. Le formulazioni di tipo IIIA si differenziano da quelle di tipo II per l'aggiunta di co-solventi o co-tensioattivi idrofili, i quali hanno lo scopo di aumentare la solubilità del principio attivo nella formulazione ma mantengono lo stesso grado di dispersione (100-250 nm). Le formulazioni lipidiche di tipo IIIB presentano invece caratteristiche idrofile più accentuate, dovute ad una percentuale di co-solventi idrofili più elevata, e sono costituite quasi esclusivamente da gliceridi semplici; questo comporta la formazione di microemulsioni del diametro di circa 50-100 nm. Questi sistemi spesso vengono chiamati sistemi auto-microemulsionanti (SMEDDS) (Pouton C.W., 2000).

Come già accennato precedentemente, i sistemi auto-emulsionanti sono miscele isotropiche fisicamente stabili di olio, tensioattivo, co-tensioattivo e farmaco solubilizzato che quando introdotti in fase acquosa e sotto blanda agitazione formano rapidamente e spontaneamente emulsioni, microemulsioni o nanoemulsioni. Così, le formulazioni auto-emulsionanti sono facilmente disperse nel tratto gastrointestinale, dove la motilità dello stomaco e dell'intestino tenue fornisce l'agitazione necessaria per l'emulsione (Gupta S. et al., 2013).

I potenziali vantaggi di questi sistemi sono:

- ottenimento di una formulazione fisicamente stabile che può essere riempita anche in capsule;
- non è richiesto nessun passaggio di dissoluzione;

- formazione di goccioline dimensioni submicroniche, quindi aumento della superficie di assorbimento, aumento della velocità e dell'estensione di assorbimento e di conseguenza una maggiore biodisponibilità.
- protezione contro la degradazione gastrica;
- facilità di produzione.

I SEDDS si sono rivelati utili per somministrare efficacemente i farmaci in Classe II, III e IV del sistema di classificazione BCS (Gupta S. et al., 2013; Tran P. e Park J-S., 2021).

3.2 Materie prime per le formulazioni lipidiche

3.2.1 Fasi oleose

I potenziali eccipienti che possono essere utilizzati per costituire la fase oleosa sono riassunti in **Tabella 3.2**.

Tabella 3.2. Principali sostanze che trovano impiego come fasi oleose nelle formulazioni lipidiche.

Tipo di carrier	Prodotto
Acidi grassi	Oleico, caprilico, eicosapentaenoico, gamma linolenico
Gliceridi idrogenati	Gliceridi idrogenati di cocco
Macrogliceridi	Laroil macrogliceride Stearoil macrogliceride Caprilocaproil macrogliceride
Mono-di-trigliceridi	Digliceril caprilato, gliceril caprilato, gliceril monocaprilato, gliceril monodicaprilato, gliceril monolaurato, triglicerid dell'acido miristico, trigliceridi a media catena
Oli vegetali	Di semi di soia, di girasole, di cocco
Poliglicerol esteri di acidi grassi	Poligliceril oleato
Esteri propilenglicolici di acidi grassi	Propilenglicole dicaprilato/caprato

L'olio rappresenta uno degli eccipienti più importanti nelle formulazioni auto-emulsionanti perché può solubilizzare quantità marcate di farmaco lipofilo, facilitare l'auto-emulsione e aumentare la frazione di farmaco lipofilo trasportato attraverso il sistema linfatico intestinale, aumentando così l'assorbimento dal tratto gastrointestinale a seconda

della natura del trigliceride (Gupta S. et al., 2013). A tale scopo in passato venivano utilizzati soprattutto oli vegetali che oggi vengono invece sostituiti con derivati semisintetici. In particolare, possono essere utilizzate diverse miscele di oli costituite da trigliceridi a corta, media e lunga catena e con diversi gradi di insaturazione. La distribuzione del farmaco tra sangue e linfa e di conseguenza il profilo di assorbimento che si otterrà sarà influenzato dalla lunghezza della catena di acidi grassi legati ai trigliceridi, dal loro grado di insaturazione e dalla quantità di lipidi. Infatti, gli acidi grassi a corta e media catena vengono direttamente trasportati nel sangue attraverso la vena porta, mentre quelli a lunga catena devono essere prima esterificati e poi possono raggiungere, mediante i chilomicroni, il sistema linfatico.

La presenza di lipidi all'interno della formulazione comporta:

- un'alterazione delle proprietà biofarmaceutiche;
- un aumento della permeabilità intestinale;
- una protezione contro gli attacchi enzimatici;
- la formazione di lipoproteine che, a loro volta, permettono il trasporto nel sistema linfatico bypassando l'effetto di primo passaggio del fegato (**Figura 3.1**).

Ad esempio, i lipidi digeribili hanno dimostrato essere potenziatori notevolmente più efficienti dell'assorbimento di farmaci scarsamente solubili, rispetto ai lipidi non digeribili (ad es. paraffina liquida). Inoltre, è importante sottolineare che la biodisponibilità del farmaco da formulazioni lipidiche dipende da:

1. Tipo di lipide utilizzato nella formulazione: digeribile o non digeribile;
2. Lunghezza dell'acido grasso legato (trigliceridi a corta (SCT), media (MCT) o lunga catena (LCT));
3. Tipo di farmaco veicolato;
4. Dimensioni delle gocce che si formano (Mua H. et al., 2013).

I lipidi sono normalmente classificati in base alla loro struttura chimica, polarità e grado di interazione con l'acqua. Quando essi vengono utilizzati come veicoli è utile considerarli in termini di digeribilità:

- lipidi non digeribili, come l'olio di paraffina, rimangono non assorbiti nell'intestino e possono limitare/ridurre l'assorbimento del farmaco e perciò il farmaco non sarà biodisponibile totalmente;
- lipidi digeribili sono quelli assunti con la dieta (gliceridi, acidi grassi, fosfolipidi, colesterolo, esteri del colesterolo) ed altri derivati sintetici. (Mua H. et al., 2013).

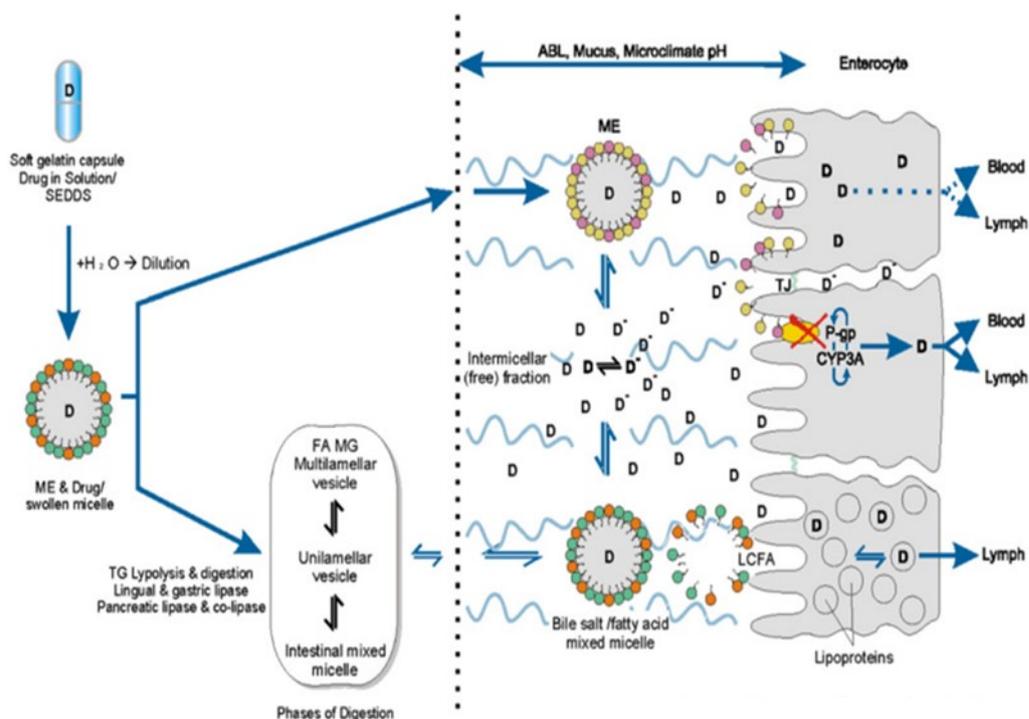


Figura 3.1. Rilascio e assorbimento di un farmaco somministrato in dispersione oleosa. I meccanismi con cui si ha un aumento dell'assorbimento del farmaco dovuto alla formulazione comprendono: A) aumento della fluidità della membrana che facilita l'assorbimento transcellulare; B) apertura delle tight junctions che portano ad un trasporto paracellulare; C) inibizione della glicoproteina-P; D) aumento del trasporto linfatico (ABL: strato acquoso; D: farmaco; D-: farmaco ionizzato; FA: acido grasso; MG: monogliceride; LCFA: acido grasso a lunga catena; ME: microemulsione; SEDDS: sistema auto-emulsionante; TG: trigliceride; TJ: tight junctions) (O'Driscoll C.M., 2002).

Acidi grassi e loro gliceridi variano in lunghezza e in grado di saturazione della catena di idrocarburi. Questi fattori, in aggiunta al grado di esterificazione degli acidi grassi influenzano la digestione dei lipidi. Il livello e l'estensione della digestione dei lipidi, la fase colloidale formata e gli effetti farmacologici dei prodotti di digestione possono tutti influenzare l'assorbimento del farmaco dal veicolo.

Diversi studi hanno messo in evidenza l'effetto esercitato dall'utilizzo di veicoli lipidici digeribili e non digeribili sull'assorbimento di molecole lipofile (SL-512, penclomedina, ecc.....). In generale è stato osservato che i lipidi digeribili portano ad un aumento della biodisponibilità orale della sostanza veicolata (de Smidt et al., 2004). La biodisponibilità orale di farmaci somministrati all'interno di formulazioni lipidiche sembra inoltre influenzata dalla velocità con la quale il lipide viene digerito. In letteratura viene riportato infatti un incremento della biodisponibilità della penclomedina quando somministrata con trigliceridi a media catena (MCT) rispetto a quando somministrata con trigliceridi a lunga

catena (LCT) a causa della lenta ed incompleta digestione di questi ultimi (de Smidt et al., 2004). La bassa disponibilità della tributirina veicolata invece in trigliceridi a catena corta (SCT) è molto bassa e questo è stato spiegato dagli autori dal fatto che il rapido rilascio del farmaco a livello intestinale promuove una sua rapida degradazione.

Una notevole influenza sulla biodisponibilità dei farmaci somministrati mediante le formulazioni lipidiche è legata al loro fenomeno di emulsione nel tratto gastro-intestinale, responsabile di un notevole incremento dell'area superficiale disponibile al rilascio del farmaco. La presenza di tensioattivi esogeni facilita l'emulsione ed influenza l'assorbimento del farmaco principalmente alterando la superficie del lipide emulsionato. Un efficace emulsione farà aumentare la superficie dell'area di legame del complesso lipasi/colipasi, facilitando così la cinetica della digestione (Tran P., Park J-S., 2021).

