

# **1. INTRODUZIONE**

## **1.1. Chemioterapia in acquacoltura**

La maggior parte delle malattie proprie dell'acquacoltura potrebbe essere significativamente ridotta prestando attenzione alla conduzione dell'allevamento e al mantenimento di condizioni ambientali ottimali, soprattutto per quanto riguarda la qualità dell'acqua. Questo, però, non è sempre economicamente sostenibile dalle aziende e rimane comunque la difficoltà di impedire che agenti di malattia si introducano nell'allevamento.

Riguardo a tale problema la vaccinazione rappresenta senza dubbio l'approccio più efficace, ma vaccini veramente attivi sono disponibili solo per un numero molto limitato di patologie batteriche: la vibriosi (sostenuta da *Vibrio anguillarum*) e la malattia della bocca rossa (sostenuta da *Yersinia ruckeri*). Tuttavia, la ricerca si sta da tempo orientando verso un uso più ampio e articolato dei vaccini e in senso lato di sostanze immunizzanti e/o immunostimolanti, nonché verso tecniche più avanzate, attraverso la caratterizzazione del genoma. La chemioterapia rimane, comunque per ora l'arma più efficace e flessibile nei confronti degli agenti eziologici presenti negli allevamenti ittici.

Per ottenere il successo terapeutico, è necessaria una rapida e prolungata aggressione dell'agente patogeno, fino all'esaurimento del processo morboso. Non meno importante è la scelta del farmaco che deve tener conto sia dell'attività intrinseca nei confronti del patogeno sia dello specifico comportamento farmacocinetico. Non va dimenticato che l'uso prolungato di uno stesso farmaco potrebbe rendere inutile il trattamento per l'insorgere di fenomeni di resistenza.

E' quindi auspicabile adottare un sistema di "rotazione" dei farmaci antibatterici per limitare il più possibile questo problema.

Nonostante il vasto numero di farmaci (antibatterici e antiparassitari), ritenuti potenzialmente idonei per il trattamento delle malattie che interessano le specie ittiche, in realtà è estremamente ristretto il campo di molecole consentite; infatti, oltre all'aspetto economico, è sempre più crescente l'attenzione sui possibili rischi che l'uso intensivo del farmaco in acquacoltura potrebbe rappresentare per la salute

umana e per l' ambiente, in particolare per quanto concerne il trasferimento di farmacoresistenze ai patogeni per l' uomo.

La terapia antibatterica nell' allevamento ittico è legalmente consentita solo con l' impiego di mangimi medicati, costituiti dal normale alimento di base addizionato del farmaco in quantità tale da permettere l' assunzione dei dosaggi di principio attivo previsti dalle leggi vigenti.

Di fronte a specie di pregio elevato e di norma ai riproduttori, si può ricorrere a somministrazioni parenterali o "per bagni", da attuarsi in piccole vasche, separate da quelle del resto dell' allevamento. Le immersioni in acqua possono essere brevi, quando il farmaco è fortemente concentrato, oppure prolungate (almeno 24 ore), nel caso in cui si usino basse concentrazioni. Relativamente alla somministrazione parenterale, se da un lato permette dosaggi sicuri e precisi, dall' altro è causa di notevole stress nel pesce; inoltre, è necessario ricorrere a personale qualificato ed a strutture specifiche con costi elevati. L' iniezione può essere intraperitoneale, intramuscolare o nel seno dorsale posto alla base della pinna dorsale.

Le caratteristiche ideali di un farmaco impiegato per via orale dovrebbero rispondere a determinati requisiti: appetibilità, buono o elevato assorbimento dal tratto gastro-enterico, stabilità del principio attivo nel mangime, ampio margine di maneggevolezza, scarsa insorgenza di farmaco-resistenza e scarso o nullo impatto ambientale. Tutte queste caratteristiche non sono in realtà disponibili per le molecole attualmente impiegate per combattere le malattie batteriche dei pesci.

Negli animali eterotermi, la cui temperatura corporea varia in funzione della temperatura dell' acqua, si assiste ad uno scarso assorbimento dei farmaci dal tratto gastro-enterico e ad una rilevante variabilità nell' assunzione di alimento all' interno di una popolazione ittica.

Inoltre il comportamento cinetico di un farmaco nelle specie ittiche è influenzato da numerosi fattori, alcuni dei quali comuni anche alle specie omeoterme ed in particolare: dalle caratteristiche fisico-chimiche del farmaco (pH, pKa, solubilità e stabilità), dalle differenze fisiologiche e biochimiche riferibili a specie, età, sesso, dagli stati patologici degli animali, dalla composizione e dalle caratteristiche della dieta, dall' entità di legame con le proteine plasmatiche e dalla presenza di altri xenobiotici. Oltre a questi, nel caso di animali eterotermi, intervengono anche fattori ambientali, quali: la temperatura, la salinità, il pH dell' acqua, la presenza di

particolari ioni, la presenza di residui organici e la quantità di ossigeno disciolto nell'acqua (Smith et al., 1981).

## **1.2. Legislazione relativa all'uso di farmaci in acquacoltura**

Dal 10 giugno 2006 è in vigore il Codice Comunitario dei medicinali veterinari: un Testo Unico che raccoglie e sostituisce tutta la precedente normativa sui medicinali veterinari per quanto riguarda l'autorizzazione all'immissione in commercio, la detenzione, la prescrizione, la fornitura e la somministrazione dei medicinali veterinari.

L' art. 1 del Decreto Legislativo 6 aprile 2006, n°193 definisce medicinale veterinario "ogni sostanza o associazione di sostanze presentata come avente proprietà curative e profilattiche delle malattie animali e che può essere usata sull'animale o somministrata all'animale allo scopo di ripristinare, correggere o modificare funzioni fisiologiche mediante un'azione farmacologica, immunologica o metabolica, oppure di stabilire una diagnosi medica" (Decreto Legislativo 6 aprile 2006, n°193, [www.camera.it/parlm/leggi/deleghe/testi/06193dl.htm](http://www.camera.it/parlm/leggi/deleghe/testi/06193dl.htm)).

Questo decreto si applica ai medicinali veterinari, incluse le premiscele per alimenti medicamentosi, destinati ad essere immessi in commercio e preparati industrialmente o nella cui fabbricazione interviene un processo industriale (Art. 2).

Non si applica invece agli alimenti medicamentosi disciplinati dal decreto legislativo 3 marzo 1993, n°90 e successive modificazioni che regola l'allestimento, l'immissione in commercio e l'utilizzo dei mangimi medicati. L' art. 3, comma 1 di tale decreto recita che nessun medicinale può essere immesso in commercio senza aver ottenuto l'AIC dal Ministero della Salute, oppure dalla Commissione Europea, a norma del Regolamento (CEE) 2309/93, fatta eccezione per alcune deroghe citate nello stesso comma.

Il D.Lgs. 6 aprile 2006, n°193 non si applica neppure ai medicinali veterinari ad azione immunologica inattivati aventi caratteristiche di vaccini stabulogeni ed autovaccini, regolamentati dal D.M. 17 marzo 1994, n°287. Questi vaccini sono prodotti dagli Istituti Zooprofilattici Sperimentali previa autorizzazione del Ministero della Salute e a seguito di parere favorevole dell'Istituto Superiore di Sanità. Essi, quindi, non sono "registrati" come avviene per gli altri prodotti farmacologici, vaccini

compresi e possono essere utilizzati solo per motivi contingenti, in presenza di gravi patologie. Inoltre essi devono essere preparati, su specifica richiesta del veterinario curante, dopo diagnosi clinica e di laboratorio con lo specifico ceppo della singola azienda (da qui il nome di stabulogeno, cioè “nato/isolato in quella stalla”).

Attualmente risultano essere autorizzati in Italia: un vaccino per la lattococcosi (IZS di Torino) e gli “storici” vaccini per la vibriosi e la bocca rossa (autorizzazione dell’ IZS delle Venezie attualmente acquisita dall’ IZS di Sassari).

Considerando che la somministrazione di medicinali veterinari ad animali destinati alla produzione di alimenti può comportare la presenza di residui negli alimenti ottenuti dagli animali così trattati, è stato emanato nell’ambito della Comunità Europea il regolamento (CEE) 2377 del 26 giugno 1990 che definisce il limite massimo di residuo (LMR o MRL) come la massima concentrazione di residui risultante dall’uso di un prodotto medicinale veterinario (espresso in mg/kg o in µg/kg sul peso vivo) consentita legalmente e riconosciuta accettabile negli o sugli alimenti.

Gli MRL variano da farmaco a farmaco, da specie a specie ed anche da un tessuto all’altro, in relazione alla possibile presenza di vie metaboliche specifiche che ne modificano il profilo farmacocinetico. La determinazione di idonei MRL consente, inoltre, di calcolare i tempi di sospensione pre-macellazione dei soggetti trattati.

Nel caso dei pesci, si deve tener conto anche della temperatura dell’ ambiente in cui vivono in quanto, essendo eterotermi, il metabolismo e l’ eliminazione di un farmaco variano notevolmente in funzione della temperatura dell’ acqua.

Pertanto, in questi animali, il tempo di sospensione è espresso in Gradi/Giorno.

Lo scopo di tale regolamento è di armonizzare le procedure di registrazione dei farmaci nei Paesi membri dell’U.E., utilizzando un approccio comune che dia garanzia assoluta di assenza di livelli residuali di farmaco o di suoi metaboliti nelle derrate destinate al consumo umano.

A corollario di questo Regolamento sono stati inseriti 4 Allegati e precisamente:

**ALLEGATO 1.** Per le sostanze farmacologicamente attive impiegate nei medicinali veterinari, per le quali sono stati fissati i valori di MRL definitivi, su valutazione del rischio tossicologico, farmacocinetico e residuale.

**ALLEGATO 2.** Per le sostanze riconosciute sicure e che quindi non necessitano la determinazione di un valore di MRL.

**ALLEGATO 3.** Per le sostanze per le quali sono stati stabiliti MRL provvisori. Sostanze che hanno bisogno di accertamenti e solo successivamente verranno collocate negli idonei allegati.

**ALLEGATO 4.** Per le sostanze la cui riconosciuta tossicità non consente di fissare alcun valore di MRL. Sostanze il cui impiego è vietato.

Per quanto concerne le specie ittiche, vengono di seguito indicati i farmaci nei diversi allegati:

**ALLEGATO 1.** Amoxicillina\*, Ossitetraciclina\*, Clortetraciclina\*, Tetraciclina, Sulfadiazina\*, Trimetoprim\*, Flumechina\*, Tiamfenicolo, Florfenicolo, Eritromicina, Teflubenzuron, Emamectina, Sarafloxacin, Enrofloxacin, Doxibiciclina, Ivermectina, Tiamulina e Lincomicina.

**ALLEGATO 2.** Acqua Ossigenata, Formalina, Sodio Cloruro, Acido Peracetico, Somatosalm, Benzalconio Cloruro (come eccipiente), Bronopol\* e Montanide.

\* uniche sostanze registrate in Italia per le specie ittiche.

**ALLEGATO 3.** Azamethiphos, Cipermetrina, Diflubenzuron, Teflubenzuron e Acido Ossolinico.

**ALLEGATO 4.** Cloramfenicolo, Nitrofurani, Furazolidone, Dimetridazolo, Metronidazolo e Ronidazolo.

Il medico veterinario può prescrivere, in caso di grave patologia, sotto la sua responsabilità, alimenti medicamentosi contenenti premiscele autorizzate per altre specie di animali da produzione alimentare o contenenti premiscele autorizzate per l'uso in acquacoltura, a dosaggi superiori da quelli indicati.

La vendita dei medicinali veterinari ad azione immunologica, di premiscele medicate nonché di medicinali veterinari contenenti chemioterapici, antibiotici, antiparassitari, corticosteroidi, ormoni, antinfiammatori, sostanze psicotrope, neutrope, tranquillanti e beta-agonisti, prescritti per la terapia di animali destinati alla produzione di alimenti per l'uomo è effettuata soltanto dietro prescrizione di ricetta medico-veterinario non ripetibile in triplice copia, di cui la prima viene conservata dal farmacista, la seconda viene da questi inviata alla A.S.L. entro una settimana dalla vendita e la terza viene conservata dal titolare degli impianti (Art. 76, D.L. 6 aprile 2006, n°193).

Nell'agosto 1995, il Dipartimento del Medicinale Veterinario formulò delle linee guida, operative dal 1° Gennaio 1998, sulla valutazione del rischio ambientale (ecotossicità)

causato dai farmaci utilizzati in acquacoltura, con esclusione dei prodotti ad azione immunologica, al fine di esaminare i potenziali effetti dannosi di questi medicinali sull'ambiente ed indicare le misure preventive utili allo scopo di ridurre tali rischi. Sono stati pertanto fissati dei limiti di concentrazione dei farmaci nell'ambiente riconosciuti come non nocivi, rispettivamente di 100 µg/kg p.c. per i farmaci impiegati nelle specie omeoterme e 1 µg/kg per quelli destinati all'impiego in acquacoltura.

Inoltre, per limitare gli aspetti negativi del farmaco veterinario e individuare un suo uso improprio, è stato istituito un Sistema Nazionale di Farmacovigilanza che fa capo al Ministero della Salute Nazionale (Dipartimento per Alimenti e Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria). Nei suoi compiti, rientrano il controllo della sicurezza e dell'efficacia clinica dei farmaci, la sorveglianza epidemiologica sulla comparsa di farmacoresistenza e la verifica di eventuali effetti tossici sugli animali di destinazione, sull'ambiente e sull'uomo, sia come manipolatore dei farmaci che in veste di consumatore delle derrate alimentari.

Tutti questi controlli devono essere associati anche alla Farmacosorveglianza, tesa a verificare le modalità di distribuzione dei farmaci lungo tutta la filiera: dalla produzione del farmaco, alla sua distribuzione, all'industria mangimistica, al veterinario prescrittore e all'allevamento.

Nella tabella 1 sono indicati i principi attivi registrati e utilizzabili in alcuni paesi della U.E.

Tabella 1. Principi attivi registrati e utilizzati in acquacoltura in alcuni paesi della U.E.

Principi attivi	Paesi U.E.											
	I	FIN	PL	IRL	S	D	DK	NL	F	UK	E	Gr
Beta- lattamine Ampicillina/Amoxicillina	X			X			X			X	X	X
Tetracicline Ossi/clor/tetracycline	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Chinoloni Flumechina	X	X		X	X*			X	X	X	X	
Acido oxolinico				X	X*		X		X			X
Sulfamidici	X			X	X*	X		X	X		X	X
Trimetoprim Trimetoprim+sulfamidico	X		X		X*	X	X		X		X	
Fenicoli Florfenicolo										X		
Fluorochinoloni Sarafloxacina				X						X		
Macrolidi Eritromicina	X*								X*		X*	X*

\* autorizzato con permesso speciale (tratto da [www.acquacoltura.it](http://www.acquacoltura.it))

### 1.3. Antibiotici utilizzabili in Italia in ittiocoltura

#### Penicilline.

L' unico derivato penicillinico introdotto nella terapia ittica in Italia è l' Amoxicillina; molecola ad ampio spettro d'azione comprendente *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Pasteurella piscicida*, *Streptococcus* spp., *Edwardsiella tarda* e, a minore sensibilità, *Vibrio anguillarum*.

Il farmaco è sensibile alle beta-lattamasi ed è suscettibile alla rapida insorgenza di farmacoresistenza mediata da plasmidi, soprattutto in relazione ad un utilizzo ripetuto

in tempi ravvicinati in uno stesso allevamento.

La somministrazione avviene per via orale, aggiungendo il farmaco all' alimento con dosaggi di 40/80 mg/kg p.c. per 10 giorni. Non sono stati osservati effetti collaterali fino a dosaggi cinque volte superiori rispetto a quello terapeutico (Brown, 1993).

MRL - 50 µg/kg (All. 1 del Reg.CEE 2377/90).

Tempo di sospensione: 150 gradi/giorno

### **Chinoloni.**

Solo la Flumechina è autorizzata in Italia per il trattamento dei Salmonidi. Si tratta di un derivato fluorurato di transizione, attivo verso i Gram positivi, ma specialmente contro i Gram negativi, utilizzato soprattutto in malattie quali la furunculosi (*Aeromonas salmonicida*), la vibriosi (*Vibrio anguillarum*) e la malattia della bocca rossa (*Yersinia ruckeri*). La somministrazione orale prevede un dosaggio di 12 mg/Kg p.c. per 5 giorni.

MRL - 150 µg/kg (All. 1 del Reg CEE 2377/90).

Tempo di sospensione: 5 giorni (l' eliminazione del farmaco dai tessuti edibili è infatti molto rapida).

### **Sulfadiazina-Trimetoprim (in rapporto di 5:1).**

Si tratta di un "sulfamidico potenziato" con un ampio spettro d' azione. L' associazione, rivelatasi molto efficace per infezioni sostenute da *Aeromonas* spp. e da *Yersinia ruckeri*, ma anche da *Corynebacterium psychrophila*, *Condrococcus columnaris* e *Vibrio anguillarum*, ha prodotto una serie importante di vantaggi: effetto battericida, rispetto ad un effetto batteriostatico dei singoli farmaci; riduzione delle MIC (concentrazione minima inibente) proprie di ogni molecola; ampliamento dello spettro d' azione; riduzione dei dosaggi dei sulfamidici e quindi degli effetti tossici; specificità di azione. Lo stesso comportamento farmacocinetico dimostra la validità dell' associazione; infatti l' assorbimento dei sulfamidici e del trimetoprim dal tratto gastro-enterico è superiore a quello di altri farmaci impiegati in acquacoltura. La somministrazione con mangime medicato prevede una dose di 30 (25 + 5) mg/Kg p.c. per 5 giorni. MRL - per la Sulfadiazina – 100 µg/kg (All. 1 del Reg CEE 2377/90) per il Trimetoprim – 50 µg/kg (All.1 del Reg CEE 2377/90). Tempo di sospensione: 500 gradi-giorno.



## **Tetracicline.**

Tutte le tetracicline hanno un ampio spettro d' azione, che nello specifico comprende *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri*, *Pasteurella piscicida* e *Streptococcus* spp. In particolare l' ossitetraciclina cloridrato (OTC), il solo principio attivo di questa classe autorizzato in Italia, è l' antibiotico di più vasto e antico impiego, che per primo è stato oggetto di studi quantitativi sull' assorbimento. Ha un margine di sicurezza ampio: sotto un profilo tossicologico, in quanto farmaco ben tollerato. Tuttavia si sono riscontrati effetti immunosoppressivi nella carpa (Grondel et al., 1989), danni a livello epatico (Bruno, 1989) e ritardato accrescimento, soprattutto in pesci molto giovani. Fenomeni di resistenza mediata da plasmidi sono diffusi in *Aeromonas*, *Vibrio* e altri batteri.

Gli studi della farmacocinetica nelle specie ittiche allevate indicano che l' ossitetraciclina presenta uno scarso assorbimento dai mangimi medicati (vedi dati tabella 2) come si realizza in genere anche per altri antibiotici (Della Rocca et al., 2005).

La ragione della scarsa biodisponibilità orale delle tetracicline andrebbe ricondotta alla formazione di complessi con cationi bivalenti, quali calcio e magnesio, presenti nella dieta (Cravedi et al, 1987) e, per le specie eurialine, nell'acqua di mare; questi complessi, non potendo attraversare le membrane lipidiche, sono assorbiti con molta difficoltà. Lunestad e Goksoyr (1990) hanno calcolato che nell'acqua di mare il 95% dell' ossitetraciclina, in un intervallo di concentrazioni compreso tra 0,5 e 100 µg/ml, è legato agli ioni calcio e magnesio. Inoltre, in un mezzo acquoso contenente il 70% di acqua di mare, le concentrazioni minime inibenti (MIC) sono perfino 10 volte più alte di quelle rilevate in un ambiente privo di calcio e magnesio, tanto che alcuni ricercatori consigliano di aumentare la quantità di farmaco nell'alimento per evitare un insuccesso terapeutico (Grondel et al., 1987). Il valore del pH a livello enterico gioca un ruolo importante nel meccanismo di assorbimento dell' ossitetraciclina, in quanto il pH intestinale è particolarmente sfavorevole all'assorbimento del farmaco (Dauble & Curtis, 1990).

Tabella 2. Assorbimento dell'ossitetraciclina dai mangimi medicati in trote (F= biodisponibilità).

Dose (mg/kg p.c.)	Temp. °C	Specie	F(%)	Rif. Bibliografico
20	14	Trota	7.1	Cravedi et al., 1987
75*	16	Trota	5.6	Bjorklund et al., 1991
150**	7	Trota	2.6	Rogestad et al., 1991
60	—	Trota	1.25	Nows et al., 1992
50***	11	Trota	30.3	Abedmi et al., 1998

\* sospensione senza alimento

\*\* capsule di gelatina

\*\*\* OTC in soluzione metanolica in capsule di gelatina

Malvisi et al. (1996) rilevarono che le concentrazioni di ossitetraciclina nelle branchie e nel fegato di Trote iridee, a seguito di somministrazione orale dell' antibiotico, erano cinque volte superiori rispetto a quelle presenti nel tessuto muscolare. Anche il rene, principale organo emuntore, presentava concentrazioni elevate, tuttavia inferiori rispetto a quelle relative al fegato. Black et al. (1991) rilevarono, viceversa, i più alti livelli di farmaco nel fegato e i più bassi nel cervello. Namdari et al. (1996) riportarono che l'ossitetraciclina, nelle due specie di salmoni trattati (*Oncorhynchus tshawytscha* e *Oncorhynchus kisutch*), si concentrava nei diversi tessuti secondo quest' ordine: fegato > ossa > rene e pelle > muscolo. Le tetraciline, in generale, tendono ad accumularsi nel pronefrone, nella colonna vertebrale e nelle squame (Grondel et al., 1989).

Negli animali eterotermi, in analogia alle specie omeoterme, i farmaci vengono escreti soprattutto per via renale e/o biliare come composti immodificati (es. tetraciline) o come metabolici. Vie minori di eliminazione sono costituite dalle branchie e dal muco della superficie corporea. Nei pesci l' entità dei processi di escrezione viene valutata sulla base delle concentrazioni reperibili in sede renale, epatica o biliare. Fattori quali lo stato fisiologico o patologico, la nutrizione, il legame con le proteine plasmatiche, il metabolismo, la particolare affinità per un tessuto (nel caso delle tetraciline per il tessuto osseo), la presenza di altri xenobiotici e la

temperatura dell' acqua sono in grado di modificare la cinetica di escrezione. A tal proposito, Salte e Liestol, (1983) nella condizione di allevamento nordico, hanno calcolato che i tempi di eliminazione dell' ossitetraciclina in seguito a trattamenti orali con 75 mg/kg p.c. sono di 60 gg per temperature sopra i 10°C ed aumentano a 100 gg per temperature tra 7°C e 10°C. Questo prolungamento può essere spiegato in relazione al fatto che bassi valori di temperatura riducono le attività enzimatiche deputate alla produzione di energia, necessaria per il processo di eliminazione del farmaco. In linea generale è stato indicato che un decremento o un incremento dell' escrezione pari a circa un 10%, si realizza per variazioni di 1°C in meno o in più della temperatura dell' acqua (Malvisi et al.,1996). Inoltre, è stato osservato che a parità di temperatura, l' eliminazione dell' ossitetraciclina è più veloce dal fegato che dal tessuto muscolare (Rigos et al., 2002). Per quanto concerne le tetracicline, nessun processo biotrasformativo nelle specie ittiche è stato riportato in letteratura (Black et al., 1991).

Per ciò che riguarda la trota iridea, Björklund e Bylund (1990) è stata studiata la farmacocinetica dell'OTC dopo singola somministrazione orale, a diverse temperature di allevamento. I risultati ottenuti, riassunti nelle tabelle 3 e 4, evidenziano la scarsa biodisponibilità del farmaco e il progressivo rallentamento dell' assorbimento e dell' eliminazione del principio attivo, al diminuire della temperatura dell'ambiente sperimentale.

Tabella 3. Assorbimento dell'OTC nella trota iridea dopo somministrazione orale di una singola dose a diverse temperature (da Björklund e Bylund, 1990).

	Temperatura	15°C	16°C	10°C	5°C	7°C
	Dose (mg/kg)	100	75	75	75	150
Siero	T <sub>max</sub> (h/gg)	9 h	1 h	12 h	24 h	1/3 gg
	C <sub>max</sub> (µg/ml)	1,14	2,1	5,3	3,2	-
Muscolo	T <sub>max</sub> (h/gg)	2 h/3 gg	2 gg	4 gg	9 gg	4/7 gg
	C <sub>max</sub> (µg/g)	0,56	2,9	4,0	2,6	-
Fegato	T <sub>max</sub> (h/gg)	3 h	2 gg	12 h	9 gg	3/5 gg
	C <sub>max</sub> (µg/g)	13,3	24,1	45,8	20	47,7

Tabella 4. Eliminazione dell'OTC nella trota iridea dopo somministrazione orale di una singola dose a diverse temperature (da Björklund e Bylund, 1990).

Temperatura	t <sub>1/2</sub> ± S.D. (gg)			Periodo di prelievo (gg)
	Siero	Muscolo	Fegato	
5°C	8,9±2,3	8,8±3,9	9,5±2,1	92
10°C	6,1±1,6	5,9±1,7	4,2±0,5	48
16°C	4,8±1,3	5,1±0,8	4,7±0,9	37

Per ciò che concerne il branzino, sono pochi i lavori reperibili in letteratura.

Treves-Brown (2000) ha riportato uno studio condotto su questa specie ittica che attesta la bassa biodisponibilità dell' OTC, dopo somministrazione per via orale, con mangime medicato in ragione di 75 mg/kg di OTC. Anche in questo caso, lo studio si incentrava sull' influenza della temperatura di allevamento (circa 20°C) sulla biodisponibilità e sulle concentrazioni residuali nel muscolo di branzino durante i 20 giorni successivi alla somministrazione.

La dose impiegata, addizionata come sempre all' alimento, è di 75 mg/kg (7,5 g/kg di mangime somministrato in ragione dell'1% della biomassa) p.c. per 14 giorni.

MRL - 100 µg/kg (All. 1 del Reg. CEE 2377/90). Tempo di sospensione: 30 giorni.

### **Macrolidi.**

L' eritromicina è il principio attivo d' elezione contro i germi Gram positivi ma, nonostante ciò, non è ancora registrata per l' acquacoltura in Italia. Per ovviare alla carenza normativa, è possibile ricorrere alla ricetta veterinaria in deroga (Art. 3, DL 119/92).

In acquacoltura sono utilizzati solo 3 macrolidi: l' eritromicina (e i suoi sali ed esteri) a 14 atomi di carbonio, la spiramicina e la josamicina con anello a 16 atomi di carbonio.

Sono antibiotici batteriostatici, attivi principalmente contro i batteri gram-positivi. Poiché nella maggior parte delle specie ittiche i batteri patogeni sono gram-negativi, le indicazioni terapeutiche dell' eritromicina sono limitate ma specifiche; fra queste: infezioni supportate da Chlamydia, Piscirickettsia e da Renibacterium salmoninarum (la malattia batterica renale o Bacterial Kidney Disease –BKD), la streptococcosi e la

lattococcosi (Bryskier A., 1998). Quest' ultima è un'infezione da cocchi Gram positivi apparsa in Europa circa 15 anni fa ed è considerata la principale responsabile del calo del 40% della produzione italiana di trote dell' ultimo decennio. È da considerarsi la patologia preminente durante la stagione primaverile ed estivo-autunnale nella maggior parte degli impianti che utilizzano acque superficiali e colpisce sia specie dulciacquicole che marine. Tale patologia si presenta elettivamente in soggetti subadulti ed adulti, di taglia superiore ai 20 g, allevati in acque correnti con temperature intorno ai 16-18°C.

L'eritromicina è selettivamente tossica per le cellule dei tubuli renali, nonostante la concentrazione riscontrabile nei reni sia paragonabile a quella nelle branchie. Lesioni nel primo tratto del tubulo prossimale sono visibili entro le 24 ore dalla somministrazione. Gli effetti sono reversibili in seguito alla sospensione della cura. (Moffitt C.M. et al. 1988).

La dose impiegata, addizionata come sempre all' alimento, è di 75 mg/kg. (7,5 g/kg di mangime somministrato in ragione dell' 1% della biomassa) p.c. per 10 giorni.

MRL - 200 µg/kg (All. 1 del Reg. CEE 2377/90). Tempo di sospensione: 500 gradi-giorno.

L'eritromicina è poco appetibile per i pesci, in particolare per i salmonidi, e questo può essere un problema soprattutto a basse temperature, quando il grado di nutrizione può essere ridotto ed un' elevata concentrazione di farmaco viene perciò richiesta.

