UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

Sede Amministrativa del Dottorato di Ricerca

XXIII CICLO

DEL DOTTORATO DI RICERCA IN

SCIENZE E TECNOLOGIE CHIMICHE FARMACEUTICHE

SISTEMI AUTOEMULSIONANTI SOLIDI

Settore scientifico disciplinare CHIM09

Dottoranda

Dr.ssa Tamara Iosio

Direttore della scuola

Prof. Enzo Alessio

Tutore

Prof.Dario Voinovich

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

1. Sistemi Autoemulsionanti

La somministrazione per via orale dei farmaci è la via più impiegata, grazie alla maggior accettabilità da parte del paziente 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, gli steps necessari durante la fase di assorbimento possono essere così riassunti:

- Step 1: è rappresentato dalla dissoluzione del farmaco.
- Step 2: è rappresentato dalla solubilità del farmaco la quale dipende dalle caratteristiche chimico fisiche.
- Step 3: prevede il passaggio del farmaco, attraverso le membrane gastro-intestinali, fino al raggiungimento della circolazione sistemica.
- Step 4: si riferisce al metabolismo direttamente correlato ai parametri farmacocinetici (figura 1)[1].

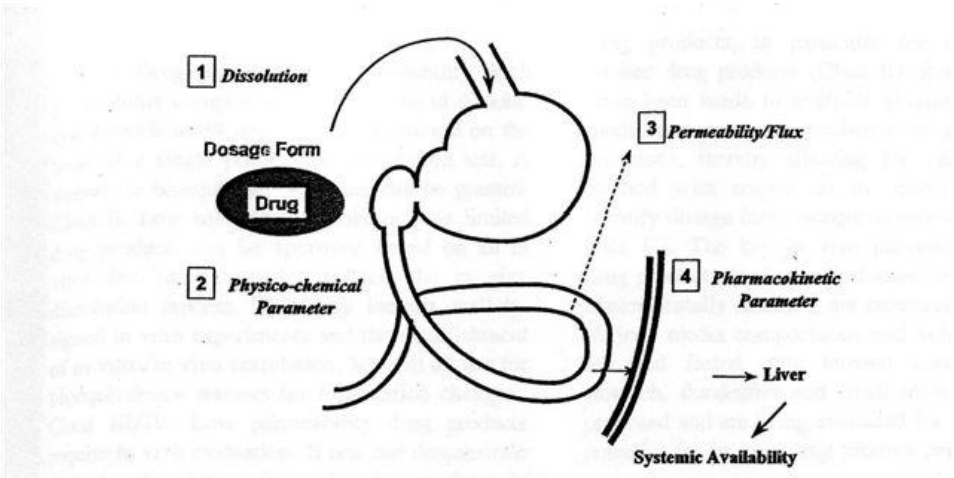


Figura 1. Rappresentazione schematica degli steps necessari per l'assorbimento per via orale.

[1] E. Lipka, G.L. Amidon., *Setting bioequivalence requirements for drug development based on preclinical data: optimizing oral drug delivery systems*. J. Control. Rel., 62, 41-49 (1999).

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.

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 1) [2].

Tabella 1. 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 cineticamente 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.[3] 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.

[2] G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah, J.R. Crison., *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 (1995).

[3] C.W. Pouton., *Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and self-microemulsifying drug delivery systems.* Eur. J. Pharm. Sci., 11, 93-98 (2000).

I sistemi lipidici hanno il vantaggio di essere versatili, in quanto possono presentarsi sotto forma di soluzioni, sospensioni, emulsioni, sistemi auto-emulsionanti e microemulsioni. Quest'ultimi sistemi sfruttano il metabolismo lipidico e la via linfatica per un loro ottimale assorbimento.

1.1. 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.[4]

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.

[4] A.J. Humberstone, W.N. Charman., *Lipid-based vehicles for the oral delivery of poorly water soluble drugs*. Drug Dev. and Ind. Pharm., 25, 103-128 (1997).

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).

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 [5,6,7].

---

[5] C.M. O'Driscoll., *Lipid-Based formulations for intestinal lymphatic delivery*. Int. J. Pharm.,15, 405-415 (2002).

[6] S. Chakraborty, D. Shukla, B. Mishra, S. Singh., *Lipid-An emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability.* Eur. J. Pharm. Biopharm., 73, 1-15, (2009).

[7] SF. Han, T. Yao, X. Zhang, L. Gan, C. Zhu, H. Yu, Y. Gan., *Lipid-based formulations to enhance oral bioavailability of the poorly water-soluble drug anethol trithione: Effects of lipid composition and formulation*. Int. J. Pharm., 379, 18-24 (2009).

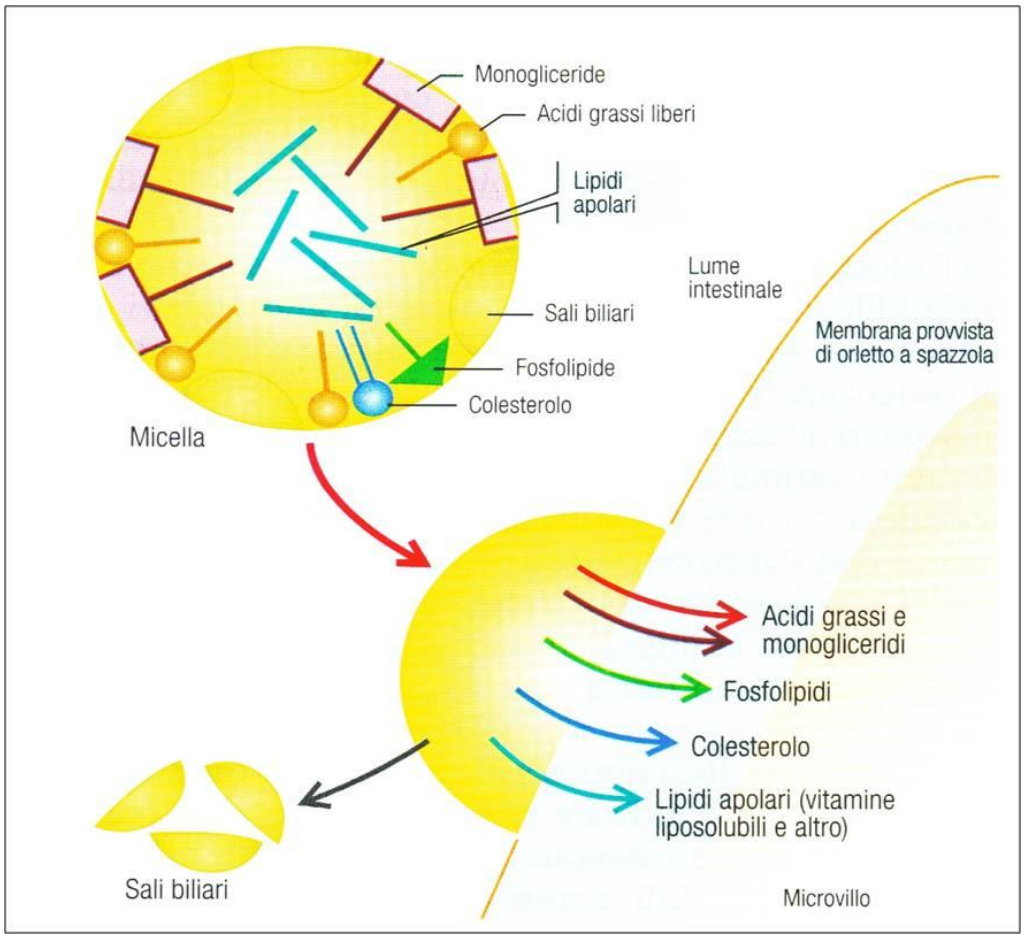


Figura 2. Assorbimento dei grassi dalle micelle.

1.2. 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 [8].

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

[8] A.J. Humberstone, W.N. Charman., *Lipid-based vehicles for the oral delivery of poorly water soluble drugs*. Drug Dev. and Ind. Pharm., 25, 103-128 (1997).

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) [9] .

[9] C.W. Pouton., *Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and self-microemulsifying drug delivery systems.* Eur. J. Pharm. Sci., 11, 93-98 (2000).

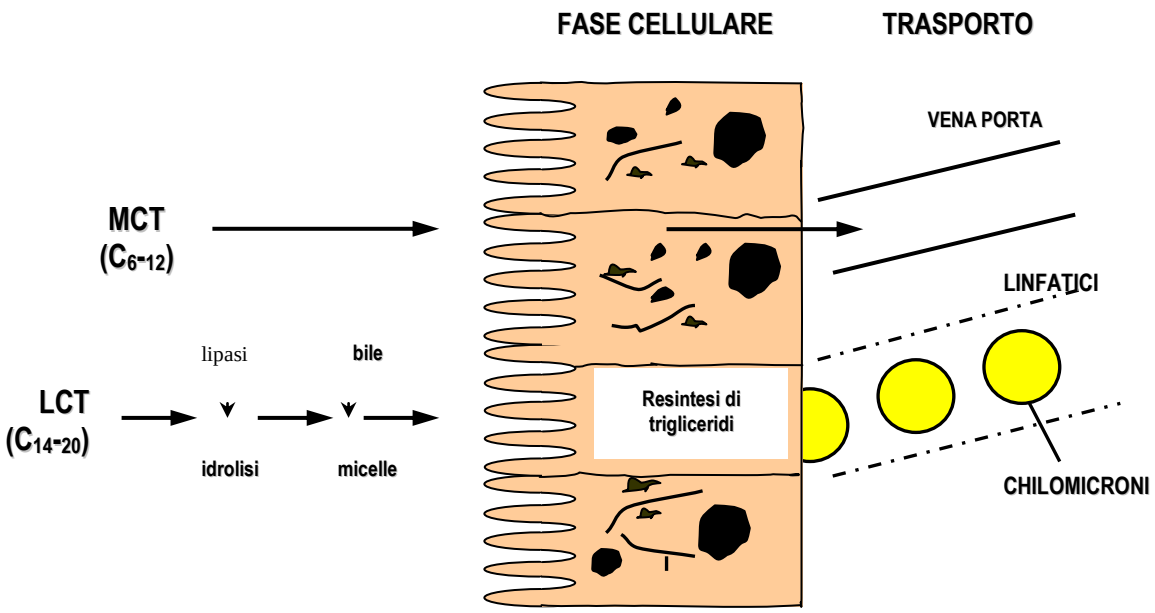


Figura 3. Raffronto delle fasi coinvolte nell'assorbimento di trigliceridi a media (C_6-C_{12}) (MCT) e lunga catena (C_{14}-C_{20}) (LCT).

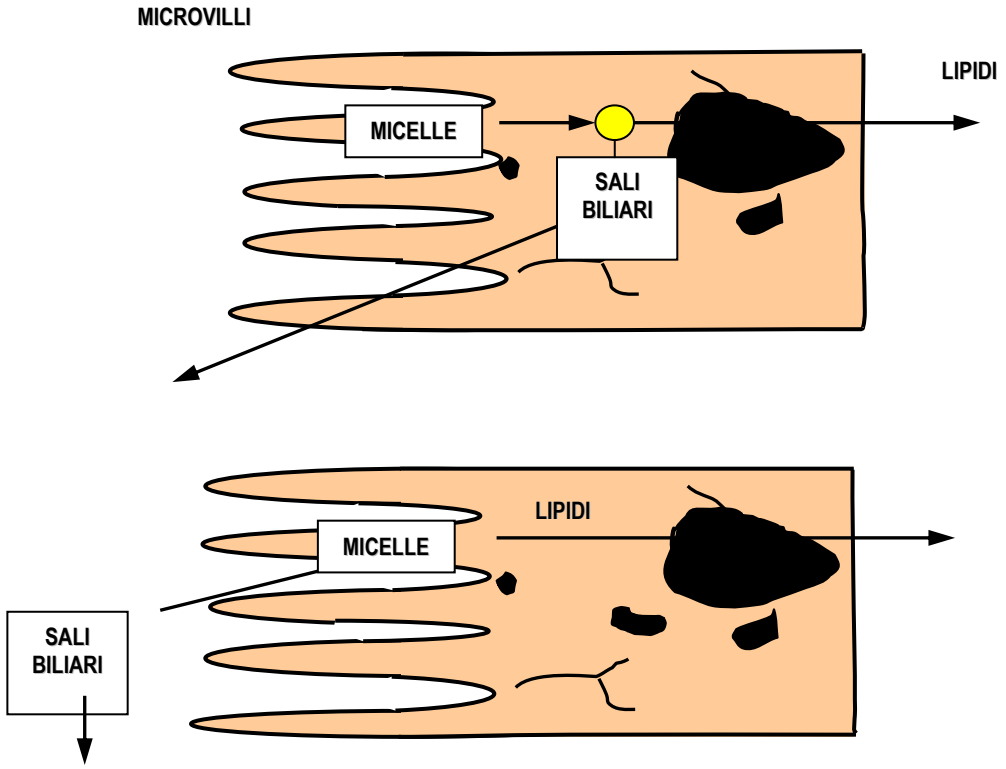


Figura 4. Ipotesi di penetrazione di lipidi micellari nelle cellule della mucosa.

1.3. 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 2 e Figura 5). Le formulazioni lipidiche vengono classificate in tipo I, II, IIIA e IIIB.

Tabella 2. Classificazione delle formulazioni lipidiche.

	Incremento del contenuto idrofilico			
	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

1.3.1 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 olii 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 3).

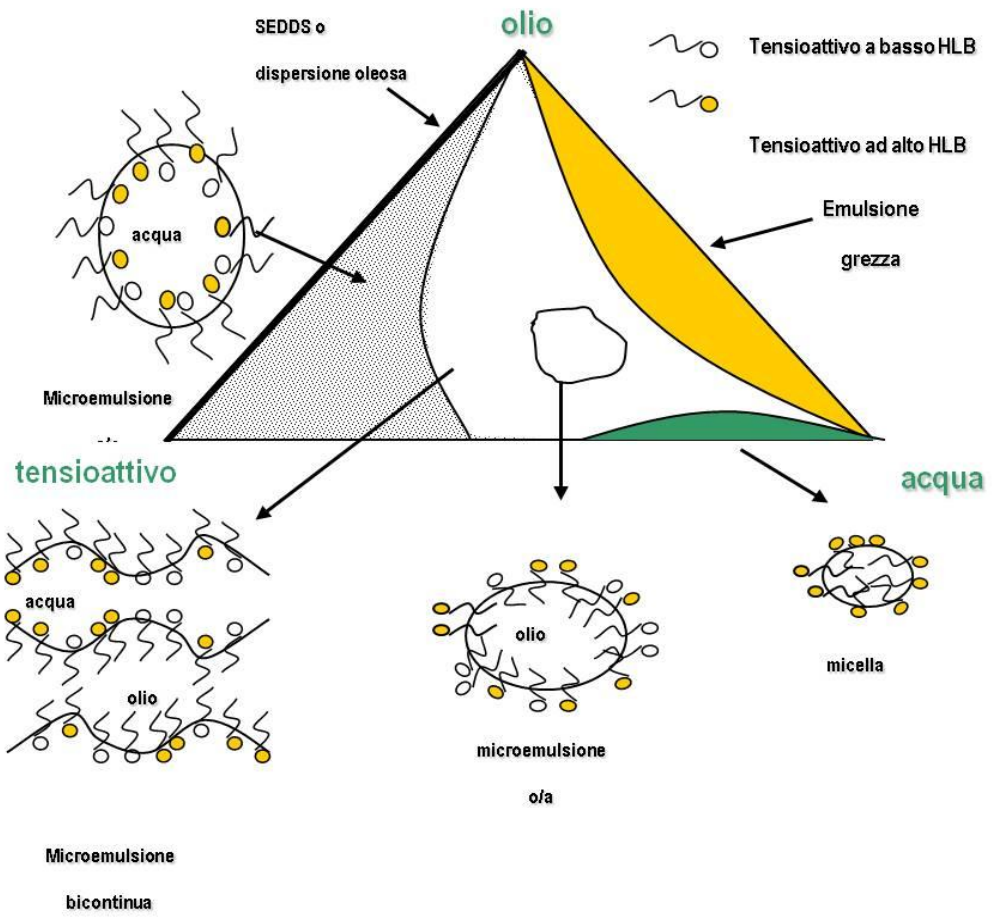


Figura 5. Ipotetico diagramma ternario di fase di un sistema olio/acqua/tensioattivo.

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 addizionando 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 II.

Tabella 3. 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	

1.3.2. Importanza del tensioattivo

L'inserimento nelle formulazioni lipidiche di un tensioattivo è legato alla sua natura anfifilica, espressa in termini di equilibrio fra porzioni idrofobiche ed idrofiliche presenti nella molecola, la quale conferisce le seguenti proprietà alle formulazioni lipidiche:

- capacità di concentrarsi e venire adsorbiti all'interfaccia;
- formare delle micelle;
- modificare le proprietà delle membrane biologiche.

Poiché le forze di attrazione tra le molecole di tensioattivo e quelle di acqua sono minori di quelle tra due molecole di acqua, la presenza di un tensioattivo all'interfaccia fa sì che la tensione superficiale risulti ridotta. Incorporate in determinate formulazioni, le molecole di tensioattivo sono in grado di modificare la disaggregazione e la dissoluzione di forme di dosaggio solide, nonché di controllare la velocità di precipitazione di farmaci somministrati in forma di soluzione.
In particolare, il rilascio di un principio attivo poco solubile, da compresse o capsule, può essere aumentato grazie alla capacità dei tensioattivi di diminuire l'aggregazione tra le particelle ed aumentare l'area superficiale disponibile per il processo di dissoluzione. Inoltre, tali agenti, riducendo la tensione superficiale, esercitano già a basse concentrazioni un effetto bagnante, favorendo così la penetrazione dell'acqua all'interno della forma farmaceutica, in modo da consentire una rapida disaggregazione.
Questi effetti risultano importanti soprattutto quando il processo di assorbimento del farmaco è limitato dalla sua bassa velocità di dissoluzione.
L'aggiunta di tensioattivi permette di ottenere soluzioni limpide o leggermente opalescenti, termodinamicamente stabili pur impiegando il soluto in concentrazione superiore a quella corrispondente alla saturazione. Questo fenomeno è chiamato "solubilizzazione micellare" ed è dovuto alla proprietà dei tensioattivi di formare degli aggregati colloidali (5-30 μm) noti come micelle (Figura 6).

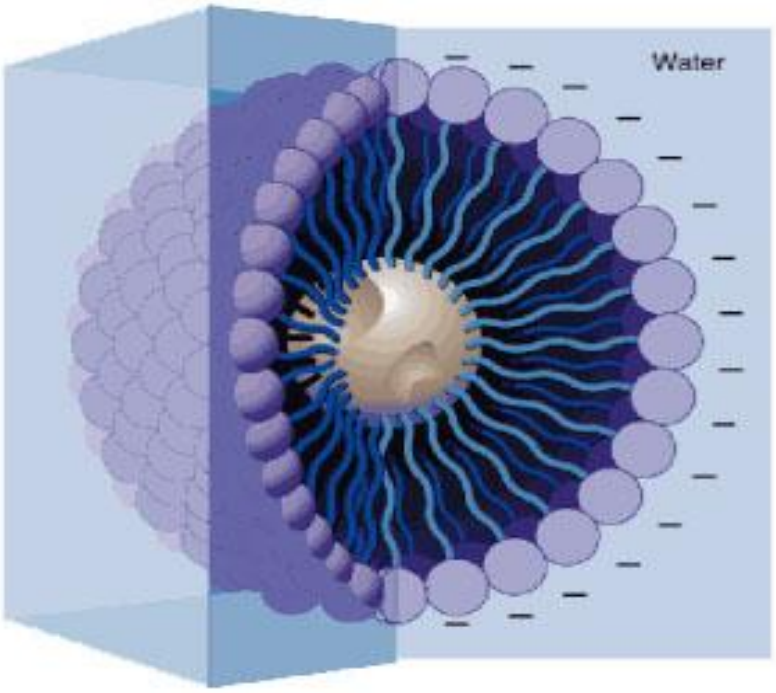


Figura 6. Struttura di una micella.

Quando un tensioattivo viene aggiunto in piccole concentrazioni all'acqua si dispone all'interfaccia aria-liquido; per concentrazioni maggiori esso non può disporsi all'interfaccia già occupata, ma resta nella massa del liquido dove forma micelle: il fenomeno avviene improvvisamente la concentrazione alla quale si verifica questo viene detta concentrazione micellare critica (CMC). In presenza di queste condizioni i composti apolari si sciolgono all'interno delle micelle, mentre quelli polari vengono adsorbiti sulla superficie.

A livello delle membrane biologiche, la presenza del tensioattivo determina una variazione dell'integrità, la quale ha come conseguenza diretta un aumento della permeabilità (Figura 7). La causa principale della perturbazione di membrana ad opera dei tensioattivi risiede nella probabile solubilizzazione e successiva precipitazione dei fosfolipidi. Una consistente variazione della permeabilità incide notevolmente sull'assorbimento, nonché sull'attività farmacologica della formulazione lipidica.