3.2.2 Tensioattivi

I tensioattivi usati in queste formulazioni non sono semplici eccipienti ma possono influenzare anche gli aspetti biofarmaceutici; per esempio, possono aumentare la biodisponibilità attraverso vari meccanismi, tra cui l'aumento della dissoluzione del principio attivo, l'aumento della permeabilità della membrana intestinale mediante interruzione dell'organizzazione strutturale del doppio strato lipidico, l'aumento della permeabilità delle *tight junctions* e l'inibizione della glicoproteina P (**Figura 3.1**) (O'Driscoll C.M., 2002).

La scelta di un tensioattivo per uso farmaceutico implica una considerazione sulla tossicità della sostanza, in quanto deve essere ingerita in grande quantità. Si è visto che gli emulsionanti di origine naturale (ad es. lecitina) sarebbero normalmente preferiti in quanto considerati essere più sicuri dei tensioattivi sintetici; tuttavia, questi eccipienti sono poco efficaci. Ne consegue che la scelta ricade sui tensioattivi sintetici non ionici o *zwitterionici*, perché considerati meno tossici e meno sensibili ai cambiamenti di pH e forza ionica. La natura dei tensioattivi non ionici viene spesso espressa in termini di bilancio tra la porzione idrofila e lipofila della molecola, utilizzando la scala empirica ideata da Griffin, in particolare più basso è il valore di HLB, maggiore è la lipofilia del composto e viceversa. I tensioattivi non ionici più comunemente utilizzati per la formulazione di forme farmaceutiche sono gli esteri del sorbitano ed i polisorbati. Normalmente la concentrazione di tensioattivi più utilizzata in preparati orali è tra il 30-60%, oltre il quale si va incontro ad irritazione gastrica. Per un efficace assorbimento bisogna evitare la precipitazione dei componenti a livello del lume intestinale e fare in modo che questi stiano stabilmente in

soluzione così da garantire un lungo periodo di assorbimento. Esiste una importante relazione tra la concentrazione del tensioattivo e la dimensione delle goccioline dell'emulsione: in alcuni casi il tensioattivo può far diminuire la dimensione delle gocce, in altri la può aumentare. Tuttavia, le dimensioni estremamente ridotte delle goccioline lipidiche prodotte dopo la dispersione delle formulazioni auto-emulsionanti favoriscono un rapido svuotamento dello stomaco e un'ampia dispersione in tutto il tratto gastrointestinale, riducendo al minimo l'esposizione ad elevate concentrazioni di tensioattivi locali e quindi riducendo il potenziale di irritazione (Gupta S. et al., 2013).

3.2.3 Co-solventi

Al fine di incrementare la quantità di farmaco solubilizzato è possibile introdurre nella formulazione un co-solvente miscibile con la fase oleosa. Tra i co-solventi più utilizzati ricordiamo: etanolo, glicerolo, glicole propilenico e polietilenglicoli (PEG)-400 (Kalepun S. et al., 2013). La presenza del co-solvente non solo può incrementare la quantità di farmaco in soluzione ma può anche facilitare la dispersione della formulazione lipidica nel mezzo acquoso. Tuttavia, ci sono diversi limiti pratici relativi all'impiego di questi co-solventi, in particolare si può verificare la precipitazione del farmaco solubilizzato dal solvente a causa della perdita della capacità solvente di questo a seguito della diluizione in mezzo acquoso, o a causa della loro rapida evaporazione (alcoli). Bisogna inoltre ricordare che può essere difficile trovare dei co-solventi che siano miscibili con la fase oleosa prescelta e che spesso i co-solventi sono incompatibili con il materiale impiegato per realizzare le capsule (Hauss D.J., 2007).

3.2.4 Additivi

Dato che le fasi oleose e i tensioattivi possono contenere nella loro struttura acidi grassi insaturi, essi possono andare incontro ad ossidazione, con la conseguente formazione di specie di perossido altamente reattive. La formazione di perossido può essere dannosa non solo per la stabilità della sostanza farmaceutica formulata, ma ha dimostrato di causare la reticolazione della gelatina, con conseguente disintegrazione ritardata della capsula di gelatina che, a sua volta, può influenzare negativamente il rilascio del farmaco. L'ossidazione può essere controllata limitando, quando possibile, l'uso di lipidi insaturi, ma soprattutto mediante introduzione di antiossidanti liposolubili come α -tocoferolo, β -carotene, propilgallato, idrossiltoluene butilato (BHT) o idrossianisolo butilato (BHA) (Hauss D.J., 2007).

3.3 Sviluppo e caratterizzazione delle formulazioni lipidiche

La scelta di realizzare una formulazione lipidica viene effettuata per farmaci per i quali non è possibile o non è sufficiente applicare uno degli approcci formulativi convenzionali quali la riduzione delle dimensioni delle particelle, l'aggiunta di tensioattivi o la preparazione di sali per ottenere una biodisponibilità adeguata. Le formulazioni lipidiche vengono impiegate per i farmaci appartenenti alla classe II del sistema di classificazione BCS, ovvero per quei farmaci in cui la scarsa solubilità in acqua e la lenta velocità di dissoluzione ne limitano l'assorbimento (Hauss D.J., 2007).

I farmaci, dunque, che potenzialmente trovano beneficio nella veicolazione attraverso questo tipo formulazioni devono presentare un coefficiente di ripartizione ($\log P$) tra 0.8 e 7.5 (Ditzinger F. et al., 2019) e presentare una solubilità in eccipienti lipidici tale da consentire la somministrazione dell'intera dose di farmaco in una singola unità di dosaggio. Un altro indicatore del potenziale di successo di una formulazione lipidica è rappresentato dalla possibilità di disporre di dati sperimentali inerenti alla biodisponibilità della molecola in presenza ed in assenza di cibo. Un incremento di biodisponibilità legato alla concomitante somministrazione del farmaco in presenza di cibo, specialmente grasso, è indice che potenzialmente il farmaco può essere veicolato con successo in questo tipo di formulazioni.

In generale lo sviluppo di una formulazione lipidica prevede le seguenti fasi:

- *Selezione* degli eccipienti;
- *Design* e sviluppo della formulazione;
- Caratterizzazione *in vitro* della formulazione;
- Test *in vivo* della formulazione.

3.3.1 Selezione dei componenti

In una formulazione lipidica sono presenti diversi componenti quali: la fase oleosa, i tensioattivi, i co-tensioattivi e i co-solventi e la loro scelta sarà funzione della loro compatibilità, nonché della solubilità del principio attivo in ognuno di essi.

Generalmente vengono selezionati gli eccipienti in cui il principio attivo da veicolare presenta la solubilità maggiore. In condizioni ideali, infatti, il principio attivo si trova completamente solubilizzato all'interno della fase lipidica. Tuttavia, queste sono condizioni ideali e molte volte non vengono raggiunte a causa delle caratteristiche chimico-fisiche del principio attivo che talvolta si può venire a trovare parzialmente in sospensione. Individuati i potenziali tensioattivi, le fasi oleose, e i co-solventi sarà necessario valutare la miscibilità dei diversi componenti e successivamente sviluppare dei diagrammi di fase al fine di

determinare i limiti quantitativi dei diversi componenti in grado di portare alla formazione di formulazione in grado di auto-emulsionare (Franceschinis E. et al., 2015).

L'auto-emulsione infatti dipende da:

- La natura della coppia olio/tensioattivo;
- La concentrazione di tensioattivo;
- Il rapporto olio/tensioattivo;
- La temperatura in cui avviene l'auto-emulsione.

Le formulazioni ottenute dovranno essere poi caratterizzate *in vitro*.

3.3.2 Caratterizzazione *in vitro* delle formulazioni

La caratterizzazione *in vitro* di queste formulazioni risulta utile nel guidare lo sviluppo di una formulazione lipidica prima di procedere con la sperimentazione *in vivo* che sarà fondamentale nel determinare l'effettiva capacità della formulazione sviluppata di veicolare in modo adeguato il principio attivo.

La caratterizzazione *in vitro* delle formulazioni lipidiche comprende la determinazione di: la capacità di auto-emulsionare, le dimensioni delle goccioline disperse, la velocità di dissoluzione e/o la capacità di mantenere in soluzione il farmaco veicolato, la capacità di diffusione e la lipolisi.

3.3.2.1 Velocità di autoemulsione

La capacità di auto emulsionare e la velocità di auto-emulsione possono essere valutate diluendo la formulazione lipidica in mezzo acquoso in condizioni standard di temperatura e agitazione. Il tempo necessario alla dispersione completa della formulazione rappresenta il tempo di auto-emulsione. A seconda del tempo di emulsione le formulazioni autoemulsionanti vengono suddivise in cinque classi (A, B, C, D, E) (**Tabella 3.3**). Solo le formulazioni in grado di emulsionare con tempi inferiori ai 60 secondi (Gruppo A) possono essere considerate dei sistemi auto-emulsionanti.

Tabella 3.3. Classificazione delle formulazioni SEDDS in funzione dei tempi di emulsione (Khoo et al., 1998).

Gruppo	Disperdibilità e apparenza	Tempo di auto-emulsione(s)
A	La formulazione si disperde rapidamente in acqua formando una microemulsione chiara, trasparente e con riflessi azzurri.	<60
B	La formulazione si disperde formando un'emulsione leggermente meno chiara della precedente che si presenta bianco-azzurra.	<60
C	Si osserva la formazione di un'emulsione bianca ma non opaca (simile al latte).	<120
D	Si osserva la formazione di un'emulsione opaca, grigio-bianca che si disperde con fatica.	>120
E	La formulazione esibisce scarsa o minima capacità di emulsionare.	>300

3.3.2.2 Dimensione delle goccioline

Le dimensioni delle goccioline possono essere determinate mediante misure di *dynamic light scattering*.

3.3.2.3 Test di dissoluzione *in vitro*

Il test di dissoluzione *in vitro* viene realizzato per verificare la capacità della formulazione di rilasciare il principio attivo veicolato nel caso delle formulazioni lipidiche solide e/o per verificare la capacità di mantenere in soluzione il principio attivo veicolato nel caso delle formulazioni che si trovano in forma liquida. Tuttavia, data l'influenza notevole del metabolismo lipidico nell'assorbimento delle molecole veicolate in queste formulazioni, il test di dissoluzione viene effettuato in mezzi di dissoluzione che simulino le condizioni pre e post prandiali in termini di pH e di presenza di sali biliari. A tale scopo vengono generalmente impiegati quelli che vengono chiamati FaSSIF (*Fasted State Simulate Intestinal Fluid*) e FeSSIF (*Fed State Simulate Intestinal fluid*) che sono dei tamponi che vengono ampiamente descritti in letteratura e contengono sodio taurocolato e lecitina di soia come agenti emulsionanti per mimare l'azione dei sali biliari (Marques M., 2004; Klein S., 2010). In letteratura, tuttavia, viene riportato anche l'impiego di tamponi FaSSIF e FeSSIF semplificati nei quali sodio taurocolato e lecitina di soia sono sostituiti con il

Tween 80 e la trietanolamina. L'impiego di questi due eccipienti permette di ottenere dei tamponi con proprietà emulsionanti confrontabili a quelli contenenti sodio taurocolato, lecitina di soia e sali biliari riducendo notevolmente i costi della sperimentazione (Zoeller T. e Klein S., 2007). Le formulazioni semplificate dei tamponi FaSSIF e FeSSIF proposti da Zoeller T. e Klein S. sono riassunte in **Tabella 3.4**.