In una prova *in vivo*, in cui al salmone reale (*Oncorhynchus tshawytscha*) veniva somministrato un alimento contenente una concentrazione di eritromicina che variava dallo 0 al 12%, è stato riscontrato che il pesce assumeva il mangime non medicato significativamente più spesso rispetto a quello medicato; quest' ultimo veniva rigurgitato in quantità proporzionale alla dose di eritromicina.

Ad ogni modo le quantità usate in questa prova erano inusualmente elevate. Infatti nello stesso pesce, impiegando una dose di 200 mg/kg/giorno addizionata, come sempre, all' alimento (mangime somministrato in ragione dell' 1,5% della biomassa), si osservava una diminuzione dell' assunzione di mangime non superiore al 20%.

Non sono riportati in bibliografia specifici studi sulla biodisponibilità orale di sistemi contenenti l' eritromicina base e derivati (esteri e sali) (Treves-Brown, 2000).

## **1.4. Rischi derivati dall'uso di farmaci in acquacoltura**

Con l'intensificarsi della produzione di proteine animali per il consumo umano, in ragione dei crescenti fabbisogni mondiali, l'uso di sostanze per il controllo delle malattie animali ha acquistato sempre maggior importanza; basti pensare che il 70-80% di tutte le specie allevate per fini alimentari subiscono trattamenti farmacologici. Anche in acquacoltura un uso intensivo di farmaci non è scevro da rischi per la salute umana e per l'ambiente.

### **1.4.1. Sicurezza nei confronti della salute umana**

Come per gli animali omeoterme allevati a scopo alimentare, anche ai pesci devono essere applicati dei tempi di sospensione in modo tale che i residui del/i farmaco/i presenti nelle carni, non costituiscano un pericolo per la salute pubblica.

I rischi da residui sono così schematizzati:

- a) Fenomeni di tossicità acuta: impossibili a verificarsi perché conseguenti a dosaggi talmente elevati da non poter essere reperibili come residuo (es.: dose tossica per una sintomatologia clinica nell'uomo è di 100 mg/kg p.c. che per un uomo di 60 kg significa assumere 6 g di farmaco cioè 60000 kg di muscolo).
- b) Manifestazioni allergiche: penicilline e derivati, sulfamidici e in misura minore le tetracicline.
- c) Effetti tossici indesiderati per assunzione protratta di quote residuali superiori agli MRL previsti: ad esempio la streptomicina è neuro-nefrotossica; l'ossitetraciclina può indurre deformità nell'embrione ed è quindi pericolosa se assunta nel primo periodo di gravidanza.
- d) Effetti sulla flora microbica intestinale: dismicrobismi con conseguenti sindromi da mal assorbimento o patologie gastroenteriche da super infezioni.
- e) Mancata efficacia di terapie antibatteriche per la comparsa di farmacoresistenza: l'uso di dosi basse o subterapeutiche di antibiotici nei mangimi medicati esercita infatti scarsi effetti antimicrobici e può indurre una resistenza

batterica trasferibile in un secondo tempo a microrganismi presenti nell'intestino dell'uomo, evento che potrebbe compromettere il trattamento di patologie (Booth et al., 1991).

#### **1.4.2. Sicurezza nei confronti dell'ambiente**

Calcolando che circa il 20% del mangime somministrato ai pesci non viene assunto e si deposita nei sedimenti sottostanti le gabbie di contenimento delle specie allevate "off-shore" è giusto pensare che la scarsa appetibilità di alcuni mangimi medicati (Hustvedt et al, 1991) e le stesse patologie, che influiscono riducendo l'appetito (Uno, 1996), portino ad un aumento di tale percentuale. Tenendo conto poi della scarsa biodisponibilità e biotrasformazione dei farmaci negli eterotermi, anche l' escrezione fecale e/o urinaria contribuisce all' accumulo dei principi attivi nei sedimenti.

Samuelson (1991) ha dimostrato che ossitetraciclina, acido ossolinico e flumechina presentano stabilità nei sedimenti, non sono cioè inattivati, e vengono rilasciati col tempo. L' ossitetraciclina non è degradata dai microrganismi dell' acqua di mare ed è molto stabile nell'oscurità. In condizioni di luce la sua emivita è di 30 ore a pH 8 contro 30 giorni in acqua dolce a pH 7, quindi la fotodecomposizione gioca probabilmente il ruolo principale nell' epurazione dell'ambiente marino dall'ossitetraciclina.

Gli effetti collaterali sull'ambiente possono così riassumersi:

- a) riduzione reversibile (50-70%) del numero dei batteri presenti nei sedimenti;
- b) inibizione dell'attività dei batteri presenti nei sedimenti responsabili della degradazione anaerobica della materia organica;
- c) possibilità di ridurre i processi di nitrificazione dell' ammoniacca prodotta: concentrazioni di ossitetraciclina comprese tra 12,5-75 mg/l ne causano un blocco con conseguente aumento dei livelli tossici di ammoniacca e nitriti;
- d) possibilità di ridurre o annullare l' attività solfato-riducente, una delle più importanti vie di degradazione della materia organica;
- e) Incremento della resistenza batterica e trasmissione della stessa a patogeni per l' uomo, come ad es. Escherichia coli (Toranzo et al., 1984). Nel 1987 Austine e Austin hanno catalogato circa 20 gruppi di batteri presenti in acquacoltura come

potenziali patogeni per l'uomo;

f) contaminazione della fauna selvatica: questa è esposta a considerevoli quantità di farmaci nel corso dei trattamenti dei pesci allevati; di conseguenza, qualora venissero catturati pesci selvatici nelle vicinanze dell'allevamento, quote rilevanti di antibiotici potrebbero essere ingerite dall' uomo. Si deve, inoltre, considerare che la dispersione può essere ampia: alcuni studi riportano la presenza di acido ossolinico in pesci pescati a 400 metri dall'allevamento fino a 12 gg post-trattamento (Lundestad, 1991).

Alla luce dei numerosi effetti negativi citati, è importante imporsi un "codice di buon utilizzo" dei farmaci: ad esempio accertarsi della diagnosi, anche sulla base dell' isolamento dell' agente causale, verificare la sensibilità dell'agente eziologico ai farmaci disponibili, anche mediante antibiogramma, impiegare la giusta dose e i tempi previsti di somministrazione, non somministrare mangimi medicati in animali inappetenti, (utilizzare solo i farmaci legalmente registrati allo scopo), monitorare routinariamente la comparsa di farmacoresistenza e rispettare i tempi di sospensione.

Queste sono regole fondamentali da seguire per salvaguardare la salute dell' ambiente e dell' uomo.

### **1.5. Formulazioni lipidiche**

La somministrazione per via orale dei farmaci è la via più impiegata, grazie alla maggior accettabilità da parte dell' animale ed alla facilità di assunzione.

La maggioranza dei principi attivi solidi, somministrati per via orale è composta da molecole sufficientemente piccole in grado di attraversare la membrana intestinale; tuttavia, la permeabilità intestinale è un fattore importante ma non necessario: affinché l' assorbimento abbia luogo deve, infatti, prima verificarsi un processo di solubilizzazione del principio attivo, nei fluidi gastrointestinali.

Quando la forma farmaceutica coinvolta è di tipo solido, la fase di assorbimento viene suddivisa in due steps fondamentali:

- step 1: è rappresentato dalla dissoluzione del farmaco, che passa dallo stato solido a quello liquido;



➤ step 2: prevede il passaggio del farmaco, attraverso le membrane gastro-intestinali, fino al raggiungimento della circolazione sistemica (Figura 1).  
 Per farmaci poco solubili, lo step limitante l'intero processo di assorbimento è la dissoluzione dello stesso, mentre per farmaci molto solubili lo step limitante l'assorbimento è rappresentato dal passaggio attraverso le membrane.

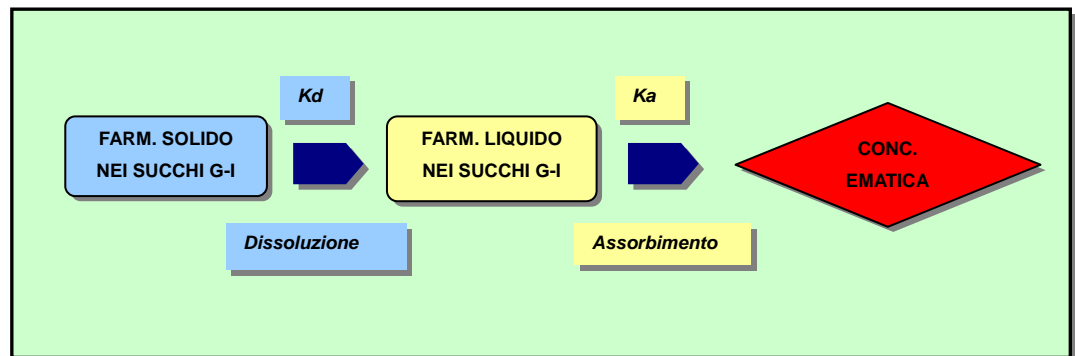


Figura 1. Rappresentazione schematica degli steps necessari per avere l'assorbimento per via orale.

Secondo i due parametri principali che stanno alla base dell'assorbimento per via orale, ossia le caratteristiche di solubilità in ambiente acquoso e di permeabilità attraverso la membrana intestinale, è stata proposta una classificazione dei farmaci in quattro classi (Tabella 5), (Amidon et al., 1995).

Tabella 5. Classificazione biofarmaceutica dei farmaci.

CLASSE I	CLASSE II
Buona solubilità Buona permeabilità	Bassa solubilità Buona permeabilità
CLASSE III	CLASSE IV
Buona solubilità Bassa permeabilità	Bassa solubilità Bassa permeabilità

Farmaci poco solubili in acqua, se somministrati in formulazioni solide tradizionali, generalmente presentano una scarsa biodisponibilità orale, in quanto l'assorbimento può essere cinematicamente limitato dalla loro bassa solubilità. Il meccanismo primario

d'azione, per cercare di migliorare la biodisponibilità, è quello di evitare, almeno parzialmente, il lento processo di dissoluzione dei farmaci idrofobici.

Diverse tecniche sono state applicate allo scopo di migliorare la solubilità di principi attivi poco solubili: le dispersioni solide, la complessazione con polimeri e più recentemente la veicolazione in 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. I sistemi lipidici hanno il vantaggio di essere versatili, in quanto possono presentarsi sotto forma di soluzioni, sospensioni, emulsioni, sistemi auto-emulsionanti e microemulsioni. Questi ultimi sistemi sfruttano il metabolismo lipidico e la via linfatica per un loro ottimale assorbimento.

### ***1.5.1. Digestione lipidica e processi di assorbimento***

I processi di digestione lipidica che si verificano all'interno dell'intestino interessano non solo i grassi introdotti con la dieta ma anche quelli utilizzati come carriers per farmaci lipofili.

La digestione dei lipidi è il risultato di tre processi sequenziali che comprendono:

- dispersione dei globuli di grasso in una emulsione grossolana, di elevata area superficiale;
- idrolisi enzimatica dei trigliceridi all'interfaccia olio/acqua;
- 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, all'interno dello stomaco, alla formazione del corrispondente digliceride e dell'acido grasso. 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 pancreatica, 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. Da una parte essi sostengono l' emulsione dei grassi, un processo importante in quanto la superficie relativamente elevata delle goccioline di emulsione favorisce la lipolisi. D' altra parte, i sali biliari 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 2).

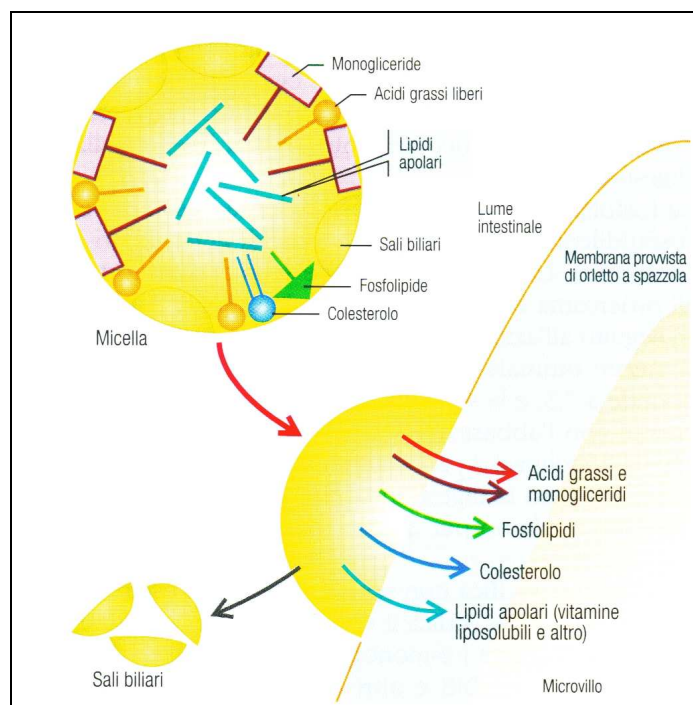


Figura 2. Assorbimento dei grassi dalle micelle

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.

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.

### **1.5.2. Assorbimento da parte del sistema linfatico**

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.

Il vantaggio dell'assorbimento del farmaco attraverso il sistema linfatico intestinale è quello di poter bypassare il meccanismo di first pass 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 lento.

L'assorbimento da parte del sistema linfatico di alcune sostanze lipofile può venir aumentato dall'interazione con carriers, quali per esempio i sali biliari. Le vie di accesso per raggiungere il sistema linfatico intestinale sono tre:

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

La via transcellulare 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 (Figura 3). I trigliceridi a media catena possono essere assorbiti direttamente, mentre quelli a catena lunga prevedono un passaggio

attraverso stadi intermedi, fino ad essere inglobati nelle micelle; solo a questo punto entrano nella circolazione linfatica.

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 ed i sali biliari trattenuti nel lume (Figura 4).

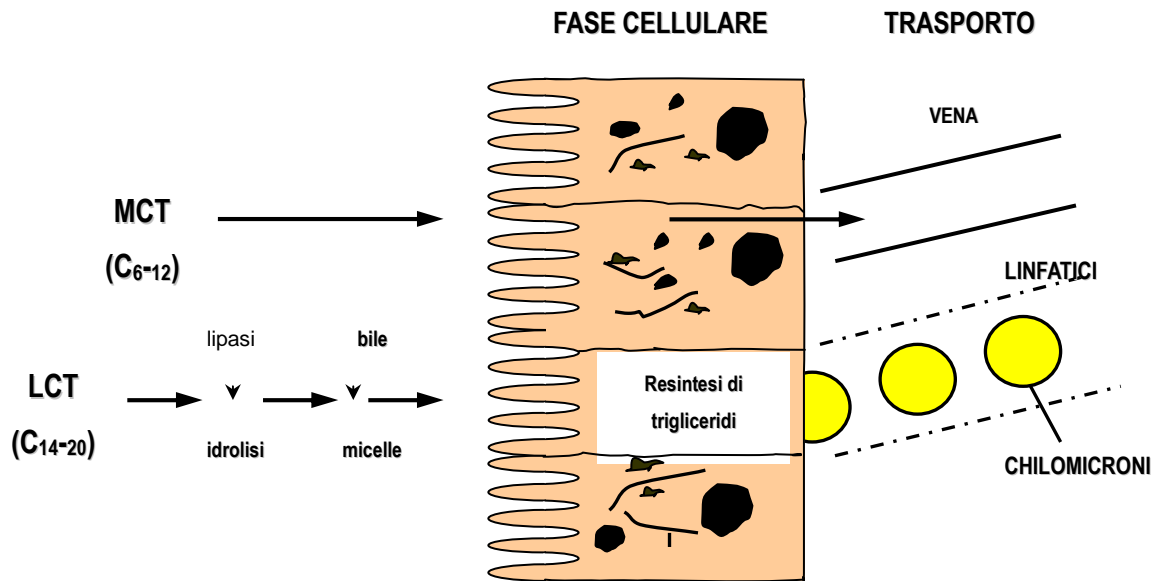


Figura 3. Raffronto delle fasi coinvolte nell'assorbimento di trigliceridi a media (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>) (MCT) e lunga catena (C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub>) (LCT)

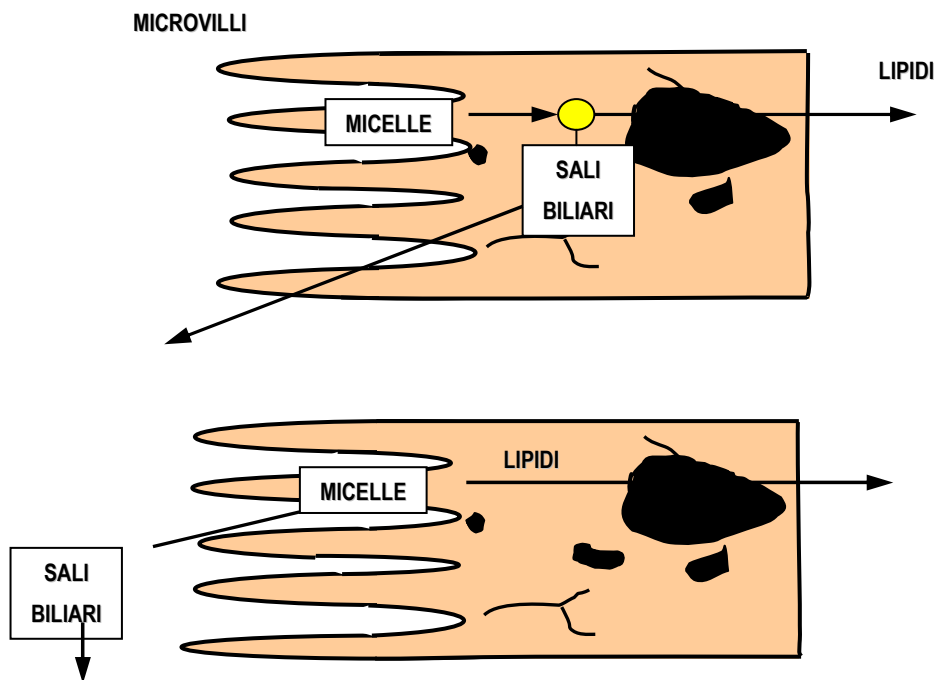


Figura 4. Ipotesi di penetrazione di lipidi micellari nelle cellule della mucosa.

## 1.6. Classificazione delle formulazioni lipidiche

Recentemente Pouton ha proposto un sistema di classificazione per le formulazioni lipidiche, basato sia sulle dimensioni delle particelle disperse che sulle caratteristiche chimico-fisiche dei componenti presenti nella formulazione (tabella 6). Le formulazioni lipidiche vengono classificate in tipo I, II, IIIA e IIIB, (Pouton, 2006).

Tabella 6. Classificazione delle formulazioni lipidiche

	<u>Incremento del contenuto idrofilico</u>			
	Tipo I	Tipo II	Tipo III A	Tipo III B
Componenti (%)				
Trigliceridi o gliceridi miscelati	100	40-80	40-80	<20
Tensioattivi	-	20-60 (HLB<12)	20-40 (HLB>12)	20-50 (HLB>11)
Co-solventi idrofilici	-	-	0-40	20-50
Dimensioni delle particelle disperse (nm)	Grossolane	100-250	100-250	50-100

### 1.6.1. Formulazioni lipidiche di tipo I

Sono classificate come “formulazioni lipidiche di tipo I” quelle costituite dal farmaco solubilizzato in trigliceridi e/o miscele di gliceridi, senza la presenza di tensioattivi. Questi sistemi semplici vengono utilizzati come carriers per i farmaci lipofili e sono quelli in cui il principio attivo viene disciolto in oli digeribili, generalmente di origine

vegetale o trigliceridi a media catena: per esempio frazioni dell' olio di cocco, girasole e semi di soia, questi ultimi sono utilizzati comunemente nell' industria alimentare e quindi sono privi di rischi tossicologici (Tabella 7).

Tabella 7. Potenziali carriers per formulazioni lipidiche orali.

Tipo di carrier	Prodotto
Acidi grassi	Oleico, caprilico, caprico, .eicosapentaenoico, gamma linolenico
Gliceridi idrogenati	Gliceridi idrogenati del cocco
Macrogolgliceridi	Lauroil macrogolgliceride Stearoil macrogolgliceride Caprilocaproil macrogolgliceride
Mono-di-trigliceridi	Digliceril caprilato, gliceril caprilato, gliceril monodicaprilato, gliceril monocaprilato, gliceril monolaurato, trigliceridi dell'acido miristico, trigliceridi a media catena in generale.
Oli, trigliceride	Caprico/caprilico trigliceride
Oli vegetali	Semi di soia, girasole, cocco
Poliglicerol esteri di acidi grassi	Poligliceril oleato (acidi grassi misti)
Esteri propilenglicolici di acidi grassi	Propilenglicole dicaprilato/caprato
Miscele varie	

Ad eccezione di un ampio utilizzo nella somministrazione delle vitamine liposolubili A e D, pochi farmaci sono stati formulati con questo tipo di sistemi.

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. Tuttavia, 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.

Un incremento della capacità solvente dei trigliceridi può essere ottenuto aggiungendo altri eccipienti lipofili, che comprendono miscele di mono- e digliceridi con struttura simile ai prodotti naturali di degradazione dei trigliceridi, aumentando notevolmente la frazione di 1-monogliceride presente nell'intestino.

Invece, quando il grado di dispersione aumenta sensibilmente e sono presenti anche tensioattivi, la formulazione lipidica viene classificata come di tipo II o di tipo III.

### **1.6.2. Formulazioni lipidiche di tipo II**

Le "formulazioni lipidiche di tipo II" sono costituite da una miscela di trigliceridi a media catena e/o mono- o digliceridi con tensioattivi con HLB generalmente inferiore a 12; generano una efficiente dispersione iniziale della fase oleosa di diametro compreso tra 100 e 250 nm. Questa classe fa riferimento soprattutto a sistemi auto-emulsionanti di rilascio di farmaci (SEDDS), in grado di emulsionarsi in soluzione acquosa in condizioni di blanda agitazione. Questo fa sì che essi siano dei buoni candidati per il trasporto di farmaci idrofobici con adeguata solubilità in olio. Al contrario delle emulsioni normali, le emulsioni derivanti dall'esposizione dei SEDDS nella fase acquosa si formano spontaneamente perché sono termodinamicamente stabili grazie ad un ridotto volume della fase oleosa dispersa ed ad un diametro delle gocce ridotto e piuttosto omogeneo.

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.

L'impiego dei sistemi auto-emulsionanti dipende da due principali fattori, i quali controllano la velocità di rilascio del principio attivo dall'olio nella fase acquosa e sono:



- l'abilità della miscela auto-emulsionante di formare emulsioni fini (dimensioni < di 5  $\mu\text{m}$ ) con distribuzione uniforme delle dimensioni;
- la polarità delle goccioline di olio risultanti che promuovono un rilascio rapido del farmaco nella fase acquosa.

La polarità delle goccioline dipende dall' HLB, dalla lunghezza della catena e dal grado di insaturazione dell'acido grasso coinvolto, dal peso molecolare della porzione idrofilica e dalla concentrazione dell'emulsionante.

### **1.6.3. Formulazioni lipidiche di tipo III**

Le formulazioni lipidiche di tipo III si suddividono a loro volta in IIIA e IIIB. Le formulazioni lipidiche di tipo IIIA si differenziano da quelle di tipo II per l'aggiunta di co-solventi o co-tensioattivi idrofilici, 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 idrofiliche più accentuate (percentuale di co-solventi idrofilici più elevata) e sono costituite quasi esclusivamente da gliceridi semplici; questo comporta la formazione di una microemulsione nel tratto gastrointestinale con goccioline del diametro di circa 50 nm. Questi sistemi sono meglio conosciuti come sistemi auto-nanoemulsionanti (SMEDDS).

## **1.7. Scopo della tesi**

In ragione della scarsa biodisponibilità orale degli antibiotici nelle specie ittiche, che ha come conseguenza problemi di impatto ambientale, d' insorgenza di farmacoresistenza e di costi maggiori per l' allevamento dovuti ad una "sovramedicazione", si è reso necessario lo studio di nuove tecniche che possano risolvere, o quantomeno ridurre, questa problematica.

Una possibile strategia consiste nell' aumentare l'assorbimento dei farmaci nel tratto gastro-enterico così da poter ridurre la quantità da somministrare.

La prima parte della ricerca è stata intrapresa con lo scopo di esaminare la potenzialità dei sistemi auto-emulsionanti lipidici d' incrementare l' assorbimento dell' ossitetraciclina cloridrato (OTC) nelle specie ittiche allevate: una di acqua dolce, la trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) ed una di acqua salata, il branzino (*Dicentrarchus labrax*), al fine di valutare se la specie o le diverse condizioni di allevamento influiscono sulla capacità della formulazione di aumentare la biodisponibilità orale del farmaco prescelto allo scopo.

Sono state valutate più formulazioni lipidiche per l' ossitetraciclina cloridrato, selezionate sulla base di test *in vitro* e della loro performance farmacocinetica, in test preliminari su ratto. La formulazione definitiva, un sistema auto-emulsionante (SES), è stata testata su entrambe le specie ittiche in confronto alla semplice soluzione acquosa di OTC. Successivamente, tale formulazione è stata caricata su un supporto solido costituito dal mangime, per rapportarne la performance *in vivo* con quella di un mangime medicato a base di ossitetraciclina cloridrato, già presente in commercio, valutando in particolare i parametri farmacocinetici  $C_{max}$ ,  $t_{max}$ , AUC e la biodisponibilità relativa.

Nella seconda parte dello studio sono state prese in esame, sempre su trote iridee, le performance *in vivo* di diversi sistemi lipidici e mangimi medicati, contenenti l' eritromicina base e l' eritromicina tiocianato, valutando i classici parametri farmacocinetici e la biodisponibilità relativa tra le diverse formulazioni.

## **2. PARTE SPERIMENTALE**

### **2.1. Materiali**

- Ossitetraciclina cloridrato (OTC), Eritromicina base (Galeno s.r.l., Prato).
- Roxytromicina (Sigma-Aldrich, Milano).
- Eritromicina tiocianato (Chemifarma S.p.a., Forlì).
- Miscela di mono-di-trigliceridi e mono-diesteri del polietilenglicole (PEG 300) con acidi grassi C18 (Labrafil M2125<sup>®</sup>, Gattefossé S.a.s., Milano).
- Miscela di mono-di-trigliceridi e mono-diesteri del PEG 400 con acidi C8 e C10 (Labrasol<sup>®</sup>, Gattefossé S.a.s., Milano).
- Miscela di mono-digliceridi di acidi grassi C8 e C10 (Akoline MCM<sup>®</sup>, Huwell Chemicals S.r.l., Milano).
- Dietilen glicole monoetil etere (Transcutol HP<sup>®</sup>, Gattefossé S.a.s., Milano).
- Glicerol mono-oleato (Peceol<sup>®</sup>, Gattefossé S.a.s., Milano).
- Diestere dell'acido oleico con PEG (Plurol oleique<sup>®</sup>, Gattefossé S.a.s., Milano).
- Monoestere dell'acido laurico con il PEG (Lauroglycol FCC<sup>®</sup>, Gattefossé S.a.s., Milano).
- Polisorbato dell'acido oleico (Tween<sup>®</sup> 80, Sygma Aldrich, Milano).
- Sodio fosfato bibasico, Acido Citrico, EDTA sale sodico (Carlo Erba, Milano).
- Solventi di grado HPLC: acetonitrile, tetraidrofurano (Carlo Erba, Milano).
- Mangime commerciale non medicato; mangime commerciale medicato caricato con OTC ed eritromicina tiocianato (Hendrix S.p.A., Mozzecane, Verona).

## **2.2. Preparazione delle formulazioni lipidiche**

### **2.2.1. Selezione della fase oleosa**

Dal momento che l' OTC forma dei complessi insolubili con i cationi presenti nell' acqua, riducendo così la propria biodisponibilità, l' antibiotico è stato veicolato in un sistema oleoso ed è stata testata la sua solubilità in diversi oli puri e in miscele di oli.

Gli oli e le miscele oleose testati sono: Lauroglycol<sup>®</sup> FCC, Akoline<sup>®</sup> MCM, Labrafil<sup>®</sup> M2125, Plurol Oleique<sup>®</sup>, Lauroglicol<sup>®</sup> FCC: Labrasol<sup>®</sup> = 1:1 (p:p), Akoline<sup>®</sup> MCM: Labrasol<sup>®</sup> = 1:1 (p:p), Labrafil<sup>®</sup> M2125: Labrasol<sup>®</sup> = 1:1 (p:p).

La solubilità dell' ossitetraciclina nei diversi oli è stata valutata aggiungendo un eccesso di farmaco a 5 ml di ognuno degli oli o delle miscele oleose scelti.