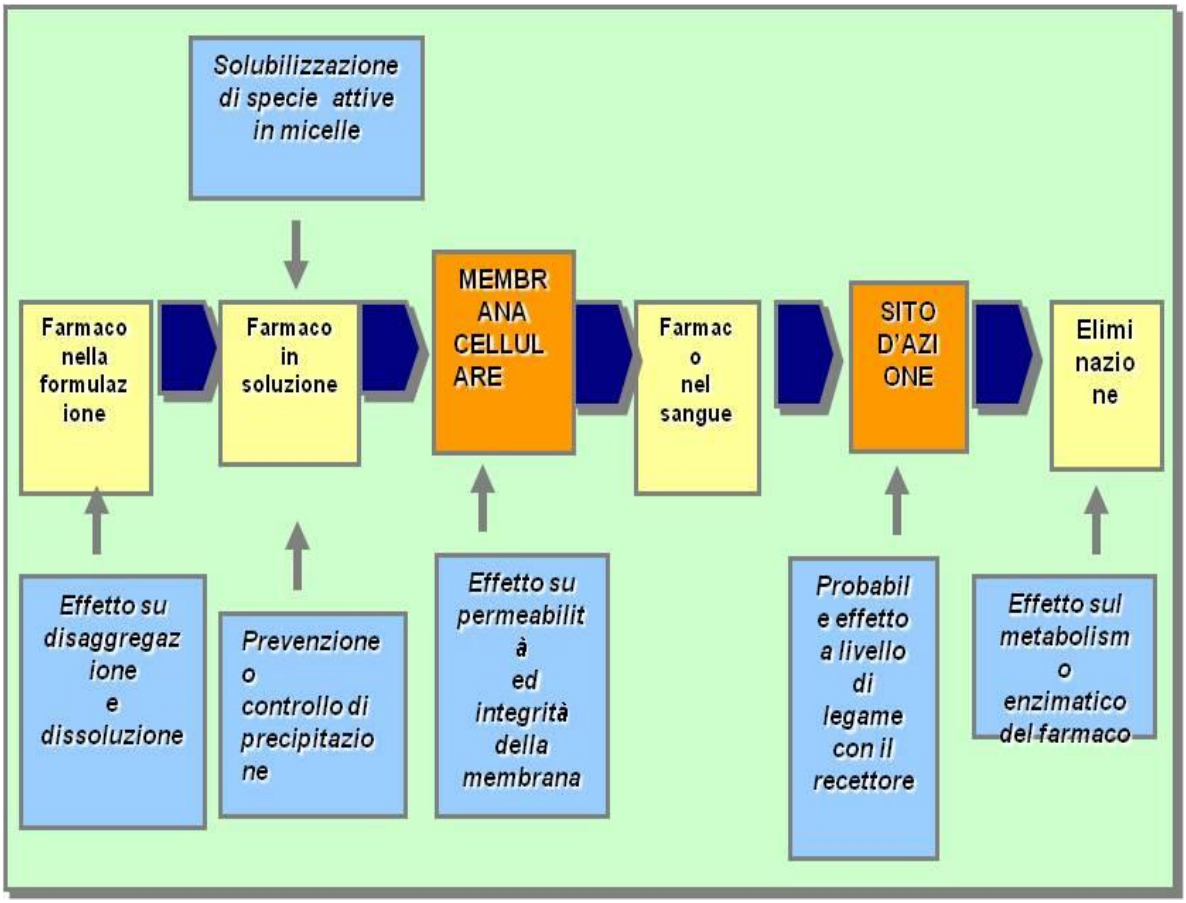


Figura 7. Possibili siti d'azione dei tensioattivi.

In campo farmaceutico sono da preferire i tensioattivi non-ionici o zwitterionici, perché considerati meno tossici e meno sensibili ai cambiamenti di pH e forza ionica.

La natura anfifila dei tensioattivi non ionici viene spesso espressa in termini di bilancio tra le porzioni idrofila e lipofila della molecola, utilizzando la scala empirica ideata da Griffin. Ad un tensioattivo non ionico, teoricamente idrofilo al 100%, viene assegnato il valore di HLB (hydrophilic-lipophilic balance) pari a 20: tensioattivi con HLB >10 sono idrofili e quindi tendenzialmente solubili in acqua, quelli con HLB <10 sono lipofili e quindi tendenzialmente solubili negli oli (Tabella 4).

La scelta di un tensioattivo per uso farmaceutico implica una considerazione della tossicità della sostanza, che deve essere ingerita in grande quantità.

Tabella 4. Scala di valori HLB e intervalli di valori in cui si collocano gli agenti solubilizzanti, i detergenti, gli emulsionanti e gli agenti antischiuma.

Comportamento caratteristico rispetto all'acqua	**HLB**	**Rapporto**		**Funzione**	
		Parte Idrofila	Parte idrofoba		
Non disperdibile	0	0	100		
				ANTI SCHIUMA	
Scarsa disperdibilità	2	10	90		
	4	20	80		**A/O**
	6	30	70		
				BAGNANTI	
Dispersione lattiginosa	8	40	60		**O/A**
Stabili dispersioni lattiginose	10	50	50		
Dispersioni trasparenti	12	60	40		
				DETERGENTI	
Soluzioni colloidali	14	70	30		
	16	80	20	**SOLUBILIZZANTI**	
	18	90	10		
	20	100	0		

I tensioattivi non ionici più comunemente utilizzati per la formulazione di forme farmaceutiche sono gli esteri del sorbitano ed i polisorbati. I principali esteri del sorbitano e i polisorbati in commercio, sono elencati in tabella 5 e 6.

Tabella 5. HLB di esteri del sorbitano.

Nome chimico	**Nome commerciale**	**HLB**
Monolaurato del sorbitano	Span® 20	8,6
Monopalmitato del sorbitano	Span® 40	6,7
Monostearato del sorbitano	Span® 60	4,7
Tristearato del sorbitano	Span® 65	2,1
Monooleato del sorbitano	Span® 80	4,3
Trioleato del sorbitano	Span® 85	1,8

Tabella 6. HLB e concentrazione micellare critica (CMC) dei polis orbati.

Nome chimico	**Nome commerciale**	**HLB**	**CMC (g dm^{-3})**
Monolaurato del sorbitano poliossietilenato	Polisorbato (Tween) ® 20	16,7	0,060
Monopalmitato del sorbitano poliossietilenato	Polisorbato (Tween) ® 40	15,6	0,031
Monostearato del sorbitano poliossietilenato	Polisorbato (Tween) ® 60	14,9	0,028
Tristearato del sorbitano poliossietilenato	Polisorbato (Tween) ® 65	10,5	0,050
Monooleato del sorbitano poliossietilenato	Polisorbato (Tween) ® 80	15,0	0,014
Trioleato del sorbitano poliossietilenato	Polisorbato (Tween) ® 85	11,0	0,023

Gli esteri del sorbitano (Figura 8) sono miscele di esteri parziali del sorbitolo e sue mono-dianidridi con l'acido oleico. Essi sono generalmente insolubili in acqua e vengono usati come emulsionanti acqua in olio e agenti bagnanti.

I polisorbati (Figura 9), invece, sono miscele complesse di esteri parziali del sorbitolo e sue mono-dianidridi condensate con un numero approssimato di moli di ossido di etilene. I polisorbati sono miscibili con acqua a causa dei loro alti valori di HLB e vengono usati come emulsionanti per le emulsioni olio in acqua.

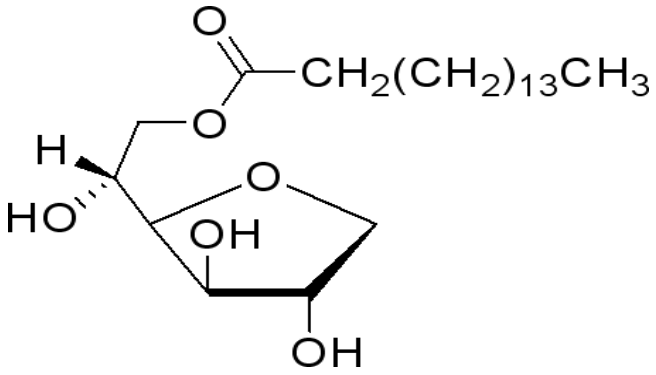


Figura 8. Struttura del monopalmitato del sorbitano (Span®40).

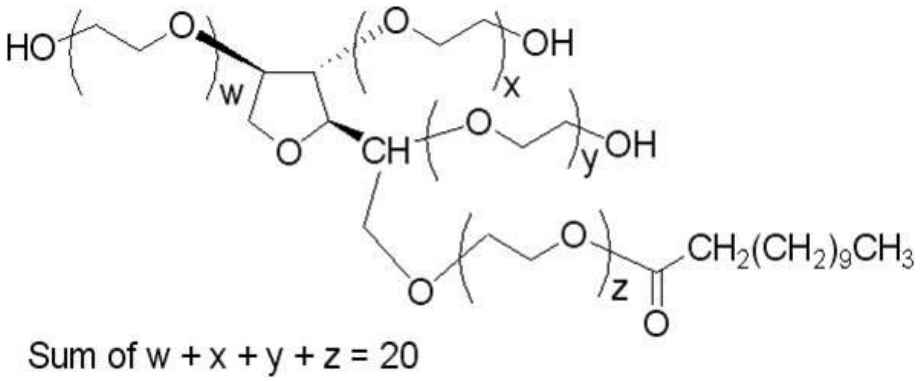


Figura 9. Formula di struttura del monolaurato del sorbitano poliossietilenato (Tween ® 20).

1.3.3. 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 per 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 [10].

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 μm) 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 [11].

---

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

[11] M. Newton, J. Petersson, F. Podczeck, A. Clarke, S. Booth., *The influence of formulation variables on the properties of pellets containing a self-emulsifying mixture.* Int. J. Pharm., 90, 987-995 (2001).

1.3.4. 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 (Tabella 2). Questi sistemi sono meglio conosciuti come sistemi auto-nanoemulsionanti (SMEDDS),[12].

1.4. Processi tecnologici

Le formulazioni lipidiche vengono commercializzate come forme farmaceutiche liquide o confezionate all'interno di capsule di gelatina dura e/o molle[13].

Al fine di ridurre i costi di produzione, gli inconvenienti legati al confezionamento, trasporto, stoccaggio e l'instabilità chimico-fisica, è stata presa in considerazione la possibilità di supportarle su un veicolo solido secondo diversi processi tecnologici (caricamento su carrier microporosi e/o polimeri reticolati, spray drying, sferonizzazione, granulazione) allo scopo di ottenere una polvere lavorabile dal punto di vista farmaceutico [14,15, 16,17,18,19,20,21,22.]

---

[12] K. Kohli, S. Chopra, D. Dhar, S. Arora, RK. Khar., *Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability*. Drug Discov. Today, 15, 965-970 (2010).

[13] M. Newton, J. Petersson, F. Podczeck, A. Clarke, S. Booth., *The influence of formulation variables on the properties of pellets containing a self-emulsifying mixture.* Int. J. Pharm., 90, 987-995 (2001).

[14] V. Agarwal, A. Siddiqui, H. Ali, S. Nazzal., *Dissolution and powder flow characterization of solid self-emulsified drug delivery system (SEDDS)*. Int. J. Pharm.,366, 44-52, (2009).

[15] E.E. Chiellini, B. Bellich, S. Macchiavelli, R. Fiannaca, D. Skrbec, G. Cadelli, F. Carli., *Atti del Fifth Central European Symposium on Pharmaceutical Technology and Biotechnology, Lubiana*, 469-470 (2003).

[16] P. Balakrishnan, B.J. Lee, D.H. Oh, J.O. Kim, M.J. Hong, JP. Jee, JA.Kim, B.K. Yoo, J.S. Woo,

1.5. Scopo della tesi di dottorato

Visto l'attuale interesse dell'industria farmaceutica verso le formulazioni solide autoemulsionanti, il lavoro di tesi è stato direzionato verso l'analisi esplorativa di forme farmaceutiche solide innovative, utilizzando il processo di estrusione-sferonizzazione, per la preparazione di sistemi autoemulsionanti solidi (SEDDS) al fine di migliorarne l'assorbimento sistemico di farmaci poco solubili.

La tecnologia suddetta è un metodo polifasico di granulazione ad umido, la quale prevede di umettare una determinata quantità di polvere, costituente la fase solida, con un liquido adatto e di processare la massa umida, così ottenuta, tramite appropriate apparecchiature in granuli destinati ad essere essiccati. La metodologia consiste nel mescolare il materiale in un apposito mixer, estruderlo in granuli cilindrici, sferonizzarlo per ottenere sferette (pellets) abbastanza uniformi, e quindi essiccarlo (Figura 10).

Tale procedimento è stato sfruttato per il caricamento del sistema autoemulsionante, costituito quest'ultimo da un sistema lipidico contenente principi attivi poco solubili (**silimarina: fitocomplesso del Cardo Mariano** e **vinpocetina**), caricati su un supporto solido composto da cellulosa microcristallina e lattosio.

C.S. Yong, HG. Choi., Enhanced oral bioavailability of dexibuprofen by a novel solid Self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). Eur. J. Pharm. Biopharm., 72, 539-545 (2009).

[17] P. Gauthier, J.M. Aiache., *Manifacture and Dissolution Studies of Lipid Spheres*. Pharm. Tech. E., 15, 34-36 (2003)

[18] C. Schmidt e P. Kleinebudde., *Influence of the granulation step on pellets prepared by extrusion/spheronization.* Chem. Pharm. Bull. 47 (3), 405-412 (1999).

[19]E. Franceschinis, D. Voinovich, M.Grassi, B. Perissutti, J. Filipovic-Grcic, A. Martinac, F. Meriani Merlo F., *Self emulsifying pellets prepared by wet granulation in high-shear mixer: influence of formulation variables andpreliminary study on the in vitro absorption.* Int. J. Pharm., 291, 87-97 (2005).

[20] E. Franceschinis, C. Bortoletto, B. Perissutti, M. Dal Zotto, D. Voinovich, N. Realdon., *Self-emulsifying pellets in a lab-scale high shear mixer: formulation and production design*. Powder Tech., 207, 113-118 (2010)

[21] Z. Wang, J. Sun, Y. Wang, X. Liu, Q. Fu, P. Meng, Z. He., *Solid self-emulsifying nitrendipine pellets: Preparation and in vitro/ in vivo evaluation*., Int. J. Pharm., 383, 1-6, (2010).

[22] A.R. Patel, PR. Vavia., *SMEDDS incorporated polymer matrix: a floating dosage form solution for drugs with poor gastric solubility*. PTE, 22, 36-42 (2010).

Mediante l'utilizzo di un estrusore a pistone è stato possibile verificare la fattibilità del processo di estrusione/sferonizzazione, valutando la relazione che intercorre, nella camera d'estrusione , tra la forza di estrusione richiesta dai diversi sistemi formulativi per ottenere successivamente pellets contenenti il sistema autoemulsionante e lo spostamento del pistone.

I pellets così ottenuti sono stati successivamente caratterizzati in vitro, effettuando prove di caratterizzazione tecnologica quali: densità, diametro, durezza, test di disgregazione e dissoluzione in vitro e valutandone la loro biodisponibilità in vivo dei loro principi attivi.

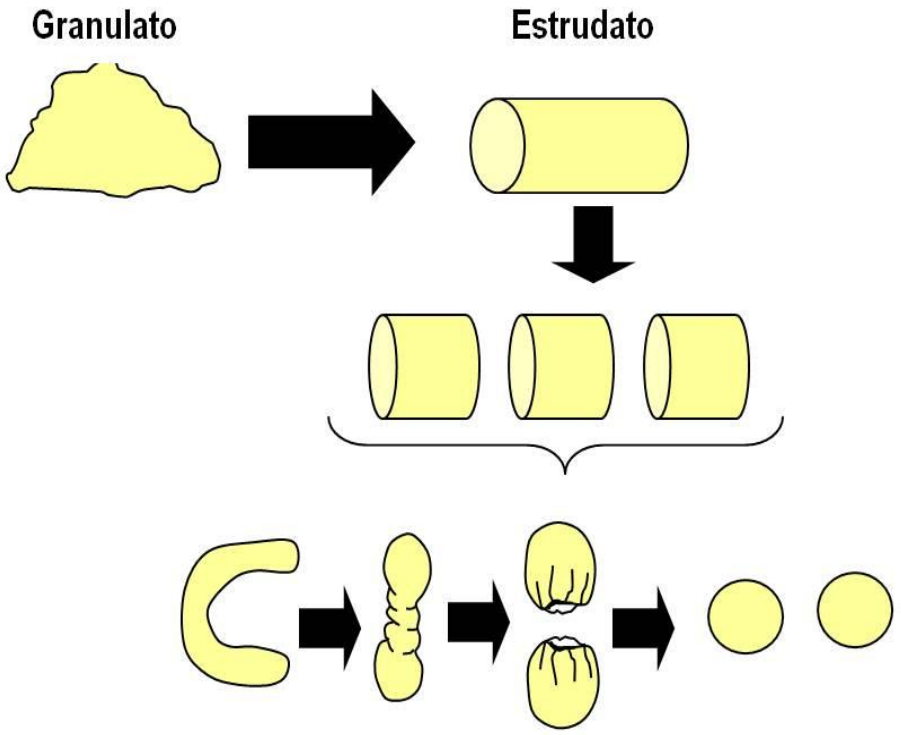


Figura 10. Processo di estrusione-sferonizzazione.

2. Principi Attivi Selezionati

2.1. Silimarina (fitocomplesso del Cardo Mariano)

Il Cardo mariano, Silybum marianum (L.) Gaertner, è una pianta erbacea della famiglia delle Compositae; è alta fino ad un metro e mezzo, ha grandi foglie glabre, lobate, ondulate, spinose e macchiate di bianco lungo le nervature; i capolini sono grandi, solitari, costituiti da fiori tubulosi di colore rosso-porpora, contornati da un involucro le cui brattee esterne terminano con grosse spine robuste (Figura 11).

Figura 11. Il Cardo mariano (Silybum marianum (L.) Gaertner)**.**

È una pianta bienne, originaria dei luoghi incolti, dei terreni secchi e pietrosi dell'Europa Meridionale, del Nord-Africa e dell'Asia Minore; è stata acclimatata nelle Americhe e nell'Australia Meridionale.

La droga proviene esclusivamente da colture ed è destinata ai Paesi industrializzati che la importano, soprattutto da Argentina, Cina, Romania e Ungheria; è costituita dai frutti

maturi, tecnicamente chiamati acheni, di forma ovale-obliqua, lunghi 6-7 mm e larghi sino a 3 mm, di colore nero e rugosi.

Sull'estremità superiore si trova una protuberanza cartilaginea giallognola; su quella inferiore, lateralmente, è presente un ilo canalicolato.

I frutti, talvolta, sono chiamati impropriamente semi e vengono privati facilmente del pappo lucido e argenteo. In commercio esistono varietà bianche, grigie e nere (Figura 12 e 13).

I principi attivi sono cromanoni particolari, i flavanolignani, la cui miscela prende il nome di silimarina ed è localizzata esclusivamente nel tegumento dei frutti.

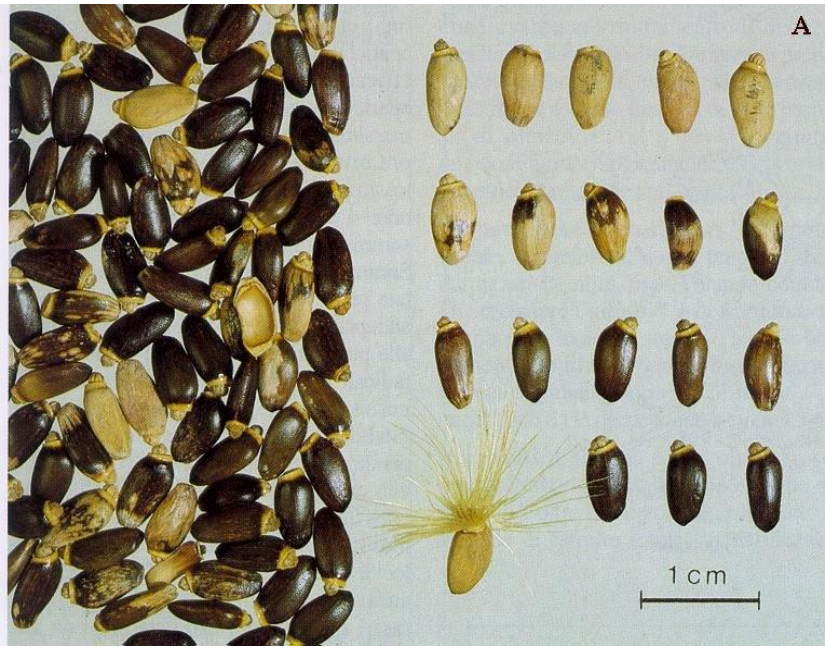


Figura 12. . Frutti di Silybum marianum (L.) Gaertner senza pappo.

Figura 13. Frutti di Silybum marianum (L.) Gaertner con pappo.

I principali flavanolignani derivano dalla cicloaddizione di un alcol fenilpropanico (alcol coniferilico) sul 2-fenilcromanone (cioè, un 2,3-diidroflavonolo, la tassifolina), portando alla formazione di un benzodiossano, la silibina, di un ossatriciclodecene, la silidianina o di un diidrobenzofurano, la silicristina. La silibina è una miscela diastereoisomera avente rapporto 1:1; costituisce un terzo della silimarina, di cui è il suo unico componente sicuramente attivo ma, poiché tale composto può essere difficilmente risolto, i preparati disponibili in commercio sono titolati solo in silimarina (Figura 14) [23].

Nella varietà a fiori bianchi (Figura 15) sono presenti i 3-desossiderivati di regioisomeri della silibina (silandrina), della silidianina (silimonina), della silicristina (isosilicristina), l'isosilibina (il suo 3-desossiderivato silandrina), i 3-desossiderivati siliermina, le neosiliermine A e B, la 2,3-deidrodisibina, tri- tetra- e pentameri della silibina (detti silibinomeri) [24].

[23] ESCOP (European Scientific Cooperative of Phytotherapy), Cardui Mariae Fructus/Milk Thistle Fruit (2005).

[24] *L'Informatore Farmaceutico*, Annuario italiano dei medicinali e dei laboratori, OEMF (2005).