La funzione del Tween 80 è quella di simulare l'azione emulsionante del sodio taurocolato e della lecitina di soia; nel tampone che mima la condizione di digiuno è presente lo 0,05% di Tween 80 ed ha un pH di 6.5. Mentre nel tampone che mima le condizioni post-prandiali la quantità di tensioattivo è incrementata allo 0,25% ed il pH scende a 5,5. In questo secondo tampone è inoltre presente la trietanolamina; l'uso di questa base è legata alla presenza nella sua struttura sia di un'ammina terziaria sia di tre gruppi idrossili; tali gruppi conferiscono delle proprietà idrofiliche e idrofobiche che simulano alcuni domini funzionali della lecitina facilitando la formazione di micelle miste e stabilizzate (Zoeller T. e Klein S., 2007).

Tabella 3.4. Composizione dei tamponi semplificati FaSSIF e FeSSIF Zoeller T. e Klein S., 2007).

Tampone che simula le condizioni di digiuno (FaSSIF)(1 L)		Tampone che simula le condizioni post-prandiali (Fed) (1 L)	
NaH ₂ PO ₄	4,4 g	NaCl	11,87 g
NaCl	6,2 g	NaOH (pellets)	4,04 g
NaOH	1M qb a pH 6,5	Acido acetico glaciale	8,65 g (pH = 5,5)
Tween80	0,05%	Tween 80	0,25%
Acqua milli-Q	qb a 1 L	Trietanolamina	0,25%
		Acqua milli-Q	qb a 1 L

3.3.2.4 Test di permeazione *in vitro* e *ex-vivo*

I test di permeazione *in vitro* sono semplici, economici e facilmente riproducibili grazie alla possibilità di standardizzare le condizioni sperimentali. Tuttavia, questi metodi non riescono a riprodurre complessivamente i fenomeni di assorbimento *in vivo* dei sistemi nanoparticolati e generalmente vengono usati per studiare i meccanismi di assorbimento intestinali (Liu W.et al., 2016).

I metodi *in vitro* per studiare l'assorbimento di nanoparticolati includono i sacchetti con le membrane da dialisi, o di tessuto intestinale di ratto e modelli con le colture cellulari (es. Caco-2). Nel metodo che prevede l'impiego di sacchetti costituiti da membrane da dialisi il campione viene versato all'interno del sacchetto che viene chiuso alle due estremità e posto in un becher contenente il mezzo di rilascio. Le dimensioni dei pori della membrana (*cut-off*) devono essere selezionati in modo da assicurare la diffusione del farmaco libero. Il mezzo di rilascio esterno è rappresentato da fluido gastro-intestinale simulato ad un appropriato pH che può anche contenere un appropriato tensioattivo per aumentare la solubilità del farmaco. A causa della pressione osmotica causata dalla differenza di concentrazione il farmaco diffonde fuori dalla membrana. Ad intervalli di tempo vengono prelevati campioni di mezzo di rilascio ed il farmaco viene opportunamente quantificato. Con le stesse membrane è possibile eseguire il test "al rovescio" (*reverse dialysis method*) in cui la formulazione viene dispersa nel becher mentre i sacchetti di membrana contengono del fluido gastro-intestinale simulato. Ad intervalli di tempo viene valutata la quantità di farmaco che si trova all'interno dei sacchetti. Questo metodo riduce la variabilità, in quanto la formulazione viene miscelata meglio nel mezzo di dispersione e simula meglio le condizioni di diffusione *in vivo*. Un secondo metodo prevede l'impiego di tessuto intestinale di ratto che può essere utilizzato in modalità *inverted* e *non-inverted* (Liu W. et al., 2016). I sacchetti di membrana da dialisi sono sostituiti con dei sacchetti creati con del tessuto intestinale di ratto che può essere *non-inverted* e quindi i villi intestinali si trovano direzionati verso l'interno e quindi la soluzione con il farmaco viene racchiusa all'interno del sacchetto oppure con l'aiuto di un supporto l'intestino può essere rovesciato (*inverted*) ed i villi intestinali si possono dunque trovare esposti verso il mezzo di dispersione contenente il farmaco. Una rappresentazione di questo metodo è rappresentata in **Figura 3.2** (Meriani F. et al. 2004).

Per studiare i meccanismi con i quali i farmaci vengono assorbiti a livello cellulare e molecolare sono stati impiegati diversi modelli cellulari tra cui le Caco-2 e le HT29-MTX. Le cellule Caco-2 vengono usate come modello *in vitro* per valutare trasporto e metabolismo cellulare e sono largamente impiegate per lo screening di farmaci somministrati oralmente e nello studio del processo di assorbimento intestinale dei farmaci. Le Caco-2 sono cellule di adenocarcinoma umano e vengono impiegate perché sono simili alle cellule dell'epitelio intestinale in termini di *tight junction*, orletto a spazzola, sistemi enzimatici e sistemi di trasporto carrier-mediati (Liu W. et al., 2016).

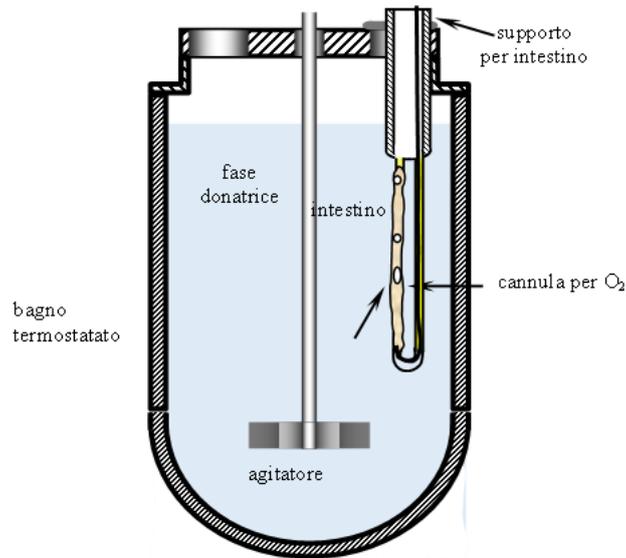


Figura 3.2. Schema del funzionamento del test di diffusione mediante intestino di ratto. Il supporto consiste in un piccolo contenitore cilindrico (contenitore per la fase ricevente), sul cui fondo sono collegate le due estremità di un capillare ad "U", parte del quale è rappresentato dall'intestino stesso. All'interno del supporto, e quindi del capillare ad esso collegato, si immette il tampone (12 ml, fase ricevente) puro a 37 °C. Nell'ambiente donatore vengono collocati da quattro a sei di questi supporti, ciascuno connesso con un tratto intestinale. Come la fase donatrice, anche ogni fase ricevente è continuamente ossigenata (95% O₂, 5% CO₂) (Meriani F. et al., 2004).

3.3.2.5 Lipolisi

Forse uno dei più complessi e poco conosciuti aspetti delle formulazioni lipidiche è la loro interazione con i processi di digestione che subiscono i lipidi e l'influenza che queste interazioni hanno sulle prestazioni della formulazione. Müller e colleghi hanno sviluppato un modello per simulare *in vitro* la lipolisi dinamica e valutare dunque gli effetti della digestione lipidica sulla solubilizzazione e il rilascio del farmaco da una formulazione lipidica (Haus D.J., 2007). Per gli esperimenti di lipolisi *in vitro*, un vessel contenente un mezzo di dissoluzione termostato a 37°C viene mantenuto in condizioni di blanda agitazione. Il mezzo di dissoluzione è costituito da una soluzione acquosa tamponata in cui sono stati aggiunti sali biliari, fosfolipidi ed il lipide.

La lipolisi viene avviata introducendo delle lipasi pancreatiche. Il pH e la concentrazione di calcio libero del mezzo, che controlla il livello di lipolisi, sono monitorati e mantenuti costanti nel tempo. Ad intervalli di tempo dei campioni vengono raccolti e centrifugati al fine di ottenere tre frazioni distinte: la prima è costituita essenzialmente da saponi insolubili di calcio di acidi grassi, la seconda, di maggior interesse, è uno strato acquoso intermedio, costituito da micelle miste di sale biliare e varie vescicole lipidiche; e la terza frazione, più

in alto, è uno strato oleoso con digliceridi e trigliceridi non idrolizzati. Al termine dell'esperimento la lipolisi viene terminata con l'aggiunta di un inibitore di lipasi (**Figura 3.3**).

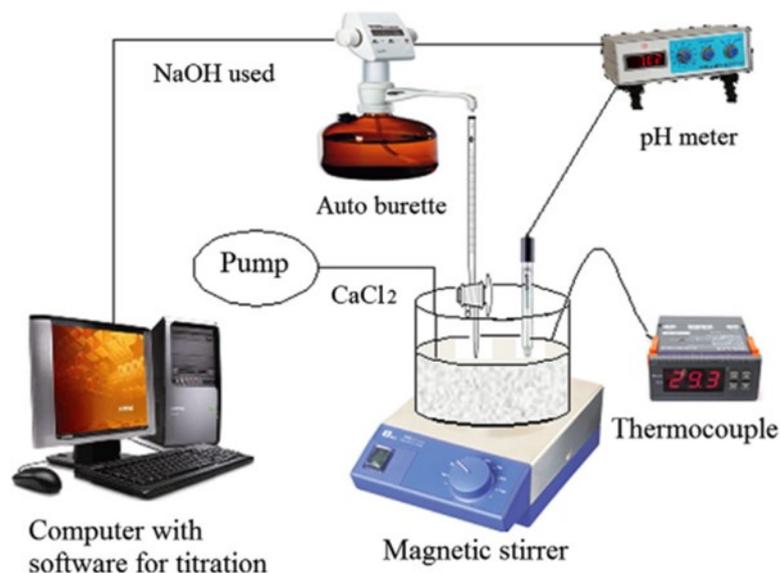


Figura 3.3. Rappresentazione del sistema messo a punto per gli esperimenti di lipolisi simulata (Kalepu S., 2013).

Durante la lipolisi, un farmaco disciolto all'interno della formulazione lipidica potrà quindi: (1) rimanere nel lipide, (2) essere solubilizzato nella fase acquosa in combinazione con prodotti di lipolisi (3) precipitare come una sostanza insolubile. La ripartizione del farmaco tra queste varie fasi non è del tutto nota anche se si pensa sia influenzata dal grado di lipofilia del farmaco che ne determinerà l'affinità per una delle tre fasi che si vengono a formare.