Le miscele di farmaco e oli sono state trasferite in provette di vetro, tappate e lasciate in agitazione a 25°C per 48 ore, tempo necessario al raggiungimento dell' equilibrio. Successivamente, ogni provetta è stata centrifugata a 3000 rpm per 5 minuti; il centrifugato è stato filtrato utilizzando filtri membrana (RC 0,45 µm, Sartorius AG, Germany). La concentrazione di OTC presente in soluzione è stata quantificata tramite HPLC con il metodo descritto nel paragrafo 2.7.5.

Vista la scarsa solubilità e l' instabilità, in soluzione acquosa a pH acido, sia dell' eritromicina base, sia dell' eritromicina tiocianato si è deciso di veicolarli in opportuni sistemi oleosi, utilizzando sempre la stessa metodica sopra descritta.

Gli oli e le miscele oleose testati per l' eritromicina tiocianato sono: Peceol<sup>®</sup>, Akoline<sup>®</sup> MCM, Labrasol<sup>®</sup>, Transcutol<sup>®</sup>, Akoline MCM<sup>®</sup>: Transcutol<sup>®</sup> = 2:1 (p:p); mentre per l'eritromicina base: Akoline<sup>®</sup> MCM, Labrasol<sup>®</sup>, Transcutol<sup>®</sup>, Akoline MCM<sup>®</sup>: Transcutol<sup>®</sup> = 1:1 (p:p), Akoline MCM<sup>®</sup>: Labrasol<sup>®</sup> = 1:1 (p:p), Labrasol<sup>®</sup>: Transcutol<sup>®</sup> = 1:1 (p:p).

La titolazione dell' eritromicina base e dell' eritromicina tiocianato presenti nei campioni è stata effettuata dalla ditta Hendrix S.p.A., Mozzecane, Verona.

### **2.2.2. Progettazione mediante diagrammi ternari di fase**

Per ottimizzare le formulazioni dei sistemi lipidici utilizzati e veicolare l' ossitetraciclina cloridrato, l' eritromicina base e l' eritromicina tiocianato si è resa

necessaria la preparazione di diagrammi di fase ternari, utilizzando la metodica della titolazione dell'acqua (Mackay, 1988) classificando così i sistemi in: liquidi limpidi (microemulsioni), sistemi gelificati e liquidi torbidi (emulsioni grossolane).

OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS

Le formulazioni così selezionate sono state sottoposte a cicli di stress termici: in particolare sono stati tenuti a 4°C per 48 ore e poi a 40°C per altre 48 ore. Successivamente le formulazioni testate sono state centrifugate per 30 minuti a 3500 rpm.

La composizione dei sistemi auto-emulsionanti (SES) è stata ricavata da quella dei

OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS

### **2.2.3. Riconoscimento del tipo di emulsione**

La calorimetria a scansione differenziale è stata impiegata per differenziare i diversi tipi di emulsione, in particolare per distinguere una microemulsione O/A da una A/O, sulla base del loro comportamento termico, come suggerito da Senatra et al. (1991).

Le analisi termiche sono state condotte usando un calorimetro a scansione differenziale Mettler TA 4000 (Mettler-Toledo, Greifensee, Svizzera), un sistema ad analisi termica equipaggiato con un processore TC 11 TA, usando una cella DSC 30 a bassa temperatura. Campioni di microemulsioni del peso di 18 mg sono stati posti in crogioli di alluminio da 40 µl e raffreddati da 0 a -70°C, sotto flusso di azoto (35 ml/min) ad una velocità di scansione di 5 K/min.

## 2.2.4. Preparazione di microemulsioni doppie

Le microemulsioni doppie, per l'ossitetraciclina cloridrato, sono state preparate usando una tecnica che prevedeva due stadi successivi. Nel primo stadio è stata preparata una microemulsione semplice o primaria (PE) costituita da appropriate quantità (selezionate mediante progettazione con diagramma ternario) di OMISSIS

OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS

(p/p) che, in questo caso, costituiva la fase oleosa esterna, ottenendo così, sempre per blanda agitazione e aggiungendo il tensioattivo, microemulsioni doppie (multiple).

La tecnica di preparazione è schematizzata in figura 5.

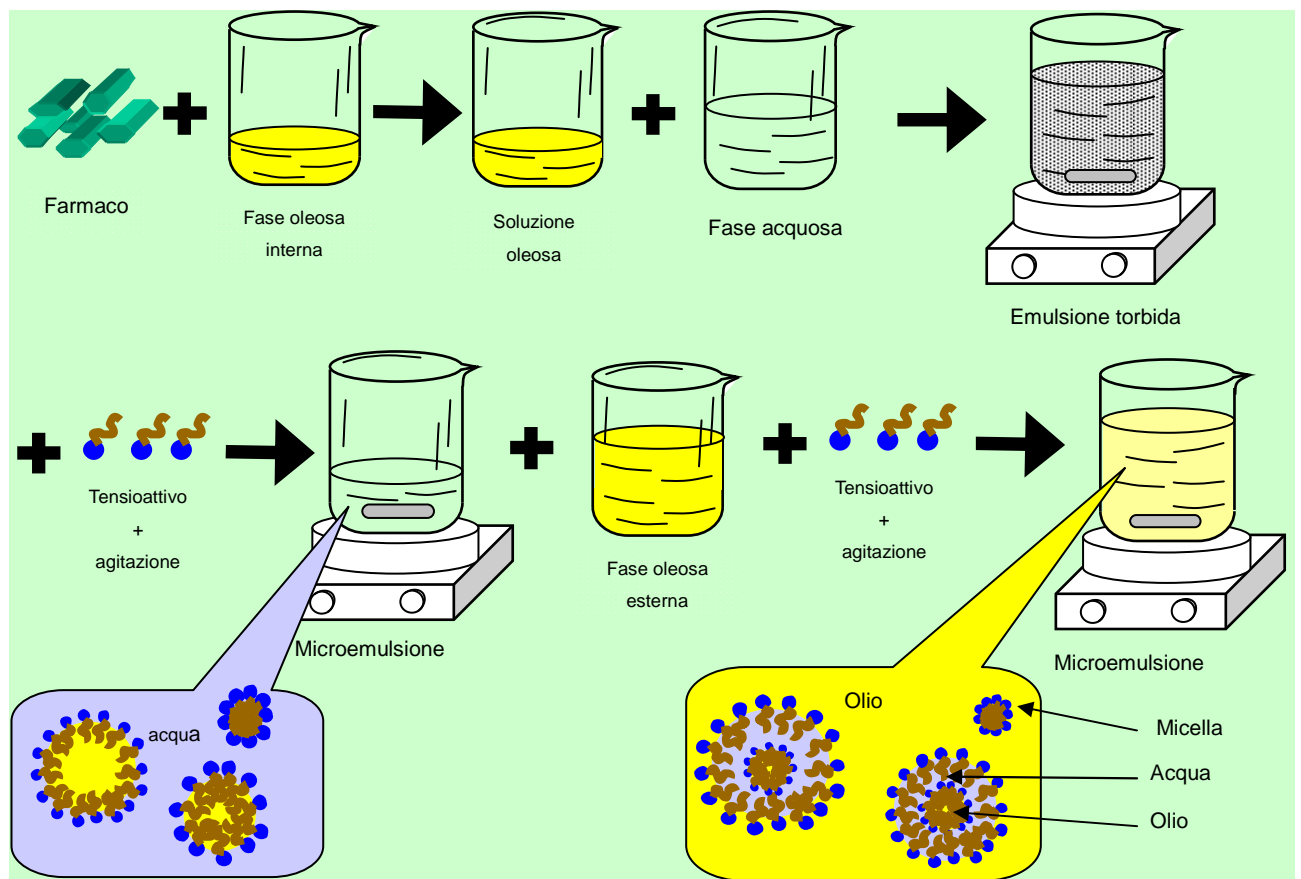


Figura 5. Tecnica di preparazione di microemulsioni doppie.

Sono stati preparati tre diversi tipi di microemulsioni: tipo I,II e III.

Per tutti e tre tipi (I,II,III) lo stadio di preparazione della microemulsione primaria era lo stesso: l'ossitetraciclina veniva incorporata nella fase oleosa interna (28 mg/ml) la

quale veniva fatta emulsionare spontaneamente con l' acqua deionizzata bidistillata e il tensioattivo sotto agitazione magnetica.

Poi, per la preparazione di microemulsioni di tipo I (O/A/O tipo I), la microemulsione primaria O/A veniva ridispersa nella fase oleosa esterna agitando per 2h a 300 rpm, formando quindi una microemulsione O/A/O.

Le microemulsioni di tipo II (O/A/O tipo II) sono state preparate analogamente, con la sola eccezione di incorporare OTC (100 mg/ml) anche nella fase acquosa.

Infine, per le microemulsioni di tipo III (O/A/O tipo III), la microemulsione primaria O/A veniva ridispersa nella fase oleosa esterna, che era stata caricata a sua volta con OTC (28 mg/ml) e miscelata per 2h a 300 rpm per formare una microemulsione doppia.

Per ogni tipo di microemulsione doppia (I,II,III) sono stati indipendentemente preparati e caratterizzati tre diversi lotti.

### ***2.3. Determinazione delle dimensioni delle gocce e misura del potenziale Z mediante Laser Light Scattering***

Le dimensioni delle gocce di microemulsione e i valori di potenziale Z sono stati determinati mediante spettroscopia a correlazione fotonica (Nano ZS Malvern Instruments, United Kingdom). La diffrazione della luce è stata misurata a 25°C e con un angolo di 90°.

Per effettuare le analisi delle microemulsioni doppie, 50 mg venivano dispersi in 2 ml di acqua deionizzata e sonicati per 30 secondi prima di effettuare l' analisi.

Per effettuare le analisi dei SES, 50 mg venivano dispersi in acqua deionizzata in opportuni rapporti di diluizione e quindi analizzati.

## **2.4. Preparazione e caratterizzazione dei mangimi medicati**

### **2.4.1. Preparazione di mangimi medicati**



### **2.4.2. Determinazione delle dimensioni della fase dispersa mediante Laser Light Scattering**

Al fine di valutare le caratteristiche dei SES dopo caricamento su mangime e, in particolare, la capacità di riformare microemulsioni una volta posti in soluzione, è stato valutato il diametro medio delle gocce rilasciate dai mangimi medicati caricati con i tre SES sviluppati per OTC, eritromicina base ed eritromicina tiocianato. In particolare, 2g di mangimi medicati sono stati posti in tamponi a pH 4,5 e 7,4 e il diametro delle gocce formate è stato misurato impiegando lo strumento Nano ZS Malvern Instruments.

## **2.5. Prove in vivo su ratti**

### **2.5.1. Intubazione gastrica (gavage)**

Questi studi *in vivo* sono stati eseguiti su ratti di tipo Wistar, del peso standard di



circa 350 g, seguendo la tecnica della “Cinetica a blocchi”. Tenendo conto delle variazioni di peso di ogni singolo ratto, a ciascuno di essi è stata somministrata, mediante intubazione gastrica (figura 6 A e B), una quantità equivalente a 18 mg/kg di OTC, veicolata all’ interno dei tre tipi di microemulsioni doppie I, II e III (somministrando perciò diversi volumi a seconda della formulazione testata).

Come confronto, sono state somministrate anche una soluzione acquosa di OTC e una soluzione oleosa (**OMISSIS**) in modo da ottenere una concentrazione finale di 6 mg/ml). A tempi determinati di 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 16 ore dalla somministrazione sono stati prelevati campioni di sangue dall’ aorta addominale, successivamente centrifugati a 1500 rpm per 10 minuti. Il plasma così ottenuto è stato immediatamente congelato a -20°C. Dopodiché si è passati all’ analisi in cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), come descritto nel paragrafo 2.7.



Figura 6. Intubazione gastrica (A e B).

## 2.6. Prove in vivo su pesci

Presso l' Allevamento Azzurro S.p.a. in località Rivoli di Osoppo (UD) sono state effettuate le prove sperimentali su trote (trota iridea, figura 7 ) stabulate in raceways, vasche-canale a flusso d' acqua corrente, mentre le prove sperimentali sui branzini (figura 8) sono state effettuate presso l'allevamento ittico La Valle del Lovo, in località Marano Lagunare (UD) stabulati in vasche-canale.

Gli animali sono stati tenuti a digiuno nei 4 giorni precedenti il trattamento.

Le incanulazioni sono state effettuate su 300 trote e su 300 branzini del peso dell'ordine di 200 g l' uno, divisi in 8 vasche (75 pesci/vasca).

I prelievi di sangue sono stati effettuati dalla vena caudale a scadenze di 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 30, 34 ore dalla prima somministrazione.

Le condizioni sperimentali per entrambe le specie sono riportate in tabella 8.

Tabella 8. Condizioni sperimentali per le due specie prese in esame

Specie	Peso medio	Temp. H <sub>2</sub> O	Gruppo I	Gruppo II	Gruppo III	Gruppo IV
Trota	200 g	12°C*	N°75 1 ml OTC A	N°75 1,24 ml OTC SES	N°75 4 pezzi OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS	N°75 OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
Branzino	200 g	18-20°C	N°75 1 ml OTC A	N°75 1,24 ml OTC SES	OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS	OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS

N°= numero di animali; OTC A= soluzione acquosa di ossitetraciclina;

OTC SES= soluzione auto-emulsionante; OTC MC= mangime commerciale Hendrix;

OTC MSES= mangime contenente il sistema auto-emulsionante.

\*la temp. di 12°C era dovuta alle condizioni climatiche contingenti, ma non è in realtà ottimale per l'allevamento delle trote (di solito sono stabulate a 15-16 °C)



Figura 7. Trota iridea: *Oncorhynchus mykiss*

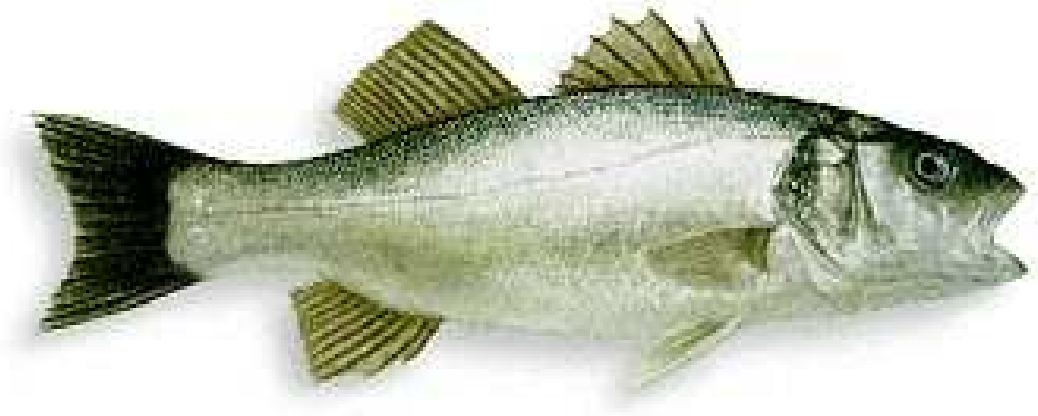


Figura 8. Branzino: *Dicentrarchus labrax*

### **2.6.1. Somministrazione mediante gavage di soluzione acquosa e sistema auto-emulsionante contenenti OTC**

I primi trattamenti sono stati effettuati su 150 branzini e su 150 trote divisi in 4 vasche (75 pesci/vasca).

75 branzini e 75 trote sono stati prima anestetizzati con tricainmetansulfonato (MS-222; 50 ppm Syndel Laboratories Ltd., Vancouver, BC, Canada) e successivamente incanulati mediante sonda gastrica, somministrando a ciascuno con 1 ml di soluzione acquosa contenente OTC pari a 75 mg/kg. Gli altri 75 branzini e 75 trote sono stati a loro volta anestetizzati ed incanulati con 1.24 ml della soluzione lipidica contenente OTC pari a 75 mg/kg (figura 9).



Figura 9. Somministrazione mediante gavage delle due formulazioni liquide testate

Ad intervalli di due ore sono stati prelevati campioni di sangue dalla vena caudale di dieci pesci per specie ittica: 5 pescati tra i branzini incanulati con la soluzione acquosa e 5 tra quelli incanulati con il sistema SES, 5 trote tra quelle incanulate con la soluzione acquosa e 5 tra quelle incanulate con SES (figura 10).

I campioni di sangue sono stati centrifugati a 4000 rpm per 15 minuti e il plasma così ottenuto è stato conservato a -20°C fino al momento dell'esecuzione delle analisi.

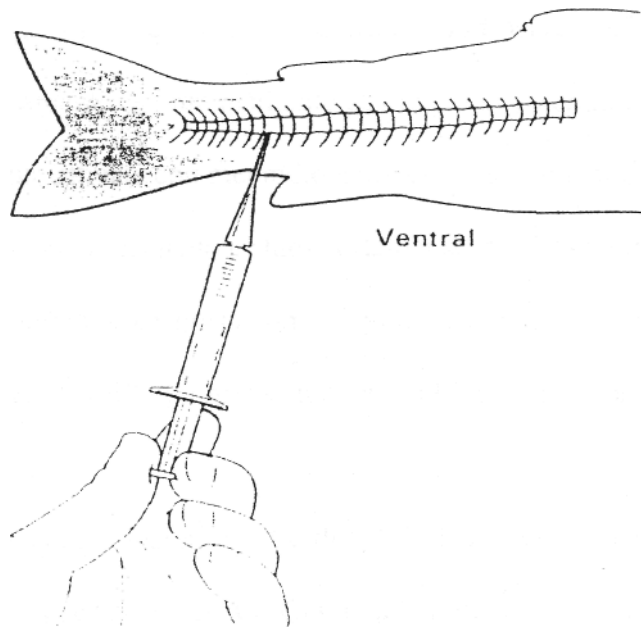


Figura 10. Disegno di un prelievo di sangue dalla vena caudale (in alto), foto di un prelievo fatto ad una trota (in basso).

OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS

I prelievi di sangue sono stati effettuati su dieci pesci per specie ad intervalli di due ore dalla prima somministrazione, i campioni di sangue sono stati centrifugati e il plasma conservato a -20°C fino al momento delle analisi.

Per quanto riguarda la somministrazione dei mangimi caricati con SES contenenti eritromicina base ed eritromicina tiocianato, è stata utilizzata la stessa procedura suddetta, utilizzando anche in questo caso come confronto il mangime medicato commerciale Hendrix.

OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS

I prelievi di sangue sono stati effettuati su 5 pesci per vasca ai seguenti tempi di prelievo:

dopo 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 ore dalla somministrazione.



Figura 11A. Sonda usata per somministrare il mangime



Figura 11B. Alcune fasi della somministrazione del mangime mediante sonda

### **2.6.3. Prova di distribuzione di OTC nel plasma, fegato e muscolo**

Per valutare come si distribuiva l' OTC veicolata come sistema auto-emulsionante all' interno dell' organismo dei pesci è stata effettuata una prova su 75 trote.

Gli animali sono stati incanulati mediante sonda gastrica con 1.24 ml della soluzione lipidica contenente OTC pari a 75 mg/kg (figura 9).

Ai tempi di: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 30, 34 ore dalla somministrazione sono stati effettuati prelievi di sangue dalla vena caudale di cinque pesci per tempo di prelievo. Dopo ogni prelievo gli stessi animali sono stati sacrificati e sono stati prelevati il fegato e il muscolo per confrontare le concentrazioni di OTC nel plasma, nel fegato e nel muscolo di ogni singolo pesce. Tali organi e tessuti sono stati congelati a  $-20^{\circ}\text{C}$  prima di procedere con l'e strazione (effettuata secondo la metodica riportata nel paragrafo 2.7.2. e la successiva analisi).

## **2.7. Trattamento dei campioni e metodo di analisi per OTC**

### **2.7.1. Estrazione di OTC dal plasma**

Prima di procedere con l'analisi in HPLC, è necessario effettuare l'estrazione del campione dal fluido biologico. A questo scopo è stato utilizzato il tampone McIlvaine-EDTA (0,1 M pH 4), ottenuto con 12,9 g di acido citrico, 37,224 g EDTA sale sodico,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anidro 10,95 g in 1 L; 5 ml di questo tampone sono stati quindi addizionati a 500  $\mu\text{l}$  di plasma, e dopo aver sottoposto il tutto all'azione del vortex, si è passati alla filtrazione, utilizzando filtri siringa da 0,45  $\mu\text{m}$ . La purificazione è avvenuta mediante passaggio in colonnine SPE C18 (C18, 100 mg Isolute columns International Sorbent Technology, Mid Glamorgan, UK), preventivamente attivate con 2 ml di MeOH e 2 ml di acqua allo 0,1 % di metanolo. È stato a questo punto caricato nelle colonne 1 ml di campione con 5 ml di tampone McIlvaine-EDTA.

Le colonne sono state, quindi, essiccate sotto vuoto per 20 minuti e il campione è stato eluito con 1 ml di MeOH.

L'eluato metanolico è stato poi portato a secco in concentratore centrifugo e ripreso con 250  $\mu\text{l}$  di fase mobile, passato in vortex, centrifugato per 10 minuti a 14.000 rpm ed iniettato in HPLC in ragione di 100  $\mu\text{l}$ .

### **2.7.2. Estrazione di OTC da muscolo e fegato**

2.5 grammi di tessuto (muscolo e pelle adesa) o di organo (fegato) sono stati addizionati con 10 ml di tampone McIlvaine-EDTA 0.1 M (pH=4), omogeneizzati con omogeneizzatore a lame (Ultra Turrax, Pabish, Milano) per 1 min e centrifugati a 7000 rpm per 30 min (ALC 4239R, Apparecchi per laboratori clinici s.r.l. Milano); prelevati gli estratti, i pellets sono stati nuovamente sottoposti al trattamento appena descritto con 10 e poi 5 ml di tampone. Degli estratti, riuniti e filtrati con filtri siringa da 0,45  $\mu\text{m}$ , ne sono stati prelevati 10 ml e su questi l'OTC è stata ulteriormente purificata mediante passaggio in colonnine SPE C18, preventivamente attivate con 2 ml di metanolo e 2 ml acqua allo 0,1 % di metanolo. Le colonne sono state quindi



caricate con 10 ml di estratto, essiccate sotto vuoto per 20 minuti e il campione è stato eluito con 1 ml di MeOH.

L' eluato metanolico è stato poi portato a secco in concentratore centrifugo e ripreso con 250 µl di fase mobile, passato in vortex, centrifugato per 10 minuti a 14.000 rpm e iniettato in HPLC in ragione di 50 µl.

### **2.7.3. Curva di calibrazione per il plasma**

#### **2.7.3.1. Curva di calibrazione per il plasma dei ratti**

Per costruire la retta di taratura nel plasma di ratto sono state preparate delle soluzioni madri costituite 450 µl di siero bianco con aggiunta di 50 µl della soluzione standard 10 volte più concentrato della concentrazione nominale che si intende saggiare. Sono state preparate diluizioni scalari in modo da ottenere concentrazioni finali di ossitetraciclina di 0,2; 0,5 e 1 µg/ml di plasma (figura 12).

Le aree dei picchi di OTC ottenute e le corrispondenti concentrazioni nominali sono state usate per ottenere l' equazione della curva di calibrazione. Da questa curva sono stati determinati i valori dell' intercetta, della pendenza e del coefficiente di correlazione  $R^2$ . Come si può notare dalle figura 12, è stata riscontrata una buona linearità della retta di calibrazione:  $R^2=0.9964$ .

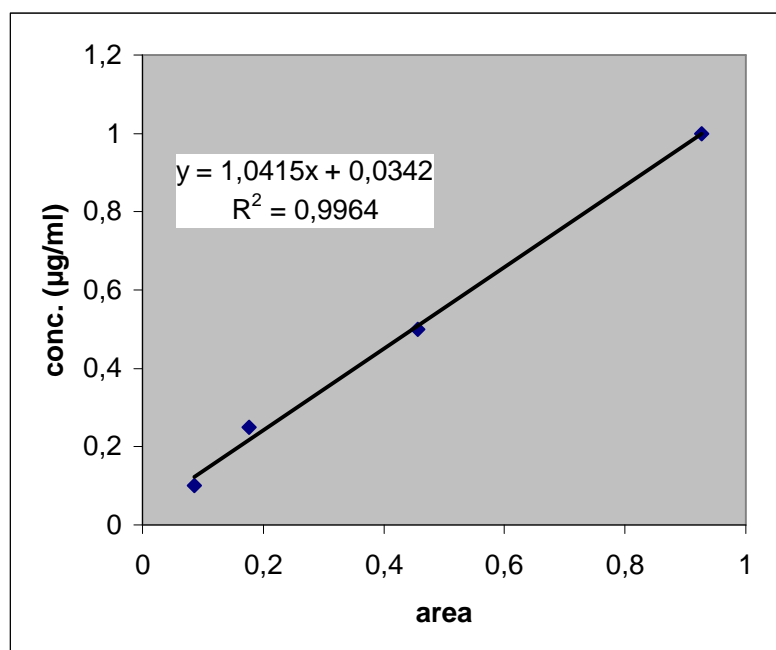


Figura 12. Curva di calibrazione per il plasma di ratto  
( $y=1,0415x+ 0,0342$ ;  $R^2=0,9964$ ).

### 2.7.3.2. Curva di calibrazione per il plasma dei pesci

Sono state preparate delle soluzioni madre di OTC (100 µg/ml) in metanolo e sono state stoccate a -20°C. Le curve di taratura per OTC nel plasma (range 0.05-1 µg/ml) sono state allestite aggiungendo opportune concentrazioni di standard a plasma bianco.

Le aree dei picchi di OTC ottenute e le corrispondenti concentrazioni nominali sono state usate per ottenere l' equazione della curva di calibrazione. Da questa curva sono stati determinati i valori dell' intercetta, della pendenza e del coefficiente di correlazione  $R^2$ .

Come si può notare dalle figura 13 e 14, è stata riscontrata una buona linearità della retta di calibrazione:  $R^2=0.9992$  per il plasma di trota e  $R^2=0.9986$  per il plasma di branzino.

I limiti di determinazione (LOD) e di quantificazione (LOQ), l'accuratezza, e il coefficiente di variazione "inter-day" della metodica analitica sono riportati in tabella 9.

La concentrazione di OTC nei campioni di plasma dei pesci trattati è stata calcolata dall' equazione della corrispondente curva di calibrazione.

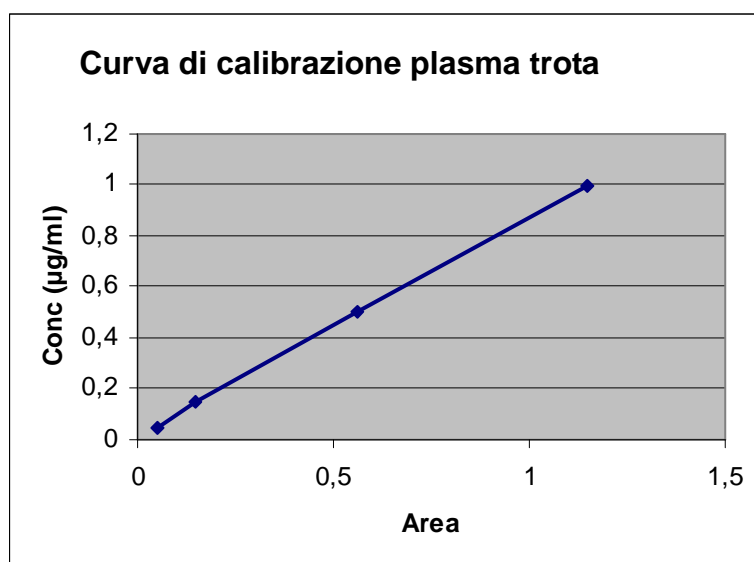


Figura 13. Curva di calibrazione per il plasma di trota  
( $y=0,8847x+ 0,0088$ ;  $R^2=0,9992$ )

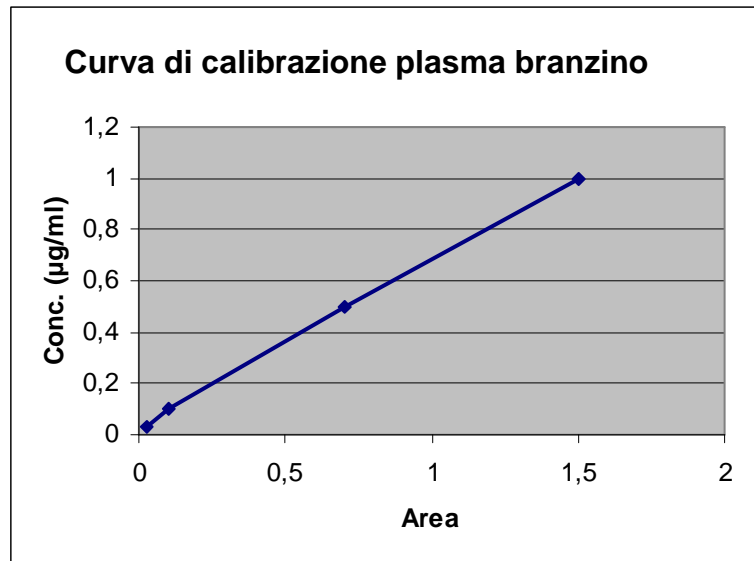


Figura 14. Curva di calibrazione per il plasma di branzino  
( $y=0,6476x+ 0,0221$ ;  $R^2=0,9986$ )

#### **2.7.4. Curva di calibrazione per il mangime**

Le curve di taratura per OTC (range: 1-10 mg/g) sono state costruite aggiungendo opportune concentrazioni di standard a mangime non medicato con antibiotico. Le aree dei picchi di OTC ottenute e le corrispondenti concentrazioni nominali sono state usate per ottenere l' equazione della curva di calibrazione. Anche da questa curva sono stati determinati i valori dell' intercetta, della pendenza e del coefficiente di correlazione  $R^2$ . Come si può notare in figura 15, è stata riscontrata una buona linearità della curva di calibrazione ( $R^2=1$ ).