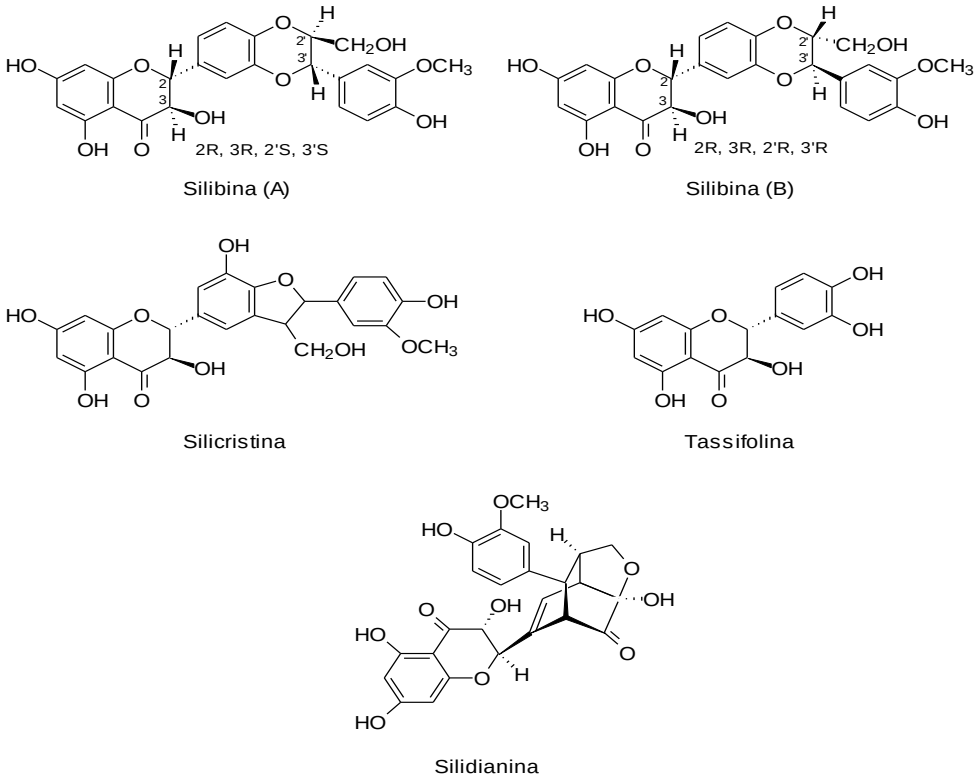


Figura 14. I principali flavanolignani contenuti nel frutto del Cardo mariano.

Figura 15. La varietà a fiori bianchi di Silybum marianum (L.) Gaertner.

La silimarina è il principio attivo della droga; è utilizzata nella profilassi e nel trattamento di danni epatici di origine tossico-metabolica, nelle alterazioni funzionali del fegato durante e dopo epatiti (sindrome post-epatitica), nelle epatopatie degenerative croniche (cirrosi e steatosi epatica), nelle epatopatie latenti; inoltre è impiegata in campo cosmetico come antiossidante. Dopo somministrazione orale della silimarina, una volta arrivata al fegato, passa con la bile nell'intestino e subisce ricircolo enteroepatico. Tuttavia, un problema che si riscontra nella somministrazione orale della silibina, è rappresentato dalla sua limitata biodisponibilità[25].

L'estraibilità dei flavanolignani mediante preparazioni estemporanee come infuso o decotto è quindi scarsa e non garantisce il raggiungimento di concentrazioni terapeutiche efficaci. Le prime dimostrazioni cliniche dell'attività del Cardo mariano si ottennero con tinture idroalcooliche. Anche tale forma d'uso viene però sconsigliata, dal momento che l'alcol nelle epatopatie è controindicato. E' quindi opportuno impiegare preparati farmaceutici ottenuti a partire da estratti secchi standardizzati.

Essendo la silibina difficilmente separabile dagli altri flavanolignani costituenti la silimarina, ed essendo anche la miscela difficilmente ottenibile in forma pura, a livello industriale si usa l'estratto titolato in silimarina, contenente circa il 70% di silimarina e il 30% di silibina. La dose singola minima utilizzata è di 30 mg di silibina, che corrisponde a 100 mg di estratto standardizzato o a 70 mg di silimarina.
In Italia sono presenti in commercio diversi preparati, tutti a base dell'estratto secco di Cardo mariano, aventi il dosaggio, riferito al titolo in silimarina, di 70 mg (Legalon® 70, compresse rivestite), 140 mg (Eparsil®, capsule; Legalon® 140, compresse rivestite), 200 mg (Eparsil®, bustine effervescenti, Legalon® 200, bustine e granulato effervescente; Marsil®, bustine e compresse; Silepar®, bustine e capsule; Silimarin®, compresse rivestite, Silirex® 200, capsule e granulato per sospensione orale in bustine; Silliver®, compresse) di silimarina per dose singola. Esistono anche sciroppi all'1% (Legalon® sciroppo) o 2% (Silirex®), come anche il preparato per infusione endovenosa Legalon SIL®, un'associazione di fosfatidilcolina e silimarina, usato soprattutto nelle intossicazioni da Amanita falloide [26] Nei suddetti prodotti solo il 20-50% della quantità

[25] M. Arcari, A. Brambilla, A. Brandt, R. Caponi, G. Corsi, M. Di Rella, F. Solinas., *Nuovo complesso di inclusione tra la silibina e la β-ciclodestrina: in vitro e assorbimento in vivo in confronto a formulazioni tradizionali.* Boll. Chim. Farm., 5, 205-209 (1992).

[26] J.J. Kabara, D.S. Orth., *Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs.* Principles and Practice, Marcel Dekker Inc**., (1997**).

assunta viene assorbita dal tratto gastrointestinale, perché il composto è scarsamente solubile in acqua. Di conseguenza, per migliorarne la biodisponibilità sono stati effettuati diversi studi con la silimarina, tra i quali:

2.1.1 Complessazione con un fosfolipide

L'assorbimento in vitro può essere migliorato significativamente complessando la silibina con fosfatidilcolina, per ottenere un composto altamente lipofilico denominato silipide e registrato dall'Indena® Spa con il nome di "Siliphos®". Studi su ratti, su volontari sani e su pazienti affetti da epatopatia hanno dimostrato che, dopo la somministrazione di una singola dose orale equimolare (pari a 200 mg/kg come silibina) di silipide e di silimarina nel ratto, la biodisponibilità del silipide era 10 volte maggiore di quella della silimarina; i livelli plasmatici di silibina raggiungono, rispettivamente, 93.4 μg/ml e 6.72 μg/ml entro due ore dalla somministrazione (Figura 16).
Lo stesso "Siliphos®" è stato somministrato per 120 giorni nell'uomo, confermando l'aumento della biodisponibilità rispetto alla somministrazione di silimarina [27].

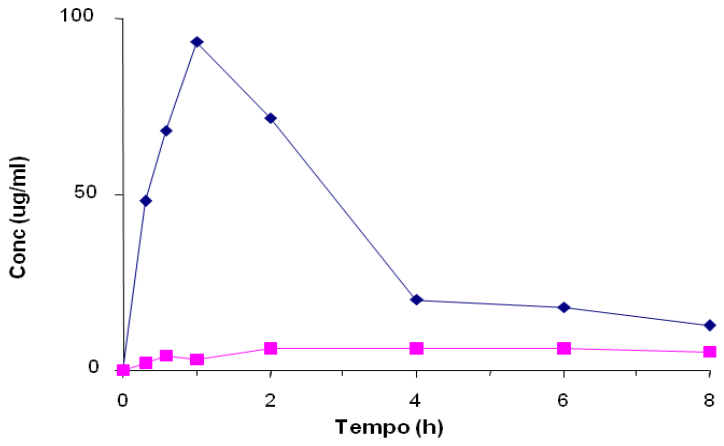


Figura 16. Concentrazione plasmatica della silibina (μg/ml) ottenuta nei ratti dopo somministrazione orale di una singola dose (200 mg/kg di silibina) di:
◆ silipide; ■ silimarina.

[27] X. Yangyu, S. Yunmei, C. Zhipeng, P. Quieng., *The preparation of sylibin-phospholipid complex and the study on its pharmacokinetics in rats.* Int. J. Pharm., 307, 77-82 (2006).

2.1.2 Inserimento in capsule di gelatina molle

E' stato effettuato un confronto tra le capsule di gelatina dura e quelle di gelatina molle, create con la tecnologia "Softgel RpScherer", per verificare se portassero ad un miglioramento della biodisponibilità della silibina, come già si era osservato per diversi principi attivi farmaceutici.

I due preparati sono stati formulati utilizzando 240 mg di un prodotto disponibile commercialmente, un complesso di silibina-fosfolipidi in rapporto 1:2, equivalenti a 80 mg di silibina (Figura 17) .

Lo studio, condotto su 12 soggetti volontari sani, ha dimostrato che la concentrazione massima plasmatica di silibina, raggiunta somministrando capsule di gelatina molle "RpScherer" era tre volte più alta rispetto a quella riscontrata in seguito alla somministrazione di capsule di gelatina dura (C_{max} = 710.12 ng/ml contro 193.46 ng/ml).

Questo incremento della biodisponibilità è correlato all'aumento dell'assorbimento del principio attivo attraverso la parete intestinale, grazie alla naturale tendenza della formulazione lipofilica ad essere digerita dalla bile e dalle lipasi gastrointestinali. I prodotti della lipolisi, come acidi grassi liberi e 2-monogliceridi, provocano un aumento della quantità delle micelle, nelle quali la silibina può dunque ripartirsi ed essere trasportata in un'opportuna forma dispersa alla membrana enterocitaria, dove si deposita in concentrazione relativamente alta, influenzando positivamente la velocità e la quantità assorbita [28].

[28] P.C. Harrasser, G. Basso., *La tecnologia del Softgel Scherer, una capsula in grado di aumentare la biodisponibilità di principi attivi naturali nell'uomo: studio comparato in cross-over sulla silibina.* Not. Chim. Farm., 5, 66-67 (1999).

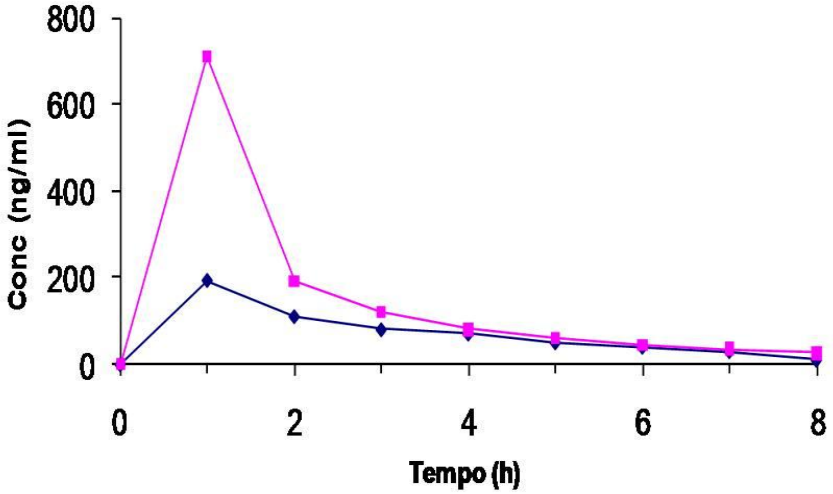


Figura 17. Concentrazione plasmatica della silibina (μg/ml) ottenuta dopo somministrazione orale a dei volontari sani di una singola dose (80 mg di silibina) formulata in capsule di gelatina:

◆ dura; ■ molle.

2.1.3 Complessazione con la β-ciclodestrina

È stato preparato per liofilizzazione un complesso di inclusione tra la silibina e la β-ciclodestrina in rapporto 1:6 p/p. Successivamente il complesso è stato utilizzato per formulare compresse ed è stato confrontato con la silibina, sottoponendolo ai test di dissoluzione in vitro ed a prove di biodisponibilità in vivo eseguita su ratti Wistar. I risultati del test di dissoluzione hanno messo in evidenza un notevole incremento sia nella velocità di dissoluzione che nella percentuale liberata per il complesso di inclusione rispetto alla silibina pura (Figura 18). Mentre nelle prove di biodisponibilità, somministrate al ratto il complesso con la β-ciclodestrina, la silibina e la silimarina, si ottengono concentrazioni biliari rispettivamente di 16.7, 0.9 e 6.3 μg/ml [29].

[29] M. Arcari, A. Brambilla, A. Brandt, R. Caponi, G. Corsi, M. Di Rella, F. Solinas., *Nuovo complesso di inclusione tra la silibina e la β-ciclodestrina: in vitro e assorbimento in vivo in confronto a formulazioni tradizionali.* Boll. Chim. Farm., 5, 205-209 (1992).

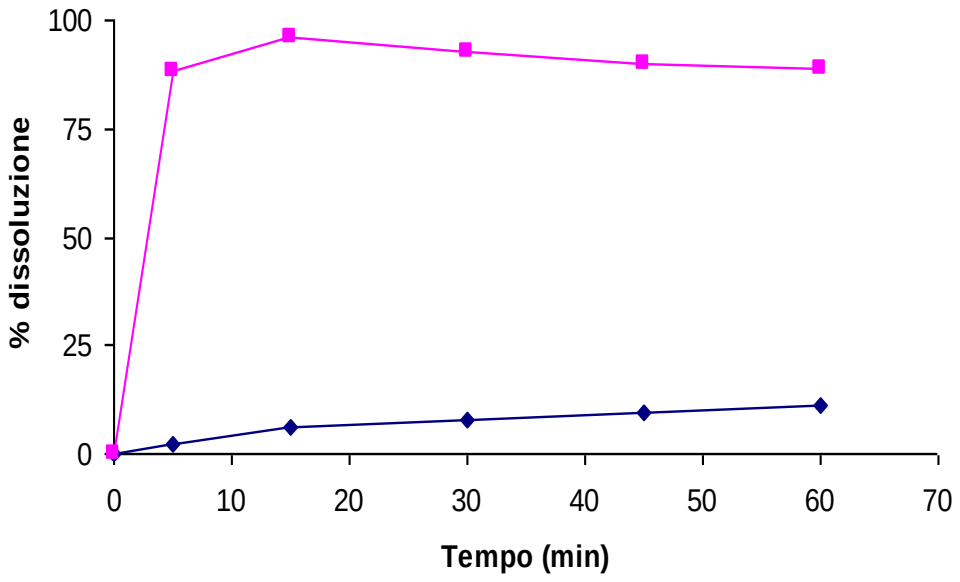


Figura 18 Profili dissolutivi ottenuti dall'estratto di silibina tal quale (◆) e dal complesso silibina/β-ciclodestrina(■).

2.1.4 Formulazione di una microemulsione

L'emulsione, creata per aumentare la biodisponibilità della silibina dopo somministrazione orale, è composta da una microemulsione contenente la silimarina. Tale microemulsione, somministrata sempre per via orale ai ratti, presentava una maggiore biodisponibilità della silibina, rispetto a quella ottenuta in seguito a somministrazione di prodotti commerciali sotto forma di compresse e capsule di gelatina dura. In entrambi i casi è stata effettuata una singola somministrazione equivalente a 60 mg/kg di silibina.

I risultati così ottenuti sono riportati nella Figura 19, dove si può notare che la biodisponibilità della silibina raggiunta con la microemulsione è molto più elevata rispetto a quella riscontrata in seguito a trattamento con i due prodotti di confronto [30].

[30] J. Woo, S. Suh., *United States Patent US 6*, 428, 821 B2 (2002).

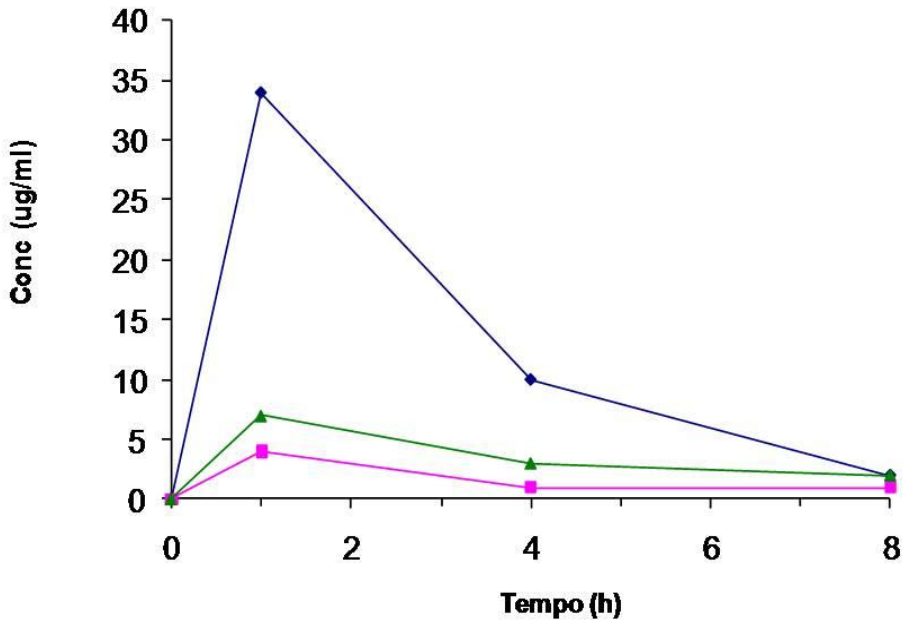


Figura 19. Concentrazione plasmatica della silibina (µg/ml) ottenuta nei ratti dopo somministrazione orale di una singola dose (60 mg/kg di silibina) formulata in: ■ compresse; ▲ capsule; ◆ microemulsione.

2.1.5 Processazione mediante spray – drying

La suddetta tecnica permette di ottenere un prodotto amorfo, solubilizzando 10 p/p di flavolignani in 30-120 p/p di solvente organico (etanolo, metanolo, alcool isopropilico, butanolo, acetone o una miscela degli stessi), successivamente la miscela viene mescolata con una soluzione acquosa contenete uno o più prodotti idrosolubili (zuccheri polialcolici quali mannitolo, treitolo, eritriolo, arabinitolo, xilitolo, talitolo, maltitolo o sorbitolo). Il prodotto amorfo così ottenuto presenta una migliore biodisponibilità in vitro, senza bisogno di aggiungere agenti bagnanti e/o altri eccipienti, dato che la percentuale di flavolignani liberata dai compositi dopo un'ora passa dal 46% all'88% [31].

[31] .J. Kabara, D.S. Orth., *Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs.* Principles and Practice, Marcel Dekker Inc., (1997).

2.1.6 Utilizzo nella preparazione di compositi con polimeri reticolati

Compositi che sono stati ottenuti veicolando la silimarina con due polimeri reticolati, uno idrofilo, il sodio croscarmellosio (Ac-Di-Sol®), ed il crospovidone (PVP-CL®) di carattere anfifilico, attraverso un processo di attivazione meccano-chimica. Si sono ottenuti così dei compositi contenenti i principali flavolignani (silicristina, silibina A e B) in forma "attivata", amorfa o nanocristallina, inseriti fra le maglie dei due polimeri utilizzati. L'attivazione è ulteriormente confermata sia dagli studi cinetici di rilascio in vitro che da quelli in vivo su ratti Wistar, che hanno messo in evidenza sia un aumento delle concentrazioni complessive che dei singoli flavolignani presenti nell'estratto secco (Tabella 7) [32].

Tabella 7. Parametri farmacocinetici dei singoli flavolignani ottenuti dopo somministrazione orale di una singola dose di silimarina e dei due compositi testati.

	Silibina A			Silibina B			Silicristina	
	Estr.	PVPCL	AcDiSol®	Estr.	PVPCL	AcDiSol®	Estr.	AcDiSol®
Dose (mg/Kg)	8,5	2,6	2,6	8	2,25	2,25	10,5	4,45
t_{max} (h)	1,00	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
C_{max} (µg/mL)	0,93	3,00	7,66	1,67	4,43	7,69	0,63	1,85
AUC (µgh/mL)	0,63	6,70	17,20	3,79	12,90	19,15	0,72	5,02
Valori dose-normalizzati								
C_{max} (µg/mL)	0,11	1,15	2,95	0,21	1,97	3,42	0,06	0,42
AUC (µgh/mL)	0,07	2,58	6,61	0,47	5,73	8,51	0,07	1,13
Biodisp. Relativa	1	**34,5**	**88,6**	1	**12,1**	**17,96**	1	**16,4**

[32] D.Voinovich, B. Perissutti, L. Magarotto, D. Ceschia, P. Guiotto, A. R. Bilia**.,** *Solid state mechanochemical simultaneous activation of the constituents of the Sylibum marianum phytocomplex with crosslinked polymers.* J. Pharm. Sci., 98(1); 215-28 (2009).

2.1.7 Utilizzo nella preparazione di dispersioni solide

Le dispersioni solide sono state ottenute utilizzando il PEG 6000 come carrier idrofilo. Sono state eseguite le prove di cinetica di dissoluzione sulla silimarina come tale e sulle dispersioni solide. Nel caso dell'estratto come tale, la velocità di dissoluzione è molto bassa: solo l'8% dei flavonoidi viene rilasciato entro i primi 30 minuti, e meno del 40% dopo le prime 12 ore.

Al contrario, per quanto riguarda le dispersioni solide, la velocità di dissoluzione è considerevolmente aumentata: circa il 50% dei flavonoidi presenti nella silimarina viene rilasciato dalla formulazione entro la prima ora, e dopo 2 ore si ha il rilascio completo.

Questo cambiamento è probabilmente dovuto alla riduzione dell'aggregazione delle particelle del fitocomplesso, e all'alterazione delle loro proprietà di superficie durante il processo di dispersione [33].

2.2. Vinpocetina

La vinpocetina, [nome IUPAC: (3α, 16α)-eburnameina-14-carbossil etil estere] comunemente conosciuta anche come etil apovincaminato o apovincamin-22-oato di etile, è un derivato semisintetico della vincamina, alcaloide ottenuto con un processo di estrazione dalla Vinca Minor Linne, pianta erbacea perenne diffusa in tutta Italia tranne che in Sardegna (Figura 20). Industrialmente la vincamina è ricavata da piante coltivate in Africa Centrale (Camerun, Guinea) quali la Voacanga e la Crioceras Longiflorus.

[33] T.C. Bai, G.B. Yan, J. Hu, H.L. Zhang, C.G. Huang., *Solubility of sylibin in aqueous poly(ethileneglicol) solution,* Int. J. Pharm., 308, 100-106 (2006).

Figura 20. Fiore tipico della Vinca Minor

La vinpocetina si ottiene per semisintesi dalla vincamina (vedi Figura 21):

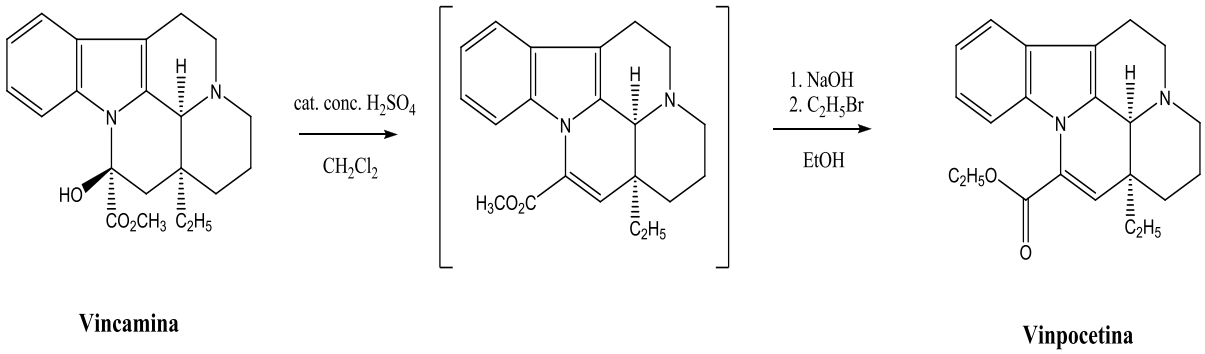


Figura 21. Via semisintetica della vinpocetina.