3.4 Caratterizzazione *in vivo*

I test di verifica richiedono invariabilmente la somministrazione del farmaco formulato a un animale prima dell'applicazione clinica. Nel progettare questi studi, è necessario tenere presente una serie di fattori, comprese le specie animali, l'uso dell'anestesia, il dosaggio, il volume, il numero e il tipo di campioni da raccogliere. Ratti e cani sono le specie animale più utilizzate per la valutazione della performance delle formulazioni lipidiche. I ratti sono generalmente adatti per studi iniziali a condizione che la formulazione sia un liquido

siringabile che può essere somministrato tramite *gavage*. Tuttavia, è stato messo in dubbio l'impiego del ratto per valutare questo tipo di formulazione a causa di una differenza specie-specifica nella secrezione biliare. Infatti, nel ratto non è presente la cistifellea quindi la bile scorre liberamente e questa è una differenza importante rispetto alle altre specie che hanno la cistifellea che rilascia la bile in risposta alla presenza di cibo o in risposta ad una quantità sufficiente di lipidi nel tratto gastro-intestinale (Haus D.J., 2007). Il flusso biliare nel cane invece è più simile a quello dell'uomo e quindi rappresenta un modello animale più idoneo. In sintesi, a causa di costi inferiori e maggiori facilità di manipolazione, i piccoli animali (ad esempio i ratti) di solito rappresentano la scelta migliore per la maggior parte delle indagini di fase iniziale, mentre un animale più grande, come il cane, è più appropriato per le fasi finali del test che richiedono una valutazione di una forma di dosaggio prototipo destinata alla somministrazione umana.

3.5 Formulazioni auto-emulsionanti solide

Le formulazioni lipidiche vengono commercializzate come forme farmaceutiche liquide o confezionate all'interno di capsule di gelatina dura e/o molle (Newton M. et al., 2001). Al fine di ridurre i costi di produzione, gli inconvenienti legati al confezionamento, trasporto, stoccaggio e l'instabilità chimico-fisica di questi sistemi è stata valutata la possibilità di supportarli su veicoli solidi sfruttando diversi processi tecnologici allo scopo di ottenere una polvere lavorabile dal punto di vista farmaceutico.

3.5.1 Caricamento su carrier microporosi e/o polimeri reticolati

Questo processo prevede il caricamento della formulazione lipidica (microemulsione o/a/o) per semplice miscelazione, mediante miscelatori a corpo rotante o a corpo fisso, su carrier microporosi o polimeri reticolati sfruttandone la loro capacità assorbente. Scegliendo opportunamente la polarità del carrier microporoso, si può modulare la velocità di rilascio del farmaco da una cessione immediata ad una prolungata (Chiellini E. et al., 2003).

I vantaggi derivanti dall'impiego di questo tipo di formulazioni per farmaci poco solubili sono i seguenti: l'incorporazione del farmaco nella fase oleosa interna della microemulsione doppia o/a/o aumenta notevolmente la sua solubilità e lo protegge da una rapida ricristallizzazione nei fluidi biologici.

3.5.2 Estrusione e granulazione in *high shear mixers*

La tecnica prevede la bagnatura di polveri con la formulazione lipidica liquida, l'impasto, l'estrusione della massa umida e la sferonizzazione al fine di ottenere granulati uniformi.

Newton M. (Newton M., 2001) ha utilizzato una formulazione placebo costituita da cellulosa microcristallina, lattosio ed una miscela di olio, tensioattivo non ionico e acqua per verificare la fattibilità del processo. I pellets ottenuti presentano un range dimensionale di 800-1600 μm e contengono il 42% della miscela auto-emulsionante rispetto al peso del granulato (Newton M., 2001). Tuttavia, il metodo di estrusione-sferonizzazione in scala industriale presenta notevoli svantaggi in quanto si tratta di un processo multistadio che comporta una capacità di produzione limitata nel tempo; le rese ponderali nell'ambito di intervalli dimensionali ristretti non sono elevate; ogni singola fase di lavorazione richiede un'apparecchiatura specifica.

Allo scopo di superare tali inconvenienti alcuni autori hanno verificato la possibilità di ottenere dei granuli automeulsionanti mediante granulatori ad alte forze di taglio (*High Shear Mixers*) (Franceschinis E. et al., 2005; Franceschinis E. et al., 2011).

3.5.3 *Spray congealing*

Il metodo dello *spray congealing* è chiamato anche raffreddamento a spruzzo. Il lipide fuso viene spruzzato in una camera di raffreddamento e, a contatto con l'aria fredda, si solidifica dando origine a particelle solide sferiche. Le particelle solide vengono raccolte nel fondo della camera e infine esse possono essere poste in capsule di gelatina dura o compresse. I parametri da considerare sono il punto di fusione dell'eccepiante, la viscosità della formulazione e la temperatura dell'aria di raffreddamento all'interno della camera per consentire l'istantanea solidificazione delle goccioline (Albertini B. et al., 2015)

3.5.4 *Spray drying*

Simile al precedente, ma in questo caso una microemulsione viene addizionata di un carrier solido come, per esempio, maltodestrine e spruzzata all'interno di una camera calda in cui il calore provoca l'evaporazione dell'acqua e l'eventuale cristallizzazione del carrier solido portando alla formazione di particelle solide (Čerpnjak K. et al., 2015)

CAPITOLO 4

ESEMPI DI SVILUPPO DI FORMULAZIONI LIPIDICHE

Si analizzano di seguito dei casi studio di formulazioni lipidiche presenti in commercio, in particolar modo ci si sofferma su: ciclosporina, paclitaxel, simvastatina e atorvastatina.

4.1 Ciclosporina

La ciclosporina è un immunosoppressore usato per prevenire il rigetto d'organo o di midollo osseo nei pazienti trapiantati: essa controlla la risposta immunitaria del paziente riducendo la funzionalità dei linfociti T, i quali appartengono alla famiglia dei globuli bianchi. Essa è prodotta dal micete *Tolypocladium inflatum* ed è il principale polipeptide del gruppo delle ciclosporine. La ciclosporina A è un peptide ciclico con un peso molecolare di 1201 Da, che si presenta come una polvere cristallina fine o in cristalli aghiformi bianchi, poco solubile in acqua (circa 9 µg/ml) mentre è solubile in etanolo ed olio e con un log P di 2.92. Il suo dosaggio è di circa 2-10 mg/kg di peso corporeo. Ne consegue che per avere un adeguato assorbimento per via orale di questo farmaco è necessario incrementare la sua solubilità in acqua.

La prima formulazione di ciclosporina immessa in commercio con il nome di Sandimmune® sono delle capsule di gelatina molle contenenti una formulazione lipidica costituita da etanolo (12,7%) come co-solvente, olio di mais come fase oleosa ed il linoleoil macrogol-6 gliceride (Labrafil M-2125CS) come tensioattivo. La formulazione ha permesso di ottenere un'ottima biodisponibilità della ciclosporina; tuttavia, rimaneva una certa dipendenza della biodisponibilità in funzione della presenza di cibo ed una variabilità tra soggetti a causa della presenza di un trigliceride a lunga catena (**Figura 4.1**).

È stata così sviluppata una seconda formulazione denominata Sandimmun Neoral® contenente alcool e glicole propilenico come cosolventi, una miscela di mono-di- e trigliceridi derivanti dall'olio di mais come fase oleosa, olio di ricino idrogenato etossilato (Cremophor RH40) come tensioattivo e tocoferolo come antiossidante. La formulazione di Sandimmun Neoral® auto-emulsiona facilmente e permette di ridurre la variabilità intra e inter-soggetto (**Figura 4.1**).

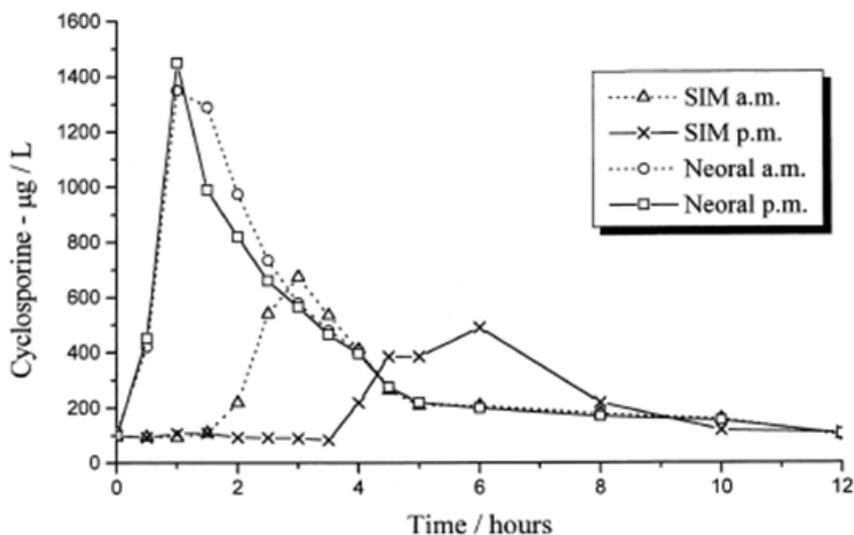


Figura 4.1. Profili plasmatici di ciclosporina in pazienti con trapianto renale a cui è stata somministrata la formulazione Sandimmune® (SIM) e la formulazione Sandimmun Neoral® in presenza di cibo (a.m) ed in assenza di cibo (p.m) (Lawrence M.J. e Rees G.D., 2000).

Dai profili plasmatici si osserva infatti che il picco plasmatico della formulazione Sandimmune® (SIM a.m) si verifica dopo 4 ore circa mentre con la formulazione Sandimmun Neoral® (Neoral p.m.) invece si verifica dopo circa 1.5 ore ed è praticamente indipendente dalla concomitante presenza di cibo (Morozowich W. e Gao P., 2009; Lawrence M.J. e Rees G.D., 2000). Attualmente in commercio negli Stati Uniti è presente un altro medicinale equivalente di Sandimmun Neoral® con denominazione Gengraf® e costituito da etanolo (12,8%), glicole etilenico, olio di ricino idrogenato etossilato (Cremophor EL), polisorbato 80 e glicole propilenico (Hauss D.J., 2007).

4.2 Simvastatina

La simvastatina appartiene alla classe delle statine; infatti, agisce riducendo la produzione di colesterolo da parte dell'organismo. Il trattamento con simvastatina è utilizzato per ridurre il rischio di infarto e ictus e diminuire la probabilità di dover affrontare interventi al cuore in caso di disturbi cardiaci o rischio di malattie cardiovascolari, abbinato ad opportuni accorgimenti alimentari, all'attività fisica e, se necessario, alla perdita di peso. Si tratta di una molecola praticamente insolubile in acqua e poco assorbita nel tratto gastrointestinale; ne consegue che anche per questa molecola lo sviluppo di formulazioni lipidiche può portare ad un aumento della biodisponibilità.

Nello studio di Kang B.K. e colleghi è stata sviluppata una formulazione auto-emulsionante contenente il 40% (p/p) di Capryol 90[®] (propilene glicole monocaprilato), 30% (p/p) di Cremophor EL[®] (Polyoxyl-35-castor oil) ed il 30% (p/p) di Carbitol[®] (Monoetil etere dietilen glicole) rispettivamente quale fase oleosa, tensioattivo e co-tensioattivo/co-solvente. Nello studio sono state selezionate due formulazioni denominate A e D che si differenziano per la quantità di principio attivo introdotto nella formulazione ed in particolare la formulazione D contiene una quantità doppia di simvastatina rispetto alla formulazione A.