Il limite di determinazione (LOD), l' accuratezza e il coefficiente di variazione "inter-day" della metodica analitica sono riportati in tabella 9.

La concentrazione di OTC nei campioni di mangime è stata calcolata dall' equazione della corrispondente curva di calibrazione.

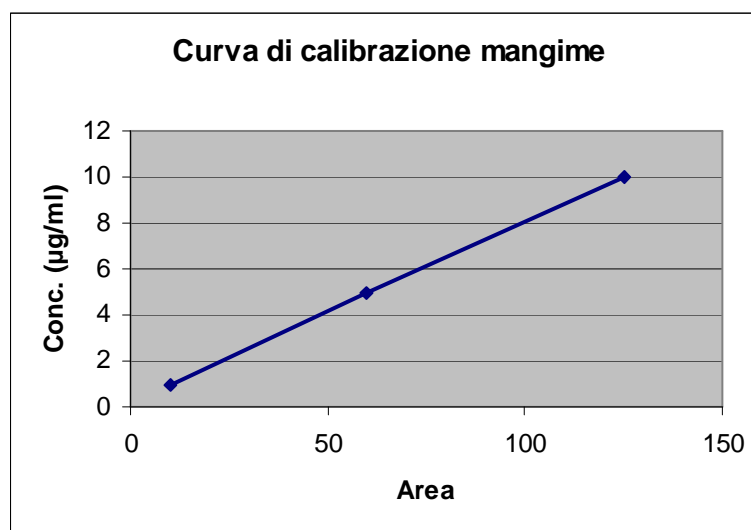


Figura 15. Curva di calibrazione per il mangime  
 $(y=0,0796x+ 0,00796; R^2=1)$

Tabella 9. Limiti di quantificazione (LOQ), determinazione (LOD), accuratezza e coefficiente di variazione “interday” della metodica analitica di estrazione di OTC da plasma e mangime.

Campione	LOD	LOQ	Concentrazioni	Accurat. (%)	Interday C.V. (%)
<u>PLASMA TROTA</u>	0.025 (µg/ml)	0.05 (µg/ml)	0.05 (µg/ml) (n=4)	108.68	7.985
			0.1 (µg/ml) (n=4)	103.09	8.242
			0.5 (µg/ml) (n=5)	95.85	3.999
			1 (µg/ml) (n=5)	100.52	4.335
<u>PLASMA BRANZINO</u>	0.025 (µg/ml)	0.05 (µg/ml)	0.05 (µg/ml) (n=3)	115.57	7.592
			0.1 (µg/ml) (n=3)	106.25	6.547
			0.5 (µg/ml) (n=4)	95.07	6.289
			1 (µg/ml) (n=4)	101.04	1.332
<u>MANGIME</u>	0.025 (µg/ml)		1 (mg/g) (n=5)	99.98	4.393
			5 (mg/g) (n=5)	100.09	1.652
			10 (mg/g) (n=5)	100.05	2.609

### **2.7.5. Titolo di OTC nei formulati**

Prima di effettuare le prove *in vivo*, i diversi sistemi lipidici (microemulsioni doppie, auto-emulsionanti) e la soluzione acquosa sono stati titolati per valutare l'effettiva quantità di ossitettraciclina cloridrato incorporata.

I suddetti formulati sono stati diluiti di 200 volte in fase mobile costituita da  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.01 M (pH 2):  $\text{CH}_3\text{CN}$ : THF(87:4:9, v:v:v) e successivamente 100  $\mu\text{l}$  sono stati iniettati in HPLC. Il titolo in principio attivo della formulazione contenente l'antibiotico è risultato pari a 2,91 mg/ml per O/A/O tipo I, 12,94 mg/ml per O/A/O tipo II, 15,9 mg/ml per O/A/O tipo III e 12,14 mg/ml per il SES.

Per quanto riguarda invece i due mangimi, 2 g di mangime Hendrix e 2 g di mangime caricato con SES sono stati addizionati 10 ml di dimetilformamide, sonicati in bagno ad ultrasuoni a 40°C per 10 minuti ed, infine, centrifugati per 5 minuti a 7000 rpm.

Il centrifugato ottenuto è stato filtrato con filtri siringa (25 mm, 0,45  $\mu\text{m}$ ) ed è stato diluito 1000 volte in fase mobile ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.01 M (pH 2):  $\text{CH}_3\text{CN}$ : THF (87:4:9, v:v:v); 100  $\mu\text{l}$  sono stati iniettati in HPLC.

OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS

### **2.7.6. Condizioni cromatografiche**

L'analisi è stata eseguita con una colonna analitica Supelcosil LC-18-DB (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 4,6 mm ID) munita di precolonna Superguard LC-18-DB (5  $\mu\text{m}$ , 20 mm x 4,6 mm ID) della SUPELCO, con una fase mobile costituita da una miscela  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.01 M (pH 2):  $\text{CH}_3\text{CN}$ : THF (87: 4: 9, v:v:v). Il flusso è stato di 1 ml/min e la lunghezza d'onda di rivelazione di 355 nm, con detector UV.

## **2.8. Trattamento dei campioni e metodo di analisi per eritromicina**

### **2.8.1. Estrazione di eritromicina dal plasma**

Prima di procedere con l'analisi cromatografica liquida accoppiata alla massa (LC-MS/MS), è necessario effettuare l'estrazione del campione dal plasma. A questo scopo è stato utilizzato come solvente di estrazione il metanolo.

10 µl di una soluzione di standard interno (roxytromicina in metanolo alla concentrazione di 10 µg/ml) sono stati addizionati a 100 µl di plasma e, successivamente, sono stati aggiunti 300 µl di metanolo.

Il campione è stato quindi agitato su vortex per 3 minuti e centrifugato per 10 minuti a 13400 g. Il surnatante è stato prelevato e filtrato utilizzando filtri siringa da 0,45 µm.

I campioni sono quindi stati posti in vial ambrate per autocampionatore, che, una volta chiuse ermeticamente, sono state conservate in congelatore a -80°C fino al momento dell'analisi.

### **2.8.2. Curva di calibrazione in matrice per il plasma**

E' stata preparata una soluzione madre di eritromicina (1000 µg/ml) in metanolo ed è stata stoccata a -20°C. Le curve di taratura per eritromicina nel plasma (range 0-4 µg/ml) sono state allestite aggiungendo a siero bianco lo standard interno (roxytromicina) alla concentrazione di 1 µg/ml di roxytromicina e soluzioni crescenti di eritromicina secondo quanto riportato in tabella 10.

Per la quantificazione, è stato utilizzato il metodo dello standard interno, calcolando il rapporto delle aree dei picchi di eritromicina e dello standard interno.

I rapporti delle aree dei picchi ottenuti e le corrispondenti concentrazioni nominali sono state usate per ottenere l'equazione della curva di calibrazione.

Da questa curva sono stati determinati i valori dell'intercetta, della pendenza e del coefficiente di correlazione  $R^2$ .

Come si può notare dalle figura 16, è stata riscontrata una buona linearità della retta di calibrazione:  $R^2=0.9996$  per il plasma di trota.

Il test di recupero è stato svolto confrontando i rapporti tra le aree dei picchi di eritromicina e standard interno (Area Ratio) ottenuti aggiungendo quest' ultimo all' inizio e al termine del processo di estrazione. I valori ottenuti sono riportati in tabella 11.

Per calcolare il coefficiente di variazione "intra-day" della metodica analitica, sei indipendenti campioni sono stati analizzati in un giorno mentre, per calcolare il coefficiente di variazione "inter-day", sei indipendenti campioni sono stati riestratti e analizzati tre volte in tre giorni diversi.

I limiti di determinazione (LOD) e di quantificazione (LOQ), sono riportati in tabella.

La concentrazione di eritromicina nei campioni di plasma dei pesci trattati è stata calcolata dall'equazione della corrispondente curva di calibrazione.

Tabella 10. Concentrazioni di eritromicina e roxitromicina utilizzate per costruire la curva di calibrazione

<b>CURVA IN MATRICE</b>			
Eritromicina (A)/Roxitromicina (R) nel plasma di trota			
<b>Campione</b>	<b>Concentrazione in matrice (ppm)</b>	<b>A/R</b>	<b>Media</b>
bianco	0	0,022	0,025
bianco		0,028	
1	0,5	0,276	0,287
2		0,298	
3	2	1,233	1,256
4		1,279	
5	4	2,472	2,4575
6		2,443	

Tabella 11. Valori di eritromicina (analita) e roxitromicina (IS) determinati per valutare il recupero

Eritromicina/Roxitromicina nel plasma di trota				
ANALITA	IS	A/R	media A/R	RECUPERO %
31400	115000	0,2730	0,2641	92,0
31900	125000	0,2552		
135000	108000	1,2500	1,1452	91,2
129000	124000	1,0403		
267000	126000	2,1190	2,0636	84,0
247000	123000	2,0081		

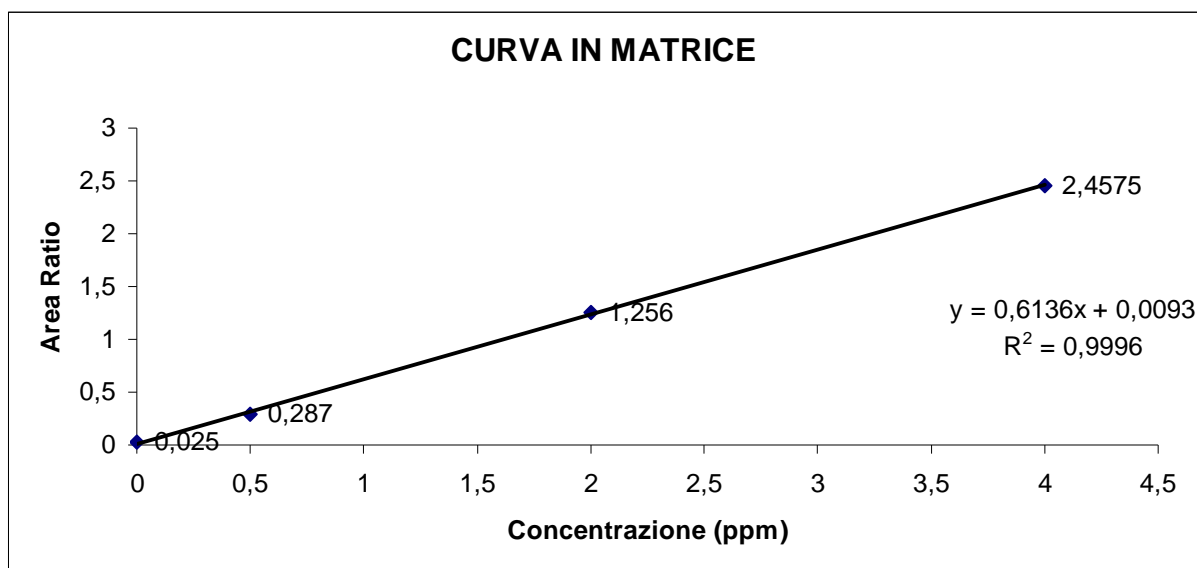


Figura 16. Curva di calibrazione per il plasma di trota  
( $y=0,6136x+ 0,0093$ ;  $R^2=0,9996$ )

Tabella 12. Limiti di quantificazione (LOQ), determinazione (LOD), coefficienti di variazione “intraday” e “interday” della metodica analitica di estrazione di OTC da plasma e mangime.

Campione	LOD	LOQ	Concentrazioni	Intraday C.V. (%)	Interday C.V. (%)
<u>PLASMA</u> <u>TROTA</u>	0.13 ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.44 ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.5 ( $\mu\text{g/ml}$ )	9.4	10.9
			2 ( $\mu\text{g/ml}$ )	1.8	10.5
			4 ( $\mu\text{g/ml}$ )	2.4	7.5



### 2.8.3. Condizioni cromatografiche

L'analisi è stata eseguita con un cromatografo liquido Agilent (Palo Alto, CA) assemblato con una pompa quaternaria LC serie 1100, un microdegassatore sotto vuoto, un auto-campionatore.

La separazione cromatografica è stata ottenuta, a temperatura ambiente, mediante una colonna a fase inversa Simmetry C18 (3,5 $\mu$ m, 150 X 4,6 mm) della Waters (Milford, MA).

E' stata utilizzata come fase mobile: ammonio acetato 1mM contenente lo 0,1% di acido acetico (eluente A) e acetonitrile (eluente B) sotto condizioni di gradiente ad un flusso di 300  $\mu$ l/min. L' eluizione è stata effettuata secondo le modalità riportate in tabella 13.

Il volume di iniezione era di 10  $\mu$ l mentre il tempo di corsa di 22 minuti.

Tabella 13. Condizioni di gradiente per la separazione cromatografica

Tempo (minuti)	A (%)	B (%)
0.00	80.00	20.00
7.00	0.00	100.00
15.00	0.00	100.00
18.00	80.00	20.00
22.00	80.00	20.00

#### **2.8.4. Condizioni per la spettroscopia di massa**

Le analisi degli spettri di massa sono state effettuate con uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo (Applied Biosystems API 3000, Toronto, ON, Canada).

Lo strumento era equipaggiato con un' interfaccia ESI (ElectroSpray Ionization), con il voltaggio impostato a 4 kV, ad una temperatura di 400°C, operante in modo positivo.

La determinazione e la quantificazione dell' eritromicina sono state effettuate mediante MRM (Multiple Reaction Monitoring) dello ione precursore protonato e dei correlati prodotti ionici. Lo ione precursore protonato (M+H)<sup>+</sup> aveva rapporto massa/carica (m/z) pari a 734.5. Le reazioni di transizione di massa prese in considerazione erano le seguenti:

m/z 734.5→576.4 (energia di collisione = 26 eV, tempo di dwell = 200ms) come quantificatore; m/z 734.5→558.5 (energia di collisione = 26 eV, tempo di dwell = 200ms) come qualificatore; m/z 734.5→716.3 (energia di collisione = 22 eV, tempo di dwell = 200ms) come qualificatore.

La reazione di transizione di massa usata per lo standard interno (roxitromicina) era 837.6→679.6 (energia di collisione = 22 eV, tempo di dwell = 200ms) .

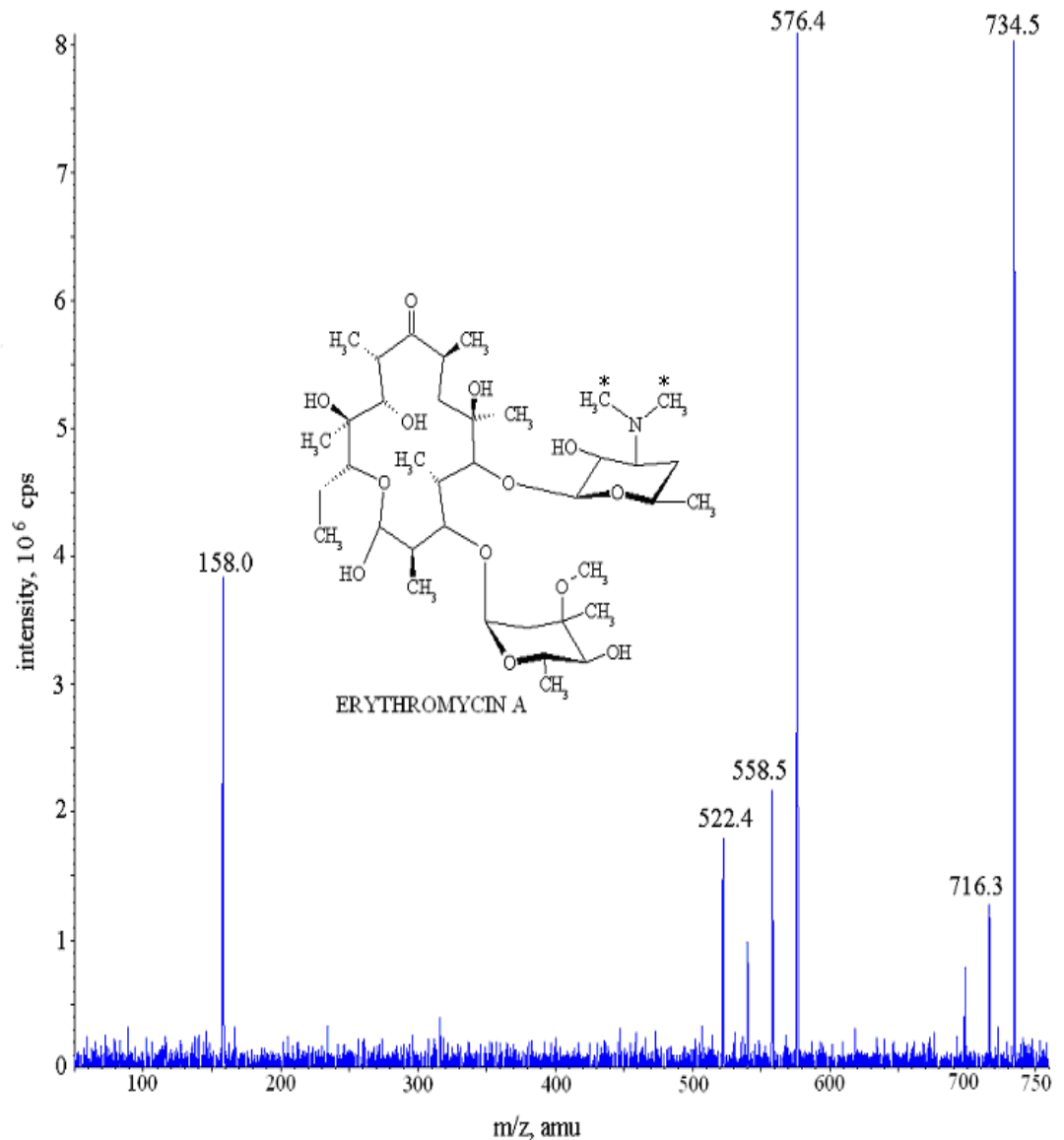


Figura 17. Scansione completa dello spettro di massa dell'eritromicina.

## 2.9. Analisi farmacocinetica

Analisi farmacocinetica non compartimentale è stata condotta usando un software WinNonlin Version 2.1 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA). L' area sotto la curva (concentrazione plasmatica vs tempo) è stata calcolata all' ultimo campionamento a cui è la concentrazione è quantificabile ( $AUC_{last}$ ) tramite il metodo trapezoidale. Sono stati riportati come osservati il tempo e la concentrazione massimi (rispettivamente  $C_{max}$  e  $t_{max}$ ). Il tempo di emivita ( $t_{1/2}$ ) è stato calcolato come  $t_{1/2} = \ln 2 / \lambda_z$  dove  $\lambda_z$  è la pendenza terminale del semi-log plot calcolato mediante regressione lineare.

### **3. RISULTATI E DISCUSSIONE**

La prima parte di questo lavoro di tesi è stata incentrata sull'allestimento di sistemi lipidici contenenti OTC, un principio attivo che nei fluidi biologici è poco biodisponibile, in quanto subisce due diverse reazioni in ambiente acquoso: una reazione di idrolisi e una reazione di complessazione con cationi. La reazione di complessazione dà origine a chelati, colorati di rosso e insolubili in acqua (Schaftenaar et al., 1990).

La chelazione della tetraciclina con cationi polivalenti del tipo  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  e ioni del tipo tricloroacetato o fosfato causa una diminuzione dell'assorbimento del farmaco dato che i complessi non oltrepassano le barriere lipidiche (Elema et al., 1996). In particolare il solfato ferroso esercita il massimo dell'effetto inibitore sull'assorbimento della tetraciclina, forse perché si dissolve in acqua più velocemente di un composto organico di ferro. L'abilità che vari composti di ferro hanno di liberare ioni ferrosi o ferrici nella parte più alta del tratto gastrointestinale prima che la tetraciclina sia assorbita sembra costituire un elemento essenziale dell'interazione. L'ordine di attività di differenti sali di ferro nel processo di chelazione *in vivo* segue di pari passo quello del loro assorbimento intestinale. Tutte le tetracicline attive formano chelati stabili con ioni  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ . L'azione antibatterica delle tetracicline dipende dalla loro attività di legame con il metallo, dato che il loro principale sito d'azione è sui ribosomi che sono ricchi di magnesio (Chambers, 2003).

Le tetracicline catturano metalli bivalenti, ma hanno maggior affinità per i metalli trivalenti con cui formano chelati farmaco-metallo 3:1. Le tetracicline terapeuticamente attive formano complessi del tipo 2:1 con ioni rame, nichel e zinco mentre quelle inattive formano complessi del tipo 1:1.

Quattro sono gli avvenimenti che indicano la formazione di un chelato: la formazione di un prodotto colorato, la diminuita solubilità in acqua del composto, la caduta del pH durante la formazione del chelato e l'assenza di ioni metallo in soluzione dopo la formazione del chelato. La diminuita solubilità in acqua dei chelati è indice di un'aumentata lipofilicità, ma, nel caso delle tetracicline chelate, la precipitazione dovrebbe diminuire l'attività biologica del farmaco dato che esse sono meno disponibili per il trasporto attraverso le membrane; il maggior volume del chelato poi, dovrebbe anche prevenirne il facile assorbimento nella forma intatta.

Proprio per evitare tali fenomeni di complessazione, l' OTC è stata quindi veicolata in un sistema oleoso e, nel corso dello studio, è stata utilizzata acqua bidistillata deionizzata come fase acquosa per la costruzione del diagramma ternario così come nello sviluppo delle formulazioni.

In uno primo momento gli esperimenti sono stati condotti al fine di individuare la composizione ottimale della formulazione. La miscela oleosa più opportuna è stata identificata mediante la valutazione della solubilità dell' OTC in diverse fasi oleose (Tabella 14).

OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
 OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
 OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
 OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS

Tabella 14. Solubilità dell'ossitetraciclina cloridrato (OTC) in sistemi lipidici oleosi a 25°C (n=3 ± S.D.)

Olio e miscele oleose	Solubilità di OTC (mg/ml) ± S.D.			
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS

Dopo aver scelto la fase oleosa ottimale, si è testato il tipo di tensioattivo da miscelare con la suddetta fase per ottenere una microemulsione per blanda agitazione.

OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
 OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS

1. minimi effetti tossici gastrointestinali,
2. una concentrazione micellare critica (CMC) più bassa rispetto ai tensioattivi ionici,
3. micelle non-ioniche meno sensibili al pH (Lawrence e Rees, 2000; Shafiq et al., 2007).

L'ottimizzazione della formulazione è stata effettuata mediante la progettazione di un diagramma di fase ternario, secondo la metodologia descritta nella parte sperimentale, che ha permesso di valutare le diverse aree e le diverse concentrazioni dei tre componenti (fase acquosa, fase oleosa e tensioattivo) che formavano emulsioni grossolane, sistemi gelificati e microemulsioni O/A e A/O.

Il diagramma di fase ternario ottenuto è riportato in figura 18.

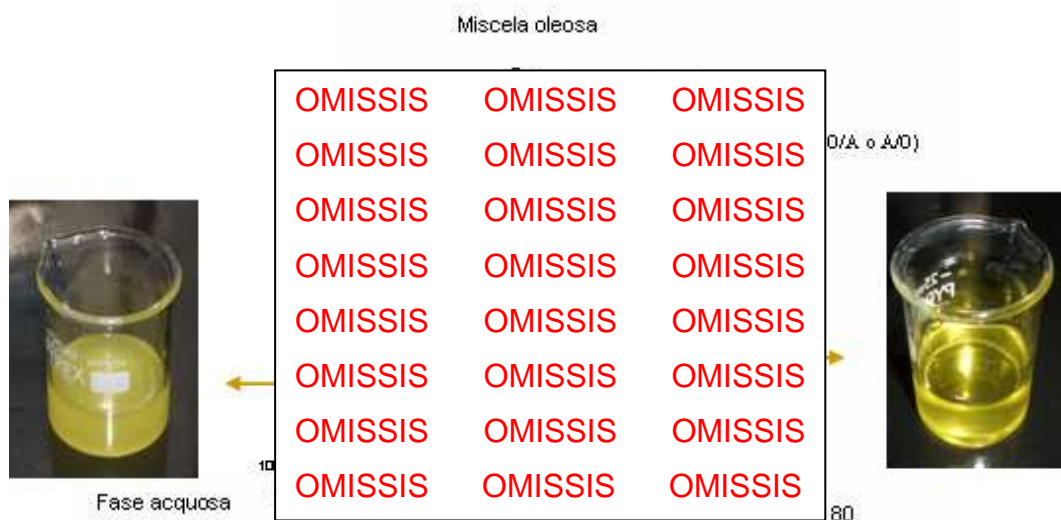


Figura 18. Diagramma di fase ternario contenente la miscela oleosa: OMISSIS OMISSIS (p/p), la fase acquosa e il OMISSIS

Dall' analisi del diagramma di fase ternario si nota che otteniamo diversi sistemi lipidici: la zona in azzurro corrisponde all'area di formazione di sistemi limpidi, probabilmente microemulsioni, mentre la zona in arancione corrisponde a sistemi gelificati e la zona non colorata a emulsioni grossolane.

Osservando il diagramma ternario, si evidenzia come l' area di formazione delle microemulsioni (regione azzurra) sia molto estesa.

Infatti, nonostante non sia stato utilizzato un co-tensioattivo, la combinazione di **OMISSIS** utilizzati in diversi rapporti percentuali, dava luogo alla formazione di tali sistemi. Questo è probabilmente dovuto alla presenza del **OMISSIS** che, malgrado in questo caso sia stato utilizzato come componente della fase oleosa, ha proprietà di tensioattivo e contribuisce ulteriormente a formare sistemi con fase dispersa aventi dimensioni molto ridotte.

Un' estesa area di formazione garantisce che la preparazione sia stabile ad un' eventuale diluizione in mezzo acquoso e garantisce la stabilità nel tratto gastro-intestinale.

Visto che l' obiettivo della tesi era quello di aumentare la biodisponibilità dell' OTC, limitata da fenomeni di chelazione nelle specie ittiche allevate, la strategia adottata consiste nella scelta di sistemi lipidici, microemulsioni O/A, per evitare così il contatto diretto con l' ambiente acquoso (acqua dolce/acqua marina) e con i fluidi gastrointestinali degli animali testati.

Per differenziare i tipi di microemulsioni, in particolare O/A da A/O all' interno del diagramma ternario, è stata impiegata la calorimetria a scansione differenziale (DSC).

La DSC è in grado di distinguere chiaramente le interazioni dell' acqua con il tensioattivo e con gli altri componenti della formulazione; infatti con tale tecnica è possibile distinguere sulla base del loro punto di congelamento (o fusione) tre tipi di acqua: l'acqua libera che congela a circa 0°C, l'acqua interfacciale, definita come l'acqua confinata all'interno dell'interfaccia di fase dispersa (congela a circa -10°C) e l'acqua legata, che è associata con le teste polari del tensioattivo e congela a temperature inferiori a - 10°C.

Brevemente, questo significa che, nella curva di raffreddamento DSC di una microemulsione O/A si osserva generalmente un picco di congelamento tra -10°C e - 30°C (a seconda delle interazioni dell'acqua) che corrisponde al congelamento

dell'acqua nella fase esterna. Al contrario, nella curva di raffreddamento DSC di una microemulsione A/O, questo picco sparisce, indice che l'acqua non è congelabile e quindi non è presente nella fase esterna.

Sulla base di questa differenza, l'area di formazione di una microemulsione è stata divisa in due sotto-regioni a seconda della fase disperdente, non solo considerando la composizione (se vi era una maggiore quantità di olio o di acqua) ma ripetendo l'analisi DSC in diversi punti dell' area di formazione di microemulsioni. Due esempi di emulsioni opposte (O/A e A/O) sono riportate in figura 19.