Dal punto di vista chimico-fisico la vinpocetina è una base debole, con un pKa di 7.31 e una solubilità in acqua a 37°C di 5 µg/ml, che diminuisce significativamente con

l'aumentare del pH della soluzione (vedi Figura 22); infatti questa decresce circa 17400 volte passando da un valore di 24,16 mg/ml ad un pH 1,2 a 1,39 µg/ml ad un pH 8 [34].

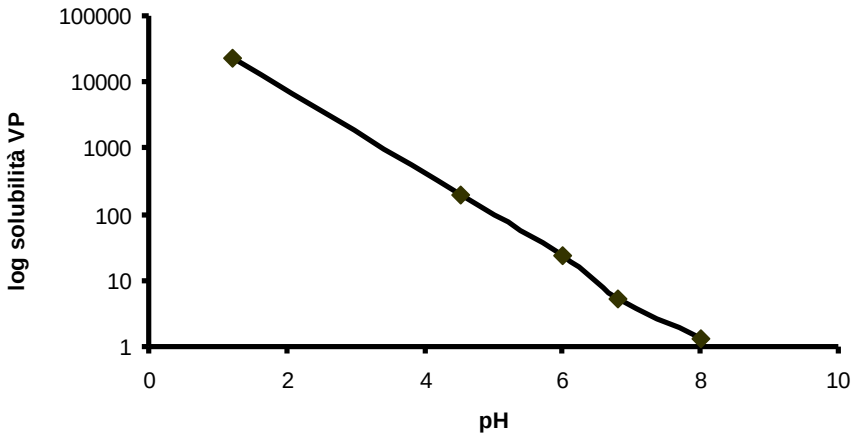


Figura 22. Solubilizzazione della vinpocetina nel range di pH 1.2-8**.**

Per quanto riguarda l'attività farmacologica, la prima qualità della vinpocetina, è quella di sostenere il metabolismo cerebrale, quindi la vigilanza, crescendo localmente la sintesi dell'adenosin trifosfato (ATP), la molecola energetica universale degli organismi viventi. La vinpocetina migliora l'utilizzo dell'ossigeno nel cervello, accresce il flusso sanguigno cerebrale e riduce l'aggregazione piastrinica. I primi studi realizzati su questo composto raccomandavano di impiegarlo principalmente nelle turbe di origine ipossica (insufficienza di ossigeno) e ischemica (insufficienza del flusso sanguigno). In queste condizioni, la vinpocetina esercita un effetto neuroprotettore considerevole e permette di salvare fino al 50% dei neuroni che sarebbero perduti definitivamente. La vinpocetina accresce anche la sintesi di diversi neurotrasmettitori che investono le funzioni cerebrali critiche come la memorizzazione, la concentrazione e l'umore. La vinpocetina infine è frequentemente utilizzata per le sue proprietà vasodilatatrici in tutte le turbe sensoriali, auditive e visuali di origine vascolare (vertigini, tinnitus, ronzii, inquinamento sonoro, retinopatie) [35] [36]primi effetti si avvertono dopo 3-4 settimane di somministrazione ed il

[34] S.S.L. Ribeiro, A. Falcao, J.A.B. Patricio, C.D. Ferreira, F.J.B. Veiga., *Cyclodextrin Multicomponent Complexation and controlled Release elivery Strategie to Optimize the Oral Bioavailability of Vinpocetine*. J. Pharm. Sci., 96, 2018-2028, (2007).

[35] J.B. Polson, S.J. Strada., *Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle.* Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 36, 403-427, (1996).

[36] D.M. Coleston, I. Hindmarth ., *Possible memory-enhancing properties of vinpocetin.* Drug. Dev. Res., 14, 191-193 (1988).

massimo effetto si ottiene dopo assunzione giornaliera per un anno alla dose di 5-10 mg. Tuttavia ai valori di pH intestinale la vinpocetina è scarsamente solubile e, di conseguenza, poco biodisponibile in quanto la maggior parte delle formulazioni attualmente in commercio presentano una biodisponibilità del 6-7% [37].

La vinpocetina è assorbita nell'intestino tenue, presenta un volume di distribuzione apparente di 138 (± 74) L dovuto al suo carattere lipofilo. L'assorbimento della vinpocetina aumenta quando viene somministrata a stomaco pieno, con un assorbimento del 60%, mentre a stomaco vuoto l'assorbimento si riduce al 7% della dose somministrata.

La vinpocetina è metabolizzata dal fegato ad acido apovincaminico e solo una piccola parte viene eliminata inalterata con le urine. La maggior parte della dose somministrata è escreta entro le 24 ore sotto forma di acido apovincaminico, metabolita della vinpocetina utilizzato come marker per gli studi farmacocinetici del farmaco stesso.

A causa del breve tempo di emivita, la determinazione della concentrazione plasmatica della vinpocetina risulta difficile. Inoltre, la velocità dell'apparizione del metabolita nel plasma è molto simile alla velocità dell'assorbimento della vinpocetina. Oltretutto, le concentrazioni plasmatiche raggiunte dalla vinpocetina sono inferiori (1.5 ng/ml) rispetto al suo metabolita (80-120 ng/ml) che, di conseguenza, può essere facilmente quantificato analiticamente [38].

Quanto detto è stato applicato con successo in uno studio farmacocinetico su 24 soggetti (volontari sani), somministrando per via orale una singola dose di 10 mg di vinpocetina, sotto forma di compresse. Successivamente sono stati prelevati campioni sanguigni a tempi prestabiliti di 0.5, 0.83, 1.16, 1.5, 2, 2.5 3, 4, 6, 8, 10 e 12 ore dalla prima somministrazione.

Il profilo plasmatico ed i parametri farmacocinetici dell'acido apovincaminico così ottenuti sono riportati rispettivamente in Figura 23 e tabella 8.

---

[37] L. Ribeiro, *T.* Loftson, D. Ferreira, F. Veiga., *Investigation and Physicochemical Characterization of Vinpocetine-Sulfobutyl Ether b -Cyclodextrin Binary and Ternary Complexes.* Chem. Pharm. Bull., 51, 914-922 (2003).

[38] L. Vlase, B. Bodiu, S.E. Leucuta., *Pharmacokinetics and comparative bioavailability of two vinpocetine tablet formulations in healthy volunteers by using the metabolita apovincaminic acide as pharmacokinetic parameter.* Arzneim. Forsch. Drug Res., 55, 664-668 (2005).

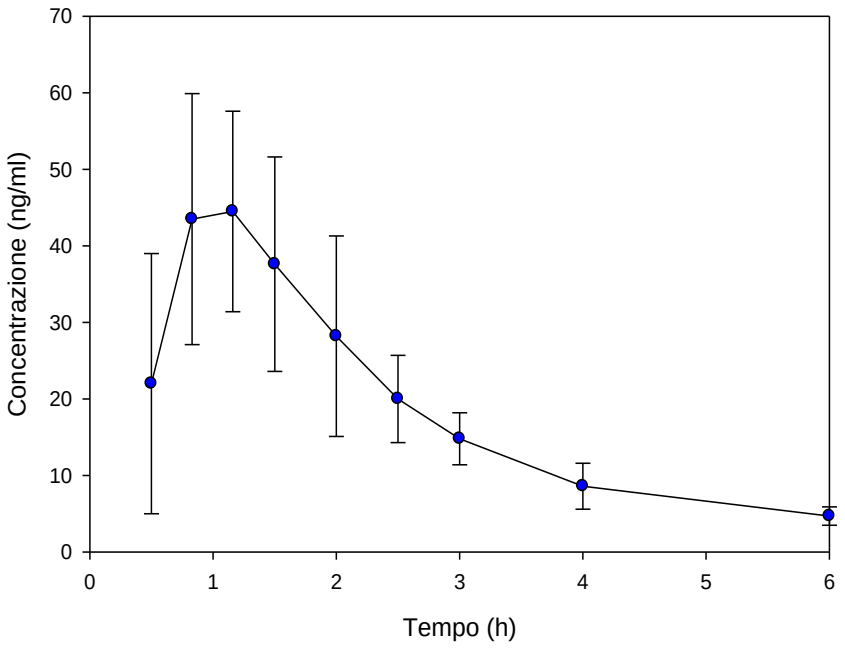


Figura 23. Profilo plasmatico dell'acido apovincaminico ottenuto dopo somministrazione orale di una singola dose contenente 10 mg di vinpocetina (n=24).

Tabella 8. Parametri farmacocinetici dell'acido apovincaminico (n=24).

PARAMETRI	MEDIA ± SD
C_{max}	49,5 ± 16,1 ng/ml
t_{max}	1,11 ± 0,36 h
$AUC_{0-\infty}$	95,1 ± 29,2 ng/ml*h
AUC_{extrap}	7,89 ± 3,12 %
$t_{½}$	0,97 ± 0,27 h
Vd/F	138,0 ± 74 L
K_{am}	3,74 ± 3,54 h^{-1}

Dove: C_{max}: concentrazione plasmatica massima; t_{max}: tempo necessario per raggiungere la concentrazione massima; $AUC_{0-\infty}$: area sotto la curva; $t_{1/2}$: tempo di emivita; **Vd/F**: volume apparente di distribuzione;K_{am}: costante apparente di metabolizzazione della vinpocetina ad acido apovincaminico [5].

Da quanto fin qui esposto si evince che uno dei principali problemi della vinpocetina è la sua bassa biodisponibilità, dovuta principalmente alla bassa solubilità nei fluidi biologici. Diversi studi sono stati condotti per aumentare la solubilità della vinpocetina (VP); è stata complessata con l'idrossipropil β-ciclodestrina (HP-β-CD), con il solfobutil etere β-ciclodestrina (SBEβCD) in presenza dell'acido citrico (CA) o tartarico (TA), il polivinilpirrolidone (PVP) e l'idrossipropil metil cellulosa (HPMC), al fine di realizzare diversi complessi di inclusione.

Il **complesso di inclusione VP-HP-β-CD-CA** è stato realizzato mediante tre tecniche diverse, di seguito descritte, tenendo conto non solo della rapidità e semplicità della realizzazione, ma altresì delle alte rese di produzione, dell'abbassamento dei costi e non per ultimo dell'ottenimento di un prodotto finito dalle caratteristiche ottimali per lo sviluppo di una forma farmaceutica:

2.2.3 Metodo della granulazione a umido o Kneading.

1760 mg di HP-β-CD e 200 mg di VP sono stati miscelati in un mortaio di ceramica con un pestello, successivamente bagnati con una soluzione acquosa contenente il 3% p/v di acido citrico e con il pestello si è proceduto al mescolamento, alfine di ottenere una dispersione omogenea del farmaco nella pasta. Il prodotto è stato mescolato vigorosamente per circa 3 ore, facendo attenzione a non inglobare un' eccessiva quantità d'aria. La pasta è stata quindi trasferita in un beacker e messa in stufa ad asciugare a 45°C per 3 giorni, per allontanare tracce di solvente. In seguito si è proceduto alla macinazione del granulato.

2.2.4 Coevaporazione.

Una soluzione acquosa contenete 1760 mg di HP-β-CD disciolti in 50 ml d'acqua e una soluzione contenente 200 mg di VP in 10 ml di CA al 3% p/v, è stata mantenuta sotto agitazione per circa 40 minuti e poi fatta evaporare, in un pallone, sotto pressione ridotta, in un rotavapor. Ad evaporazione avvenuta il prodotto solido è stato recuperato dal pallone e, quando ancora leggermente umido, messo in un piccolo beacker in stufa a 45 °C alfine di allontanare eventuali residui di solvente. Successivamente si è proceduto alla macinazione.

2.2.5 Liofilizzazione.

La stessa soluzione utilizzata nel processo di coevaporazione è stata sottoposta al processo di liofilizzazione, ottenendo così un prodotto con un'elevata porosità ed elevato volume apparente. Questi fattori permettono di raggiungere con estrema facilità la solubilizzazione con l'aggiunta d'acqua, senza che permangano cristalli residui e senza danneggiare il materiale, grazie alle basse temperature (-50°C) alle quali avviene il processo.

Anche i **complessi VP-SBEβCD-PVP-TA e VP-SBEβCD-HPMC-TA** sono stati preparati con la stessa metodica sopradescritta.
Nel metodo della granulazione a umido la quantità di acido tartarico (TA) aggiunta corrisponde a un rapporto 2:1 p/p VP:TA, mentre con il metodo della liofilizzazione e coevaporazione i complessi di inclusione sono stati preparati con quantità equimolari di ciclodestrine e vinpocetina disciolte in una soluzione contenente 1,5 % p/v di acido tartarico e 0,25 % p/v di PVP, oppure in una soluzione contenente 1,5 % p/v di acido tartarico e 0,1 % di HPMC[39].
I complessi di inclusione così ottenuti sono stati sottoposti, contemporaneamente, sia al test di dissoluzione che a quello di solubilità a pH 6.8. I risultati così ottenuti sono riportati in Tabella 8 e in Figure 15 e 16. Dal test di solubilità riportato sempre in Tabella 7, si evince come nel complesso di inclusione VP-SBEβCD-TA-PVP la vinpocetina presenti un aumento di solubilità 16000 volte superiore rispetto alla vinpocetina pura. Le cinetiche di dissoluzione dei complessi di inclusione VP-HP-β-CD hanno messo in evidenza come quest'ultimi sono in grado di mantenere alta la percentuale di vinpocetina nel mezzo di dissoluzione, ovvero acqua distillata a pH 6.5. Questo fenomeno è stato attribuito alla presenza dell'acido citrico, che impedisce la ricristallizzazione e quindi la sua precipitazione, ed è stato riconfermato preparando dei complessi di inclusione senza l'acido citrico (Figura 24).

---

[39] S.S.L. Ribeiro, D.C. Ferreira, F.J.B. Veiga., *Physicochemical investigation of the effects of water-soluble polymers on vinpocetine complexation with β-cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivative in solution and solid state*. Europ. J. Pharm. Sci., 20, 253–266 (2003).

Tabella 9. Solubilità della vinpocetina complessata con le ciclodestrine .

COMPLESSO	SOLUBILITA'
VP	5 µg/ml
VP-β-CD	30 mg/ml
VP-SBEβCD-TA	60 mg/ml
VP-SBEβCD-TA-PVP	80 mg/ml

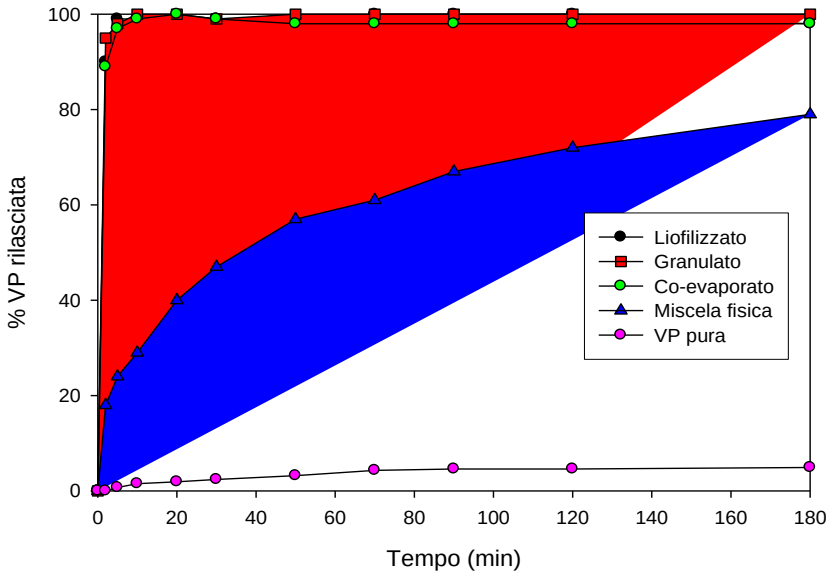


Figura 24. Profili di dissoluzione della vinpocetina (VP), della miscela fisica e dei complessi di inclusione preparati con metodi diversi.

Quest'ultimi, durante il test di dissoluzione, hanno messo in luce il passaggio in soluzione della vinpocetina che successivamente ricristallizza, per la mancanza dell'acido citrico, che ne impedisce la precipitazione (Figura 25) [40].

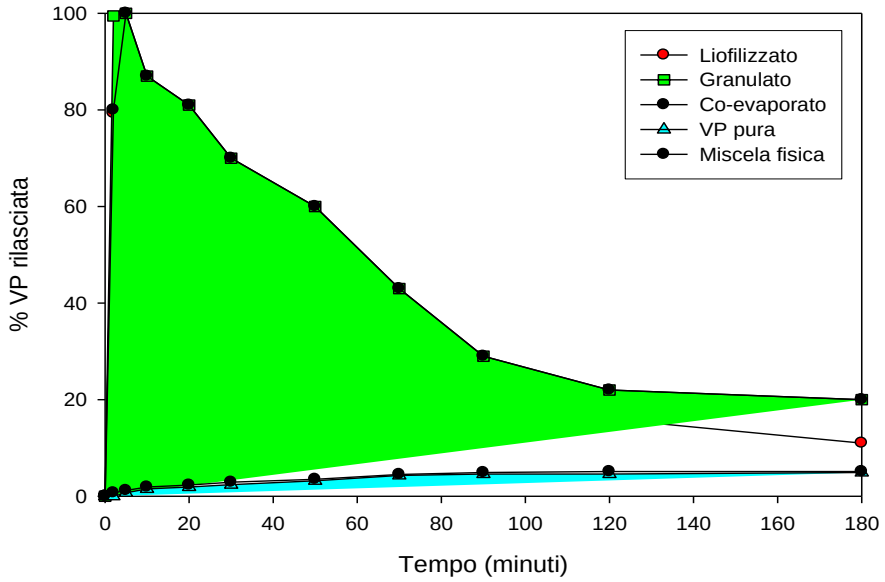


Figura 25. Profili di dissoluzione della vinpocetina e dei complessi in assenza dell'acido citrico.

Per verificare le performance dei complessi di inclusione ottenute in vitro, i complessi **VP-SBEβCD-PVP-TA** sono stati incorporati in una matrice di idrossipropil metil cellulosa e successivamente sottoposti al processo di compressione diretta, ottenendo compresse con un titolo di 20 mg di vinpocetina. Le compresse così ottenute sono state saggiate in vivo e, utilizzando il coniglio come animale modello, sono state somministrate oralmente due compresse corrispondenti alla dose finale di 40 mg di vinpocetina. I parametri farmacocinetici ottenuti sono riportati in Tabella 10 ed i profili ematici sono invece illustrati in Figura 26.

[40] Nie S, Fan X, Peng Y, Yang X, Wang C, Pan W. "*In Vitro and In Vivo Studies on the Complexes of Vinpocetine with Hydroxypropyl-β-cyclodextrin*"., Arch. Pharm. Res., 30, 991-1001, 2007.

Tabella 10. Parametri farmacocinetici ottenuti dopo somministrazione orale di compresse contenenti 40 mg di vinpocetina (n=6 conigli).

Formulazione	C_{max} (ng/ml)	t_{max}(h)	AUC $_{0-\infty}$ (ng*h/ml)	$T_{1/2}$ (h)	Biodisponibilità Relativa (%)
F-A	61,52 ± 10,54	2	518,35 ± 76,47	6,38 ± 1,41	—
F-B	50,9 ± 6,18	1,5	1086,37 ± 248,69	15,46 ± 4,44	209,58
F-C	64,17 ± 5,1	2	1416,26 ± 236,92	14,67 ± 3,55	273,22
F-D	71,19 ± 6,81	2,5	1499,89 ± 150,69	14,85 ± 2,11	289,96

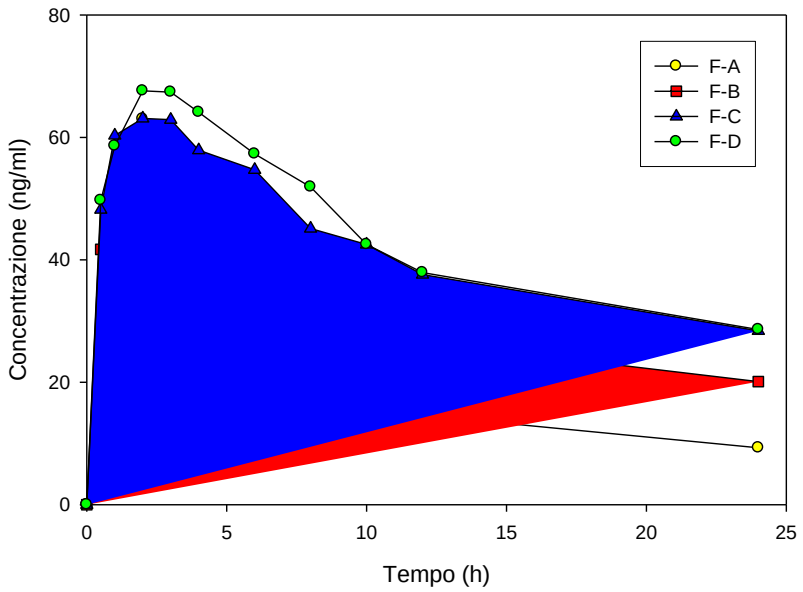


Figura 26. Profili plasmatici della vinpocetina ottenuti dopo somministrazione orale delle formulazioni riportate in tabella 10.

Mentre per quanto riguarda il complesso di inclusione **VP-HP-β-CD-CA,** somministrato in vivo per gavage sempre su conigli, alla dose di 10 mg/kg di principio attivo sospeso in 20 ml di acqua, il profilo plasmatico ed i parametri farmacocinetici ottenuti sono illustrati e riportati rispettivamente in Tabella 11 e Figura 27.