Le due formulazioni in seguito a dispersione in mezzo acquoso portano alla formazione di microemulsioni con dimensioni rispettivamente di 33 e 150 nm. Le *performance* di queste due formulazioni sono state valutate realizzando delle prove di dissoluzione *in vitro* (**Figura 4.2**) e di biodisponibilità *in vivo* su cane (**Figura 4.3**) e sono state confrontate con quelle del prodotto commerciale di riferimento a base di simvastatina (Zocor[®]) (Kang B.K. et al., 2004).

I dati di dissoluzione *in vitro* mostrano che entrambe le formulazioni formulate sono in grado di incrementare la quantità e la velocità con la quale la simvastatina va in soluzione e presentano delle performance migliori rispetto al prodotto *brand* (**Figura 4.2**). Successivamente, dato i migliori risultati ottenuti *in vitro* con la formulazione A, per questa formulazione è stata valutata anche la biodisponibilità *in vivo*.

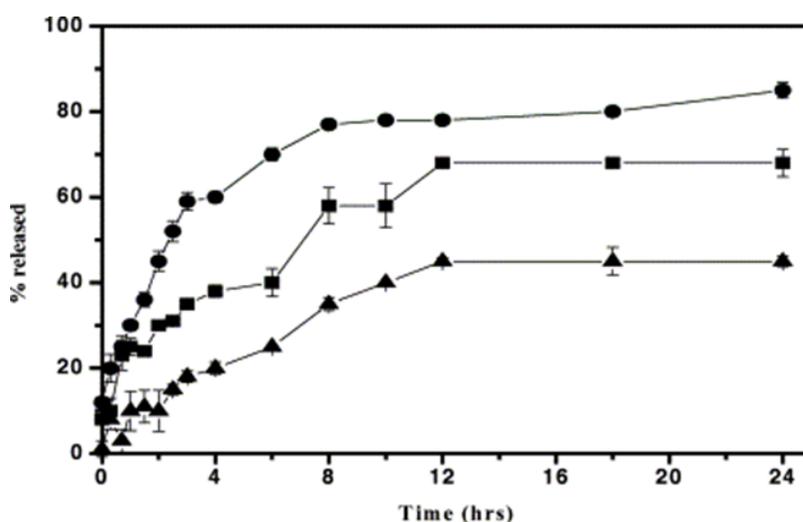


Figura 4.2. Profili di dissoluzione della simvastatina da SMEDDS A (-●-), D (-■-), e compresse tradizionali Zocor[®] (-▲-) (Kang B.K. et al.,2004).

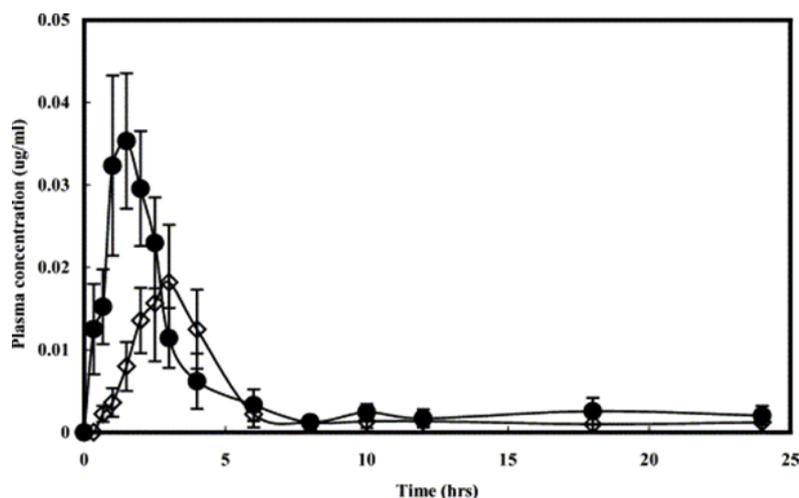


Figura 4.3. Concentrazioni plasmatiche della simvastatina acida dopo somministrazione orale delle compresse tradizionali (-* -) e del SMEDDS A (-♦-) in cani beagles (n=9 and 2mg/kg) (Kang B.K. et al., 2004).

Dai profili plasmatici si evince che la formulazione auto-emulsionante A sviluppata permette di ottenere una biodisponibilità orale e una concentrazione plasmatica massima più alte rispetto al farmaco di riferimento (Kang B.K. et al., 2004).

In un secondo studio di Karim F.T. e colleghi è stata sviluppata una formulazione auto-emulsionante per la simvastatina. In questo studio la selezione degli eccipienti è stata effettuata tenendo conto della solubilità del principio attivo, ed in particolare sono stati selezionati il propilene glicole monocaprilato (Capryol 90®) e il polisorbato 80 (Tween 80) rispettivamente come solubilizzante e tensioattivo. Uno studio sistematico ha portato alla selezione della formulazione denominata F2 costituita da una miscela 7:3 (m/m) di Capryol 90/Tween-80 in grado di portare alla formazione di microemulsioni con dimensioni di 74 nm ed un rilascio totale del farmaco in meno di 20 minuti.

Lo studio ha previsto degli studi di diffusione in vitro con intestino e uno studio *in vivo* in cui si sono determinati i livelli di colesterolo in un arco temporale di 5 giorni (Karim F.T. et al., 2015).

4.3 Atorvastatina

Un altro farmaco appartenente alla classe delle statine è l'atorvastatina. Essa si presenta come una polvere cristallina insolubile in acqua. Viene assorbita rapidamente dopo somministrazione orale e il tempo necessario a raggiungere la concentrazione plasmatica massima è di circa 1–3 h, tuttavia l'atorvastatina presenta una bassa biodisponibilità a causa

della clearance presistemica della mucosa gastrointestinale e al metabolismo di primo passaggio epatico.

Al fine di migliorare la sua biodisponibilità orale può essere sviluppata una formulazione lipidica autoemulsionante. Nello studio di Shen H.R. e Zhong M.K. sono state sviluppate delle formulazioni contenenti oleoil macrogol-6 gliceride (Labrafil) o triglicerici a media catena (Labrafac), glicole propilenico e olio di ricino idrogenato etossilato (Cremophor RH40) con le funzioni rispettivamente di fase oleosa, co-solvente e tensioattivo (Shen H.R. e Zhong M.K., 2006). Le formulazioni delle tre formulazioni selezionate sono riassunte in **Tabella 4.1.**

Tabella 4.1. Composizione delle tre formulazioni selezionate e dimensioni delle gocce dopo dispersioni in mezzo acquoso (Shen H.R. e Zhong M.K., 2006).

	A	C	E
Labrafil (% m/m)	31	31	-
Labrafac (% m/m)	-	-	31
Cremophor RH40 (% m/m)	32	32	32
Glicole propilenico (% m/m)	32	32	32
Dimensioni gocce (nm)	72	105	75

Per le tre formulazioni è stato eseguito il test di dissoluzione e confrontato con quello che si ottiene con le compresse in commercio (**Figura 4.4**). I risultati hanno messo in evidenza che tutte le tre formulazioni autoemulsionanti sono in grado di incrementare la velocità e l'entità di atorvastatina in soluzione.

Dato che la formulazione A è quella che porta ad un rilascio più veloce e completo di principio attivo è stata selezionata per gli studi *in vivo*. I profili plasmatici ottenuti con la formulazione A e con il prodotto di riferimento sono riportati in **Figura 4.5**.

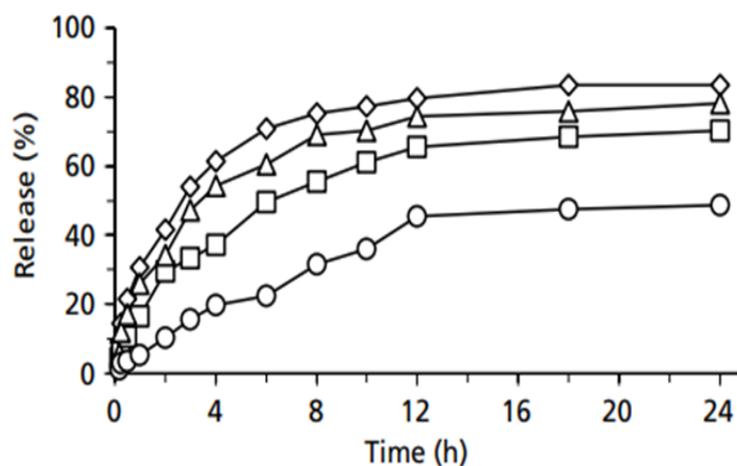


Figura 4.4. Profili di dissoluzione dell'atorvastatina dalle formulazioni SMEDDS (A=◇, C=□, E=△) e dalle compresse convenzionali (○) in un fluido intestinale simulato (pH=7.4) (Shen H.R. e Zhong M.K., 2006).

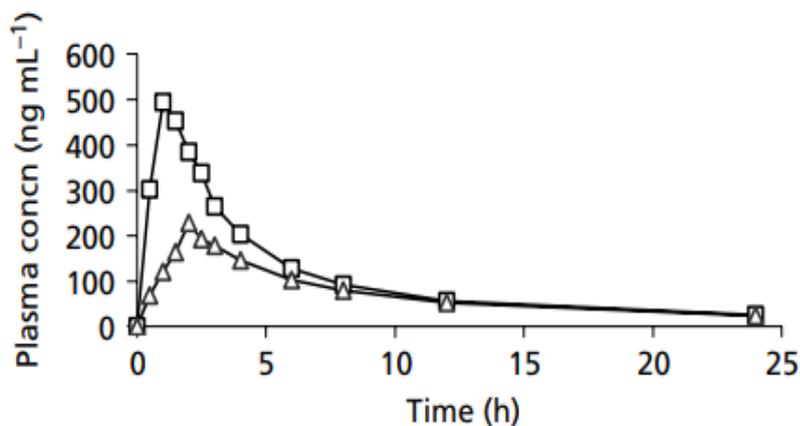


Figura 4.5. Profilo concentrazione plasmatica di atorvastatina dopo somministrazione orale di formulazioni SMEDDS A (□) e dalle compresse convenzionali (△) in cani beagles (n=6 e 6 mg/kg) (Shen H.R. e Zhong M.K., 2006).

I risultati ottenuti mettono in evidenza che la concentrazione plasmatica massima e l'AUC della formulazione autoemulsionante sono significativamente superiori a quelli della formulazione di riferimento e la biodisponibilità relativa di atorvastatina nella formulazione A risulta circa 1,5 volte superiore rispetto alla compressa di riferimento.

4.4 Paclitaxel

Il Paclitaxel è un farmaco antitumorale, è un diterpenoide estratto dalla corteccia di Tasso occidentale, *Taxus brevifolia*. È attivo nelle metastasi del cancro al seno ed è in fase di valutazione nel trattamento del carcinoma mammario in fase iniziale. È stato inoltre approvato dall'FDA per il trattamento del cancro ovarico e mammario, del sarcoma di Kaposi e di altri carcinomi tra cui quelli ai polmoni, colon, prostata, testa e collo, cervicale e cervello. Il Paclitaxel possiede un peso molecolare elevato (853 Da) e una solubilità in acqua molto bassa (<1 mg/mL); il composto non contiene gruppi funzionali che possono essere ionizzati alterando il pH o gruppi per poter formare sali e poter incrementare la sua solubilità. La solubilità del farmaco in veicoli farmaceutici comuni e/o solventi accettabili come ad esempio PEG 400, etanolo, glicole propilenico, glicerolo, ecc. è limitata (Gao P. et al., 2003).