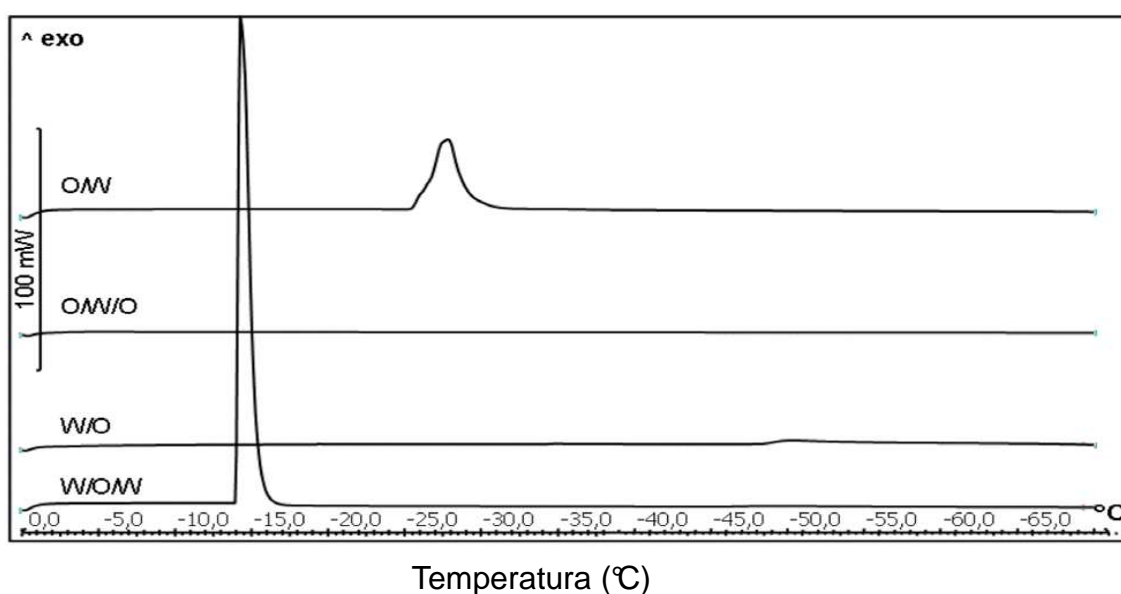


Figura 19. Esempi di curva DSC durante un ciclo di raffreddamento di quattro differenti tipi di microemulsioni. (W: fase acquosa; O: fase oleosa)

All'interno della zona di formazione di microemulsioni di tipo O/A, è stata scelta una determinata formulazione sulla base dei seguenti criteri:

1. è stata preferita una microemulsione avente il minor rapporto di diluizione tra fase esterna e fase interna sulla base del fatto che, minore è il volume totale della formulazione, maggiore è la concentrazione di OTC in essa caricata,
2. è stata utilizzata la minor quantità di tensioattivo necessaria a formare la microemulsione all'interno della formulazione, per ridurre la possibile insorgenza di irritazione gastro-intestinale.

OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS



Tabella 15. Composizione percentuale delle microemulsione primaria ottimizzata per OTC

Componenti	Microemulsione primaria per OTC (%)
Ossitetraciclina cloridrato	0,84
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS	
Acqua	30

Tale formulazione era posta al centro dell' area di formazione di microemulsioni e questo assicurava la formazione del sistema anche con piccole variazioni della composizione (per esempio in seguito a diluizione).

In tal modo è stato selezionato il rapporto 1:1 (p/p) tra fase oleosa e fase acquosa, garantendo quindi una formulazione avente un ridotto volume e un' elevata concentrazione di OTC: tra le possibili formulazioni è stata scelta quella avente la minor percentuale di tensioattivo (40%).

Una volta ottimizzata la microemulsione primaria, tre diversi tipi di microemulsioni doppie sono state preparate e la loro composizione è riportata in tabella 16.

Tabella 16. Composizione percentuale delle microemulsioni doppie testate

Componenti	Microemulsioni O/A/O		
	tipo I <sup>a</sup> (%)	tipo II <sup>b</sup> (%)	tipo III <sup>c</sup> (%)
Ossitetraciclina cloridrato	0,29	1,29	1,59
OMISSIS OMISSIS			
<sup>a</sup> Ossitetraciclina cloridrato è caricata nella fase oleosa interna <sup>b</sup> Ossitetraciclina cloridrato è caricata nella fase oleosa interna e nella fase acquosa <sup>c</sup> Ossitetraciclina cloridrato è caricata nella fase oleosa interna ed esterna			

Le tre microemulsioni differivano per la composizione percentuale (tipo I e II: 35% PE, 35% fase oleosa esterna, 30% OMISSIS) mentre tipo III: 10% PE, 55% fase oleosa esterna, 35% OMISSIS) e per la quantità di OTC nelle diverse fasi; risultando però invariate ai test di stabilità. Per quel che riguarda i titoli in OTC i valori determinati tramite analisi HPLC erano: 2,91 mg/ml per O/A/O tipo I, 12,94 mg/ml per O/A/O tipo II e 15,92 mg/ml per O/A/O tipo III.

Per verificare la formazione di microemulsioni doppie O/A/O sono state effettuate delle analisi DSC, confrontando successivamente i comportamenti termici di microemulsioni O/A/O con i termogrammi di microemulsioni singole e di un campione di microemulsione doppia A/O/A preparata per questo scopo.

I termogrammi, riportati in figura 19, hanno confermato la presenza di microemulsioni doppie con la fase oleosa esterna per i tipi I, II e III. Infatti, il picco di congelamento dell'acqua della fase esterna è chiaramente visibile nei sistemi A/O/A con un intenso picco a  $-15^{\circ}\text{C}$  mentre è assente nelle microemulsioni O/A/O. Inoltre è interessante notare come il picco di congelamento dell'acqua si osservi a temperature diverse a seconda della presenza di microemulsioni singole o doppie. Tali differenze non sono imputabili al tipo di tensioattivo dato che è stato utilizzato lo stesso tensioattivo per preparare i due sistemi. In particolare, nel caso delle microemulsioni doppie, il punto di congelamento è a circa  $-15^{\circ}\text{C}$ , tipico dell'acqua interfacciale (probabilmente perché questo tipo di sistemi sono caratterizzati da un'elevata area interfacciale) mentre nel caso di una microemulsione singola O/A l'evento termico si osserva a  $-28^{\circ}\text{C}$ , come ci si può attendere dall'acqua legata con interazioni più forti.

I tre tipi di microemulsioni doppie sono state caratterizzate in termini di dimensioni delle gocce e sono risultate essere nell'ordine di 150 nm, dimensioni proprie di una microemulsione (vedi tabella 17).

Tabella 17. Dimensioni e potenziale Z delle microemulsioni doppie

Parametri	O/A/O tipo I	O/A/O tipo II	O/A/O tipo III
Dimensioni (nm)	117	162	187
Indice di polidispersità	0.423	0.398	0.479
Potenziale Z (mV) ± S.D.	0.0	0.0	-9,2 ± 0,1

Dall' analisi dei risultati riportati in tabella 17 si può notare che le dimensioni delle gocce crescono quando l' OTC viene caricata negli strati più esterni dei sistemi (Verwey et al., 1948). L' indice di polidispersità determinato è piuttosto basso in tutti e tre i casi, il che garantisce un' uniformità delle dimensioni dei sistemi allestiti .

Questi ultimi valori sono molto promettenti per quel che riguarda una possibile performance *in vivo*. Infatti, gocce di olio di dimensioni ridotte forniscono un' ampia area superficiale su cui agiscono le lipasi pancreatiche per idrolizzare i trigliceridi, promuovendo così un maggior rilascio del farmaco e/o la formazione di micelle contenenti OTC, determinando una maggiore e più uniforme distribuzione del farmaco nel tratto gastro-intestinale e minimizzando l' irritazione dovuta al contatto tra l' OTC e la parete intestinale (Shah et al., 1994).

I valori di potenziale Z di queste formulazioni (riportati in tabella 17) sono approssimativamente zero, come ci si aspetta da microemulsioni costituite con tensioattivi non-ionici. Vi è solo una differenza marginale tra i tipi I,II e III, quest' ultimo tipo ha un valore leggermente negativo probabilmente dovuto alla presenza di OTC nello strato oleoso più esterno.

Successivamente, i tre tipi di microemulsioni sono stati somministrati ai ratti, mediante intubazione gastrica.

Le concentrazioni plasmatiche delle diverse formulazioni testate sono riportate in figura 20 e tabella 18.

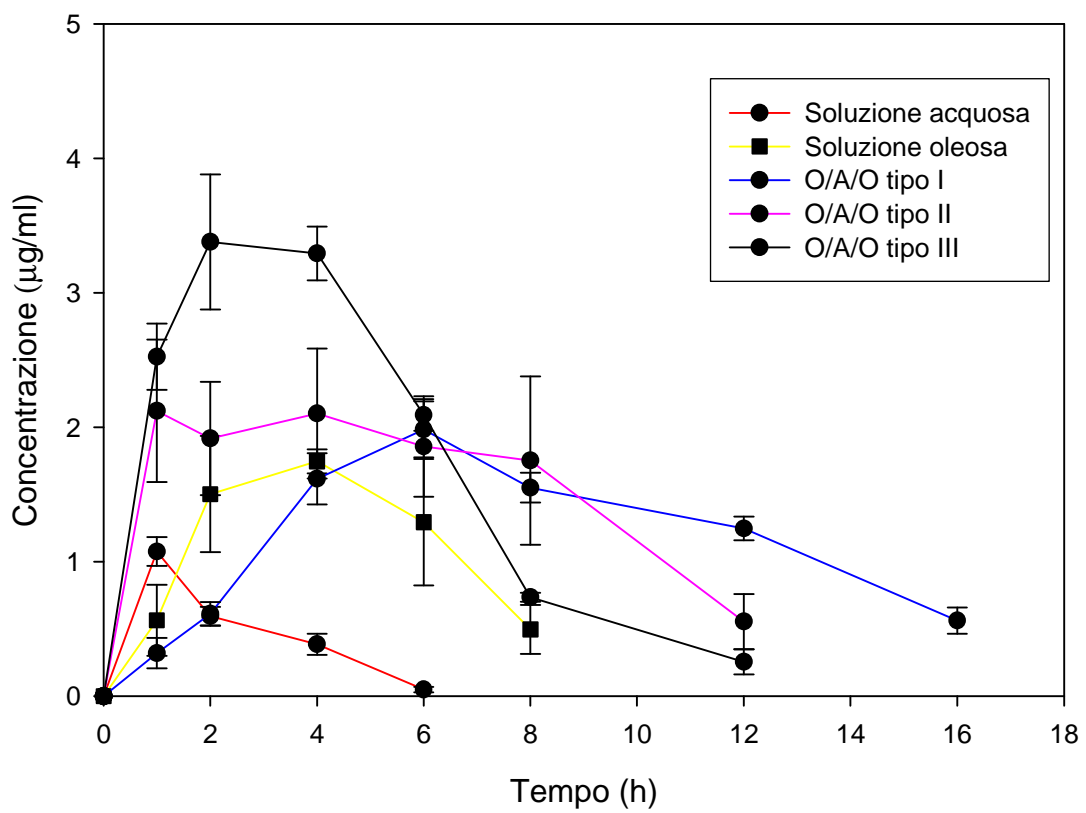


Figura 20. Livelli plasmatici dell'OTC in funzione del tempo, ottenuti dopo somministrazione orale di singole dosi (18 mg/kg), delle cinque formulazioni testate.

Tabella 18. Parametri farmacocinetici di OTC ottenuti in seguito a somministrazione orale delle cinque formulazioni testate (valore medio  $\pm$  S.D., n=3).

Parametri	Soluzione acquosa	Soluzione oleosa	O/A/O tipo I	O/A/O tipo II	O/A/O tipo III
$t_{max}$ (h)	1	4 $\pm$ 2	6 $\pm$ 1	4.66 $\pm$ 3,05	3,33 $\pm$ 1,15
$C_{max}$ ( $\mu$ g/ml)	1,07 $\pm$ 0,15	1,95 $\pm$ 0,35	1,98 $\pm$ 0,23	2,40 $\pm$ 0,15	3,46 $\pm$ 0,43
$AUC_{last}$ ( $\mu$ g h/ml)	2,35 $\pm$ 1,04	9,40 $\pm$ 1,46	19,20 $\pm$ 1,19	18,92 $\pm$ 1,22	20,60 $\pm$ 1,68
$AUC_{\infty}$ ( $\mu$ g h/ml)	3,55 $\pm$ 0,99	11,18 $\pm$ 1,40	20,04 $\pm$ 1,23	22,37 $\pm$ 2,41	21,39 $\pm$ 1,55
$t_{1/2}$ (h)	2,14 $\pm$ 0,67	2,21 $\pm$ 1,24	9,35 $\pm$ 1,39	3,68 $\pm$ 2,56	2,08 $\pm$ 0,32
Biodisponibilità relativa (%) <sup>a</sup>	100	315	560	630	603
$MRT_{\infty}$ (h)	3,63 $\pm$ 0,89	5,30 $\pm$ 1,02	11,3 $\pm$ 1,07	7,45 $\pm$ 2,15	4,64 $\pm$ 0,46

<sup>a</sup>Biodisponibilità relativa =  $(AUC_{ME} / AUC_{soluzione\ acquosa}) \times (dose_{soluzione\ acquosa} / dose_{ME})$

Come prevedibile, somministrando la soluzione acquosa si ottengono livelli plasmatici di OTC più bassi di quelli ottenuti somministrando la soluzione oleosa. Infatti, in soluzione oleosa non avviene la reazione di complessazione tra OTC e ioni presenti nel mezzo acquoso. Inoltre, la soluzione oleosa contiene il Labrasol<sup>®</sup> che ha proprietà tensioattivi e che potrebbe facilitare l'assorbimento del principio attivo. Il calcolo dell'area sotto la curva (AUC) fornisce un confronto tra le biodisponibilità delle varie forme di dosaggio: l'AUC delle microemulsioni I, II e III sono rispettivamente di 5,6, 6,3 e 6,0 volte maggiori di quella della soluzione acquosa. Confrontate con la soluzione oleosa, le microemulsioni hanno una biodisponibilità quasi due volte superiore.

Questi risultati, che forniscono una conferma dei benefici offerti da tali sistemi, possono essere giustificati in diversi modi. Innanzitutto, l'aumentato assorbimento di OTC può essere dovuto alla presenza di gocce di dimensioni ridotte (meno di 190 nm nonostante ogni goccia contenga al proprio interno un'altra goccia di acqua e ancora di olio) che determinano la formazione di un'enorme area superficiale e, di conseguenza, un'ampia distribuzione nel tratto gastro-intestinale.

Inoltre, ci si aspetta che i sali biliari contribuiscano ulteriormente al processo di formazione delle microemulsioni, formando gocce ancora più piccole *in vivo* (Mackay, 1988).

Un'ulteriore spiegazione potrebbe essere fornita dal fatto che il farmaco venga solubilizzato e circondato da micelle costituite dai prodotti di digestione lipidica (Wang et al., 2008). Tali prodotti di lipolisi, assieme al tensioattivo, potrebbero anche influenzare la permeabilità e la diffusione attraverso la membrana (Aungst, 2000).

Osservando con maggiore dettaglio i profili plasmatici ottenuti con le tre microemulsioni tipo I, II e III, si può notare che sono molto diversi.

Per O/A/O tipo I, il valore di  $t_{max}$  si osserva dopo 6 h, anziché dopo 1 h per la soluzione acquosa e dopo 4 ore per la soluzione oleosa. Questa differenza potrebbe dipendere dalla posizione del farmaco all'interno della microemulsione: l'OTC è caricata nella fase oleosa interna e, prima di venir assorbita, deve diffondere attraverso due strati più esterni del sistema.

I meccanismi di cessione del farmaco, infatti, dai sistemi emulsionati multipli, includono la diffusione delle molecole del farmaco dalle gocce interne (1), dal mezzo

delle gocce esterne (2) o per trasferimento di massa dovuto alla coalescenza delle gocce interne (3), come mostrato in figura 21 (Florence -Attwood, 2002).

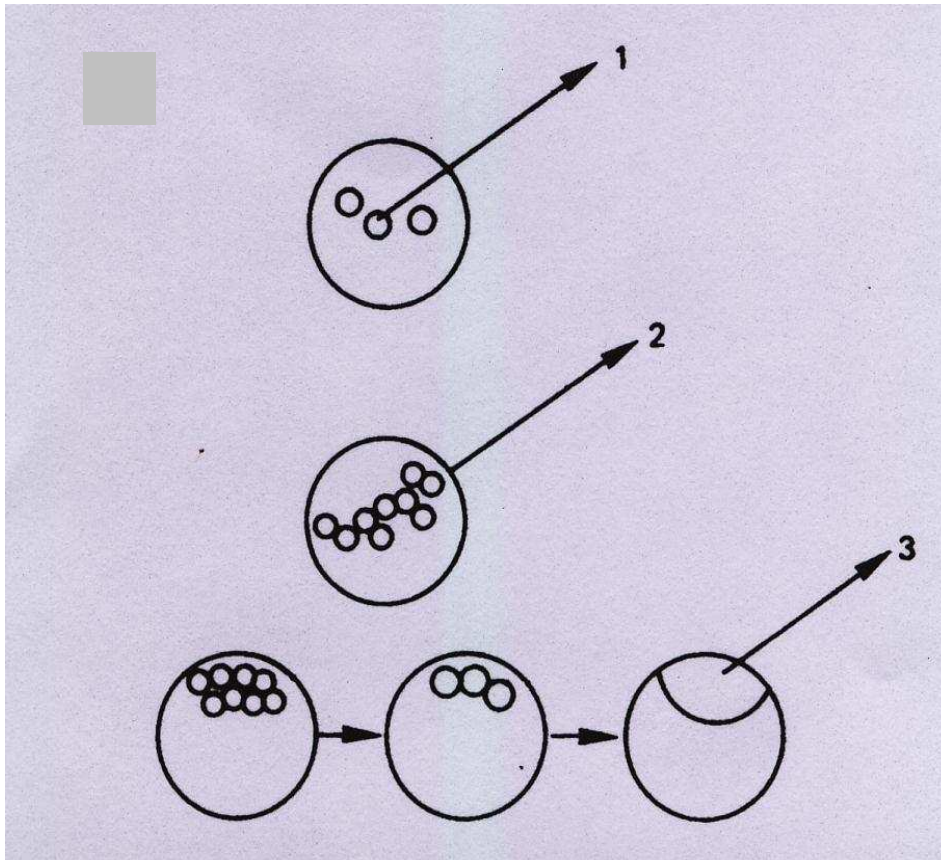


Figura 21. Rappresentazione dei meccanismi di rilascio del farmaco da un sistema lipidico microemulsionato.

Nel caso di O/A/O tipo II invece, contenente l' OTC anche nella fase acquosa, si nota come la concentrazione nel plasma aumenti molto più velocemente. Infatti già dopo un'ora si ottiene la  $C_{max}$ . Questo andamento potrebbe essere dovuto al fatto che le gocce di fase acquosa contenenti l' OTC vengano prontamente a contatto con la mucosa intestinale e vengano rapidamente assorbite. Il metabolismo del farmaco, che determina una diminuzione della concentrazione plasmatica, viene compensato con un più lento assorbimento dell' OTC ceduta dalle gocce di fase interna oleosa ed è per questo che la concentrazione rimane quasi costante fino a otto ore più tardi, formando un plateau.

Infine, per O/A/O tipo III, l' andamento iniziale è simile a quello della soluzione oleosa ma con concentrazioni più elevate. In questo caso l' aumento di concentrazione plasmatica di OTC è il più rapido probabilmente per la presenza di OTC nella fase

oleosa esterna oltre che nella fase oleosa interna.

Confrontando O/A/O tipo I con O/A/O tipo III si può notare che da 8 h in poi hanno lo stesso andamento ma il profilo ottenuto somministrando O/A/O tipo III è molto più basso rispetto a O/A/O tipo I.

Le due formulazioni sono entrambe caricate con OTC nella fase oleosa interna ma nel tipo I questa fase rappresenta il 10,41% della formulazione totale mentre per O/A/O tipo III rappresenta il 2,93% della composizione totale. Questa è la ragione per cui O/A/O tipo I assicura un rilascio prolungato del farmaco a differenza di O/A/O tipo III. Si può perciò ottenere un rilascio sostenuto del principio attivo solo quando un' elevata quantità di OTC viene caricata nella fase oleosa interna.

OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS



Il sistema auto-emulsionante è stato miscelato con il 30% di acqua (rapporto 1:1, p/p con fase oleosa +farmaco) ed è stato valutato il diametro medio dei globuli della fase dispersa utilizzando la tecnica del Laser Light Scattering.

Come riportato in figura 22, il diametro della fase dispersa corrisponde a circa 200 nm: questa è un' ulteriore conferma che il sistema auto-emulsionante allestito forma una microemulsione per semplice agitazione.

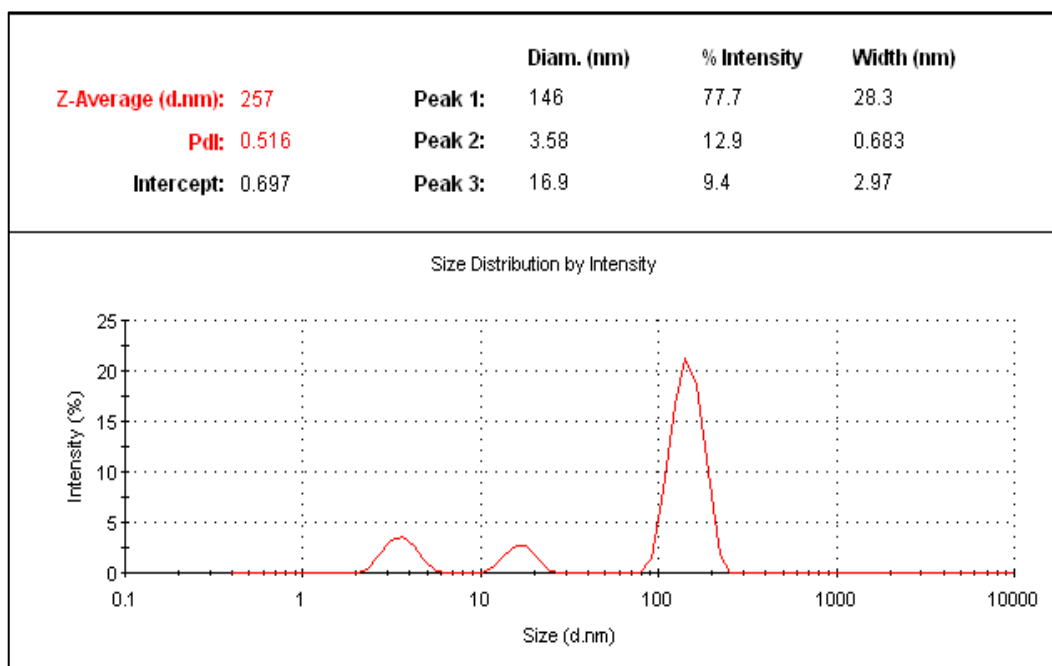


Figura 22. Dimensioni del SES contenente OTC

Visti i risultati promettenti ottenuti, il passo successivo è stato quello di valutare la performance farmacocinetica del SES nelle due specie ittiche selezionate: trota iridea e branzino, che rappresentano rispettivamente una specie d'acqua dolce e una di acqua salata. Queste specie ittiche si differenziano per il diverso processo di osmoregolazione, necessario per i pesci e che consiste nel mantenimento di una concentrazione stabile interna di acqua e sali.

La maggior parte dei pesci ha, però, un bilancio salino diverso da quello dell'acqua in cui vive: questa differenza rappresenta un rischio perché la pressione osmotica, esercitata in zone come la bocca e le branchie, può dar luogo a pericolosi cambiamenti di composizione chimica interna.

Il corpo dei pesci marini ha una concentrazione di sali inferiore a quella del mare, l'animale deve quindi evitare di perdere acqua.

Per questa ragione, molti pesci marini bevono elevate quantità di acqua di mare eliminando la maggior parte dei sali attraverso un'escrezione attiva di sali dalle branchie e attraverso l'urina concentrata, anche se in quantità ridotte.

Il contrario avviene nelle specie d'acqua dolce che devono evitare la perdita di sali; essi bevono poco e si procurano i sali attraverso le branchie per assorbimento attivo (figura 23).

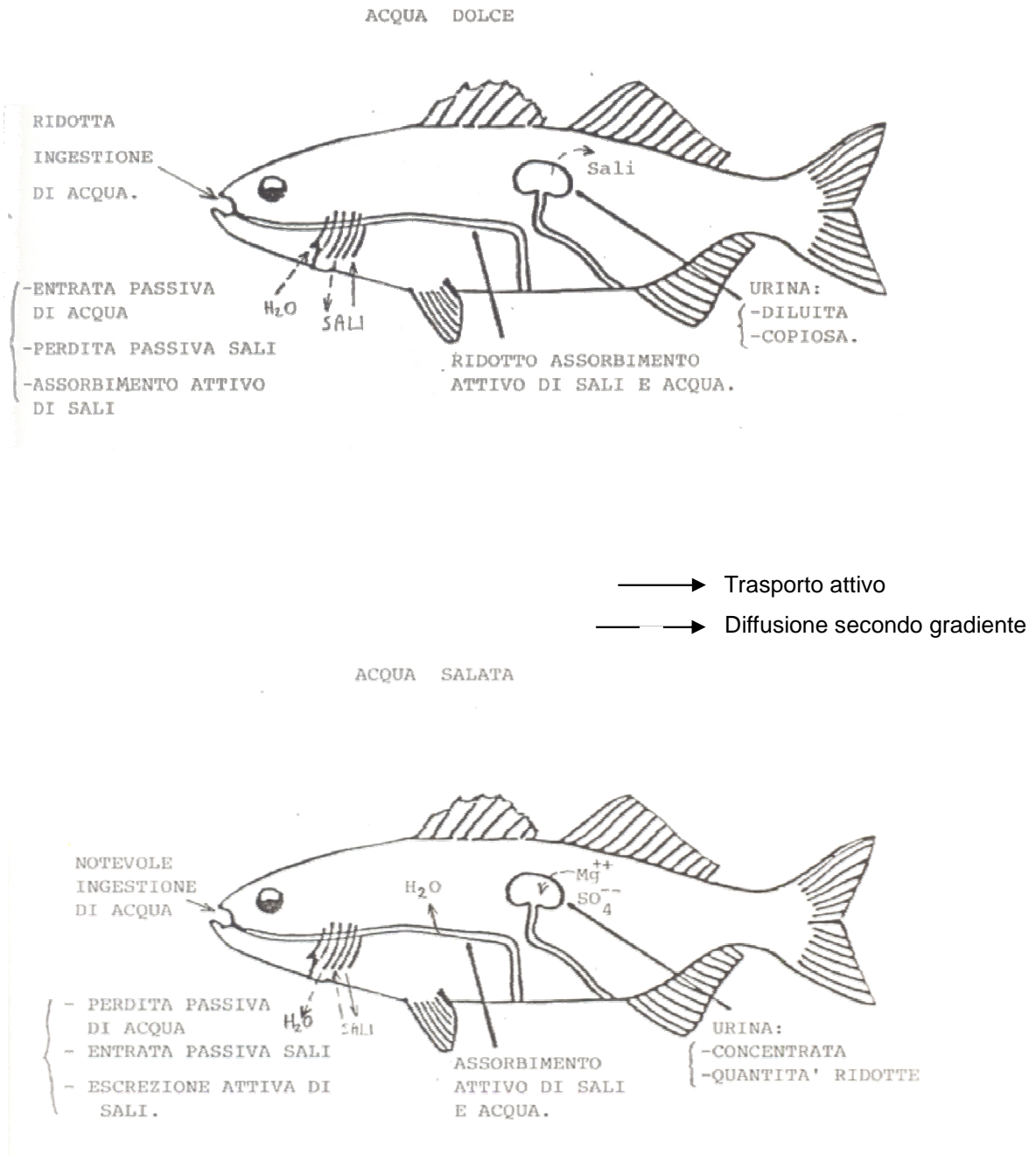


Figura 23. Meccanismi di osmoregolazione nei teleostei adattati ad acqua dolce (in alto) e acqua salata (in basso).

All' interno del tratto gastro-intestinale dei pesci marini, quali i branzini, vi è quindi acqua di mare modificata. Il fenomeno di complessazione di OTC con i cationi presenti in soluzione (che determina la formazione di chelati che ne limitano l'assorbimento) è dunque particolarmente influente nei pesci marini che, non solo vivono in un ambiente acquatico con una maggior concentrazione di sali ma, che ingeriscono elevate quantità di acqua all'interno del proprio organismo.

La somministrazione delle formulazioni liquide ad entrambe le specie ittiche è stata effettuata mediante gavage. Ad un gruppo è stato fornito 1 ml di soluzione acquosa, ad un altro gruppo 1,24 ml di SES, in modo da fornire la stessa dose di OTC (75 mg/kg).