Tabella 11. Parametri farmacocinetici del complesso di inclusione (**VP-HP-β-CD-CA)** e della vinpocetina pura ottenuti dopo una singola somministrazione orale (n=6 conigli).

Sistema	**C_{max} (ng/ml)**	**t_{max} (h)**	**AUC_{0-12} ng*h/ml**	**Biodisponibilità Relativa (%)**
VP pura	208,86 ± 83,96	1.41 ± 0,29	681,61 ± 146,94	—
Complesso di inclusione	482,65 ± 147,76	0,5 ± 0,07	1282,24 ± 265,19	188,118

.

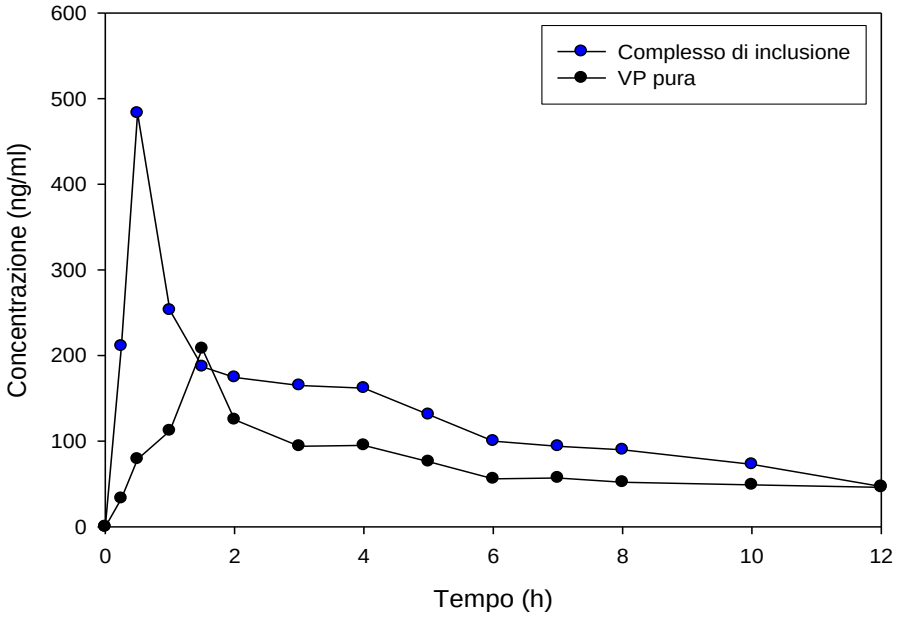


Figura 27. Profili plasmatici della vinpocetina ottenuti dopo una singola somministrazione orale del complesso di inclusione (**VP-HP-β-CD-CA)** e della vinpocetina pura.

3. Parte Sperimentale

3.1. Materiali

- Polisorbato dell'acido laurico (Tween® 80, E433), acido trifluoroacetico concentrato (Sygma Aldrich, Milano);
- Miscela di mono- e digliceridi di acidi grassi C8 e C10 (E471)(Akoline MCM®, Gattefossè, Milano)
- Acidi grassi a catena media C8-12 (Mygliol® 812, Sasol GmbH Olechemicals, Witten, Germania)
- Lecitina di soia (E322), propilenglicole (E1520), poliglicerol-poliricinoleato (E476)(Food Ingredients Service S.r.l., Milano)
- Silibina, Estratto secco di Cardo mariano (silimarina con un titolo del 83% p/p di silibina: 39% silibina A e 44% silibina B p/p Indena® Spa, Milano)
- Vinpocetina (Linnea SA, Riazzino (Locarno) Svizzera).
- Enzima β-glucuronidasi/ariluslfatasi (Helix Pomatia) (Boehringer Manheim, Manheim, Germania)
- Cellulosa microcristallina, Avicel® PH 101 (FMC Corp., Ireland)
- Sodio Croscaramellosio, AcDiSol® (FMC Corp., USA)
- Lattosio monoidrato, GranuLac 200® (Meggle, Wasseburg, Germania)
- Acido acetico 96%, borace, etere dietilico, idrossido di sodio, metanolo,
- quercetina (Carlo Erba Reagenti, Milano)
- olio vegetale (Gallo, Portogallo)

3.2. Preparazione del sistema lipidico solido

3.2.1. Preparazione del sistema auto emulsionante

Da quanto riportato nella parte introduttiva, un sistema autoemulsionante è costituito solitamente da una miscela di tensioattivi e co-tensioattivi e da una fase oleosa. Tale sistema in presenza dei fluidi fisiologici gastrointestinali è in grado di formare delle emulsioni e/o delle microemulsioni, a seconda del rapporto percentuale dei vari componenti. In Tabella 12 sono riportate le differenze tra un'emulsione e una microemulsione[41].

Tabella 12. Differenze tra emulsioni e microemulsioni

Proprietà	Emulsioni	Microemulsioni
Diametro particelle	1.000-20.000 nm	< 200 nm
Stabilità termodinamica	-	+
Formazione spontanea	-	+
Diluizione	-	+
Alta viscosità	+	-
% tensioattivo	Bassa	15 – 70
Aspetto visivo	Lattea, opaca	Isotropica, trasparente
Potere di solubilizzazione	+	++
Scaling-up	-	+
Processo di preparazione	-	+

Per ottimizzare la formulazione del sistema autoemulsionante si è resa necessaria la preparazione di un diagramma di fase ternario a temperatura ambiente.

[41] P.P. Costantinides, J.P. Scalart., *Formulation and physical characterization of water-in-oil microemulsion containing long-versus medium-chain glycerides.* Int. J. Pharm., 158, 57-68 (1997).

Per quanto riguarda la Silimarina per costruire tale diagramma è stata progettata, in base a prove preliminari, una formulazione costituita da: miscela di tensioattivi costituita da polisorbato 80 e lecitina di soia in rapporto 1:0.2 p/p, fase oleosa composta da una miscela di mono- e di gliceridi di acidi grassi C8 e C10 e acidi grassi a catena media C8-12 in rapporto 1:1 p/p e miscela di cotensioattivi costituita da propilenglicole e poligliceril-poliricinoleato in rapporto 1:0.1 p/p. Mentre, per quanto riguarda la Vinpocetina, è stata progettata una formulazione composta da: mono di-gliceride, polisorbato 80, olio vegetale e vinpocetina in rapporto 20:49.4:30:0.6 p/p.

Per verificare se tali sistemi sono in grado di formare una microemulsione a livello fisiologico, è stata utilizzata la tecnica della titolazione con l'acqua in rapporto 1:250 v/v. La scelta di questo rapporto è stata dettata da quanto riportato in letteratura sulla quantità di fluidi presenti nel tratto gastrointestinale umano; a tal riguardo nello stomaco i valori medi corrispondono a 118 ml, nell'intestino tenue 212 ml, nell'intestino crasso 187 ml [42],[43]. Alcuni esempi sono riportati di seguito in Figura 28.

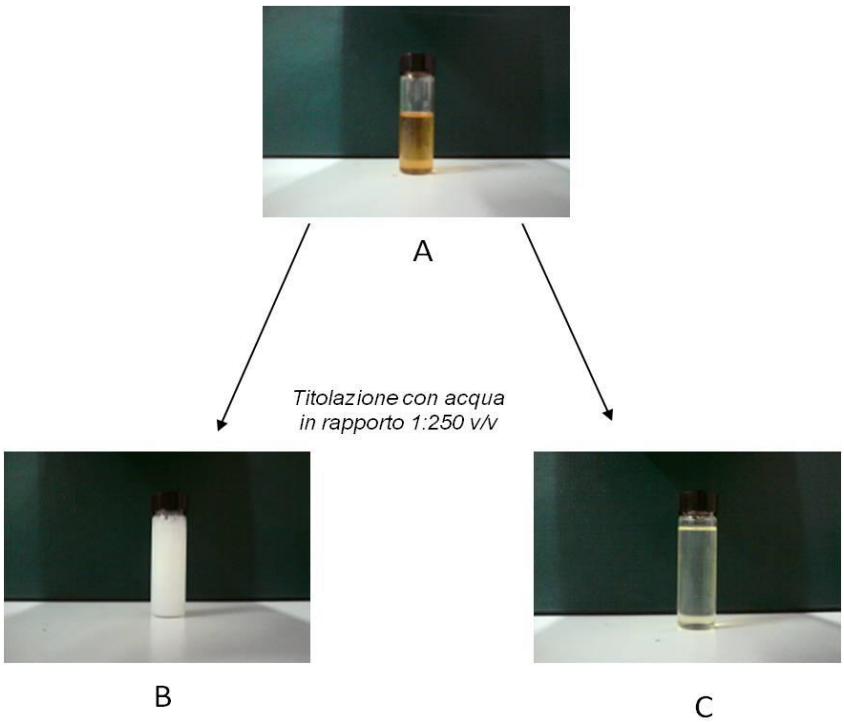


Figura 28. Aggiungendo acqua al sistema lipidico formulato (**A**), si può ottenere emulsioni lattee (**B**) oppure trasparenti (**C**).

[42] E.L. McConnell, H.M. Fadda, A.W. Basit., *Gut instincts: explorations in internal Physiology and drug delivery.* Int. J. Pharm., 364, 213–226 **(**2008).

[43] E.A. Albert, A. Belmonte., *Formulation and in vitro and in vivo characterization of a phenytoin self-emulsifying drug delivery system (SEDDS).* Eur. J. Pharm. Sci. 35, 257-263 (2008).

3.2.2. Determinazione delle dimensioni della fase dispersa con Laser Light Scattering

Le dimensioni delle gocce di microemulsione sono state determinate mediante Coulter N 4 Plus (Coulter Corporation, Miami, Florida, USA)(Figura 29).

Figura 29. Apparecchio per Photon Correlation Spectroscopy, modello Coulter N4 Plus.

Questo strumento utilizza la spettroscopia di correlazione fotonica (PCS) detta anche dynamic light scattering, la quale determina le dimensioni delle gocce misurando la variazione di intensità della luce laser diffratta, provocata dalle stesse al passaggio attraverso un fluido. La caratteristica di questa tecnica non distruttiva permette la misurazione di particelle di dimensione nanometrica. Infatti, per ottenere un'analisi dettagliata dei campioni presi in esame, il Coulter N4 Plus prevede sei angoli fissi di misurazione al fine di prevenire eventuali sovrapposizioni del segnale. La tecnica PCS è applicabile a particelle sospese in un liquido in uno stato di movimento casuale provocato dai moti browniani.

La velocità di movimento è inversamente proporzionale alla dimensione delle particelle (più sono piccole e più velocemente si muovono o diffondono); la velocità può essere determinata analizzando l'intensità della fluttuazione di un raggio laser diffratto dalle particelle. L'intervallo di dimensioni analizzato è compreso fra 40 nm e 3 μm e viene fornita anche la distribuzione dimensionale del campione analizzato [44].

3.2.3. Apparecchiatura utilizzata per gli studi preformulativi di estrusione

Per la preparazione dei pellets è stato utilizzato un coestrusore a pistone sperimentale con stampo interno intercambiabile (Lloyd Instruments LR 50K, UK Load cell instruments 50kN) (Figura 30)[45].

Figura 30. Coestrusore a pistone Lloyd Instruments LR 50K, UK Load cell instruments 50 kN.

[44] E.W. Vervey, J.Th.G. Overbeek., *Theory of the stability of liophobic colloids.* Elsevier, Amsterdam (1948).

[45] F. Pinto, M.H. Lameiro, P. Martins., *Investigation on the co-extrudability and spheronization properties of wet masses.* Int. J. Pharm., 227, 71-80 (2001).

Si tratta di un'apparecchiatura adatta all'uso per il laboratorio di ricerca e sviluppo in quanto è possibile eseguire le numerose prove, necessarie per la messa a punto di una formulazione o di un processo, utilizzando quantità relativamente modeste di prodotti.
Le operazioni di processo e di pulizia risultano inoltre più agevoli.
Il coestrusore a pistone è formato da due cilindri cavi concentrici d'acciaio inox, uno interno e uno esterno.
La sezione trasversale del cilindro interno ed esterno è rispettivamente di 122 e 1047 mm^2.
Il cilindro interno ed esterno vengono entrambi riempiti con la massa umida, pressata manualmente per aumentare la resa.
Alla testa di questi cilindri vengono collocati due stampi intercambiabili anch'essi di acciaio inox. I due cilindri d'acciaio vengono introdotti manualmente e i due pistoni, uno per ogni cilindro, pressano la massa attraverso gli stampi con la stessa forza d'estrusione.
Lo stampo esterno è stato progettato con un diametro esterno di 5.0 mm con una cavità interna di 4.0 mm (la sezione trasversale è di 6.7 mm^2), mentre lo stampo interno ha una diametro di 1 mm (la sezione trasversale è di 0.8 mm^2). Una rondella di gomma tra cilindro e stampo e tra gli stampi garantisce una buona aderenza e tenuta d'acqua. Lo stampo interno presenta sia un foro centrale, attraverso cui passa la massa presente nel cilindro interno, sia otto fori, disposti in modo circolare attorno al foro centrale, attraverso cui passa la massa presente nel cilindro esterno. Il materiale in tal modo confluisce attraverso lo stampo esterno dove estrusi interni ed esterni si uniscono per dare un coestruso. Una rappresentazione schematica della testa dell'estrusore è data nella Figura 31.
Il tutto è fissato ad una struttura rigida di circa 1.80 m in altezza, la cui parte superiore è mobile e, man mano che scende, a velocità fissata, esercita una pressione sul pistone, quindi, sul cilindro che provoca l'estrusione e/o coestrusione del materiale attraverso lo stampo.
L'apparecchiatura fin qui descritta è collegata ad un registratore, in modo da valutare la relazione che intercorre tra la forza di estrusione e lo spostamento del pistone, nella camera di estrusione, richiesta dai diversi sistemi formulativi.
Con questo strumento è stato possibile, quindi, ottenere singoli estrusi (con il cilindro e lo stampo interno), estrusi tubolari (cilindro esterno e stampo appropriato) e coestrusi (cilindri e stampi interno ed esterno).

La produzione degli estrusi avviene utilizzando solo il cilindro interno del coestrusore. Sono state effettuate diverse prove d'estrusione ottenendo così semplici estrusi che sono stati poi sferonizzati, per 20 minuti, e successivamente essiccati per 35 minuti alla temperatura di 60°C (Figura 32).

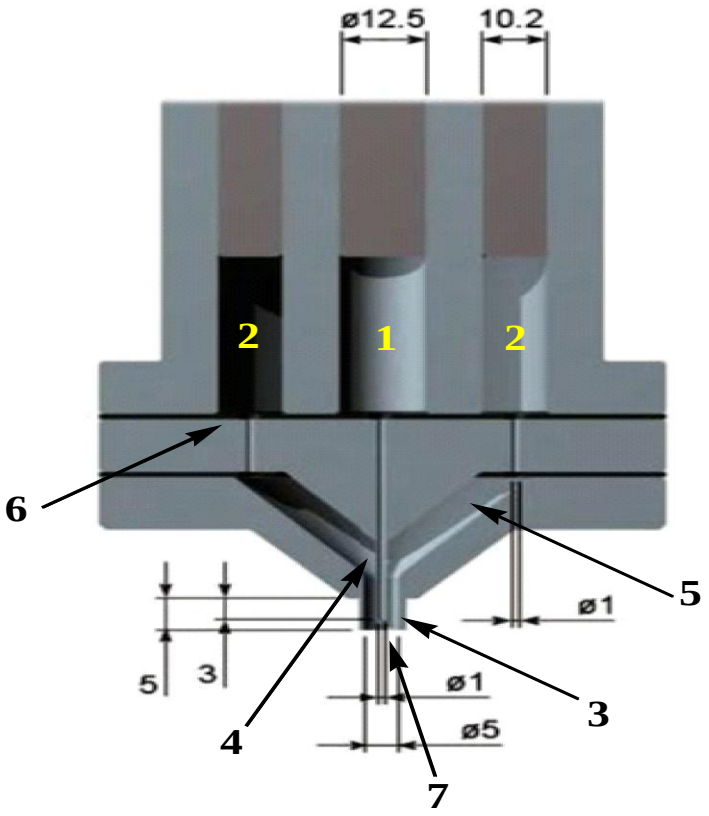


Figura 31. Rappresentazione schematica della testa dell'estrusore a pistone utilizzata: (1) Cilindro interno con pistone interno; (2) Cilindro esterno con pistone esterno; (3) Stampo esterno; (4) Stampo interno; (5) Area di estrusione della massa esterna; (6) Fori di connessione presenti nello stampo interno; (7) Area d'uscita dell'estruso e/o coestruso.

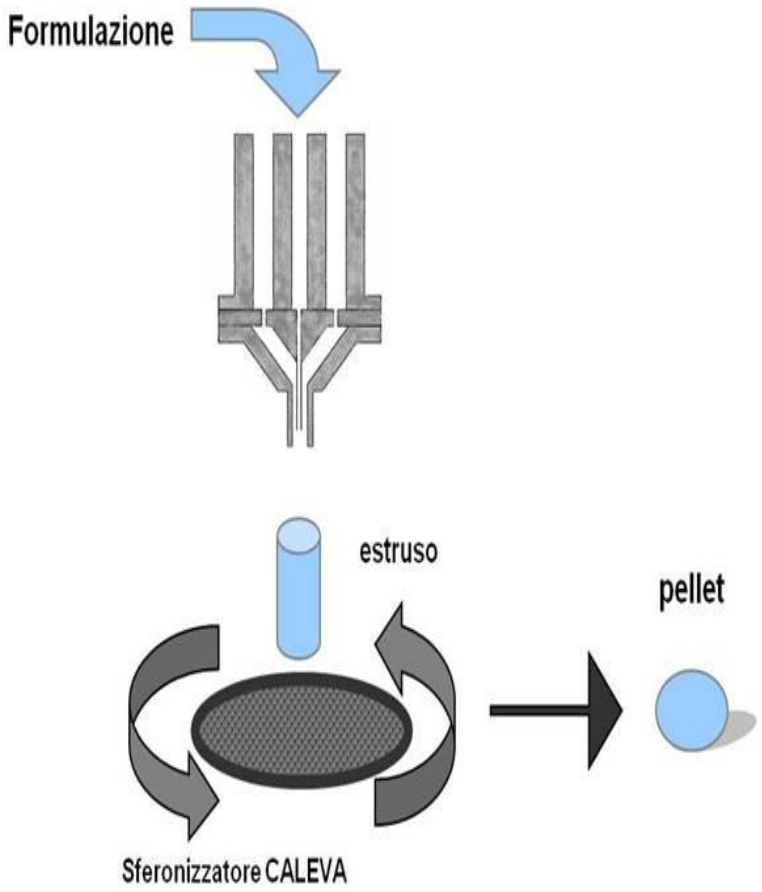


Figura 32. Diagramma di flusso per la preparazione di pellets.

3.3. Preparazione dei pellets

Per individuare le condizioni ideali di formazione dei pellets, sono state effetuate alcune prove preliminari, variando il carico, la velocità di estrusione e le forze di estrusione applicate. Sulla base dei risultati ottenuti, gli esperimenti successivi sono stati usati impiegando un carico totale di massa umida di 150 grammi.
Le fasi della preparazione dei pellets possono venir suddivisi in:

- Miscelazione

Le polveri, in questo caso lattosio monoidrato e cellulosa microcristallina, vengono miscelate in un miscelatore planetario (Kenwood Chef, UK) per 20 minuti.

- Bagnatura

Il sistema autoemulsionante formato viene miscelato con il 10% in peso di acqua e spruzzato sulla miscela delle polveri usando un nebulizzatore manuale, per permettere un omogeneo adsorbimento. La velocità di miscelazione viene mantenuta costante per poter ottenere miscele con una bagnatura uniforme e caratteristiche plastiche che né permettano una facile estrusione e sferonizzazione.

- Estrusione

Dopo una bagnatura omogenea si avanza con il processo di estrusione. La massa umida ottenuta viene introdotta nella camera di estrusione e pressata manualmente per aumentarne la compattezza. Poi vengono fissati gli stampi e viene fatto scendere il pistone che comprime la massa e la fa uscire dando origine all'estruso.

- Sferonizzazione

Gli estrusi vengono sferonizzati su un piatto rotante, utilizzando uno sferonizzatore CALEVA modello 230 (UK), alla velocità di 1000 rpm per 20 minuti.

- Essicamento e conservazione

Le sferette formate vengono raccolte ed essicate in essicatore a letto fluido (Aromatic Fielder AG) per 35 minuti a 45°C, fino al raggiungimento di un peso costante. Il prodotto finito viene conservato in sacchetti di poletilene ben chiusi, lasciandolo stagionare per 14 giorni prima di sottoporlo a caratterizzazione.

3.4. Caratterizzazione dei pellets

3.4.1. Analisi granulometrica

Per l'analisi granulometrica è stata usata una setacciatrice Endocottos Octagon 200, provvista di 5 setacci impilati in acciaio inossidabile con maglie di 2000, 1250, 800, 720, 500 e 400 μm, connessa ad un'apparecchiatura vibrante ERWEKA AR 400.
L'analisi viene fatta posizionando 150 grammi di prodotto nel primo dei setacci della batteria, che viene fatta vibrare a 7/10 dell'ampiezza massima per 20 minuti. Le frazioni trattenute dai diversi setacci e quella raccolta sul piatto di fondo vengono pesate e successivamente vengono calcolate percentuali cumulative (p/p) trattenute sui setacci stessi, rispetto alla quantità totale setacciata.

3.4.2. Studi morfologici

I campioni sono stati rivestiti tramite spruzzo Au/Pd sotto vuoto spinto (Edwards Milano, Italia) e la superficie degli sferoidi è stata esaminata mediante l'utilizzo del microscopio a scansione elettronica Philips 500 (Eindhoven, Olanda).