Il Paclitaxel è solubile in miscele 1:1 di Cremophor EL ed etanolo anidro e tale solubilità è sfruttata nella formulazione dei due prodotti commerciali a base di Paclitaxel che vengono somministrati mediante infusione lenta previa diluizione con soluzione fisiologica (Taxol, Paxene). Tuttavia, il Cremophor EL presente nella formulazione parenterale è stato associato a gravi effetti collaterali e porta a ipersensibilità, nefrotossicità e neurotossicità in molti pazienti. Negli ultimi anni sono stati compiuti vari sforzi per sviluppare delle formulazioni orali a base di Paclitaxel; infatti, la somministrazione orale offrirebbe numerosi vantaggi, tra cui la possibilità di poter mettere a punto dei protocolli per il trattamento cronico e semplice da seguire per i pazienti. Tuttavia, il paclitaxel somministrato per via orale presenta una bassa biodisponibilità (<10%) principalmente a causa della sua bassa solubilità ma anche a causa dell'elevato metabolismo epatico e della sua affinità per la glicoproteina P. Per superare questo problema, in letteratura sono riportate diverse formulazioni, tra cui ricordiamo liposomi, microsfele, nanocapsule, nanoparticelle (Gibaud S. e Attivi D., 2012; Cho H.-Y. et al., 2016). Lo sviluppo di formulazioni autoemulsionanti può essere una valida alternativa in quanto può portare ad un incremento dell'assorbimento linfatico e ridurre direttamente o indirettamente il metabolismo di primo passaggio. Il sistema linfatico è una parte del sistema circolatorio e svolge un ruolo cruciale nel riconoscimento e nell'attivazione della risposta del sistema immunitario alla malattia. È la via principale per la diffusione di cellule cancerose, virus e alcune infezioni. Una volta invaso da cellule tumorali o virus, i linfonodi regionali fungono da serbatoi di cellule tumorali che possono facilmente diffondere. Pertanto, il sistema linfatico è un importante sito bersaglio per lo sviluppo di nuovi vaccini, trattamenti antitumorali, agenti immunoterapici e agenti di imaging. Nello studio di Cho H.-Y. e colleghi è stata sviluppata

una formulazione autoemulsionante per migliorare la biodisponibilità orale del paclitaxel anche sfruttando la via di assorbimento linfatica (Cho H.-Y. et al., 2016). Nello studio la selezione dei diversi eccipienti ha tenuto conto della loro capacità di solubilizzazione del principio attivo. La formulazione finale sviluppata contiene il 10% (m/m) di etil oleato come fase oleosa, il 10% (m/m) di polietilen glicole 400 come co-solvente e l'80% (m/m) di una miscela di polisorbato 80 e dietilen glicol monoetil etere (Carbitol) in rapporto di 9:1. La formulazione finale è stata adsorbita su carrier solido a base di silice colloidale al fine di ottenere un sistema auto-emulsionante solido (s-SEDDS) che superi alcuni limiti delle formulazioni SEDDS liquide come la compatibilità con i componenti delle capsule. Il processo è stato realizzato diluendo la formulazione SEDDS con acqua e adsorbendo la microemulsione in silice colloidale mediante tecnica di *spray-drying*. In seguito a dispersione in mezzo acquoso la formulazione s-SEDDS sviluppata porta alla formazione di microemulsioni con dimensione delle gocce di circa 17 nm. La caratterizzazione dello stato solido mediante calorimetria differenziale a scansione e diffrazione a raggi X ha suggerito che Paclitaxel nella formulazione sviluppata si trova in forma di dispersione molecolare nelle emulsioni o in uno stato amorfo o cristallino con dimensioni molto piccole. Gli studi di farmacocinetica realizzati su ratti (**Figura 4.6**) hanno messo in evidenza la capacità della formulazione di incrementare notevolmente l'assorbimento orale del farmaco (**Tabella 4.2**) portando ad una biodisponibilità quasi doppia.

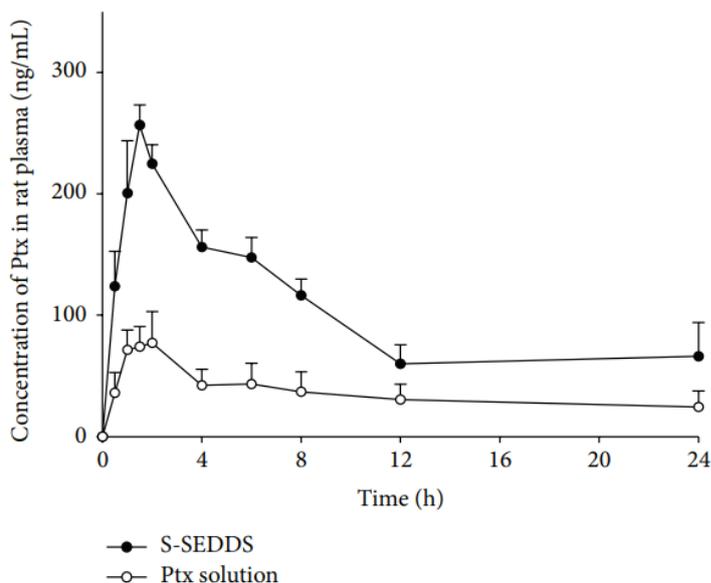


Figura 4.6. Concentrazione plasmatica del Paclitaxel dopo somministrazione della molecola in soluzione e con la formulazione auto-emulsionante sviluppata (Cho H.-Y. et al., 2016).

Tabella 4.2. Parametri farmacocinetici del Paclitaxel dopo somministrazione orale di una soluzione di Paclitaxel e della formulazione auto-emulsionante (Cho H.-Y. et al., 2016).

Parametro	Paclitaxel soluzione	Paclitaxel SEDDS
C_{max} (ng/ml)	84.6±4.1	259.5±7.5
T_{max} (hr)	1.8±0.2	1.7±0.2
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (ng*hr/ml)	1816.5±206.4	3308.5±486.2

Al fine di valutare se il farmaco veicolato raggiunge i linfonodi e quindi sfrutta il sistema linfatico per il suo assorbimento, gli autori hanno determinato la concentrazione di Paclitaxel nei linfonodi dopo 4 ore dalla somministrazione. I risultati ottenuti sono riassunti in **Figura 4.7**. I dati mettono in evidenza la capacità della formulazione auto-emulsionata di raggiungere i linfonodi con un'efficienza del targeting linfatico rispetto a quelli della soluzione di riferimento dopo la somministrazione orale.

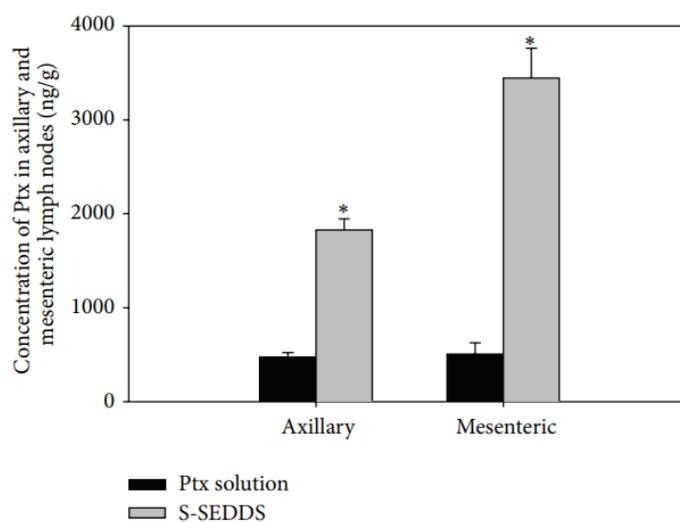


Figura 4.7. Concentrazione di Paclitaxel nei linfonodi mesenterici e ascellari dopo 4 ore dalla somministrazione orale (Cho H.-Y. et al., 2016).

In conclusione, lo studio di Cho H.-Y. E colleghi suggerisce che le formulazioni autoemulsionanti possono essere delle buone candidate per ottenere un incremento di biodisponibilità orale e migliorare il suo assorbimento linfatico (Cho H.-Y. et al., 2016).

Sebbene la somministrazione di farmaci lipofili in SEDDS presenti diversi vantaggi nell'assorbimento, ci sono anche alcune limitazioni. Spesso, infatti, dopo la somministrazione orale di queste formulazioni si verifica la precipitazione del farmaco nel tratto gastro-intestinale. Questo si verifica perché queste formulazioni contengono elevate concentrazioni di eccipienti miscibili con acqua che in seguito a dispersione nel tratto gastro-intestinale provocano una sovrasaturazione del farmaco superiore a causa della perdita del potere solubilizzante della formulazione in seguito a diluizione.

La digestione dei lipidi presenti nella formulazione può portare ad un aumento di polarità dei lipidi stessi con perdita del potere solubilizzante nei confronti del farmaco e formazione di uno stato di sovrasaturazione. La formazione di questi stati sovrasaturi può promuovere l'assorbimento in quanto incrementa il gradiente promuovendo teoricamente il processo di diffusione. Tuttavia, spesso i farmaci tendono a precipitare nel tratto gastrointestinale molto rapidamente in forme cristalline stabili portando ad una riduzione della biodisponibilità. Pertanto, le formulazioni ideali dovrebbero essere in grado di mantenere uno stato supersaturo per un periodo di tempo appropriato per consentire un maggiore assorbimento (Park H. et al., 2020).

Un'altra limitazione dei SEDDS è la loro potenziale tossicità; è, infatti, desiderabile creare delle goccioline emulsione di dimensioni micro/nanometriche per aumentare il rapporto tra area superficiale e volume, e di conseguenza aumentare la lipolisi da parte della lipasi e stimolare la diffusione passiva. A tale scopo però è necessario introdurre nella formulazione un'elevata concentrazione di tensioattivo che assicura inoltre che il farmaco rimanga in soluzione durante la conservazione e dopo somministrazione orale. Queste alte dosi di tensioattivi possono portare a effetti collaterali gastrointestinali che possono essere scarsamente tollerati durante le terapie croniche. Per superare questi inconvenienti, alcuni autori hanno sviluppato delle formulazioni autoemulsionanti supersature. In generale, le formulazioni supersature permettono di ottenere una soluzione supersatura del farmaco nel tratto gastro-intestinale portando ad un incremento dell'assorbimento di farmaci poco solubili. Lo stato di supersaturazione può essere raggiunto mediante l'aggiunta di inibitori di precipitazione in grado di stabilizzare temporaneamente uno stato sovrasaturo del farmaco veicolato (Morozowich W. e Gao P., 2009; Park H. et al., 2020). Le formulazioni auto-emulsionanti sovrasature saranno quindi costituite da miscele di miscele di fase oleosa, tensioattivo e co-solvente ma in cui la quantità di tensioattivo viene ridotta rispetto alle formulazioni auto-emulsionanti tradizionali, un inibitore di precipitazione ed il farmaco da veicolare.