Gli animali sono stati quindi sedati e, ad intervalli di tempo stabiliti, sono stati prelevati campioni di sangue per valutare le concentrazioni plasmatiche di OTC, tramite HPLC.

A titolo di esempio, nelle figure 24 e 25 sono riportati due cromatogrammi relativi ad ognuna delle due specie selezionate.

Le concentrazioni plasmatiche di OTC, a vari tempi di prelievo, sono riportati in tabella 20 e i rispettivi profili nelle figure 26 e 27, mentre i parametri farmacocinetici sono riportati in tabella 21.

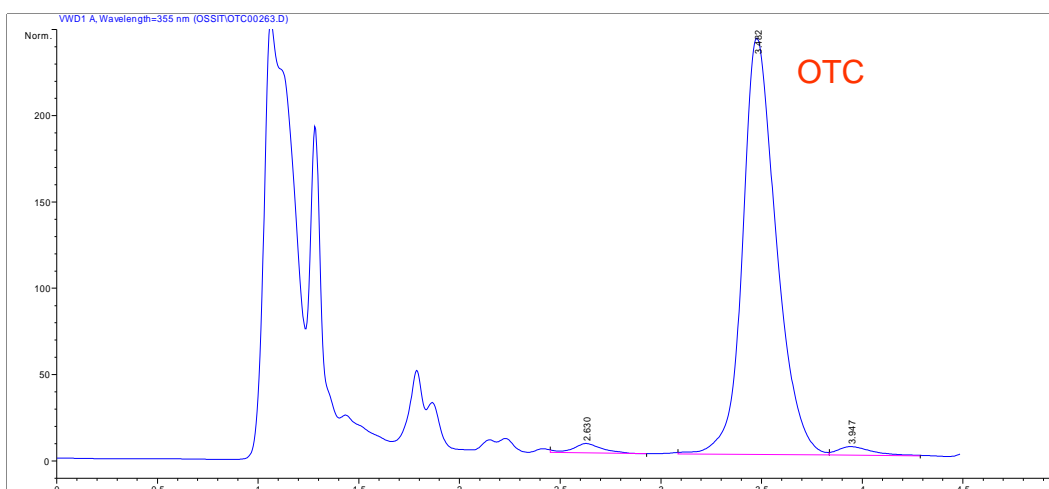


Figura 24. Cromatogramma relativo ad un campione di plasma di trota iridea

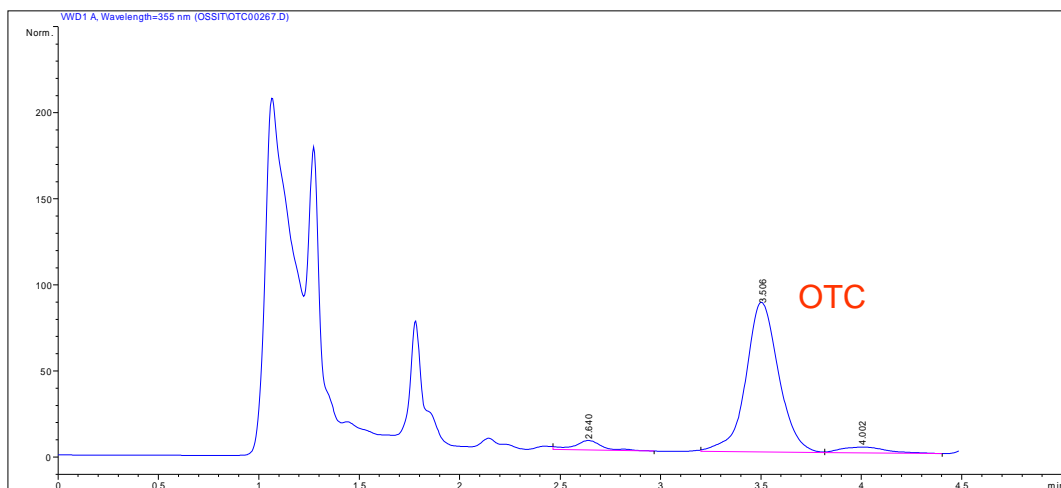


Figura 25. Cromatogramma relativo ad un campione di plasma di branzino

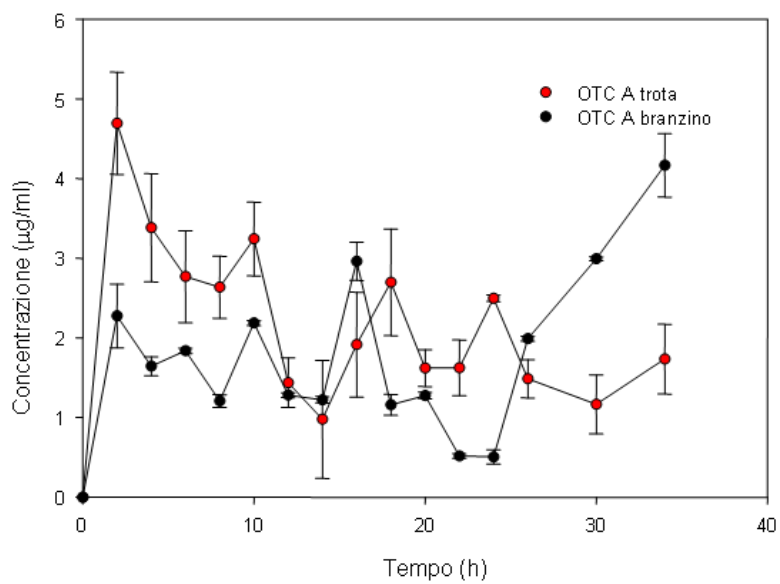


Figura 26. Profili farmacocinetici ottenuti dopo somministrazione della soluzione acquosa (OTC A) avente una concentrazione di 75 mg/kg

Tabella 20. Concentrazioni plasmatiche di OTC ottenute somministrando le formulazioni liquide alle due specie ittiche

Tempo (h)	OTC A Trota ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ S.D.	OTC A Branzino ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ S.D.	OTC SES Trota ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ S.D.	OTC SES branzino ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ S.D.
0	0,00 $\pm$ 0,0	0,00 $\pm$ 0,0	0,00 $\pm$ 0,0	0,00 $\pm$ 0,00
2	4,69 $\pm$ 0,64	2,27 $\pm$ 0,40	17,97 $\pm$ 2,71	12,69 $\pm$ 2,87
4	3,38 $\pm$ 0,68	1,64 $\pm$ 0,12	22,33 $\pm$ 3,01	26,20 $\pm$ 1,23
6	2,77 $\pm$ 0,57	1,84 $\pm$ 0,03	20,12 $\pm$ 2,06	6,26 $\pm$ 2,82
8	2,64 $\pm$ 0,39	1,21 $\pm$ 0,08	19,53 $\pm$ 1,91	5,68 $\pm$ 1,20
10	3,24 $\pm$ 0,46	2,19 $\pm$ 0,03	20,38 $\pm$ 2,07	5,59 $\pm$ 0,90
12	1,44 $\pm$ 0,31	1,28 $\pm$ 0,03	18,46 $\pm$ 2,12	4,55 $\pm$ 0,30
14	0,98 $\pm$ 0,74	1,22 $\pm$ 0,04	9,59 $\pm$ 1,95	4,81 $\pm$ 0,17
16	1,92 $\pm$ 0,66	2,96 $\pm$ 0,24	16,17 $\pm$ 0,10	4,32 $\pm$ 0,20
18	2,70 $\pm$ 0,67	1,16 $\pm$ 0,13	7,70 $\pm$ 2,12	3,57 $\pm$ 0,30
20	1,62 $\pm$ 0,23	1,28 $\pm$ 0,04	5,13 $\pm$ 2,28	3,65 $\pm$ 0,29
22	1,62 $\pm$ 0,35	0,52 $\pm$ 0,03	10,16 $\pm$ 1,90	4,14 $\pm$ 0,40
24	2,50 $\pm$ 0,04	0,51 $\pm$ 0,09	5,79 $\pm$ 1,76	4,57 $\pm$ 0,20
26	1,49 $\pm$ 0,24	1,99 $\pm$ 0,03	11,36 $\pm$ 1,66	9,30 $\pm$ 0,25
30	1,17 $\pm$ 0,37	2,99 $\pm$ 0,02	5,37 $\pm$ 1,57	31,22 $\pm$ 3,20
34	1,73 $\pm$ 0,34	4,17 $\pm$ 0,40	8,88 $\pm$ 1,23	6,41 $\pm$ 2,75

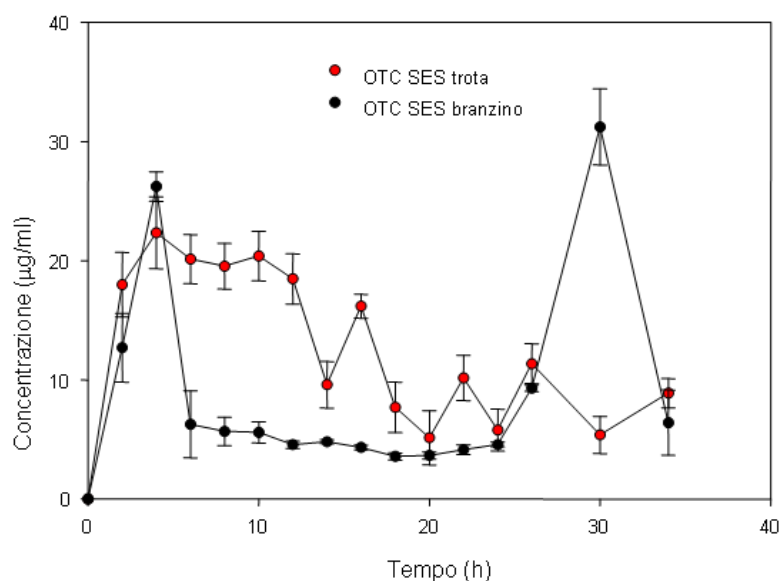


Figura 27. Profili farmacocinetici ottenuti dopo somministrazione del sistema auto-emulsionante (OTC SES) avente una concentrazione di 75 mg/kg

Tabella 21. Parametri farmacocinetici di OTC in entrambe le specie ittiche delle due formulazioni liquide testate

Parametri	OTC A	OTC SES	OTC A	OTC SES
Specie ittica	Trota		Branzino	
$C_{max}$ (µg /ml)	4,70	22,33	4,17	31,22
$t_{max}$ (h)	2	4	34	30**
$AUC_{last}$ (µg h/ml)	71,50	420,01	62,43	337,63
Biodisponibilità relativa (%)*	100	586,70	100	540,80

\*Biodisponibilità relativa= $AUC_{last}/AUC_{last\ acq} \times 100$

\*\*un primo picco, di concentrazione leggermente inferiore, si rileva a 4h

Tali risultati hanno dimostrato l'efficacia della formulazione costituita dal sistema auto-emulsionante ad aumentare la biodisponibilità orale di OTC, sia in trote iridee che nei branzini.

In entrambe le specie ittiche si è ottenuto un marcato aumento della biodisponibilità rispetto alla semplice soluzione acquosa, pari a quasi 6 volte nel caso della trota iridea e di circa 5 volte nel caso del branzino (tabella 21). Rispetto alla soluzione acquosa, l'aumento di biodisponibilità ottenuto nel branzino è di minore entità. Tuttavia questo dato è più degno di attenzione dato che l'ambiente acquatico del branzino, cioè l'acqua di mare, come noto, presenta una maggiore concentrazione di ioni disciolti rispetto all'acqua dolce.

Nei profili farmacocinetici delle formulazioni liquide si osserva un'evidente oscillazione della concentrazione plasmatica nel tempo. Tale fenomeno potrebbe essere attribuito alla farmacocinetica dell'OTC, notoriamente soggetta a circolo entero-epatico, sia nell'uomo che nelle specie ittiche prese in esame (Treves-Brown, 2000).

Nei medesimi profili si poteva altresì riscontrare una netta differenza tra le due specie ittiche: mentre nella trota la concentrazione plasmatica tende a scendere in modo piuttosto graduale dopo il picco a circa 4 h, nel branzino si rilevano due massimi plasmatici (a 4h e a 30h). Un simile fenomeno potrebbe essere legato al ciclo cardiaco e ad un possibile accumulo temporaneo del farmaco in un organo, presumibilmente il fegato, da cui viene nuovamente liberato alla ripresa delle funzioni fisiologiche, come proprio di questa specie ittica. Tale fenomeno è ancora più evidente nel grafico di figura 27, che corrisponde invece alla somministrazione del SES contenente OTC. La somministrazione di una formulazione a base lipidica esaspera questo fenomeno di accumulo perché i grassi che tendono ad accumularsi nel fegato dell'animale veicolano l'OTC in quest'organo (Sargent J.R. et al., 2002).

Per valutare la distribuzione dell'OTC all'interno dell'organismo della trota è stata fornita una singola dose di SES.

In figura 28 e in tabella 22 vengono evidenziate le concentrazioni analizzate nel plasma, nei fegati e nei muscoli degli stessi pesci, ai vari tempi di prelievo.

In tabella 23 vengono riportati i parametri farmacocinetici corrispondenti ai profili ottenuti.

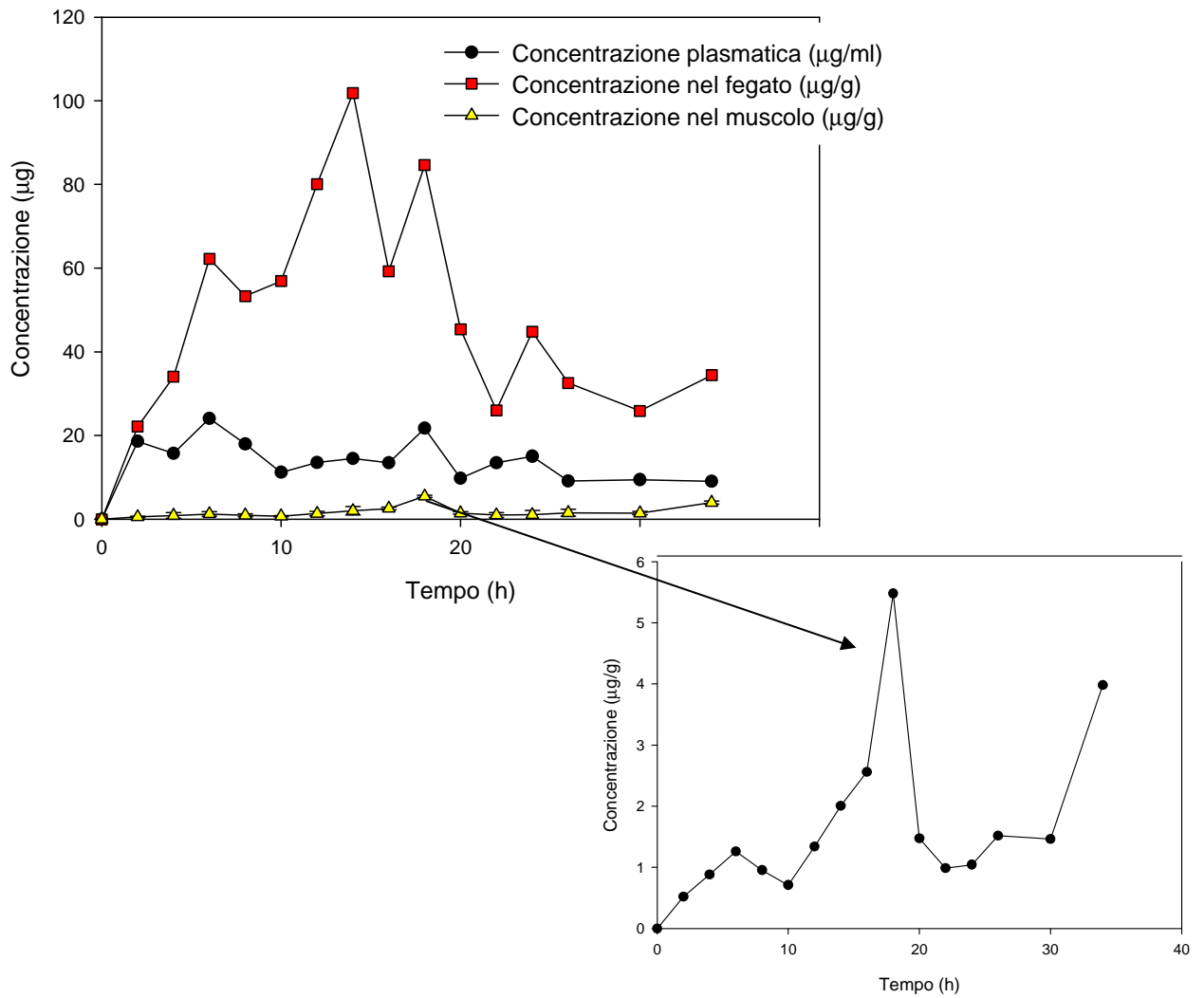


Figura 28. Concentrazioni di OTC analizzate nel plasma, nei fegati e nei muscoli degli stessi pesci ai vari tempi di prelievo



Tabella 22. Valori di concentrazione di OTC nel plasma, nel fegato e nel muscolo a vari tempi di prelievo

Tempo (h)	Concentrazioni nel plasma ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$ S.D.	Concentrazioni nel fegato ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ S.D.	Concentrazioni nel muscolo ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ S.D.
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,0	0,00 $\pm$ 0,0
2	18,59 $\pm$ 12,39	22,12 $\pm$ 20,06	0,52 $\pm$ 0,17
4	15,71 $\pm$ 13,30	34,04 $\pm$ 18,86	0,88 $\pm$ 0,66
6	24,04 $\pm$ 7,49	62,23 $\pm$ 21,61	1,26 $\pm$ 0,56
8	17,96 $\pm$ 4,37	53,29 $\pm$ 43,84	0,95 $\pm$ 0,36
10	11,19 $\pm$ 4,22	56,88 $\pm$ 32,14	0,71 $\pm$ 0,13
12	13,53 $\pm$ 3,09	80,11 $\pm$ 22,43	1,34 $\pm$ 0,55
14	14,48 $\pm$ 5,87	101,88 $\pm$ 73,60	2,00 $\pm$ 1,01
16	13,44 $\pm$ 9,16	59,28 $\pm$ 26,00	2,56 $\pm$ 0,33
18	21,70 $\pm$ 10,66	84,63 $\pm$ 80,00	5,48 $\pm$ 0,24
20	9,77 $\pm$ 3,38	45,41 $\pm$ 11,82	1,47 $\pm$ 0,28
22	13,46 $\pm$ 13,70	26,01 $\pm$ 32,24	0,98 $\pm$ 0,57
24	15,03 $\pm$ 6,68	44,81 $\pm$ 20,52	1,04 $\pm$ 1,06
26	9,10 $\pm$ 4,68	32,54 $\pm$ 24,83	1,51 $\pm$ 0,82
30	9,46 $\pm$ 7,27	25,86 $\pm$ 8,88	1,46 $\pm$ 0,41
34	9,03 $\pm$ 2,21	34,39 $\pm$ 13,77	3,98 $\pm$ 0,38

Tabella 23. Parametri farmacocinetici relativi a profili di figura 28

Parametri	Plasma	Fegato	Muscolo
$t_{max}$ (h)	6	14	18
$C_{max}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	24,04	101,88	5,41
$AUC_{last}$ ( $\mu\text{g h/ml}$ )	459,68	1510,49	55,37
$AUC_{\infty}$ ( $\mu\text{g h/ml}$ )	639,86	1964,46	114,86
$t_{1/2}$ (h)	17,96	10,78	10,40

Osservando figura 28, risulta evidente che l'OTC somministrata come SES tende ad accumularsi nel fegato. L'AUC del profilo corrispondente alle concentrazioni analizzate nel fegato è più di tre volte maggiore rispetto all'AUC del plasma (vedi tabella 23).

Dalla stessa figura si evidenzia come, sia nel plasma che nel fegato e nel muscolo, somministrando un' unica dose iniziale, le concentrazioni sono soggette a continue oscillazioni. Tali oscillazioni sono probabilmente dovute al rilascio del farmaco dal principale organo di accumulo, il fegato. L' OTC rilasciata, attraverso la bile verrebbe nuovamente liberata a livello intestinale per poi essere riassorbita ed essere nuovamente distribuita ai vari organi e tessuti tra cui il muscolo.

Un' ulteriore conferma di tale circolo entero-epatico viene fornita dai valori di  $t_{1/2}$ . Infatti, per il plasma, tale valore è insolitamente più elevato rispetto a quelli di fegato

e muscolo (17 ore nel plasma confronto a 10 ore per fegato e muscolo).

Per visualizzare il transito del sistema auto-emulsionante nel tratto gastro- intestinale del pesce (in questo caso solo sulla trota) è stato somministrato il sistema SES contenente, nella fase oleosa, un'aliquota pari a 480 mg/ml (30% p/p) di un mezzo di contrasto lipofilo, il lipiodol ultrafluido (Guerbet S.p.A., Genova): una miscela di esteri etilici di acidi grassi iodurati di origine vegetale.

Sono state poi effettuate radiografie sulle trote dopo vari intervalli di tempo dalla somministrazione (0-2-4 h). Dalla radiografia effettuata a due ore (figura 29) dalla somministrazione, si nota un risultato interessante: il sistema SES si distribuisce uniformemente in tutta l'area gastrica grazie alle ridotte dimensioni delle gocce. Infatti, la forma visibile in bianco nella radiografia corrisponde al tratto gastrico della trota rappresentato in figura 30.

Dopo 4 h, l'intensità del contrasto è meno marcata, probabilmente in accordo al massivo assorbimento della formulazione dopo 4h, visibile nei profili plasmatici sopra-riportati (figura 28) e alla farmacocinetica di questa specie.



Figura 29. Radiografie di trota (a) e dopo somministrazione di un mezzo di contrasto a tempo 2h (b) e 4h(c)

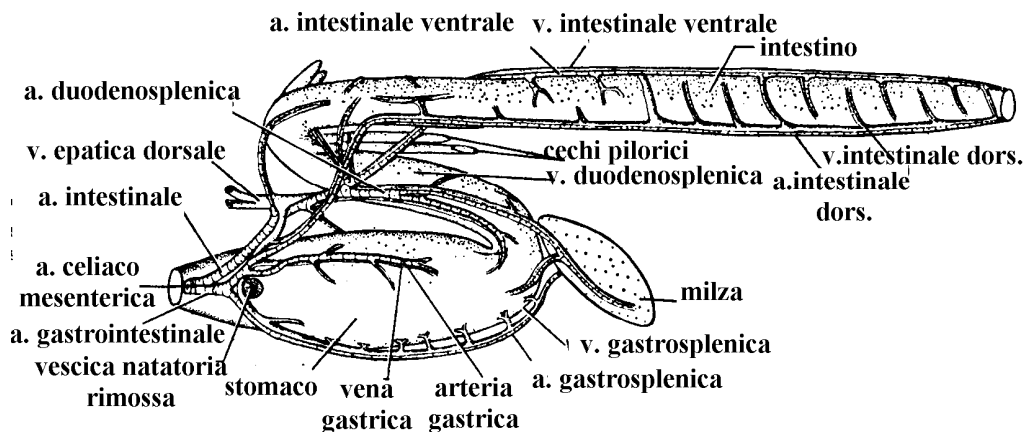


Figura 30. Tratto digerente della trota

La somministrazione delle formulazione liquide mediante gavage, però, non mima la comune prassi di allevamento in cui l'antibiotico viene fornito in forma di mangime medicato.

Il passo successivo è stato, quindi, quello di caricare il sistema auto-emulsionante sul supporto solido costituito dal mangime, al fine di preparare un mangime medicato auto-emulsionante.

La tecnica di produzione del mangime medicato commerciale Hendrix consiste nella miscelazione di varie farine (51% di farina di pesce, 15% di lecitina di soia, 34% tra glutine di frumento, amido di frumento, integratori minerali e vitaminici) e nella successiva estrusione in estrusore a vite ad una temperatura di 60°C. A questo punto, il mangime viene raffreddato; poi ingrassato con olio di pesce in miscelatore a vuoto ed infine miscelato con la polvere medicamentosa (polvere di OTC su un supporto di amido) per ottenere un dosaggio nominale in OTC pari a 75 mg/kg, in ragione di una alimentazione sia nella trota che nel branzino dell'1% della biomassa, come previsto dalla legislazione italiana.

OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
 OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
 OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
 OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
 OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
 OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS

commerciale.

Prima di testare *in vivo* tale mangime, si è voluto valutare che il caricamento su mangime non alterasse le proprietà del SES e che fosse ancora in grado di riformare una microemulsione una volta posto in soluzione. Il mangime medicato, caricato con il SES, è stato posto in due tamponi corrispondenti al valore di pH gastrico e al valore di pH intestinale della trota alimentata (rispettivamente a pH 4,5 e 7,4) ed è stato misurato il diametro delle gocce formate.

Come riportato nelle figure 31 e 32, le gocce formate in entrambi i pH hanno dimensioni intorno ai 200 nm, indice che la proprietà del SES di riformare *in vivo* una microemulsione è rimasta inalterata anche dopo caricamento su mangime.

Dopo aver preparato i due mangimi, il lavoro è continuato effettuando la prova in campo, testando il mangime caricato con il SES su un campione di 75 trote e di 75 branzini e il mangime medicato commerciale su altrettanti esemplari. Ad intervalli di tempo stabiliti, sono stati prelevati campioni di sangue per valutare le concentrazioni plasmatiche di OTC ai vari tempi, tramite HPLC (tabella 24 ).

I parametri farmacocinetici sono riportati in tabella 25 e i rispettivi profili nelle figure 33 e 34.