3.4.3. Determinazione della densità vera

La densità vera dei pellets è stata determinata con il Multipicnometro della Quantachrome Corporation/Nordest srl.
La tecnica di misurazione della densità vera con questo strumento utilizza il principio secondo il quale un corpo solido sposta una quantità di fluido pari al suo volume.
Il fluido in questo caso è rappresentato da un gas; il più raccomandato è l'elio, poiché le sue ridotte dimensioni atomiche gli permettono di penetrare facilmente attraverso i pori e le fessure del corpo solido in esame.
L'elio ha anche il vantaggio di avere un comportamento analogo ai gas ideali, facilitando così la metodica analitica visto che questo metodo si basa proprio sulla legge dei gas ideali.

La determinazione della densità dei campioni, con il Multipcnometro, viene effettuata andando a valutare la differenza di pressione che si verifica quando una quantità di elio, a pressione nota, viene fatta fluire da una cella di riferimento a volume noto, ad una cella contenente una quantità nota di campione solido.
La prima operazione, dopo aver introdotto il campione in quantità nota, consiste nel purgare il sistema con elio in maniera da eliminare eventuali residui di ossigeno; successivamente la cella portacampioni viene portata a pressione ambiente.

$$p_a(V_c - V_p) = n_a R T_a \qquad \text{Eq. 1}$$

dove:
p_a = pressione atmosferica
V_c = volume della cella porta campioni
V_p = volume della polvere
n_a = numero di moli di gas occupanti il volume della cella portacampione in presenza della polvere
R = costante dei gas perfetti
T_a = temperatura ambiente.

Successivamente viene fatto entrare l'elio nella cella di riferimento, fino a raggiungere una pressione di 17 PSI al di sopra di quella atmosferica. A questo punto la cella di riferimento si trova nelle condizioni descritte nell'equazione:

$$p_1 V_r = n_1 R T_a \qquad \text{Eq. 2}$$

Dove:
p_1 = pressione della cella di riferimento
V_r = volume della cella di riferimento
n_1 = numero di moli di gas contenute nel volume V_r.

Quando la cella di riferimento viene messa in comunicazione con la cella porta campioni, la pressione scenderà ad un valore p_2, in quanto aumenta il volume totale a disposizione del gas. L'equazione dei gas ideali in queste nuove condizioni sarà:

$$p_2 (V_c - V_p + V_r) = (n_a + n_1)RT_a \qquad \text{Eq. 3}$$

dove:
$(V_c - V_p + V_r)$ = volume occupato dal gas in queste nuove condizioni
$(n_a + n_1)$ = numero di moli totali di gas presenti in questo nuovo volume.

Combinando le equazioni 1, 2, 3 e riarrangiando otteniamo che:

$$V_c - V_p = (p_1 - p_2) / (p_2 - p_a) \times V_r$$

Dato che l'azzeramento corrisponde alla pressione atmosferica, l'equazione può essere ulteriormente semplificata, per ottenere:

$$V_p = V_c - V_r \left(\frac{p1}{p2} - 1\right)$$

Dove:
V_c e V_r sono noti (13.91 cm^3 e 6.33 cm^3 rispettivamente) e valori di p_1 e p_2 vengono letti dallo strumento. In queste condizioni possiamo calcolarci il volume vero del campione (V_p), escludendo cioè gli spazi tra le particelle, e dei pori presenti nelle singole particelle.

Per ottenere la densità vera, espressa in g/cm^3, basterà dividere il peso del campione di solido utilizzato per il suo volume:

densità vera = g di povere / volume vero (V_p)

3.4.4. Test di disaggregazione

Il saggio di disaggregazione è stato effettuato per verificare se i pellets si disaggregano entro un periodo sufficientemente accettabile, tale da garantire un impiego farmaceutico di facile attuazione. Per quanto concerne le forme farmaceutiche solide non rivestite, il tempo massimo di disaggregazione previsto è di 15 minuti.

La disaggregazione viene raggiunta quando nessun residuo rimane sulla rete del cestello. Se c'è residuo deve essere costituito da una massa molle; rimangono solo frammenti del rivestimento o solo frammenti sulla rete del cestello.

La parte principale dell'apparecchio è costituita da un sistema rigido a cestello che sostiene sei tubi cilindrici in vetro lunghi 77.5 ± 2.5 mm, del diametro interno di 21.5 mm, con pareti dello spessore di circa 2 mm. Ciascun tubo è dotato di un disco cilindrico realizzato in plastica trasparente con densità relativa di 1.18 – 1.20.

Ogni disco ha cinque fori del diametro di 2 mm, uno al centro e gli altri quattro disposti regolarmente su un cerchio del raggio di 6 mm dal centro del disco.

La superficie laterale del disco presenta quattro scanalature equidistanti tagliate in modo tale che sulla superficie superiore del disco siano 9.5 mm di larghezza e di 2.55 mm di profondità e nella parte inferiore 1.6 mm^2.

Nel nostro caso sono stati modificati i dischi, applicando una retina con un'apertura delle maglie pari a 400 µm, in modo tale da poter analizzare tutte le frazioni moda dei nostri composti.

I tubi sono tenuti verticali da due dischi di plastica trasparenti, separati e sovrapposti, di 90 mm di diametro e 6 mm di spessore, con sei fori equidistanti sia dal centro del disco che tra di loro. Sotto il disco inferiore è fissata una rete metallica di filo d'acciaio inossidabile con apertura delle maglie di 2 mm.

I dischi sono tenuti rigidamente in posizione da barre metalliche verticali situate nella parte periferica. Il cestello, tramite un braccio metallico, è collegato superiormente ad un dispositivo meccanico in grado di alzarlo e abbassarlo in modo uniforme ad una frequenza costante compresa tra 28 e 32 cicli per minuto per un'ampiezza di 50-60 mm. Il sistema è sospeso nel liquido contenuto in un becker da un litro.

Il volume del liquido è tale che, quando il cestello è nella posizione più bassa, la rete è almeno 25 mm sopra la base del becker e le estremità superiori aperte dei tubi rimangono sopra la superficie del liquido. Tutto il sistema viene termostatato a circa 36-38°C.

Si introducono in ciascuno dei sei tubi circa un grammo di pellets e si posiziona il disco al di sopra di essi; quindi si sospende il sistema nel becker contenente acqua a 37°C.
Successivamente si mette in funzione l'apparecchio e si calcola il tempo necessario affinché il materiale solido (pellets) sia completamente disaggregato.

3.4.5. Test di compressione

Il test di compressione dei pellets è stao effettuato usando L'apparecchio CT5 (Engineering Systems, Nottingham UK) che presenta una cella di carico di 5 Kg e una velocità di 1.0 mm/min.
Per ogni formulazione 7 pellets sono stati analizzati e su ogni prova è stato possibile osservare la variazione della loro froma in seguito all'applicazione di una forza.

3.4.6. Test di dissoluzione in vitro

Per determinare la velocità di dissoluzione del farmaco modello dalle formulazioni prese in esame, è stato utilizzato il dissolutore a paletta.
Gli studi di dissoluzione sono stati eseguiti utilizzando come mezzo di dissoluzione acqua distillata a 37 °C.
L'apparecchio è costituito da:

- Un recipiente cilindrico di vetro borosilicato trasparente a fondo emisferico (vessel) dalla capacità di 1000 mL, un coperchio fissato in modo tale da ritardare l'evaporazione. Il coperchio ha un foro centrale per l'inserimento dell'albero agitatore ed altri orifizi per l'introduzione del termometro e di dispositivi per il prelievo di liquido;
- Un agitatore costituito da un albero verticale, alla cui estremità inferiore è fissata una paletta avente la forma di una sezione di cerchio sottesa a due corde parallele; la paletta è posizionata centralmente all'estremità inferiore all'albero; l'albero è posto in modo tale che l'asse si mantenga entro i 2 mm dall'asse del recipiente e che la parte inferiore della paletta sia alla distanza di 25 ± 2 mm dal fondo interno del recipiente. La parte superiore dell'albero è collegata ad un motore munito di un regolatore di velocità; l'agitatore ruota in modo uniforme senza vibrazioni apprezzabili;

- Il bagnomaria, che permette di mantenere il mezzo di dissoluzione a 37 ± 0.5°C.

Per realizzare la prove di dissoluzione 3 g di pellet sono stati versati direttamente all'interno del vessel, previamente riempito con 500 mL di acqua distillata a pH 7.4 portata ad una temperatura di 37°C.

Un volume pari a 1,5 ml della sospensione è stato prelevato dopo 5, 10, 30, 60 minuti di incubazione, e per ogni campione la prova è stata ripetuta tre volte, assumendo come valido il valore delle tre determinazioni.

3.5. Studi in vivo

3.5.1. Silimarina: fitocomplesso del Cardo Mariano

Gli studi in vivo sono stati eseguiti su ratti di tipo Wistar, del peso standard di circa 450 g, seguendo la tecnica della "cinetica a blocchi" somministrando SES caricati su pellets ed estratto secco.

Una singola dose di pellets è stata dispersa in 2 ml di soluzione fisiologica (0.9% NaCl) contenente 18.78 mg di Silibina A e 35.5 mg di silibina B (dose totale di silibina 54.28 mg) e somministrata direttamente nel lume duodenale nel ratto mantenuto a digiuno.

Nel gruppo di controllo sempre con la stessa metodica è stata somministrata una sospensione acquosa dell'estratto secco contenente 25.41mg di silibina A e 28.66 mg si silibina B (dose totale di silibina 54.07 mg).

L'assorbimento per via linfatica è stato valutato mediante incanulazione diretta del dotto toracico vicino alla sua confluenza con la cisterna del chili. Un secondo catetere è stato inoltre inserito nella vena giugulare per prelevare contemporaneamente anche i campioni plasmatici. Il vantaggio di questa tecnica è il fatto di poter contemporaneamente prelevare plasma e raccogliere linfa dallo stesso animale[46]

A tempi determinati di 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240 e 360 minuti dalla somministrazione sono stati prelevati campioni di 500 µl di plasma che successivamente sono stati centrifugati a 1500 rpm per 10 minuti..

[46] T. Iosio, D. Voinovich, B. Perissutti, F. Serdoz, D. Hasa, I. Grabnar, S. Dall'acqua, G. P. Zara, E. Muntoni, J. Pinto., *Oral bioavailability of Silymarin phytocomplex formulated as self-emulsifying pellets.* Phytomedicine. http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2010.10.012

Mentre i campioni linfatici sono stati raccolti dalla cisterna del chili rispettivamente nei tempi di 0-30, 30-60, 60-90, 90-120,120-210, 210-240, 240-260 minuti dalla somministrazione.

I campioni di plasma e di linfa così ottenuti sono stati immediatamente congelati a -20 °C fino al momento dell'analisi, effettuata con cromatografia liquida accoppiata alla massa (LC-MS/MS).

3.5.2. Determinazione del contenuto di silibina nell'estratto secco, nel SES e nei pellets

Per la determinazione dei flavolignani nell'estratto secco, nel SES e nei pellets è stato adottata la seguente procedura: una quantità delle diverse formulazioni è stata accuaratamente pesata e trasferita in un pallone di volume pari a 25 ml. La soluzione così ottenuta è stata quindi sonicata per 10 minuti e filtrata attraverso filtri siringa (25 mm, 0.45 μm) e quantificata sempre mediante LC-MS/MS .

3.5.3 Preparazione dei campioni plasmatici e linfatici

Per la determinazione della silibina libera, è stato sufficiente aggiungere ad ogni campione di quantità pari a 50 μl di plasma e 50 μl linfa: 750 μl di etere e 50 μl di standard interno (quercetina - 25 μg/ml) per poi procedere con il metodo di estrazione. Di seguito si miscela per 10 min col vortex e si lascia a riposo per 5 minuti. Dopo 15 minuti lo strato etereo viene trasferito in provetta e portato a secco in concentratore centrifugo. Il residuo risultante viene ripreso in 20 μl di metanolo. La soluzione così ottenuta (10 μl) viene iniettata in HPLC-MS. La stessa metodica è stata utilizzata per la determinazione della silibina libera nei campioni plasmatici umani, utilizzando però campioni di quantità pari a 500 μl di plasma, 5 ml di etere e 50 μl di standard interno per poi procedere con il metodo di estrazione.

Per l'analisi della silibina totale nel plasma umano sono stati impiegati 500 μl di plasma per ogni campione, aggiungendo:

- ✓ 900 μl di soluzione tampone sodio acetato a pH 5,6 (soluzione ottenuta sciogliendo 137 g di sodio acetato al 96% in 1000 ml di acqua distillata);
- ✓ 100 μl di soluzione di enzima β-glucuronidasi (pesati 8 mg e portati a 10 ml con tampone acetato, comportando la sua attivazione).

La miscela viene agitata per circa 5 min, e lasciata successivamente reagire a 37° C per 4 ore.
Quando la reazione volge al termine, si addizionano:
- 2.0 ml di una soluzione di tampone borato 1 M a pH 8.5 (soluzione ottenuta sciogliendo 100,5 g di borace in 500 ml di acqua);
- 50 µl di soluzione di standard interno (alla concentrazione di 50 µg/ml).

3.5.4. Condizioni per l'analisi cromatografica

L'analisi quantitativa della silibina è stata condotta utilizzando un cromatografo Varian LC212 con rivelatore di massa 500-MS. Il volume di ciascuna iniezione è stato di 10 µl.
La separazione cromatografica è stata ottenuta utilizzando una colonna Agilent XDB C-8 (5µm, 2.1x150mm). Come fase mobile è stata utilizzata una miscela di acqua (contenente 0,1% di acido formico) e metanolo sotto condizioni di gradiente, ad un flusso di 200 µL/min. L'eluizione è stata effettuata passando dal 65% di acqua e 35% di metanolo nei primi 32 minuti, al 55% di acqua e 45% di metanolo nei 3 minuti successivi per poi concludersi con il 100% di acqua nei 5 minuti finali.
Il tempo di corsa era di 40 minuti e i tempi di ritenzione di quercetina (m/z 301) e di silibina A e B (m/z 481) rispettivamente 17, 19, e 20 minuti.
La soluzione madre di standard interno (quercetina), è stata preparata pesando 5 mg e portandoli a volume con metanolo in un matraccio da 200 ml. È stata così ottenuta una soluzione alla concentrazione di 25 µg/ml.

Per allestire la soluzione standard, utilizzata nell'analisi dei campioni, volumi scalari di una soluzione madre di silibina A e B (alla concentrazione di 40 µg/ml) sono stati trasferiti in matracci da 10 ml assieme ad 1 ml della soluzione di standard interno (in modo da ottenere un range di concentrazioni che vada dai 0,50 ai 3 µg), il tutto è stato poi portato a volume con metanolo. Si è ottenuta così la retta di taratura ($y = 0,2332x - 0,0024$ con un coefficiente di correlazione $R^2 = 0,99$).

Per allestire la soluzione standard nel plasma invece, volumi scalari della soluzione madre di silibina A e B sono stati trasferiti in delle eppendorf contenenti 500 µl di plasma e 50 µl della soluzione di standard interno (in modo da ottenere un range di concentrazioni di silibina che vada dai 2 ng ai 1,7 µg). I campioni così ottenuti sono stati poi estratti come descritto precedentemente ottenendo in tal modo la retta di taratura ($y = 0,4701\ x – 0,0009$ con un coefficiente di correlazione $R^2 = 0,99$).

In Figura 33 sono rappresentati i cromatogrammi in metanolo della quercetina e della silibina A e B e i rispettivi spettri di massa mentre nella Figura 34 è riportato un cromatogramma relativo ad un campione plasmatico umano.

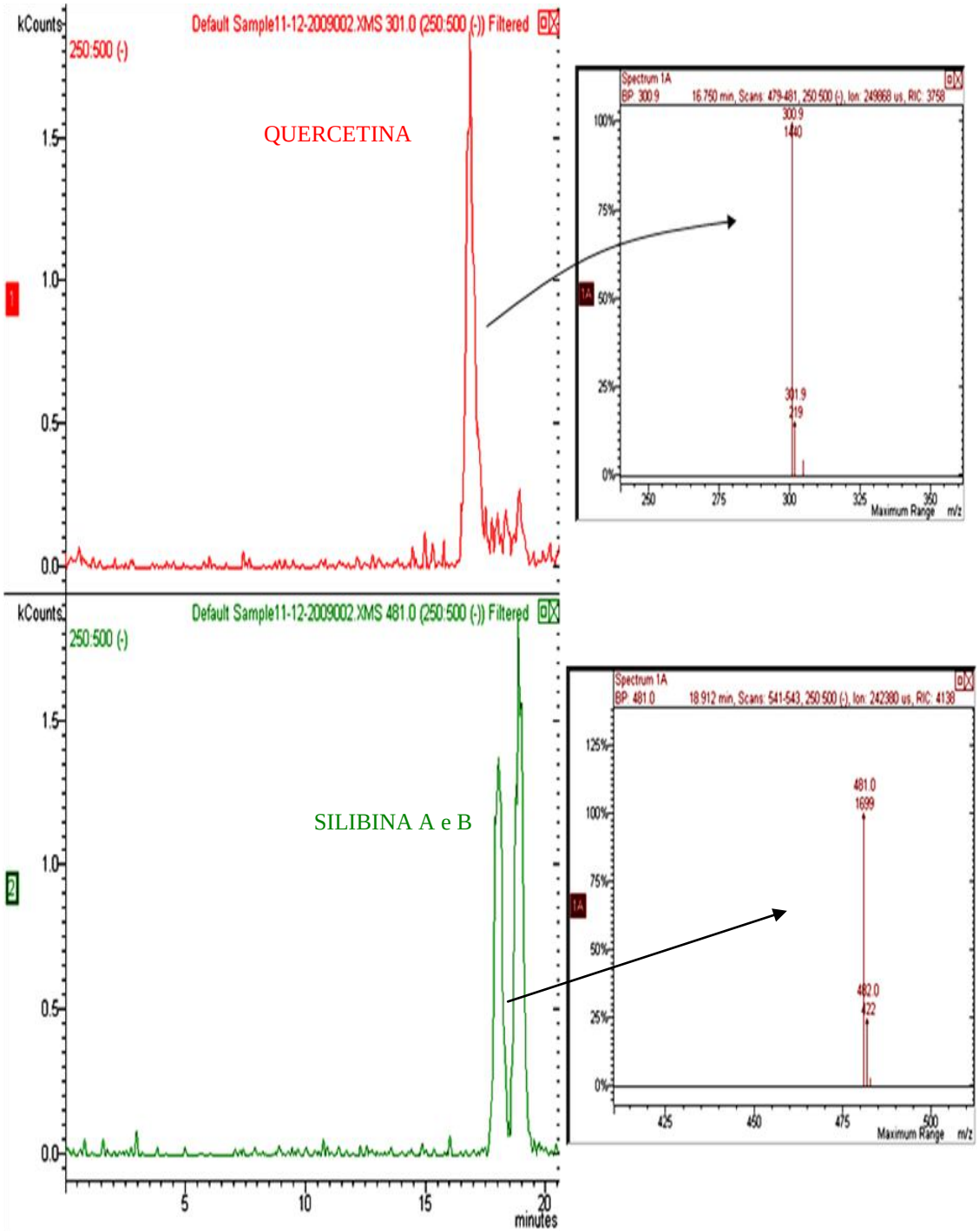


Figura 33. Cromatogramma della quercetina (rosso) e della silibina A e B (verde) con il rispettivo spettro di massa.

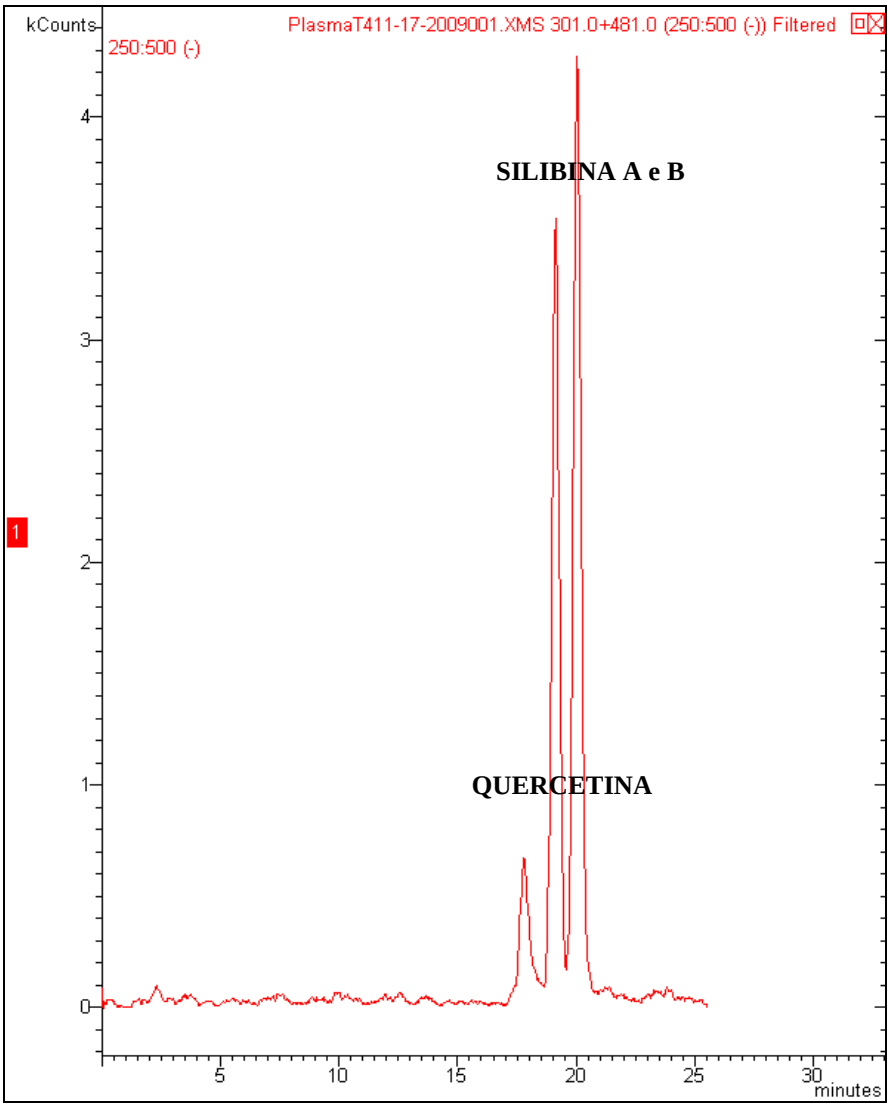


Figura 34. Cromatogramma relativo a un campione di plasma umano.