Gao P. e colleghi hanno sviluppato delle formulazioni autoemulsionanti supersature per la

somministrazione di Paclitaxel (Gao P. et al., 2003).

In particolare, in questo studio gli autori hanno verificato la biodisponibilità del Paclitaxel veicolato in una formulazione autoemulsionante tradizionale, in una formulazione autoemulsionante supersatura, nella formulazione in commercio Taxol® e in una formulazione autoemulsionante supersatura contenente anche ciclosporina come inibitore della glicoproteina P. Come inibitore di precipitazione è stata usata l'idrossipropil metil cellulosa (HPMC). Le formulazioni valutate nello studio sono riportate in **Tabella 4.3**.

Tabella 4.3. Composizione delle formulazioni valutate nello studio (Gao P. et al., 2003).

Componente	Formulazione A (mg/g)	Formulazione B (mg/g)	Formulazione C (mg/g)	Formulazione D (mg/g)
Paclitaxel	57	6.8	62.5	60
Ciclosporina A	-	-	-	30
Etanolo	151.5	423.2	156.25	150
PEG 400	151.5	-	156.25	150
Cremophor EL	400	570	417	400
Gliceril dioleato	190	-	208	160
HPMC	50	-	-	50
	Autoemulsionante supersatura	Taxol®	Autoemulsionante	

Al fine di verificare la capacità di HPMC di mantenere in soluzione il Paclitaxel in seguito a dispersione in mezzo acquoso della formulazione autoemulsionante supersatura rispetto alla formulazione autoemulsionante tradizionale, gli autori hanno realizzato dei test di dissoluzione i cui risultati sono riportati in **Figura 4.8**.

I dati dimostrano che la diluizione *in vitro* della formulazione autoemulsionante supersatura determina la formazione di una microemulsione, seguita da una lenta cristallizzazione di Paclitaxel; questo risultato indica che il sistema è supersaturo e lo stato supersaturo è prolungato dalla presenza di HPMC nella formulazione. Successivamente tutte quattro le formulazioni sono state valutate *in vivo* e i profili plasmatici che hanno ottenuto sono riportati in **Figura 4.9**

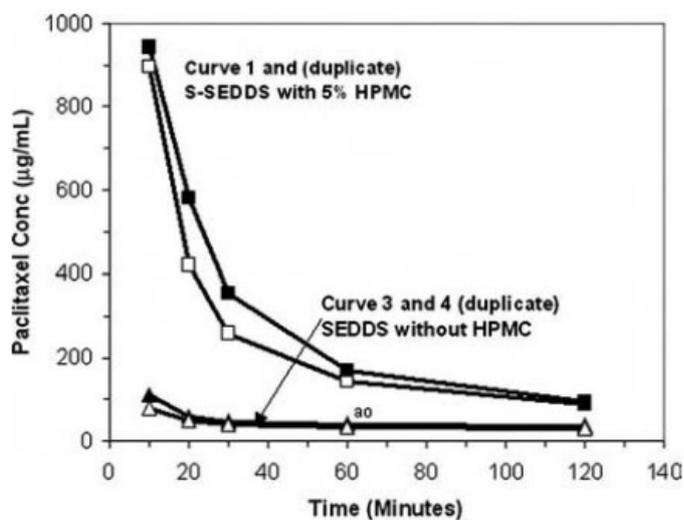


Figura 4.8. Profili concentrazione-tempo di Paclitaxel osservati in seguito a test di dissoluzione in vitro (Gao P. et al., 2003).

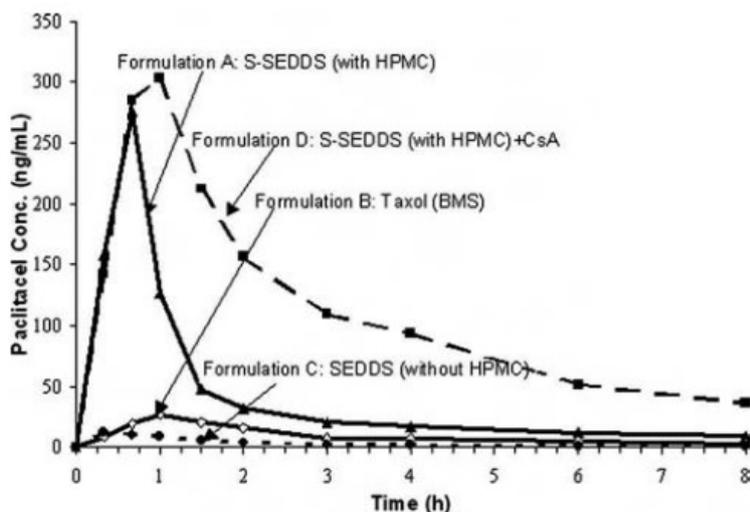


Figura 4.9. Profili plasmatici delle quattro formulazioni dopo somministrazione orale (Gao P. et al., 2003).

I dati confermano che la formulazione A, cioè la formulazione autoemulsionante supersatura permette di incrementare notevolmente la biodisponibilità orale del Paclitaxel, inoltre l'introduzione nella formulazione di un inibitore delle glicoproteine P permette di incrementare ulteriormente l'assorbimento del farmaco.

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI

La maggior parte delle nuove molecole candidate a diventare dei farmaci appartengono alla classe II e di conseguenza per queste molecole sarà decisivo lo sviluppo di formulazioni in grado di migliorare la loro solubilità per poter ottenere una biodisponibilità adeguata. In questo lavoro di tesi sono state descritte le formulazioni lipidiche, ovvero delle formulazioni costituite essenzialmente da un principio attivo disciolto in una miscela di uno o più eccipienti, i quali possono essere trigliceridi, gliceridi parziali, tensioattivi o co-tensioattivi. Le formulazioni lipidiche vengono classificate in funzione delle dimensioni delle gocce disperse, della capacità di emulsionare e delle caratteristiche dei componenti presenti nella formulazione. In particolare, tra le formulazioni lipidiche più promettenti ricordiamo le formulazioni lipidiche auto-emulsionanti che sono miscele isotropiche di olio, tensioattivo e co-solvente/co-tensioattivo in grado di auto-emulsionare spontaneamente in presenza di un mezzo acquoso portando alla formazione di una micro o nanoemulsione. Le formulazioni lipidiche presentano numerosi vantaggi, tra i quali ricordiamo l'incremento della biodisponibilità orale e la diminuzione della variabilità intra e inter-soggetto. Queste formulazioni si sono rivelate utili per aumentare la biodisponibilità orale di diverse molecole tra cui ricordiamo la ciclosporina, il ritonavir, l'isotretionina per i quali esistono già dei prodotti in commercio. Tuttavia, in letteratura vengono riportati diversi studi che hanno dimostrato la capacità di queste formulazioni di incrementare la biodisponibilità orale anche di altre molecole, tra le quali ricordiamo la simvastatina, l'atorvastatina, e il paclitaxel.

BIBLIOGRAFIA & SITOGRAFIA

Albertini B., Di Sabatino M., Melegari C., Passerini N., *Formulation of spray congealed microparticles with self-emulsifying ability for enhanced glibenclamide dissolution performance*, Journal of Microencapsulation (2015) 32 (2) 181-192. Doi: 10.3109/02652048.2014.98534.

Amidon G.L., Lennernas H., Shah V.P., Crison J.R., *A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vivo drug product dissolution and in vivo bioavailability*, Pharmaceutical Research (1995) 12, 413-420.

Amorosa M., *Forme farmaceutiche, vie di somministrazione e assorbimento dei farmaci*, In: Principi di Tecnica Farmaceutica (2021) Piccin Nuova Libreria.

Aulton M.E., Taylor K.M.G., *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacturing of medicines* (2018) Elsevier.

Buraphacheep V., Morakul J. B., *Nanocrystals for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs*, Asian Journal of Pharmaceutical Sciences (2015) 10 (1) 13-23.

Čerpnjak K., Zvonar A., Vrečer F., Gašperlin M., *Development of a solid self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for solubility enhancement of naproxen*, Drug Development and Industrial Pharmacy (2015) 41:9,1548-1557. Doi: 10.3109/03639045.2014.971031.

Chiellini E., Bellich B., Macchiavelli S., Fiannaca R., Skrbec D., Cadelli G.C., Carli F., *Solid double microemulsions for improved absorption of scarcely bioavailable drugs*. Atti del Fifth Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Biotechnology, Lubiana (2003) 469-470.

Cho H.-Y., Kang J.H., Ngo L., Tran P., Lee Y.-B., *Preparation and Evaluation of Solid-Self-Emulsifying Drug Delivery System Containing Paclitaxel for Lymphatic Delivery*, Journal of Nanomaterials (2016) Article ID 3642418. doi: dx.doi.org/10.1155/2016/3642418.

Colombo P., Alhaique F., Caramella C., Conti B., Gazzaniga A., Vitale E., *Farmaci e forme farmaceutiche*, In: Principi di Tecnologia Farmaceutica (2015) Casa Editrice Ambrosiana.

Corti G., Maestrelli F., Cirri M., Zerrouk N., Mura P., *Development and evaluation of an in vitro method for prediction of human drug absorption: II. Demonstration of the method suitability*, European Journal of Pharmaceutical Sciences (2006) 27(4):354-362. doi:10.1016/j.ejps.2005.11.005.

Craig D.Q., *The mechanisms of drug release from solid dispersions in water soluble polymers*, International Journal of Pharmaceutics (2002) 231 (2), 131-44.

de Smidt P.C., Campanero M.A., Trocóniz I.F., *Intestinal absorption of penclomedine from lipid vehicles in the conscious rat: contribution of emulsification versus digestibility*, International Journal of Pharmaceutics (2004) 270, 109-118.

Ditzinger F., Price D.J., Ilie A.R., Köhl N.J., Jankovic S., Tsakiridou G., Aleandri S., Kalantzi L., Holm R., Nair A., Saal C., Griffen B., Kuentz M., *Lipophilicity and hydrophobicity considerations in bio-enabling oral formulations approaches – a PEARRL review*, Journal of Pharmacy and Pharmacology 71 (2019) 464-482. Doi: <https://doi.org/10.1111/jphp.12984>.

Florence A.T., Attwood D., *Physicochemical Principles of Pharmacy* (2006) Pharmaceutical Press.

Franceschinis E., Santomaso A.C., Benda L., Perissutti B., Voinovich D., Realdon N., *Influence of process variables on the properties of simvastatin self-emulsifying granules obtained through high shear wet granulation*, Powder Technology (2015) 274, 173-179. Doi: 10.1016/j.powtec.2015.01.026.

Franceschinis, E., Bortoletto, C., Perissutti, B., Dal Zotto, M., Voinovich, D., Realdon, N., *Self-emulsifying pellets in a lab-scale high shear mixer: Formulation and production design*, Powder Technology (2011) 207 (1-3), 113-118. Doi: 10.1016/j.powtec.2010.10.016.

Franceschinis, E., Voinovich, D., Grassi, M., Perissutti, B., Filipovic-Grcic, J., Martinac, A., Meriani-Merlo, F., *Self-emulsifying pellets prepared by wet granulation in high-shear mixer: Influence of formulation variables and preliminary study on the in vitro absorption*, International Journal of Pharmaceutics (2005) 291(1-2), 87-97. Doi:10.1016/j.ijpharm.2004.07.046.