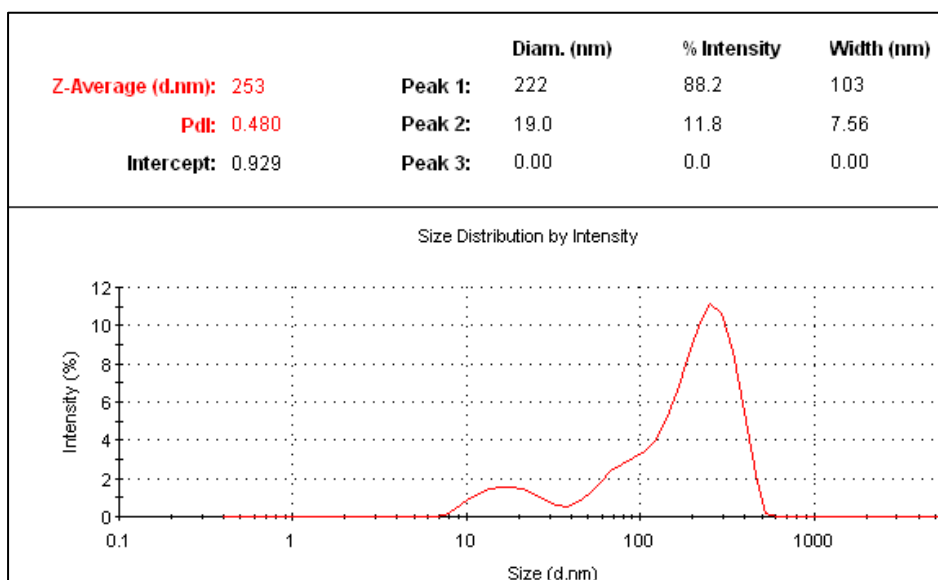


Figura 31. Diametro delle gocce del SES con OTC caricato sul mangime e posto in un tampone a pH 4,5

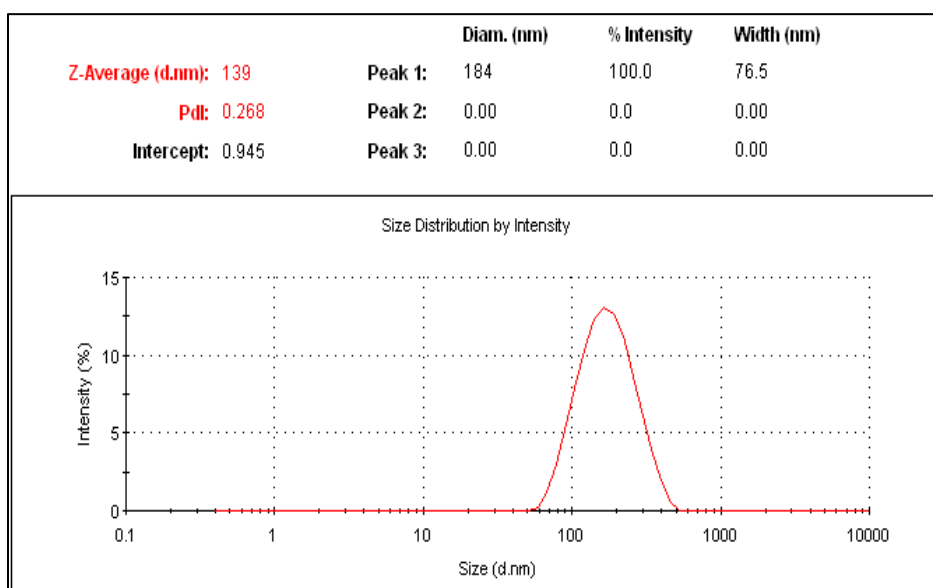


Figura 32. Diametro delle gocce del SES con OTC caricato sul mangime e posto in un tampone a pH 7,4

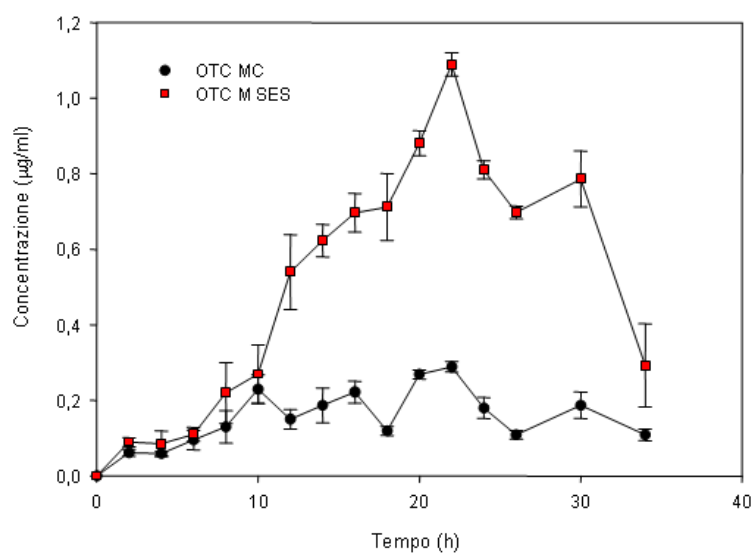


Figura 33. Profili farmacocinetici nella trota dopo somministrazione di 15 mg/kg di mangime medicato

Tabella 24. Concentrazioni plasmatiche a vari tempi di prelievo

Tempo (h)	OTC MC Trota ( $\mu\text{g/ml}$ )	OTC MC Branzino ( $\mu\text{g/ml}$ )	OTC MSES Trota ( $\mu\text{g/ml}$ )	OTC MSES Branzino ( $\mu\text{g/ml}$ )
0	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
2	0,012 $\pm$ 0,00	0,344 $\pm$ 0,1	0,018 $\pm$ 0,00	1,010 $\pm$ 0,10
4	0,012 $\pm$ 0,00	0,102 $\pm$ 0,05	0,017 $\pm$ 0,01	0,519 $\pm$ 0,08
6	0,019 $\pm$ 0,02	0,588 $\pm$ 0,09	0,022 $\pm$ 0,00	2,130 $\pm$ 0,20
8	0,026 $\pm$ 0,01	0,656 $\pm$ 0,11	0,044 $\pm$ 0,02	1,830 $\pm$ 0,19
10	0,046 $\pm$ 0,00	0,250 $\pm$ 0,04	0,054 $\pm$ 0,04	0,990 $\pm$ 0,00
12	0,030 $\pm$ 0,00	0,444 $\pm$ 0,19	0,108 $\pm$ 0,03	1,220 $\pm$ 0,09
14	0,037 $\pm$ 0,01	0,533 $\pm$ 0,13	0,125 $\pm$ 0,01	1,630 $\pm$ 0,12
16	0,044 $\pm$ 0,01	0,534 $\pm$ 0,06	0,139 $\pm$ 0,01	1,530 $\pm$ 0,08
18	0,024 $\pm$ 0,00	0,860 $\pm$ 0,08	0,142 $\pm$ 0,03	2,150 $\pm$ 0,12
20	0,054 $\pm$ 0,01	1,740 $\pm$ 0,21	0,176 $\pm$ 0,02	2,740 $\pm$ 0,18
22	0,058 $\pm$ 0,00	0,650 $\pm$ 0,09	0,218 $\pm$ 0,01	3,600 $\pm$ 0,17
24	0,036 $\pm$ 0,01	0,631 $\pm$ 0,06	0,162 $\pm$ 0,01	0,980 $\pm$ 0,06
26	0,022 $\pm$ 0,00	0,585 $\pm$ 0,12	0,139 $\pm$ 0,00	0,790 $\pm$ 0,03
30	0,037 $\pm$ 0,01	0,315 $\pm$ 0,07	0,157 $\pm$ 0,03	1,430 $\pm$ 0,07
34	0,022 $\pm$ 0,00	0,574 $\pm$ 0,01	0,058 $\pm$ 0,00	0,812 $\pm$ 0,04



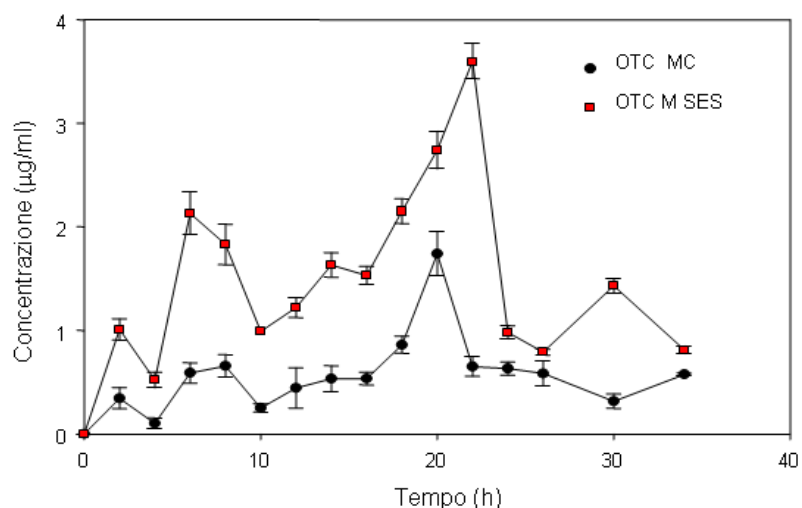


Figura 34. Profili farmacocinetici nel branzino dopo somministrazione di 15 mg/kg di mangime medicato

Tabella 25. Parametri farmacocinetici in entrambe le specie ittiche dei mangimi medicati

Parametri	OTC MC	OTC MSES	OTC MC	OTC MSES
Specie ittica	Trota		Branzino	
$C_{max}$ (µg /ml)	0,06	0,22	1,74	3,60
$t_{max}$ (h)	22	22	20	22
$AUC_{last}$ (µg h/ml)	1,05	3,61	18,83	50,37
Biodisponibilità relativa (%) <sup>*</sup>	100	342,45	100	267,55

\*Biodisponibilità relativa= $AUC_{last}/AUC_{last\ acq} \times 100$

Osservando i quattro valori di AUC ottenuti, si può notare che il mangime MSES è più biodisponibile rispetto a quello commerciale in entrambe le specie ittiche, rispettivamente 3,4 volte nelle trote e 2,7 volte nei branzini.

Come già nel caso delle formulazioni liquide, rispetto al riferimento (in questo caso il mangime commerciale), l' aumento di biodisponibilità è maggiore nella trota. Se si confrontano, tuttavia, le concentrazioni plasmatiche e le risultanti aree sotto la curva, si può notare che nelle trote i valori sono molto più bassi rispetto ai branzini per entrambi i mangimi. Questo dato sembrerebbe in contrasto con l' ambiente acquatico della trota, più favorevole all' assorbimento del farmaco, essendo ridotta la sua complessazione.

Tuttavia, sono possibili diverse spiegazioni. Innanzitutto, tale fenomeno potrebbe essere dovuto ad un effetto specie-specifico, tale da far sì che la trota abbia una digestione più rallentata o meno efficace di quella del branzino.

Vi è poi da considerare che il metabolismo dei pesci, che sono animali eterotermi, è funzione della temperatura dell'acqua e quindi si assiste ad un differente assorbimento dei farmaci dal tratto gastro-enterico a seconda della temperatura (Björklund and Bylund, 1990; Black et al., 1991). In questo studio, quando sono state condotte tali prove, i branzini erano stabulati in vasche con una temperatura dell'acqua di 18-20°C, ottimale per questo tipo di pesci, mentre le trote erano stabulate a 12°C, temperatura inferiore a quella ottimale per il benessere delle trote (circa 15-16°C). Quest' ultima specie potrebbe, quindi, aver risentito di queste condizioni sub-ottimali di stabulazione, con il risultato di un metabolismo rallentato e conseguente minor assorbimento del mangime medicato, in accordo ai precedenti dati di letteratura (Björklund and Bylund, 1990; Black et al., 1991).

Per visualizzare il transito del mangime nell'apparato digerente dei pesci (anche in questo caso solo sulle trote) è stato somministrato il mangime caricato con il SES, con bario solfato come mezzo radio-opaco, effettuando successivamente a tempi diversi le radiografie (vedi figura 35).

Da tali immagini si evince che, dopo 8h, gli estrusi, inizialmente tutti visibili nello stomaco dell'animale (tempo 0), in parte sono ancora intatti nello stomaco, mentre altri sono già disgregati e stanno migrando verso l'intestino. Un altro interessante dato è che alcuni estrusi vengono rigurgitati nella cavità buccale, presumibilmente

per essere frantumati e successivamente digeriti. Quest' ultimo fenomeno non è stato precedentemente descritto in letteratura, ma era molto comune negli esemplari da noi testati ed è stato riscontrato anche a diversi tempi dalla somministrazione (vedi figura 36).

Questo peculiare comportamento delle trote è sicuramente una delle cause della scarsa biodisponibilità di OTC somministrata come mangime medicato.

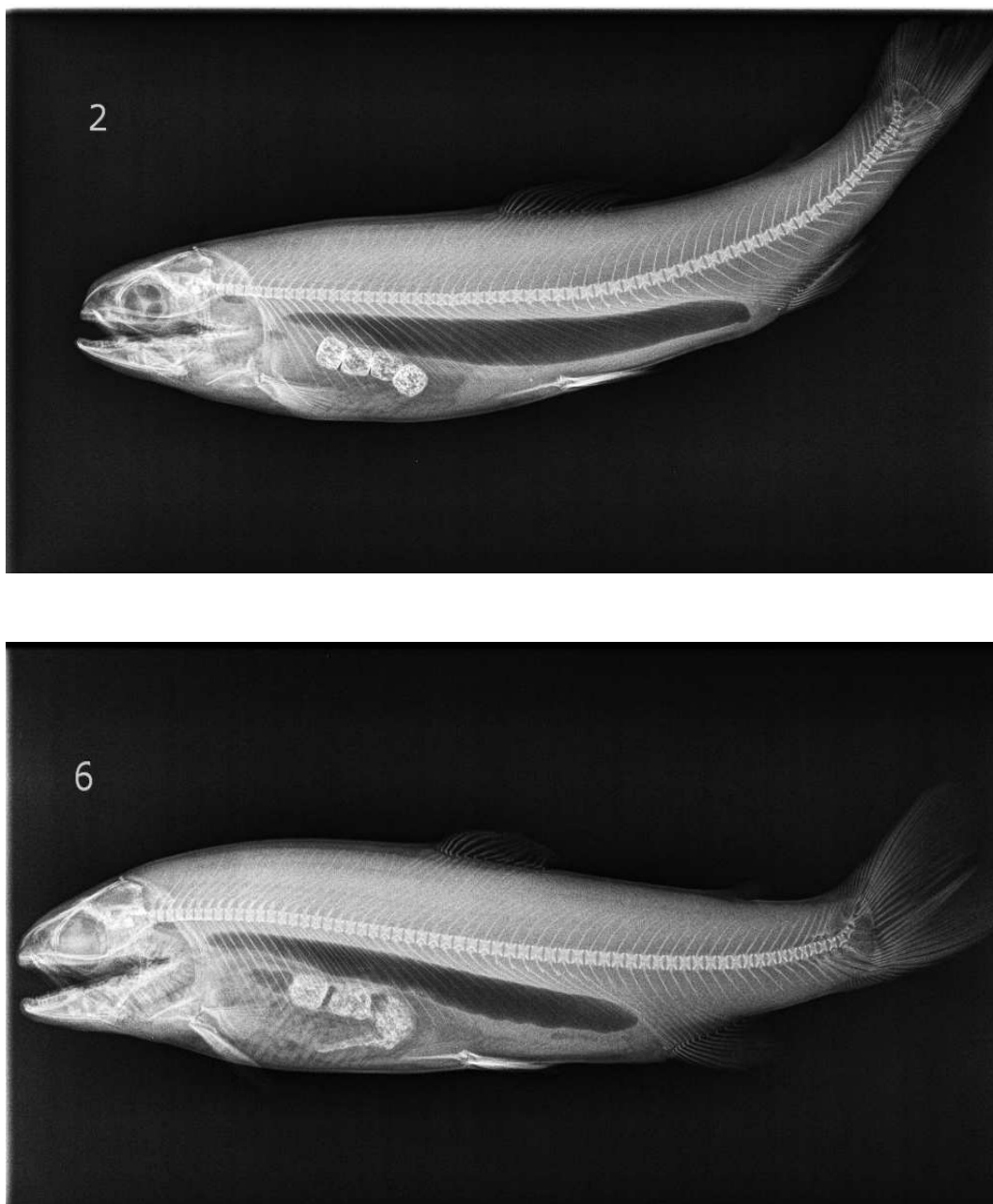
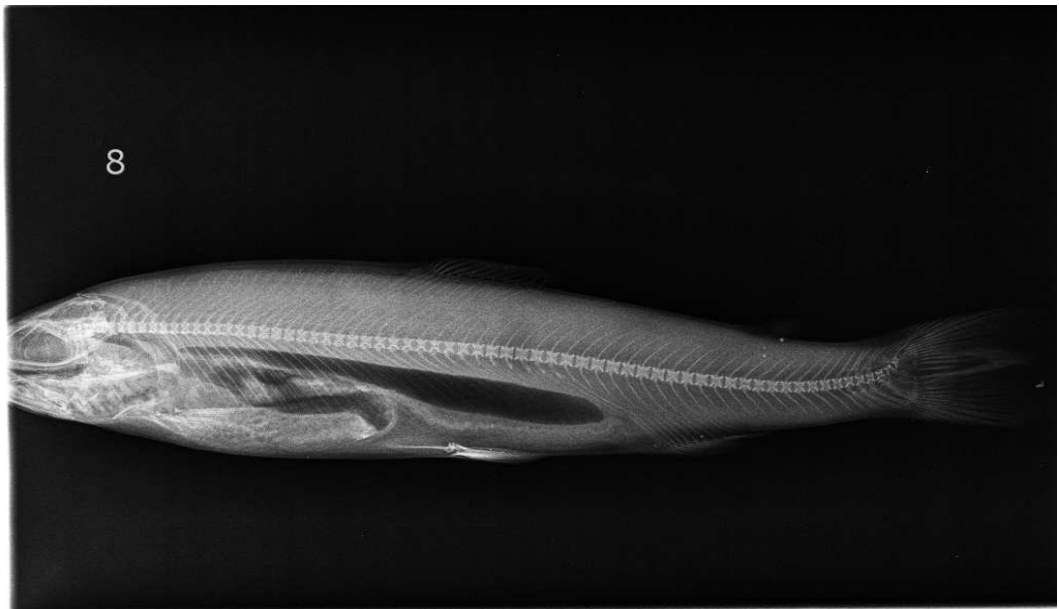
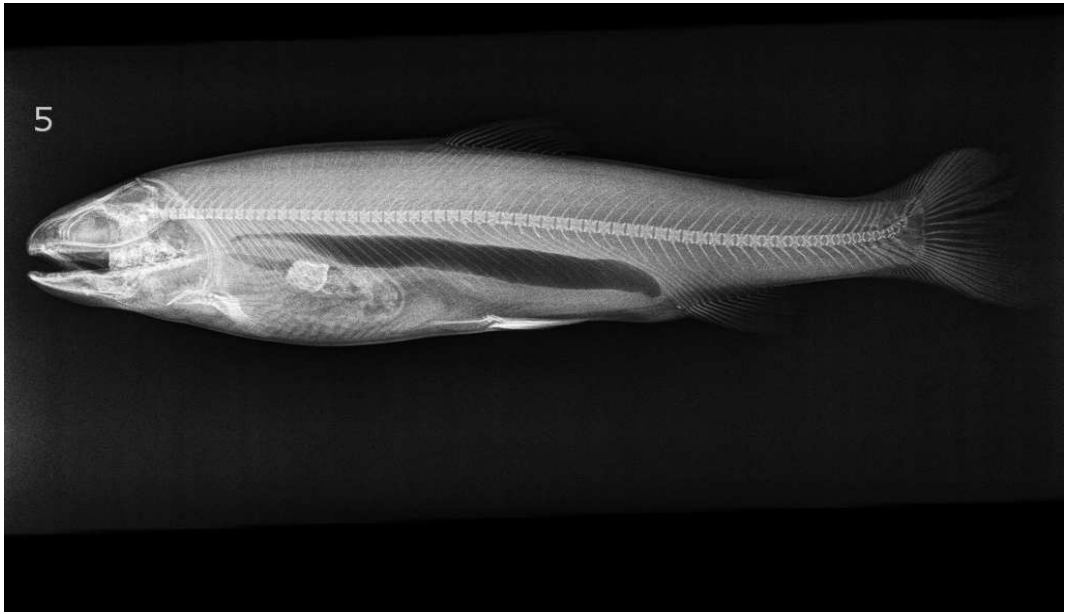


Figura 35. Radiografie di trota dopo somministrazione di MSES contenente bariosolfato a tempi diversi dalla somministrazione: 2 (0h), 6 (8h)

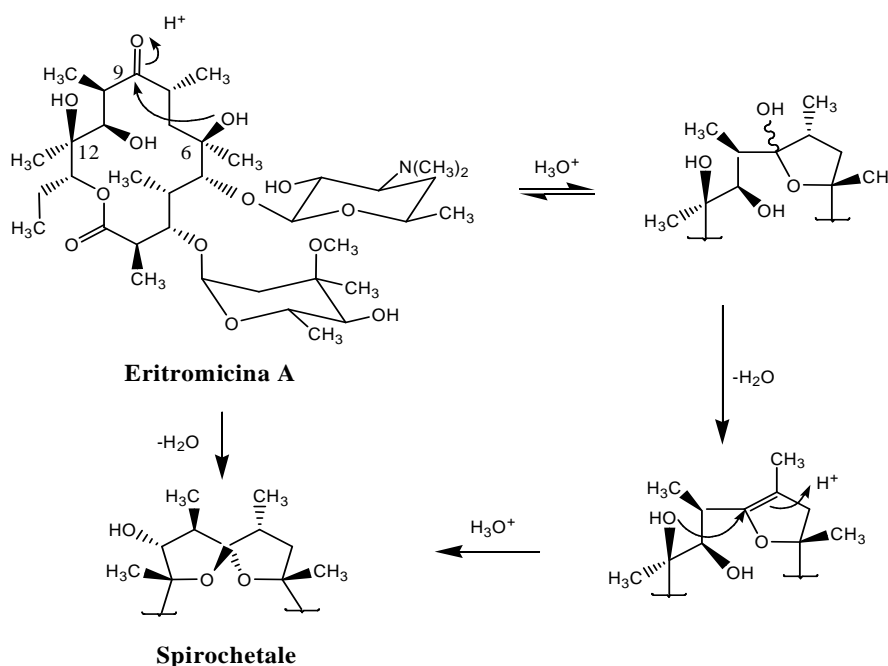


Figura 36. Radiografie di trota dopo somministrazione di MSES contenente bario solfato a tempi diversi dalla somministrazione: 3 (2h), 4 (4h), 5 (6h), 8 (24h)



La seconda parte di questo lavoro di tesi è stata incentrata sull'allestimento di sistemi lipidici contenenti eritromicina, un antibiotico utilizzato frequentemente nel settore acquacoltura.

Quest' ultimo è instabile in ambiente acido e quindi tende a degradarsi nello stomaco. L' instabilità deriva da una facile ciclizzazione intramolecolare in cui l' OH al C-6 attacca il gruppo carbonilico formando un emichetale che subisce poi una disidratazione irreversibile. La partecipazione dell' OH in C-12 porta ad uno spirochetale, ritenuto responsabile delle tipiche irritazioni gastrointestinali che si riscontrano in seguito alla somministrazione di questo principio attivo.



**Instabilità in ambiente acido dell' Eritromicina**

Essendo l'eritromicina instabile in ambiente acido, in terapia viene utilizzata sotto forma di sali o esteri. Queste forme sono attive solo *in vivo*, sono pertanto profarmaci che nell'organismo vengono idrolizzati enzimaticamente liberando l'antibiotico madre.

Lo scopo è stato quello di valutare le potenzialità dei sistemi lipidici ad aumentare la biodisponibilità dell'antibiotico, soggetto ad inattivazione lungo il tratto gastro-intestinale, non solo in forma salificata ma anche in forma di eritromicina base. Sono stati quindi messi a punto due sistemi lipidici: uno per eritromicina base e uno per

eritromicina tiocianato.

Visto che i principi attivi sono scarsamente solubili e instabili in soluzione acquosa sono stati disciolti in opportuni sistemi oleosi riportati nelle tabelle 26 e 27.

Tabella 26. Solubilità dell'eritromicina base in sistemi lipidici oleosi a 25°C (n=3 ± S.D.)

Olio e miscele oleose	Solubilità di eritromicina base (mg/ml)			
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS

Tabella 27. Solubilità dell'eritromicina tiocianato in sistemi lipidici oleosi a 25°C (n=3 ± S.D.)

Olio e miscele oleose	Solubilità di eritromicina tiocianato (mg/ml)			
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS
OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS	OMISSIS

Per eritromicina base è stata utilizzata la stessa formulazione ottimizzata per OTC, sulla base della buona solubilità dell'eritromicina nella stessa fase oleosa e degli

ottimi parametri farmacocinetici ottenuti per l' OTC.

La formulazione viene riportata in tabella 28.

Tabella 28. Composizione percentuale del sistema auto-emulsionante a base di eritromicina base

OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS

Mentre, per quanto riguarda eritromicina ticcianoato, è stata evidenziata una buona

OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS

La formulazione è stata ottimizzata sempre mediante diagramma pseudo-ternario di fase. Ai tre vertici del triangolo vi erano: la fase acquosa, la fase oleosa e tensioattivo e co-tensioattivo.

All' interno del diagramma di fase è stata quindi delimitata l' area in cui i componenti, miscelati in determinate composizioni percentuali, davano luogo alla formazione di una microemulsione (figura 37). Il fatto che una microemulsione si formasse o meno (e quindi che la formulazione rientrasse o meno all' interno dell' area di formazione) è stato stabilito analizzando le dimensioni delle gocce della formulazione allestita mediante Laser Light Scattering.

All' interno dell' area di formazione è stata selezionata la formulazione indicata dalla freccia a cui corrisponde la composizione percentuale riportata in tabella 29.

Da tale formulazione è stata ricavata la composizione del sistema auto-emulsionante riportata in tabella 30.





Tabella 29. Composizione percentuale della microemulsione allestita per eritromicina tiocianato

OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS

Tabella 30. Composizione percentuale del SES allestito per eritromicina tiocianato

OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS

Tale formulazione è stata quindi sottoposta ad analisi DSC, in modo da poter discernere se si trattava di una microemulsione O/A o A/O sulla base del comportamento termico, nonostante la composizione facesse supporre che si trattasse appunto di una microemulsione O/A.

Come si può notare dal termogramma riportato in figura 38, vi è il picco di congelamento tipico dell' acqua esterna legata (tra -10°C e -30°C) e ciò indica che si tratta di una microemulsione tipo O/A.

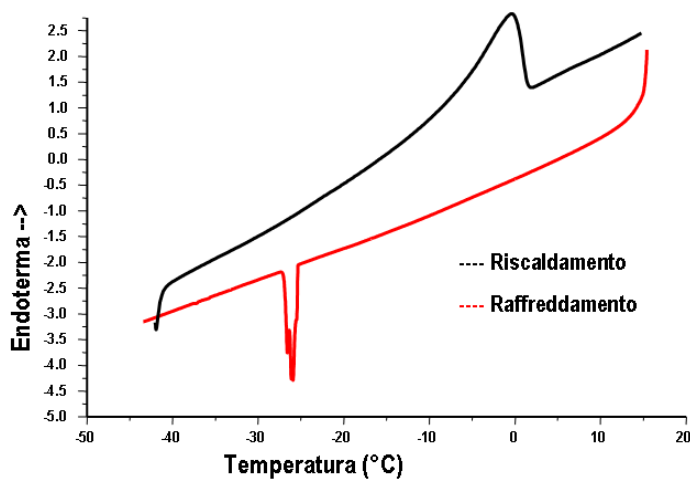


Figura 38. Termogramma DSC della microemulsione ottimizzata per eritromicina tiocianato

Il SFC allattito per eritromicina base è stato successivamente miscelato con il 20% di

OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
 OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
 OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
 OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
 OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
 OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS

I risultati sono visibili rispettivamente in figura 39 e 40 ed evidenziano come i due sistemi siano in grado di riformare delle microemulsioni per semplice agitazione.

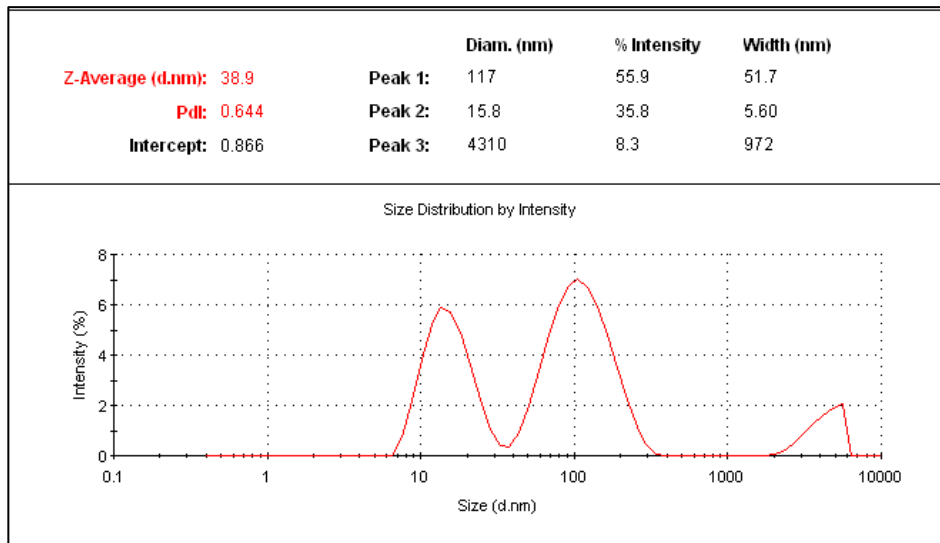


Figura 39. Dimensioni delle gocce del SES contenente eritromicina base

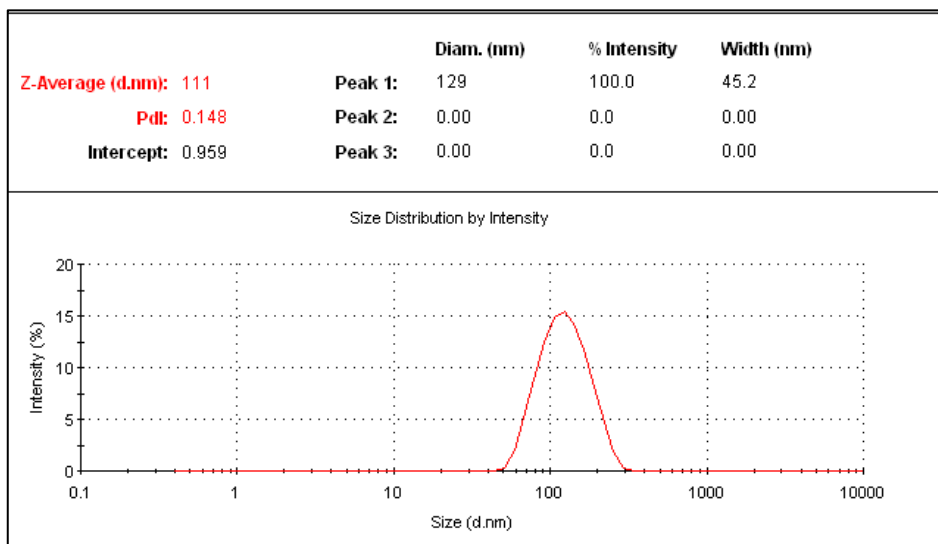


Figura 40. Dimensioni delle gocce del SES contenente eritromicina tiocianato

Una volta ottimizzati i due SES, si è passati al caricamento sul mangime per la preparazione di mangimi medicati.

OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
 OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
 OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
 OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
 OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
 OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS

commerciale (7,5 g/kg).