3.6. Vinpocetina

Anche per la Vinpocetina gli studi in vivo sono stati eseguiti su ratti maschi di tipo Wistar, del peso 450 grammi; utilizzando 4 ratti per ogni formulazione. Tenendo conto delle variazioni di peso di ogni singolo ratto, a ciascuno di essi è stata somministrata, mediante intubazione gastrica (Figura 35), una quantità equivalente a 40 mg/kg di principio attivo. Ciascun gavage è stato eseguito con 2 ml d'acqua e successivo lavaggio con 1 ml d'acqua. A tempi determinati di 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 240 minuti dalla somministrazione sono stati prelevati campioni di 600 µl di plasma dall'aorta addominale.

Ciascun campione prelevato è stato successivamente centrifugato a 1500 rpm per 10 minuti.
Il plasma così ottenuto è stato immediatamente congelato a -20° C fino al momento dell'analisi, effettuata con cromatografia liquida accoppiata alla massa (LC-MS/MS).

Figura 35 . Intubazione gastrica.

3.6.1. Determinazione del contenuto di vinpocetina nei pellets

Prima di effettuare le prove in vivo, le diverse formulazioni testate (sospensione e pellets) sono state titolate per valutare l'effettiva quantità di vinpocetina incorporata. In un matraccio da 100 ml è stata posta una quantità di formulato tale da contenere 5 mg teorici di vinpocetina e portando a volume con acetonitrile ottenendo così un titolo rispettivamente di 4.6 e 19.8 μg/ml.

3.6.2. Trattamento dei campioni plasmatici e metodo di analisi per la vinpocetina.

Prima di procedere con l'analisi quantitativa è stato necessario effettuare l'estrazione del campione dal plasma. A questo scopo, è stato utilizzato come solvente di estrazione il metanolo: 200 μl di plasma sono stati addizionati a 600 μl di metanolo.
Il campione è stato quindi agitato su vortex e centrifugato a 5000 rpm per 6 minuti.
5 μl di questa soluzione sono stati quindi iniettati direttamente in un Cromatografo Varian LC212 con rivelatore di massa 500-MS. La separazione cromatografica è stata ottenuta, a temperatura ambiente, mediante una colonna Varian C18 Polaris (3 μm, 2.0

x 50mm). E' stata utilizzata come fase mobile: acetonitrile e acqua (contenente 0,1 % di acido formico) sotto condizioni di gradiente ad un flusso di 200 µl/min. L'eluizione è stata effettuata con 84% di acqua e il 16% di acetonitrile per i primi due minuti, e successivamente, il 43% di acqua e il 57% di acetonitrile. Il tempo di corsa era di 4 minuti. Per la quantificazione è stata costruita una retta di taratura (y = 79985 x + 271796 con un coefficiente di correlazione R^2 = 0,99) sulla base delle concentrazioni nominali (28.48-142.4 ng/ml). La reazione di transizione di massa presa in considerazione per la determinazione e la quantificazione della vinpocetina era la seguente: m/z 290-390.

Nella figura 36 è riportato un cromatogramma relativo ad un campione plasmatico di ratto.

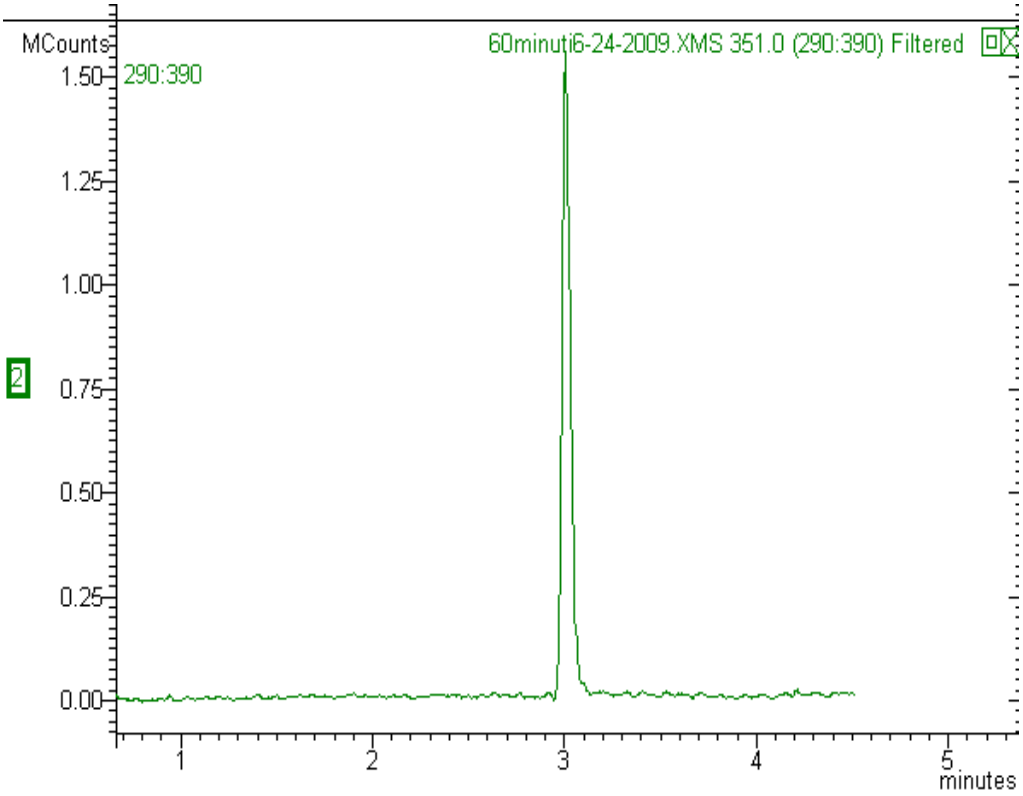


Figura 36. Cromatogramma relativo alla vinpocetina in un campione di plasma

4. Risultati e Discussioni

Gli "sferodi" o "pellets" sono definiti, in tecnica farmaceutica, come una forma di dosaggio costituita da granuli sferici dalle dimensioni uniformi, con un diametro compreso fra 200 e 3000 μm; di quest'ultimi le dimensioni più diffuse sono comprese tra 500 e 1000 μm[47].

Nell'ambito delle preparazioni farmaceutiche di morfologia solida i pellets assumono particolare rilievo per la loro versatilità d'impiego e multifunzionalità al tempo stesso. Normalmente vengono introdotti in capsule di gelatina dura piuttosto che compressi, poiché le loro dimensioni ridotte garantiscono un transito facilitato attraverso l'antro pilorico e quindi un raggiungimento immediato dell'intestino. Questo permette di evitare la ritenzione, per un periodo incontrollato di tempo, della forma farmaceutica e di ottenere un migliore pattern di rilascio. Inoltre la forma rotondeggiante li rende ideali per un rivestimento con polimeri semi-permeabili in modo tale da ottenere un rilascio controllato del principio attivo ivi contenuto. Dal punto di vista tecnologico gli sferoidi presentano ottime caratteristiche di flusso, che agevolano la fase di riempimento delle capsule e che permettono inoltre di adattare facilmente la quantità di farmaco nell'unità di dosaggio, utilizzando capsule di diverse dimensioni o variando il peso del riempimento, senza dover riformulare il prodotto. Queso lavoro di dottorato è stato incentrato dapprima nell'allestimento di un sistema autoemulsionante (SES) liquido, e successivamente sono stati condotti degli esperimenti al fine di individuare la composizione ottimale delle formulazioni. Pertanto sono state identificate, dopo prove preliminari, le composizioni e i rapporti dei singoli componenti presenti nelle formulazioni ed in seguito è stato messo a punto il processo di estrusione per l'ottenimento degli estrusi.

4.1. Silimarina (fitocomplesso del Cardo Mariano)

Per quanto riguarda tutto il processo di produzione della **silimarina** il primo passo è stato quello di preparare la miscela di tensioattivi, essa infatti è costituta rispettivamente da polisorbato 80 e lecitina di soia in rapporto 1:0.2 p/p, la fase oleosa è composta da

[47] K.E. Fielden, J.M. Newton. R.C. Rowe., *The effect of lactose particle size on extrusion properties of microcrystalline/lactose mixtures*. J. Pharm. Pharmacol., 41, 217-221 (1989).

una miscela di mono- e di gliceridi di acidi grassi C8 e C10 e acidi grassi a catena media C8-12 in rapporto 1:1 p/p ed infine la miscela di cotensioattivi è costituita da propilenglicole e poligliceril-poliricinoleato in rapporto 1:0.1 p/p successivamente indicati come X_1, X_2 e X_3.

In seguito, dopo aver determinato la composizione e i rapporti di X_1, X_2 e X_3, gli studi sono stati incentrati sull'identificazione delle percentuali di ciascun componente, al fine di trovare i rapporti necessari per formare un sistema lipidico ottimale. Tali limitazioni ci hanno permesso di ottenere la massima solubilizzazione dei principali flavolignani presi in esame. Questa solubilizzazione è stata ottenuta aggiungendo ad ogni singolo sistema lipidico un eccesso di estratto secco, sottoponendo in seguito ad agitazione per 24 ore a temperatura ambiente, e centrifugando poi a 1500 rpm per 15 minuti. La soluzione lipidica ottenuta aveva un titolo, determinato mediante HPLC, di 150 mg/mL di flavolignani (68 mg/mL di silibina A, 45,37 mg/mL di silibina B).

Tabella 13. Design sperimentale per la miscela a tre componenti sottoposta a delle limitazioni.

N° Prova	Random	X_1 (%)	X_2 (%)	X_3 (%)	Aspetto visivo
1	14	65	15	20	Emulsione lattea
2	9	55	5	40	Gel
3	16	45	15	40	Gel
4	8	70	10	20	Emulsione lattea
5	1	70	5	25	Gel
6	12	55	15	30	Gel
7	15	67,5	12,5	20	Emulsione trasparente/gel
8	5	50	10	40	Emulsione lattea
9	6	62,5	5	32,5	Emulsione lattea
10	7	70	7,5	22,5	Gel
11	4	61	10	29	Gel
12	3	63	12,5	24,5	Emulsione trasparente/gel
13	10	58	7,5	34,5	Gel
14	2	53	12,5	34,5	Emulsione lattea
15	11	65,5	10	24,5	Emulsione trasparente
16	13	65,5	7,5	27	Emulsione trasparente/gel

Limtazioni: $45\% \leq X1 \leq 70\%$, $5\% \leq X2 \leq 15\%$, $20\% \leq X3 \leq 40\%$.

Le prove sperimentali sono state progettate utilizzando il disegno per miscele effettuando un'analisi puntiforme con l'utilizzo del programma NEMRODW [48].

Le sedici prove sperimentali progettate al fine di ottenere una microemulsione acqua in olio, sono riportate nel diagramma ternario della Figura 37, e le relative concentrazioni sono riportate in Tabella 13.

Tutti e sedici i sistemi lipidici progettati sono stati successivamente miscelati con acqua distillata in rapporto 1:250 v/v e sottoposti a blanda agitazione per un minuto, per mimare l'attività dei fluidi del sistema gastrointestinale, verificando così la capacità del sistema di formare una microemulsione a livello fisiologico [49,50].

Dall'analisi dei risultati ottenuti, riportati sempre in Tabella 13, si evince che la formulazione ottimale in grado di formare un'emulsione lipidica corrisponde alla n°15, avente la seguente composizione:

- 65,5% di X_1;
- 10% di X_2;
- 24,5% di X_3.

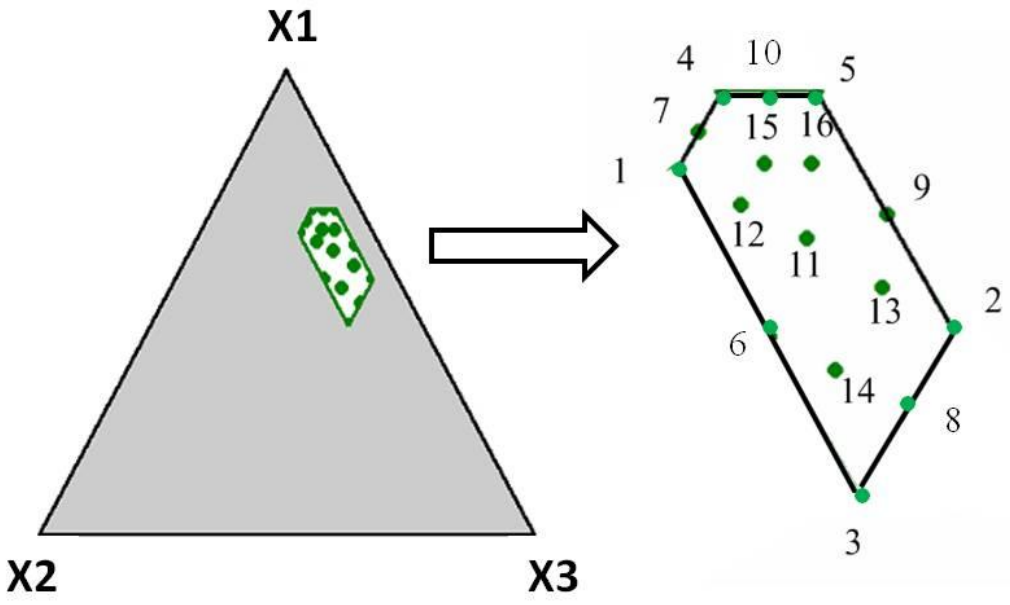


Figura 37. Rappresentazione grafica del dominio sperimentale isolato mediante le prove preliminari.

[48] D. Mathieu, J. Nony, R. Phan-Tan-Luu., *NEMRODW (New efficient methodology for research using optimal design) software.* L.P.R.I., Marseille, (2009).

[49] Emma L. McConnell, Hala M. Fadda, Abdul W. Basit., *Gut instincts: explorations in internal Physiology and drug delivery.* Int. J. Pharm., 364, 213–226, (2008).

[50] Eman Atef, Albert A. Belmonte., *Formulation and in vitro and in vivo characterization of a phenytoin self-emulsifying drug delivery system (SEDDS).* Eur. J. Pharm. Sci. 35, 257-263, (2008).

Una volta individuata la formulazione ottimale, questa è stata caratterizzata determinando le classi dimensionali della fase oleosa dispersa, mediante la tecnica del Laser Light Scattering (LLS) [51].

Dagli studi effettuati è risultato che le gocce della fase dispersa hanno un diametro medio di 15 nm. Questi valori sono un'ulteriore conferma del fatto che è stata allestita una microemulsione (Figura 38).

Poiché l'obiettivo del lavoro di tesi è stato quello di ottenere sistemi auto emulsionanti solidi il passo successivo è stato quindi quello di caricare il SES su un supporto solido formato da polveri di lattosio e cellulosa microcristallina (MCC).

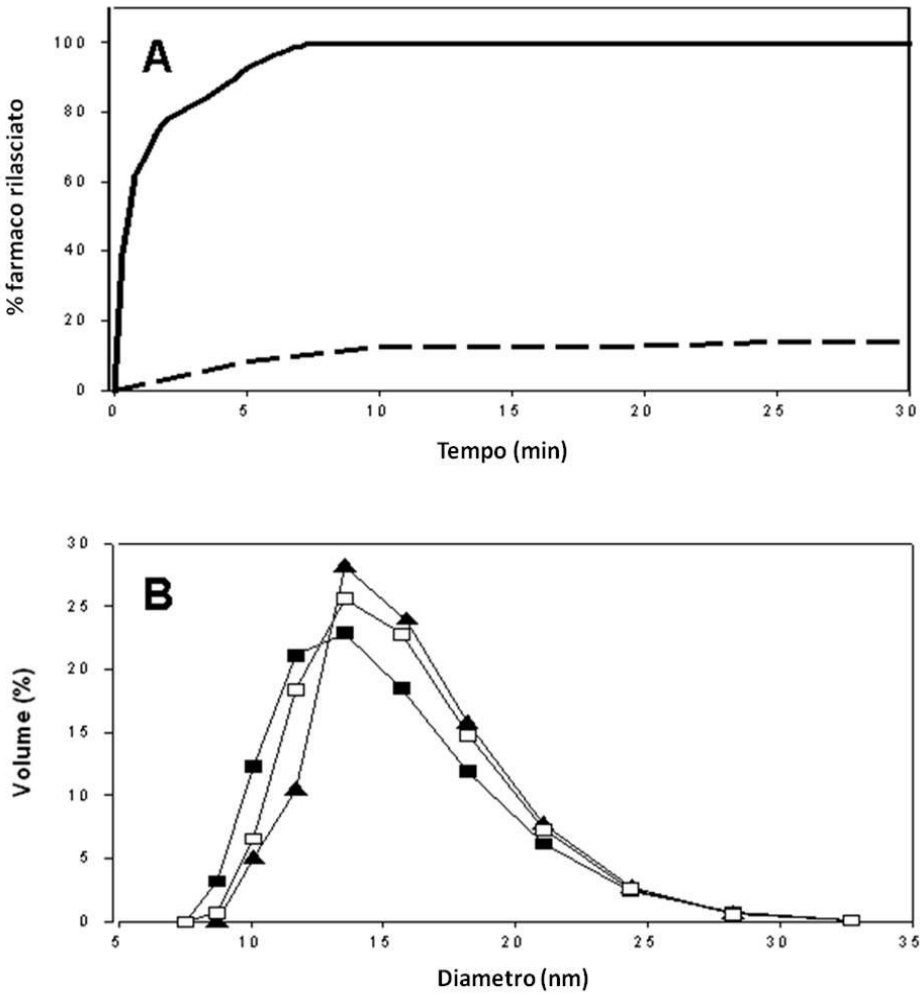


Figura 38 .(A) Profilo dissolutivo dei flavolignani in funzione del tempo dell'estratto secco (- -) dei pellets n° 7 (-), **(B)** caratteristiche dimensionali dei SES durante il test dissolutivo:SES liquido di riferimento (□), dai pellets dopo 15 (▲) e 30 minuti di dissoluzione (■).

[51] E.W. Vervey, J.Th.G. Overbeek., *Theory of the stability of liophobic colloids.* Elsevier, Amsterdam (1998).

Per ottenere una massa plastica successivamente estrudibile, una volta determinate le concentrazioni dei componenti del SES, è stato necessario trovare le concentrazioni ideali degli eccipienti costituenti i pellets: la cellulosa microcristallina e il lattosio.

Da prove preliminari risulta che l'intervallo di concentrazione dei singoli componenti è di:

28 % ≤ MCC ≤ 52%

10% ≤ LATTOSIO ≤ 34%

32% ≤ SES ≤ 47%

La cellulosa microcristallina (MCC) infatti modifica le proprietà reologiche della formulazione conferendole un adeguato grado di plasticità e resistenza, tenendo sotto controllo il movimento dell'acqua all'interno della massa umida durante il processo.

Ad accrescere ulteriormente la qualità della miscela destinata ad essere estrusa e sferonizzata, concorre anche la presenza del lattosio (LAC) che, a causa della sua ridotta distribuzione granulometrica, permette una miglior miscelazione riducendo lo stato di friabilità dell'estruso (Figura 39 e Tabella 14).

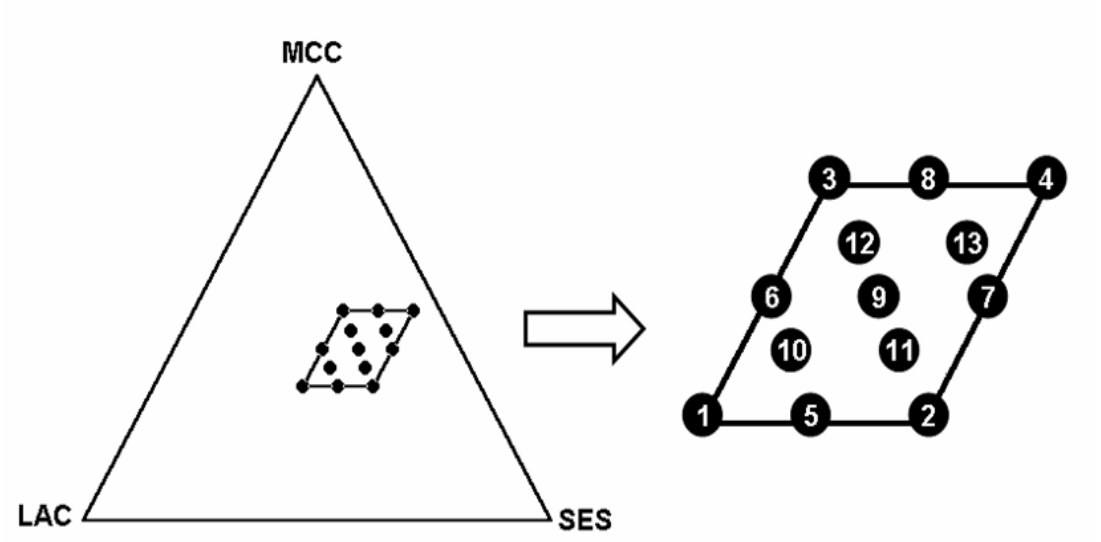


Figura 39. Rappresentazione grafica dei punti sperimentali appartenenti al disegno sperimentale riportato in Tabella 16.

Tabella 14. Disegno sperimentale progettato per testate per la produzione di pellets (composizione espressa in % p/p).

N° Exp	MCC[a]	LAC[b]	SES[c]	Forza di estrusione (KN)	Tipo di profilo
1	30.00	38.00	32.00		No
2	30.00	23.00	47.00		No
3	47.00	21.00	32.00		No
4	47.00	6.00	47.00	21	Ok
5	30.00	30.50	39.50		No
6	38.50	29.50	32.00		I.F.
7	38.50	14.50	47.00	22	Ok
8	47.00	13.50	39.50	21	Ok
9	38.50	22.00	39.50	22	Ok
10	34.25	30.00	35.75		No
11	34.25	22.50	43.25	23	Ok
12	42.75	21.50	35.75		No
13	42.75	14.00	43.25	23	Ok

[a] 30% < MCC < 47% Ok= estrusione fattibile
[b] 6% < LAC < 38% No= formulazione non estrudibile
[c] 32% < SES < 47% I.F.= flusso irregolare

Dalle prove e dal disegno sperimentale sulle suddette formulazioni si evince che non tutte sono estrudibili e quindi adatte alla produzione di semplici estrusi.