Friman S., Backman L., *A new microemulsion formulation of cyclosporin: pharmacokinetic and clinical features*, Clinical Pharmacokinetics (1996) 30, 181–193.

Gao P., Rush B.D., Pfund W.P., Huang T., Bauer J.M., Morozowich W., Kuo M-S, Hageman M.J., *Development of a Supersaturable SEDDS (S-SEDDS) Formulation of Paclitaxel with Improved Oral Bioavailability*, Journal of Pharmaceutical Sciences (2003) 92 (12) 2386-2398.

Gershanik T., Benita S., *Self-dispersing lipid formulations for improving oral absorption of lipophilic drugs*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics (2000) 50, 179-188.

Gibaud S., Attivi D., *Microemulsions for oral administration and their therapeutic applications*, Expert Opinion on Drug Delivery (2012) 9 (8), 937–951. doi:10.1517/17425247.2012.694865).

Gupta S., Kesarla R., Omri A., *Formulation Strategies to Improve the Bioavailability of Poorly Absorbed Drugs with Special Emphasis on Self-Emulsifying Systems*, ISRN Pharmaceutics (2013) 848043. doi: 10.1155/2013/848043.

Hauss D.J., *Oral lipid-based formulations*. Advanced Drug Delivery Reviews (2007) 59, 667–676. doi: 10.1016/j.addr.2007.05.006.

Holm R., *Bridging the gaps between academic research and industrial product developments of lipid-based formulations*, Advanced Drug Delivery Reviews (2019) 142, 118-127. doi: 10.1016/j.addr.2019.01.009.

Humberstone A.J., Charman W.N., *Lipid-based vehicles for the oral delivery of poorly*

water soluble drugs, *Advanced Drug Delivery Reviews* (1997) 25, 103-128.

Jorga A., Holt D.W., Johnston A., *Therapeutic Drug Monitoring of Cyclosporine, Transplantation Proceedings* (2004) 36 (Suppl 2S), 396S-403S. doi:10.1016/j.transproceed.2004.01.013

Kalepun S., Manthina M., Padavala V., *Oral lipid-based drug delivery systems – an overview*, *Acta Pharmaceutica Sinica B* (2013) 3, 361-372. doi: 10.1016/j.apsb.2013.10.001.

Kang B.K., Lee J.S., Chon S.K., Jeong S.Y., Yuk S.H., Khang G., Lee H.B., Cho S.H., *Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs*, *International Journal of Pharmaceutics* (2004) 274, 65-73.

Kang B.K., Lee J.S., Chon S.K., Jeong S.Y., Yuk S.H., Khang G., Lee H.B., Cho S.H., *Development of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs*, *International Journal of Pharmaceutics* (2004) 274 (1-2) 65-73.

Karim F.T., Kalam A., Anwar R., Miah M.M., Rahman M.S., Islam S.M.A., *Preparation and evaluation of SEDDS of simvastatin by in vivo, in vitro and ex vivo technique*, *Drug Development and Industrial Pharmacy* (2015) 41 (8) 1338-1342. doi: 10.3109/03639045.2014.950271

Khadka P., Ro J., Kim H., Kim I., Kim J. T. , Kim H., Cho J. M., Yun G., Lee J., *Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability*, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* (2014) 9, 304-316.

Khan A.A., Mudassir J., Mohtar N., Darwis Y., *Advanced drug delivery to the lymphatic system: lipid-based nanoformulations*, *International Journal of Nanomedicine* (2013) 8, 2733-2744.

Khoo S.M., Humberstone A.J., Christopher Porter J.H. Edwards G.A., Charman W.N., *Formulation design and bioavailability assessment of lipidic self-emulsifying formulations of halofantrine*, *International Journal of Pharmaceutics* (1998) 167 (1-2) 155-164. doi: 10.1016/S0378-5173(98)00054-4.

Klein S., *The Use of Biorelevant Dissolution Media to Forecast the In Vivo Performance of a Drug*, *The AAPS Journal* (2010) 12 (3) 397-406. Doi: 10.1208/s12248-010-9203-3.

Klinke R., Silbernagl S., *Fisiologia*, Prima edizione italiana, Zanichelli, Bologna (1999).

Kommuru T.R., Gurley B., Khan M.A., Reddy I.K., *Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment*, *International Journal of Pharmaceutics* (2001) 212, 233-246.

Krishnaiah Y.S.R., *Pharmaceutical Technologies for Enhancing Oral Bioavailability of Poorly Soluble Drugs*, *Journal of Bioequivalence & Bioavailability* (2010) 2, 028-036. doi:10.4172/jbb.1000027.

- Lawrence M.J., Rees G.D., *Microemulsion-based media as novel drug delivery systems*, *Advanced Drug Delivery Reviews* 45 (2000) 89–121; doi: 10.1016/s0169-409x(00)00103-4.
- Lawrence M.J., Rees G.D., *Microemulsion-based media as novel drug delivery systems*, *Advanced Drug Delivery Reviews* (2000) 45, 89–121.
- Le-Ngoc Vo C., Park C., Lee B-J., *Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2013) 85 (3) 799-813.
- Liu W., Pan H., Zhang C., Zhao L., Zhao R., Zhu Y., Pan W., *Developments in Methods for measuring the intestinal absorption of nanoparticle-bound drugs*, *International Journal of Molecular Sciences* (2016) 17, 1171.
- Liu X., Testa B., Fahr A., *Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation*, *Pharmaceutical Research* (2011) 28, 962–977.
- Marques M., *Dissolution Media Simulating Fasted and Fed States*, *Dissolution Technologies* (2004) doi: dx.doi.org/10.14227/DT110204P16.
- Martini F.H., Tallitsch R.B., Nath J.L., Ober W.C., *Anatomia umana* (2019) EdiSES.
- Meriani F., Coceani N., Sirotti C., Voinovich D., Grassi M., *In vitro nimesulide absorption from different formulations*, *Journal of Pharmaceutical Sciences* (2004) 93, 350.
- Morozowich W., Gao P., *Improving the Oral Absorption of Poorly Soluble Drugs Using SEDDS and S-SEDDS*. In: *Developing Solid Oral Dosage Forms Pharmaceutical Theory And Practice* (2009) Pages 443-468 Elsevier.
- Mua H., Holm R., Müllertz A., *Lipid-based formulations for oral administration of poorly water-soluble drugs*, *International Journal of Pharmaceutics* (2013) 453 (1) 215-224.
- Newton M., Petersson J., Podczek F., Clarke A., Booth S., *The influence of formulation variables on the properties of pellets containing a self-emulsifying mixture*, *Journal of Pharmaceutical Sciences* (2001) 90, 987-995.
- O'Driscoll C.M., *Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15 (2002) 405–415.
- Papich M. G., Martinez M. N., *Applying Biopharmaceutical Classification System (BCS) Criteria to Predict Oral, Absorption of Drugs in Dogs: Challenges and Pitfalls*, *The AAPS Journal* (2015) 17 (4) 948-964. doi: 10.1208/s12248-015-9743-7.
- Park H., Ha E.-S., Kim M.-S., *Current Status of Supersaturable Self-Emulsifying Drug Delivery Systems*, *Pharmaceutics* (2020) 12, 365. doi:10.3390/pharmaceutics12040365.
- Passerini N., Perissutti B., Albertini B., Franceschinis E., Lenaz D., Hasa D., Locatelli I., Voinovich D., *A new approach to enhance oral bioavailability of Silybum Marianum dry extract: Association of mechanochemical activation and spray congealing*, *Phytomedicine* (2012) 19, 160-168. DOI: 10.1016/j.phymed.2011.06.027.
- Porter C. J. H., Trevaskis N. L., Charman W. N., *Lipids and lipid-based formulations:*

optimizing the oral delivery of lipophilic drugs, Nature Reviews Drug Discovery (2007) 6, 231-248.

Pouton C.W., *Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and lipid formulation classification system*, European Journal of Pharmaceutical Sciences (2006) 29 (3-4)278-287. doi: 10.1016/j.ejps.2006.04.016.

Pouton C.W., *Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems*, European Journal of Pharmaceutical Sciences (2000) 11 (2) S93–S98. doi: 10.1016/s0928-0987(00)00167-6.

Prajapati B.G., Patel M. M., *Conventional and Alternative Methods To Improve Oral Bioavailability Of Lipophilic Drugs*, Asian Journal of Pharmaceutics (2007) 1, 1-8.

Rowe R.C., Sheskey P.J., Quinn M.E., *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Sixth edition (2009) Pharmaceutical Press.

Ruiz A.R., Manuali MSD, <https://www.msmanuals.com/it-it/casa/disturbi-digestivi/biologia-dell-apparato-digerente/panoramica-sull-apparato-digerente>. consultato il 5 maggio 2022.

Salvia-Trujillo L., Fumiaki B., Park Y., McClements D. J., *The influence of lipid droplet size on the oral bioavailability of vitamin D2 encapsulated in emulsions: an in vitro and in vivo study*, Food & Function (2017) 8, 767-777.

Sekiguchi K., Obi. N., *Studies on Absorption of Eutectic Mixture of Sulfathiazole and that of Ordinary Sulfathiazole in man*, Chemical Pharmaceutical Bulletin (1961) 9, 866-872.

Shen H.R., Zhong M.K., *Preparation and evaluation of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) containing atorvastatin*, Journal of Pharmacy and Pharmacology (2006) 58 (9) 1183–1191. doi: 10.1211/jpp.58.9.0004.

Sherwood L., *Fondamenti di fisiologia umana*, Quarta edizione (2012) Piccin.

Strickley R.G., *Currently Marketed Oral Lipid-Based Dosage Forms: Drug Products and Excipients* In: Oral Lipid-Based Formulations (2007) Ed. Hauss D.J., CRC Press. doi: 10.1016/B978-0-444-53242-8.00019-9.

Tran P., Park J-S., *Recent trends of self-emulsifying drug delivery system for enhancing the oral bioavailability of poorly water-soluble drugs*, Journal of Pharmaceutical Investigation (2021) 51, 439–463.

Vertzoni M, Augustijns P, Grimm M, Koziolk M., Lemmens G., Parrott N., Pentafragka C., Reppas C., Rubbens J., Van Den Abeele J., Vanuytsel T., Weitschies W., Wilson C.G., *Impact of regional differences along the gastrointestinal tract of healthy adults on oral drug absorption: An UNGAP*, European Journal of Pharmaceutical Sciences (2019) 134, 153-175. doi: 10.1016/j.ejps.2019.04.013.

Vietti B., *Solubilizzazione di farmaci di classe II e di classe IV mediante polissamteri*, Tesi di Dottorato (2009) Università di Parma.

Zhao J., Yang J., Xie Y., *Improvement strategies for the oral bioavailability of poorly water-*

soluble flavonoids: An overview, International Journal of Pharmaceutics (2019) 570, 118642. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118642.

Zoeller T., Klein S., *Simplified Biorelevant Media for Screening Dissolution Performance of Poorly Soluble Drugs*, Dissolution Technologies (2007) dx.doi.org/10.14227/DT140407P8.