Prima di testare *in vivo* tale mangime, si è voluto determinare che il caricamento su mangime non alterasse le proprietà dei SES e che fossero ancora in grado di riformare delle microemulsioni una volta in soluzione. I due mangime medicati, caricati con i SES, sono stati posti in due tamponi corrispondenti al valore di pH gastrico (4,5) e al valore di pH intestinale (7,4) della trota alimentata ed è stato misurato il diametro delle gocce formate. I risultati sono visibili nelle seguenti figure: 40, 41, 42 e 43.

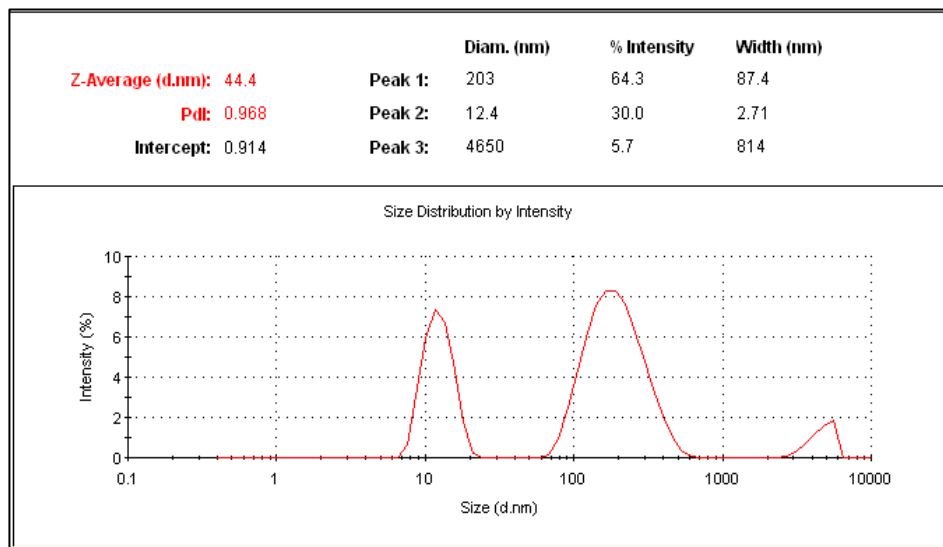


Figura 40. Diametro delle gocce del SES con eritromicina base caricato sul mangime e posto in un tampone a pH 4,5

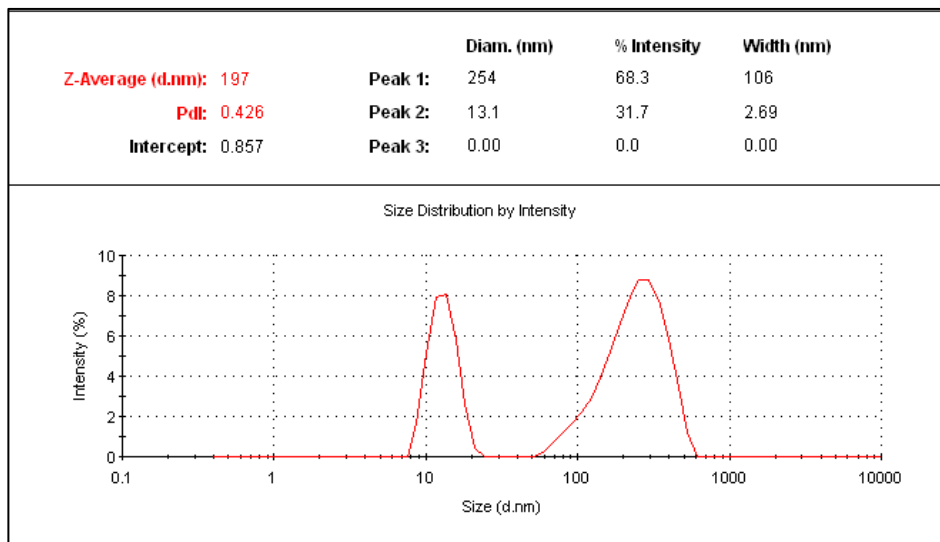


Figura 41. Diametro delle gocce del SES con eritromicina base caricato sul mangime e posto in un tampone a pH 7,4.

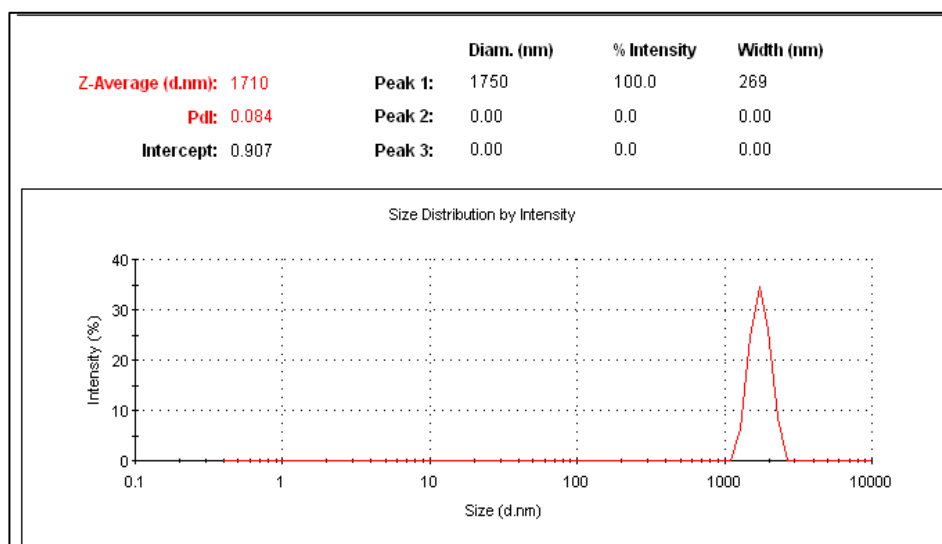


Figura 42. Diametro delle gocce del SES con eritromicina tiocianato caricato sul mangime e posto in un tampone a pH 4,5

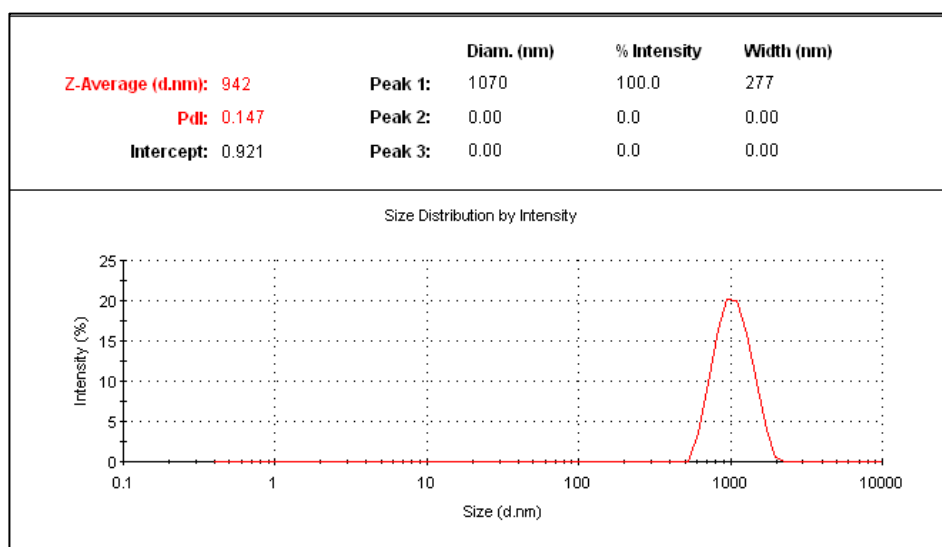


Figura 43. Diametro delle gocce del SES con eritromicina tiocianato caricato sul mangime e posto in un tampone a pH 7,4

Come riportato nelle figure 40 e 41, le gocce formate dal mangime caricato con eritromicina base in entrambi i pH hanno dimensioni intorno ai 200 nm, indice che la proprietà del SES di riformare *in vivo* una microemulsione è rimasta inalterata anche dopo caricamento su mangime, diverso è il comportamento del mangime caricato con il tiocianato, che a contatto con i due tamponi forma delle gocce attorno ai 1000 nm (figura 42 e 43).

Successivamente alla caratterizzazione dei mangimi, il lavoro è proseguito effettuando la prova in campo su trote divise in tre gruppi: al primo gruppo è stato somministrato il mangime caricato con SES a base di eritromicina base, al secondo gruppo è stato somministrato il mangime caricato con SES a base di eritromicina tiocianato, al terzo ed ultimo gruppo è stato somministrato il mangime medicato commerciale contenente eritromicina tiocianato. Ad intervalli di tempo stabiliti, sono stati prelevati campioni di sangue per valutare le concentrazioni plasmatiche di eritromicina ai vari tempi, tramite l'analisi cromatografica liquida accoppiata alla massa (LC-MS/MS) .

I parametri farmacocinetici sono riportati in tabella 31 e i rispettivi profili in figura 44



Figura 44. Profili farmacocinetici nella trota dopo somministrazione di 15 mg/kg di eritromicina base nei tre mangimi medicati.

Tabella 31. Parametri farmacocinetici relativi alla somministrazione dei mangimi medicati contenenti eritromicina

Parametri	Mangime Hendrix	Mangime con SES (eritromicina base)	Mangime con SES (eritromicina tiocianato)
<p style="color: red;">OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS                      OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS                      OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS                      OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS                      OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS                      OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS                      OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS                      OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS                      OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS</p>			

$$^a \text{Biodisponibilità relativa} = (AUC_{\text{SES}} / AUC_{\text{HENDRIX}}) \times (\text{dose}_{\text{HENDRIX}} / \text{dose}_{\text{SES}})$$

Osservando il grafico riportato in figura 44 si può notare come, pur somministrando la stessa dose di farmaco, si ottengano tre profili molto diversi tra loro.

Innanzitutto si può notare come l'assorbimento del principio attivo sia molto più rapido nel caso dei mangimi caricati con sistemi auto-emulsionanti. I valori di  $t_{\text{max}}$  riportati in tabella 31 mettono in evidenza questa osservazione: per i due mangimi caricati con SES si osserva dopo 30 minuti mentre nel mangime commerciale dopo 12 h.

Questa differenza è probabilmente imputabile al fatto che l'eritromicina è stata disciolta all'interno dei SES ed è stata fatta adsorbire sulla superficie degli estrusi di mangime e quindi era prontamente disponibile per venir assorbita. Nel caso del mangime commerciale invece l'eritromicina (come eritromicina tiocianato) viene fornita in forma di polvere e viene impaccata sul mangime mediante l'olio di pesce quindi, prima di venir assorbita deve essere liberata dall'olio di pesce e solubilizzarsi nei fluidi gastro-intestinali.

Dai risultati ottenuti si può inoltre notare come i livelli plasmatici determinati



somministrando il mangime caricato con SES a base di eritromicina base siano più elevati rispetto a quelli degli altri due mangimi.

Questo dato risulta interessante soprattutto alla luce del fatto che l' eritromicina base è più instabile a pH acido. Evidentemente il sistema garantisce la formazione di gocce di fase dispersa circondate da molecole di tensioattivo che prevengono la degradazione e favoriscono, tramite un' aumento dell'area superficiale e della permeabilità, un maggiore assorbimento.

Tali proprietà invece non vengono apprezzate per la formulazione allestita per il tiocianato che infatti ha la stessa AUC del mangime commerciale, a parità di dosi somministrate. Questa differenza è probabilmente dovuta ai valori di dimensioni delle gocce di SES con eritromicina tiocianato liberate dal mangime. Evidentemente la formulazione perde le sue proprietà di riformare una microemulsione in seguito a caricamento su mangime per eventuali interazioni con la matrice stessa.

Un' altra causa di tale instabilità potrebbe essere il fatto che come fase oleosa è stato utilizzato il Transcutol<sup>®</sup> che, una volta posto in soluzione, tende a migrare e a disperdersi nel mezzo acquoso e di conseguenza non costituisce più un veicolo per l'eritromicina tiocianato.

## 4. CONCLUSIONI

Gli studi effettuati nella prima parte di questa tesi sono stati condotti al fine di migliorare la biodisponibilità dell' ossitetraciclina cloridrato nelle specie ittiche allevate ed in particolare nella trota e nel branzino, veicolando tale farmaco in un sistema auto-emulsionante.

Tale sistema è stato ottimizzato effettuando degli studi preformativi, che hanno

OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS  
OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS OMISSIS

tensioattivo si è rilevata di fondamentale importanza per ottenere un sistema auto-emulsionante in grado di formare, per blanda agitazione, in presenza di fluidi gastrointestinali, una microemulsione.

L' ottimizzazione della formulazione del SES è stata possibile grazie alla progettazione di un diagramma di fase ternario e, successivamente, alla calorimetria a scansione differenziale.

Le analisi sono proseguite allo scopo di ottenere una caratterizzazione del sistema auto-emulsionante: utilizzando il Laser Light Scattering è stato possibile determinare il diametro medio delle gocce della fase dispersa, che è risultato pari a 200 nm, ulteriore valore di conferma della formazione di una microemulsione.

Sono stati poi condotti gli studi *in vivo* sulle trote e sui branzini per valutare la biodisponibilità dell' ossitetraciclina cloridrato veicolata nel sistema auto-emulsionante.

Osservando l' AUC dei grafici ottenuti, si è giunti alla conclusione che l' OTC veicolata in un SES presentava una biodisponibilità quasi 6 volte (nella trota) e circa 5 volte (nel branzino) maggiore rispetto all' OTC in fase acquosa.

Per mimare, poi, la comune prassi di allevamento in cui l' antibiotico viene fornito in forma di mangime medicato, sulle due specie ittiche prese in esame è stato testato il sistema auto-emulsionante caricato su sul mangime in confronto con un mangime medicato già presente in commercio.

Prima delle prove *in vivo* sono state misurate le dimensioni delle gocce del SES rilasciato dal mangime una volta posto in due sistemi tampone che mimavano i pH dello stomaco e dell'intestino dei pesci, rispettivamente pH 4,5 e pH 7,4.

Anche in questo caso le dimensioni delle gocce erano intorno ai 200 nm, conferma che il SES era in grado di formare una microemulsione anche se caricato sul mangime.

I profili farmacocinetici hanno dimostrato che il mangime caricato con il sistema auto-emulsionante era più biodisponibile del mangime medicato già presente in commercio, in entrambe le specie ittiche: rispettivamente 3,4 volte più biodisponibile nella trota e 2,7 nel branzino.

Ciò rappresenta un vantaggio significativo, dal momento che è sufficiente somministrare 1/6 (per la trota) e 1/5 (per il branzino) della dose di farmaco sciolto nel SES, per ottenere gli stessi effetti di una dose di OTC tal quale. Questo risultato è molto importante in acquacoltura perchè permette di ridurre l'inquinamento ambientale e di limitare l'insorgenza di farmacoresistenza.

Dal confronto dei risultati ottenuti dagli esperimenti sulle due specie ittiche si è notata la potenzialità del sistema auto-emulsionante solido nell' evitare o quantomeno ridurre la complessazione dell' antibiotico non solo in acqua dolce ma anche in un ambiente particolarmente sfavorevole come l' acqua di mare. Inoltre, in accordo a quanto riportato in letteratura, nel caso della trota è stata rilevata l' importanza della temperatura dell'ambiente acquatico sull'assorbimento dell' OTC.

Dall' osservazione tramite indagini radiografiche del passaggio del mangime nel tratto gastro-intestinale è infine emerso un altro interessante dato, e cioè che alcuni estrusi vengono rigurgitati nella cavità buccale, presumibilmente per essere frantumati e successivamente digeriti. Questo fatto, non riportato in letteratura, potrebbe costituire un'ulteriore causa della ridotta biodisponibilità dell' OTC.

Mentre nella seconda parte della tesi, visti i risultati positivi usati con OTC, gli stessi sistemi lipidici sono stati utilizzati per veicolare altri principi attivi di largo impiego in acquacoltura, anche se in uso per deroga: l' eritromicina, sia in forma di base che sotto forma salificata, il tiocianato. Anche in questo caso, dopo somministrazione *in vivo*, solo su trote, dei mangimi medicati contenenti i principi attivi suddetti, le prove di biodisponibilità hanno messo in evidenza una maggior performance farmacocinetica rispetto al mangime commerciale.

Sviluppi futuri della ricerca riguarderanno la realizzazione di prove *in vivo* su animali malati per testare l'efficacia dei sistemi lipidici anche su tali esemplari.

Altri ampliamenti della ricerca riguarderanno lo studio di un modello farmacocinetico che tenga conto della temperatura dell'acqua, vista l'importanza di questa variabile nell'influenzare il metabolismo dei pesci. Si definirà in tal modo la concentrazione ottimale di farmaco da somministrare ai pesci a seconda delle condizioni climatiche contingenti.

Inoltre, si potrebbe perfezionare la strategia del caricamento del sistema auto-emulsionante sul mangime: non più per semplice adsorbimento sull'estruso, ma impastando direttamente il SES con le farine costituenti il mangime e successivamente sottoponendo la miscela ad estrusione. In questo modo si avrebbe il SES omogeneamente distribuito in tutta la matrice con possibile miglioramento della performance.

Da quanto sin qui esposto, si evince che l'obiettivo della ricerca, e cioè l'aumento della biodisponibilità di antibiotici utilizzati in acquacoltura tramite veicolazione in sistemi lipidici, è stato pienamente raggiunto e in più sono emersi numerosi possibili sviluppi per un futuro approfondimento.

## Bibliografia

- Abedini S., Namdari R., Law F.C.P. (1998). Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxytetracycline in rainbow trout and chinook salmon, *Aquaculture*, 162, 23-32.
- Amidon G.L., Lennernas H., Shah V.P., Crison J.R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vivo drug product dissolution and in vivo bioavailability, *Pharm. Res.*, 12, 413-420.
- Aungst B.J. (2000). Intestinal permeation enhancers, *J. Pharm. Sci.*, 89, 429-441.
- Austin B. & Austin D.A. (1987). Bacterial fish pathogens. Disease in farmed and wild fish., Ellis Horwood Ltd., Chichester, England, pag. 364.
- Björklund H.V., Bylund G. (1991). Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Xenobiotica*, 21. 1511-1520.
- Björklund H.V., Bylund G., (1990). Temperature-related absorption and excretion of oxytetracycline in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.), *Aquaculture*, 84, 363-372.
- Black W.D., Ferguson H.W., Byrne R, Claxton M.J., (1991). Pharmacokinetic and tissue distribution study of oxytetracycline in rainbow trout following bolus intravenous administration. *J. vet. Pharm. and Ther.*, 14: 351-358.
- Booth N.H., McDonald L.E. (1991). Tossicologia del farmaco e residui chimici. In "Farmacologia e terapeutica veterinaria", Prima ed. italiana, a cura del Prof. Beretta C., Ed. EMSI, Roma, 1111-1168.
- Bryskier A. (1998). Roxithromycin: Review of its antimicrobial activity, *J. Antimicrob. Chemother.*, 41, 1-21.

Chambers H.F. (2003). Farmaci antimicrobici: tetraciclina, In Goodman and Gilman's: Le basi farmacologiche della terapia, (Hardman, J.G, Limbird L.E, Alfred Goodman Gilman Eds.), Mc Graw-Hill, 10<sup>a</sup> edizione, 1177-1184.

Costantinides P.P. (1995). Lipid Microemulsions for Improving Drug Dissolution and Oral Absorption: Physical and Biopharmaceutical Aspects, Pharm. Res. 12, 1561-1572.

Constantinides P.P. and Scalart J.P. (1997). Formulation and physical characterisation of water-in-oil microemulsion containing long-versus medium-chain glycerides, Int. J. Pharm. 158: 57-68.

Cravedi J.P., Chaubert G., Delous G. (1987). Digestibility of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestibility. Aquaculture, 60, 133-141.

Dauble D.D., Curtis L.R. (1990). Influence of digestive processes on the absorption and fate of quinoline ingested by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Environ. Toxicol. Chem., 9, 505-512.

Della Rocca G., Di Salvo A., Malvisi J. (2005). Valutazione della biodisponibilità di ossitetraciclina microincapsulata a seguito di somministrazione orale singola e protratta nella trota fario (*Salmo trutta trutta*) e nel branzino (*Dicentrarchus labrax*), Ittiopatologia, 2, 137-144.

Elema M.O., Hoff K.A., Kristensen H.G. (1996). Bioavailability of oxytetracycline from medicated feed administered to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater, Aquaculture 143, 7-14.

Florence A.T., Attwood D. (2002). Le basi chimico-fisiche della tecnologia farmaceutica, Ed. EdiSES, Napoli.

Foje W.O. (1991). Principi di chimica farmaceutica, 2a ed. italiana, a cura di Dall'Acqua F., Da Re P., Caffieri R., Vedaldi D., ed. Piccin, Padova, 33, 762-764.

- Garti N., Aserin A., Tiunova I., Fanun M. (2000). A DSC study of water behavior in water-in-oil microemulsions stabilized by sucrose esters and butanol Colloid Surf.; 170; 1-18.
- Grondel J.L., Nouws J.F.M., De Jong M., Shutte A.R., Dnessens F. (1987). Pharmacokinetics and tissue distribution of oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio* L.), following different routes of administration, J. Fish Dis., 10, 153-163.
- Hustvedt S.O., Storekten T., Salte R. (1991). Does oral administration of oxolinic acid or oxytetracycline affect feed intake of rainbow trout?, *Aquaculture*, 92, 109-113.
- Lawrence M.J., Rees G.D. (2000) Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv. Drug Del. Rev.* 45: 89-121.
- Lunestad B.T., Goksoyr J. (1990). Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in seawater by complex formation with magnesium and calcium, *Dis. Aquat. Org.*, 9, 62-72.
- Mackay R.A. (1988). Use of Triangular Diagrams in the study of emulsions. In: "Encyclopedia of Emulsion technology", Becher P., Marcel Dekker Ed., New York, Vol. 3, 233-237.
- Malvisi S. J. (1991). L'impiego dei farmaci in acquacoltura, *Laguna*, 5, 30-37.
- Malvisi S. J., Della Rocca G., Anfossi P., Poretti G. (Dicembre 1996). Tissue distribution and residue depletion of oxytetracycline in sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) after oral administration, *Aquaculture*, 147, 3-4.
- Moffitt C.M. and Schereck J.A. (1988). Accumulation and depletion orally administered erythromycin thiocyanate in tissues of Chinook salmon, *Transactions of American fisheries Society*, 117, 394-400.

Namdari R., Abedini S., Law F.C.P. (1996). Tissue distribution and elimination of oxytetracycline in seawater chinook and coho salmon following medicated-feed treatment, *Aquaculture*, 144, 27-38.

Nouws J.F.M., Grondel J.L., Boon J.H., van Ginneken V.J.T. (1992). Pharmacokinetics of antimicrobials in some fresh water fish species. In: "Chemotherapy in Aquaculture: from theory to reality", Michel C.M. and Alderman D.J. Eds., Off.Int.Epizoot, Symposium, Paris, 12-15 March 1991, 437-447.

Pouton C.W. (2000). Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and self-microemulsifying drug delivery systems, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 11, 93-98.

Pouton C.W. (2006). Advances in Understanding Oral Absorption and Delivery of Problem Compounds, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 29, 278-287

Prescott J.F., Baggot J.D. (1996). Terapia antimicrobica in medicina veterinaria, Ed. EMSI, Roma, 270.

Rigos G., Alexis M., Andriopoulou A., Nengas I. (2002). Pharmacokinetics and tissue distribution of oxytetracycline in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, at two water temperatures, *Aquaculture*, 210, 59-67.

Samuelsen O.B. (1991). The fate of antibiotics/chemoterapeutics in marine aquaculture sediments. In: "Chemotherapy in Aquaculture: from theory to reality", Symposium, Paris, 12-15 March, 1991, Michel C. and Alderman D.J. Eds., O.I.E., 162-171.

Sargent J.R., Tocher D.R., Bell J.G. (2002). The lipids, In: "Fish nutrition" (Elsevier Science Eds.), 3<sup>rd</sup> edition, 181-257.



Schaftenaar W., Prenen G.H., Seinhorst J.W., Jager L.P. (1990). Oxytetracycline and oral herd treatment: a literature review, Tijdschrift voor diergeneeskunde, 115:825-836.

Senatra D., Lendinara L., Giri M.G. (1991). W/O microemulsions as model systems for the study of water confined in microenvironments: Low resolution <sup>1</sup>H magnetic resonance relaxation analysis, Prog. Coll. Polym. Sci., 84, 122.

Shafiq S., Shakeel F., Talegaonkar S., Ahmad F.J., Khar R.K., Ali M. (2007). Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation, Eur. J. Pharm. Biopharm, 66, 227-243.

Shah N.H., Carvajal M.T., Patel C.I., Infeld M.H., Malick A.W. (1994). SEDDS with polyglycolized glycerides for improving in vitro dissolution and oral absorption of lipophilic drugs, Int. J. Pharm., 106, 15-23.

Shah N.H., Carvajal M.T., Patel C.I., Infeld M.H., Malick A.W. (1994). Self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) with polyglycolised glycerides for improving *in vitro* dissolution and oral absorption of lipophilic drugs, Int. J. Pharm., 106, 15-23.

Smith G.L., Hattinghy E., Ferreira J.T. (1981). Chemotherapy of bacterial fish disease, J. Fish Biol., 19,147-153.

Treves-Brown K. M. (2000). Applied Fish Pharmacology, Kluwer Academic Publishers, London, England.

Verwey E.W. Overbeek J.Th.G. (1948). Theory of the stability of Liophobic Colloids, Elsevier, Amsterdam.

Zvonar A., Gasperlin M. (Aprile 2008). Structural transition of celecoxib loaded microemulsion following water dilution. Sixth World Meeting on Pharmaceutics,

Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona.

Wang S., Sun M., Ping Q. (2008). Enhancing effect of Labrafac Lipophile WL 1349 on oral bioavailability of hydroxysafflor yellow A in rats, *Int. J. Pharm.*, 358, 198-204.

## INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1. Chemioterapia in acquacoltura	1
1.2. Legislazione relativa all'uso di farmaci in acquacoltura	3
1.3. Antibiotici utilizzabili in Italia in ittiocoltura	7
1.4. Rischi derivati dall'uso di farmaci in acquacoltura	14
1.4.1. Sicurezza nei confronti della salute umana	14
1.4.2. Sicurezza nei confronti dell'ambiente	15
1.5. Formulazioni lipidiche	16
1.5.1. Digestione lipidica e processi di assorbimento	18
1.5.2. Assorbimento da parte del sistema linfatico	20
1.6. Classificazione delle formulazioni lipidiche	22
1.6.1. Formulazioni lipidiche di tipo I	22
1.6.2. Formulazioni lipidiche di tipo II	24
1.6.3. Formulazioni lipidiche di tipo III	25
1.7. Scopo della tesi	26
2. PARTE SPERIMENTALE	27
2.1. Materiali	27
2.2. Preparazione delle formulazioni lipidiche	28
2.2.1. Selezione della fase oleosa	28
2.2.2. Progettazione mediante diagrammi ternari di fase	28
2.2.3. Riconoscimento del tipo di emulsione	29
2.2.4. Preparazione di microemulsioni doppie	30
2.3. Determinazione delle dimensioni delle gocce e misura del potenziale Z mediante Laser Light Scattering	31
2.4. Preparazione e caratterizzazione dei mangimi medicati	32
2.4.1. Preparazione dei mangimi medicati	32
2.4.2. Determinazione delle dimensioni della fase dispersa mediante Laser Light Scattering	32
2.5. Prove in vivo su ratti	32
2.5.1. Intubazione gastrica (gavage)	32
2.6. Prove in vivo su pesci	34

2.6.1. Somministrazione mediante gavage di soluzione acquosa e sistema auto-emulsionante contenenti OTC	36
2.6.2. Somministrazione di mangimi medicati	37
2.6.3. Prova di distribuzione di OTC nel plasma, fegato e muscolo	39
2.7. Trattamento dei campioni e metodo di analisi per OTC	40
2.7.1. Estrazione di OTC dal plasma	40
2.7.2. Estrazione di OTC da muscolo e fegato	40
2.7.3. Curva di calibrazione per il plasma	41
2.7.3.1. Curva di calibrazione per il plasma dei ratti	41
2.7.3.2. Curva di calibrazione per il plasma dei pesci	42
2.7.4. Curva di calibrazione per il mangime	43
2.7.5. Titolo di OTC nei formulati	45
2.7.6. Condizioni cromatografiche	45
2.8. Trattamento dei campioni e metodo di analisi per eritromicina	46
2.8.1. Estrazione di eritromicina dal plasma	46
2.8.2. Curva di calibrazione in matrice per il plasma	46
2.8.3. Condizioni cromatografiche	49
2.8.4. Condizioni per la spettroscopia di massa	50
2.9. Analisi farmacocinetica	51
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	52
4.CONCLUSIONI	98
Bibliografia	101