La determinazione della formulazione ottimale per la produzione di estrusi è stata confermata dalla relazione che intercorre tra la forza di estrusione e lo spostamento del pistone nella camera di estrusione.

Durante il processo, infatti, si possono distinguere tre differenti fasi:

- una fase di compressione iniziale,
- una fase di flusso stazionario,
- una fase di flusso forzato

Nella fase di compressione, la forza aumenta, finché la densità del materiale assume un valore costante e ciò si riflette con un cambiamento notevole in carico e minimo in spostamento; la pressione continua a crescere, finché l'estruso inizia a fuoriuscire dall'orifizio.

Subentra, a questo punto, la fase di flusso stazionario (steady state flow), durante la quale la forza di estrusione si mantiene stabile, nonostante continui lo spostamento del pistone.

Al flusso stazionario segue una fase di flusso forzato, caratterizzato da un graduale aumento nella forza di estrusione in quanto il pistone risulta prossimo alla superficie dello stampo.

Fasi di compressione e di flusso forzato brevi e di flusso stazionario prolungato, caratterizzato dalla presenza di una pressione costante, rappresentano una garanzia di ottenere estrusi e coestrusi di ottima qualità (Figura 40).

In base alle prove preliminari per questo processo non sono state considerate forze d'estrusione inferiori a 20 Kg e superiori a 35 Kg. Applicando, infatti, forze d'estrusione insufficienti, le masse da estrudere risultano troppo umide e soffici con il rischio di dare agglomerati durante la sferonizzazione; al contrario forze troppo elevate danno estrusi troppo asciutti che non sono in grado di plasmarsi a sfere.

Dall'analisi del profilo d'estrusione si denota che durante il primo stadio del processo, il pistone scende nel cilindro comprimendo e pressando al massimo il materiale con un minimo incremento della forza; è in questo punto che la massa raggiunge il minimo volume e la massima densità.

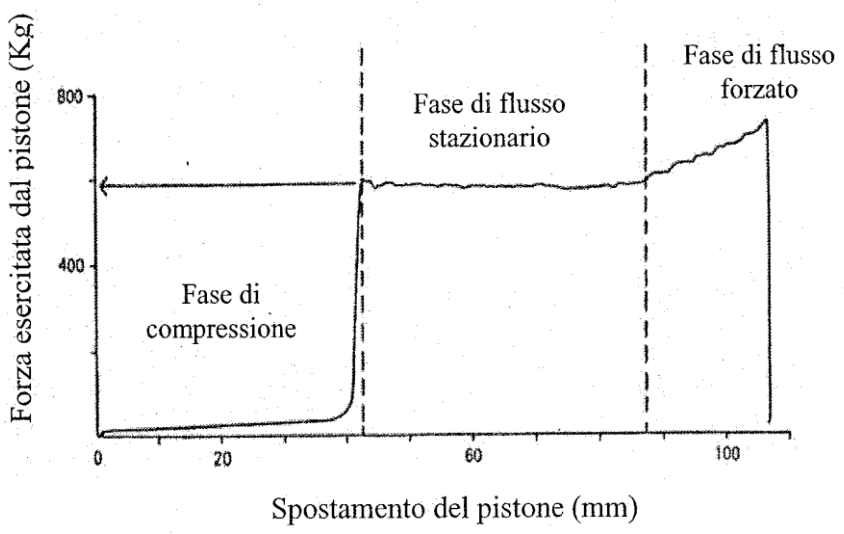


Figura 40. Grafico: forza di estrusione / spostamento del pistone nel coestrusore.

Alla fine di questa fase di compressione la forza necessaria per l'estrusione, prima aumenta notevolmente, permettendo il flusso del materiale attraverso il capillare dello stampo, poi viene mantenuta costante e si ha un flusso continuo del materiale attraverso il capillare, si verifica cioè uno steady state lineare a dimostrazione del fatto che le formulazioni presentano caratteristiche tecnologiche per essere sottoposte a questo tipo di processo.

Dai risultati ottenuti si nota che la formulazione n° 13, costituita dal 42.75% di cellulosa microcristallina, dal 14% di lattosio e dal 43.25% di sistema autoemulsionante è in grado di produrre semplici estrusi caratterizzati da superficie liscia e omogenea. Il profilo d'estrusione di questa formulazione è rappresentato in Figura 41.

Mentre lo stadio stazionario è costante a dimostrazione del fatto che la massa estrusa presenta sia una corretta ed uniforme consistenza sia una sufficiente fluidità che ne consente un libero flusso durante la lavorazione, per le altre formulazioni invece (n°1,2,3,5,10,12 riferite in Tabella 16) la formazione di estrusi non avviene (Figura 42).

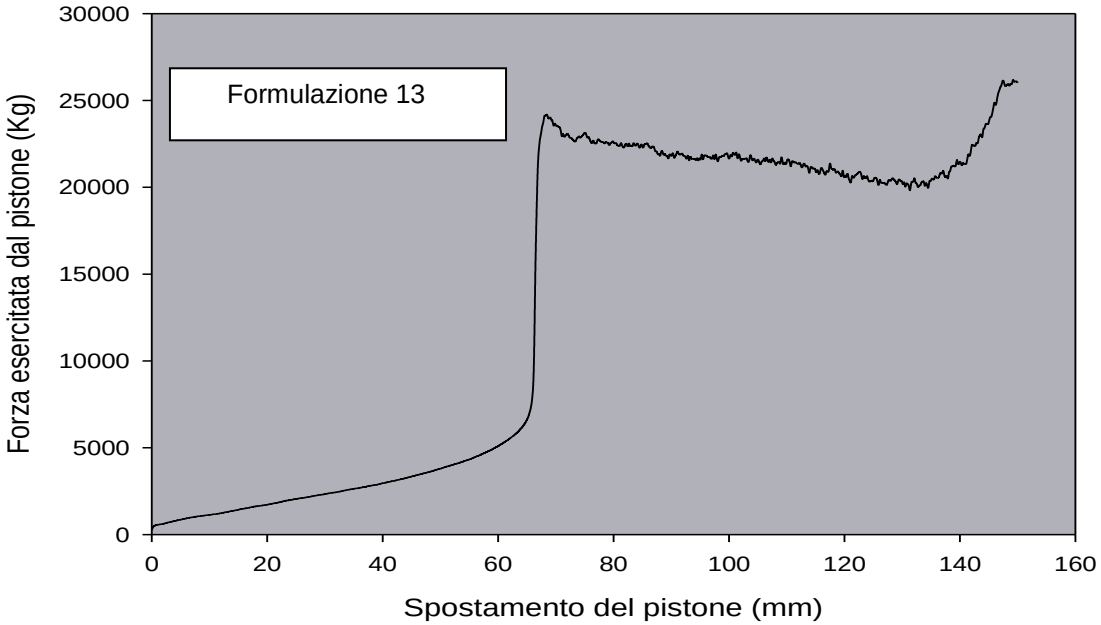


Figura 41. Profilo d'estrusione della formulazione con 42.5% di MCC, 14% di lattosio e 43.25% di SES.

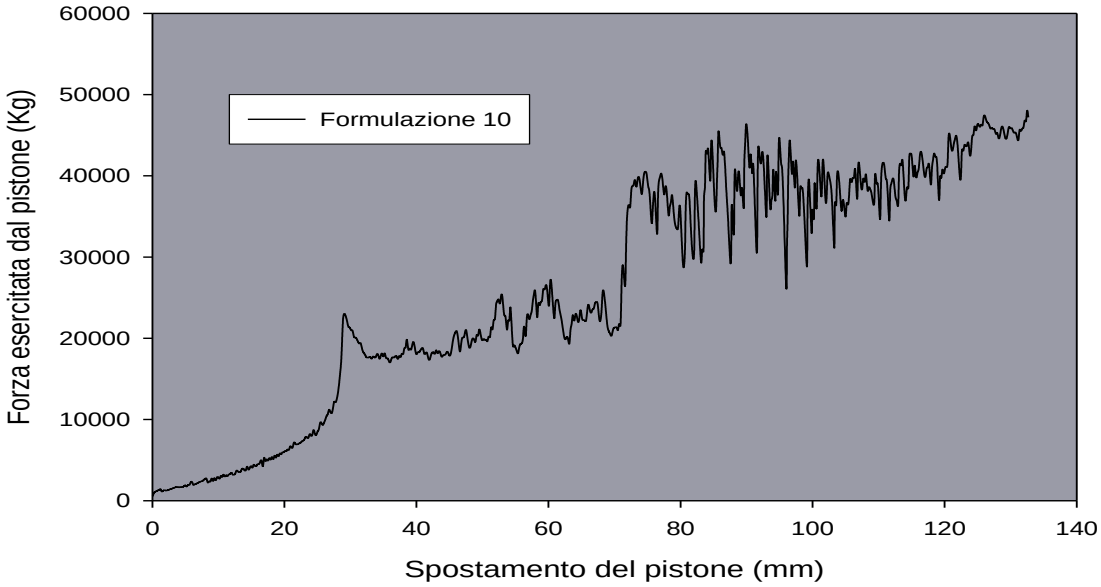


Figura 42. Formulazione a bagnatura insufficiente: la massa non estrude.

Per le formulazioni n° 3, 6, 9 lo steady state non è ideale e non garantisce perciò estrusi con caratteristiche plastiche e di superficie soddisfacenti (Figura 43).

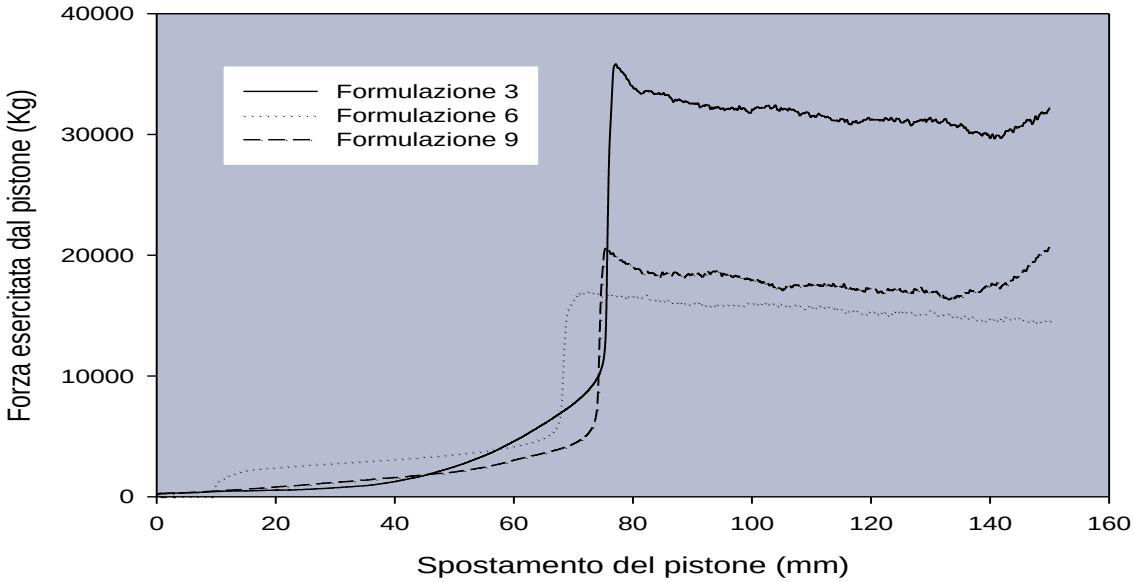


Figura 43. Profili d'estrusione delle formulazioni a steady state non ideale.

Per le altre formulazioni (n° 2 e 7) invece, si è verificata spesso un'irregolarità di superficie definita come fenomeno dello shark-skinning (Figura 44).

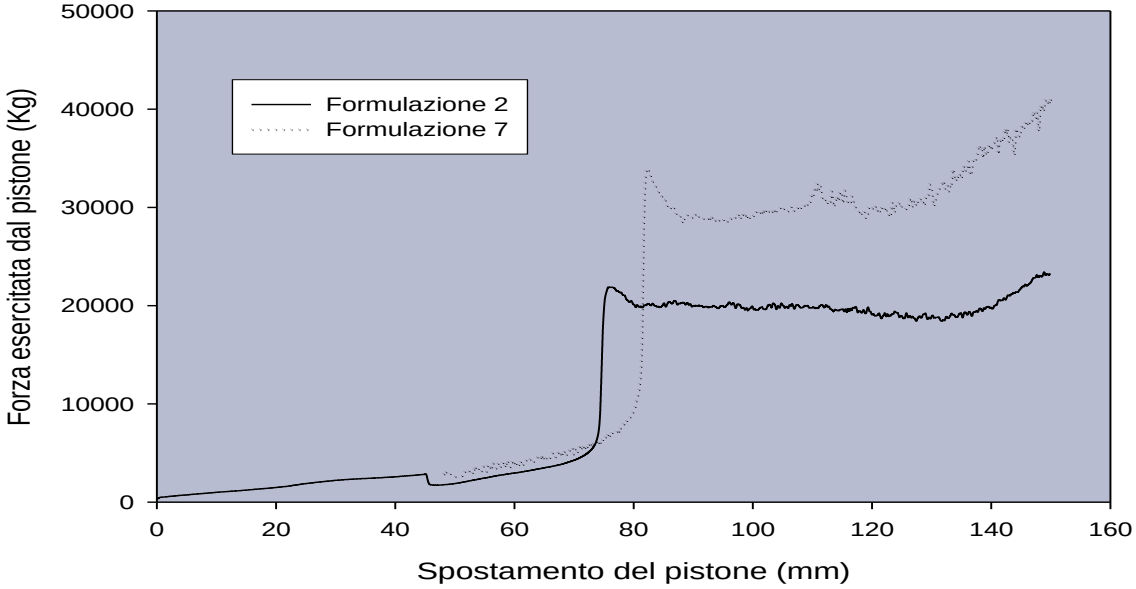


Figura 44. Profili d'estrusione per formulazioni in cui si è verificato shark-skinning.

Dimostrata la fattibilità del processo di estrusione e successiva sferonizzazione il passo successivo è stato quello di analizzare le caratteristiche tecnologiche dei pellets ottenuti. Dalla Tabella 15 si denota che la classe dimensionale con percentuale più elevata è di 1400 µm e poiché la velocità di dissoluzione aumenta con l'aumentare dell'area specifica di superficie è evidente che per l'assorbimento di fitocomplessi poco solubili in acqua, come nel nostro caso, è importante ottenere al più presto possibile la disgregazione dei pellets (Tabella 15).

Tabella 15. Caratteristiche tecnologiche dei pellets.

	Exp.4	Exp.7	Exp.8	Exp.9	Exp.11	Exp.13
Densità(g/cm3) (n=3) a	1.27	1.30	1.21	1.19	1.25	1.26
Forza (gf) (n=10) a	36	23	78	60	35	43
Tempo di disgregazione (min) (n=6) a	5.5	5	7	7	6	6
Classe dimensionale (μm)						
2000-1400	14	-	31	-	-	25
1400-1000	57	78	60	60	62	65
1000-715	26	20	9	37	33	10
715-500	3	2	-	3	5	-

Dai valori ottenuti si nota che in termini di densità i valori sono paragonabili tra le formulazioni mentre i valori riguardanti la durezza sono strettamente correlati alla percentuale di cellulosa microcristallina e fase oleosa presente. Anche l'analisi morfologica dei pellets mette in evidenza l'effetto dei componenti lipidici sulla superficie. Dalle immgini si pò notare come i pellets che hanno una elevata quantità di MCC presentino un superficie sferica (Figura 45 **a** e **c**); al contrario, all'aumentare della quantità di Lattosio ed MCC la forma diviene meno sferica. (Figura 45 **d** ed **e**). Nelle Figure 45 **a**, **b** e **d** a causa della presenza del SES si notano delle creste frastagliate in rilievo che rendono la superficie più rugosa a causa della sospensione di lattosio e cellulosa microcristallina nella fase lipidica.

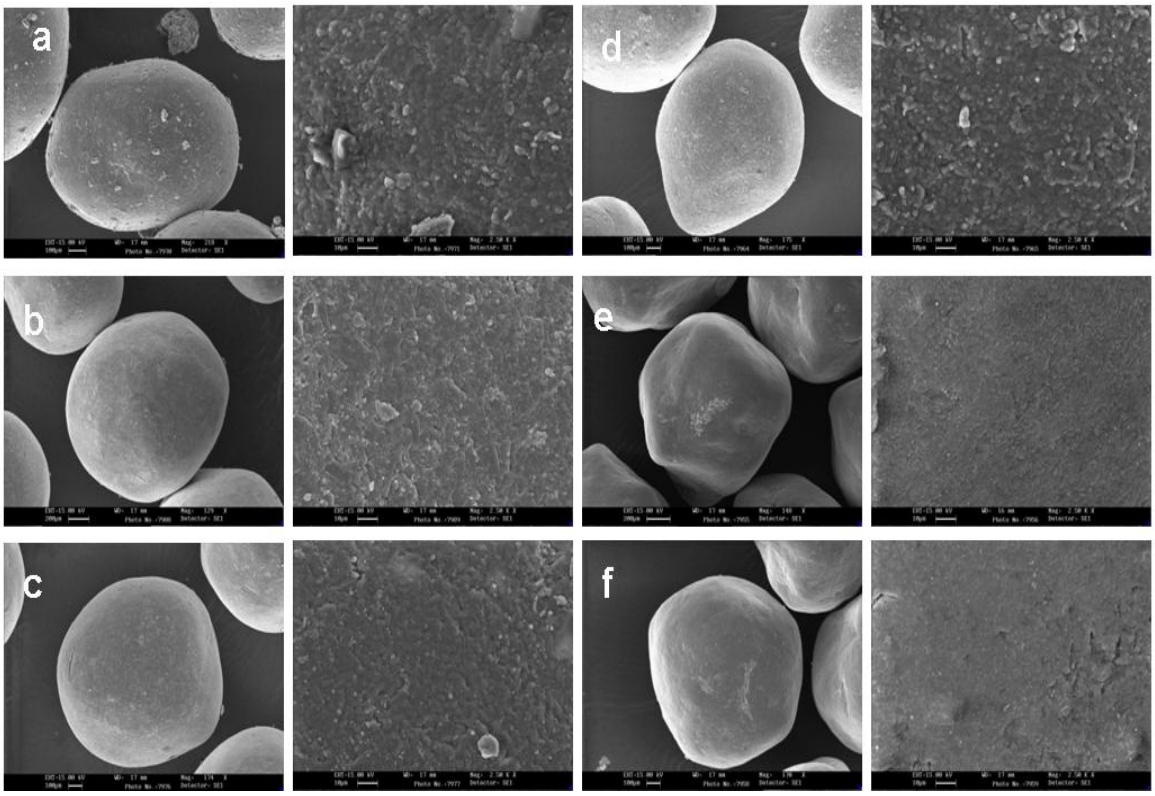


Figura 45. (a-f) Forma e caratteristiche di superficie dei pellets ottenuti dalle formulazioni 4 (a), 7 (b), 8 (c), 9 (d), 11 (e), 13 (f) osservate al SEM.

Da quanto analizzato nella parte precedente, la formulazione n°13 risulta essere la formulazione ottimale, considerando sia la percentuale di fase oleosa caricata (42.75 %) sia il profilo d'estrusione ottenuto (vedi Figura 41).

Da quanto esposto nella parte introduttiva, i sistemi autoemulsionanti sono caratterizzati dalla capacità di emulsionarsi in soluzione acquosa in condizioni di blanda agitazione.

Al contrario delle emulsioni classiche, le emulsioni derivanti dall' esposizione del SES nella fase acquosa si formano spontaneamente perché sono sistemi termodinamicamente stabili, grazie a un ridotto volume della fase oleosa dispersa.

Per evidenziare le potenzialità raggiunte da tali composti nei confronti della rispettiva sospensione acquosa, la performance di rilascio dei pellets della formulazione n°13 è stata ottenuta eseguendo la metodica "cinetica di solubilizzazione".

Dai risultati riportati in Figura 38 si evince che, a differenza della sospensione acquosa, questa formulazione di pellets rilascia il 80% di principio attivo entro 5 minuti, mentre il fitocomplesso sotto forma di estratto non supera il 20% dopo 30 minuti.

Questi valori sono correlati al fatto che le dimensioni delle gocce formate da tali sistemi denotano che minore è il diametro delle gocce e maggiore è l'area superficiale delle

stesse così da promuovere velocemente la diffusione del principio attivo nel fluidi intestinali.

Considerando quindi la capacità dei SES a contatto con i fluidi biologici di riformare la microemulsione, il passo successivo è stato quello di investigare la performance suddetta per la formulazione n°13 (90 mg di pellets con titololo in flavolignani di 6.08 mg) considerando il metodo del ricircolo ex vivo, utilizzando ratti maschi Wistar di peso 250 – 300 g (Figura 46)[52].

Trascorsi in ricircolo 60 minuti, la soluzione quindi è stata recuperata e analizzata con la tecnica LLS, per verificare eventuali variazioni nelle dimensioni della microemulsione formata, rispetto a quelle ottenute in vitro.

I risultati così ottenuti vengono riportati in Figura 46 e in accordo anche con il profilo di dissoluzione dall'analisi del grafico si evince che il sistema autoemulsionante liberato dai pellets, sottoposto a ricircolo, presenta gocce di dimensioni di 90 e 104 nm, rispetto alla microemulsione dispersa in acqua in rapporto 1:250 v/v dove le gocce avevano dimensioni pari a 15 nm.

Queste differenze sono ascrivibili in parte ad interazioni di tipo chimico-fisico tra cellulosa microcristallina, lattosio e sistema lipidico, come pure alle interazioni con la parete intestinale ed i fluidi gastrici.

Questi valori comparati alle dimensioni delle gocce prime di essere caricate dimostrano che le proprietà emulsionanti del SES vengono mantenute anche dopo il caricamento su pellets.

Dimensioni delle gocce così ridotte possono promuovere la formazione di una grande area interfacciale per la lipasi pancreatica che idrolizza i trigliceridi, promuovere quindi il rilascio di principio attivo e di conseguenza ne migliora l'assorbimento.

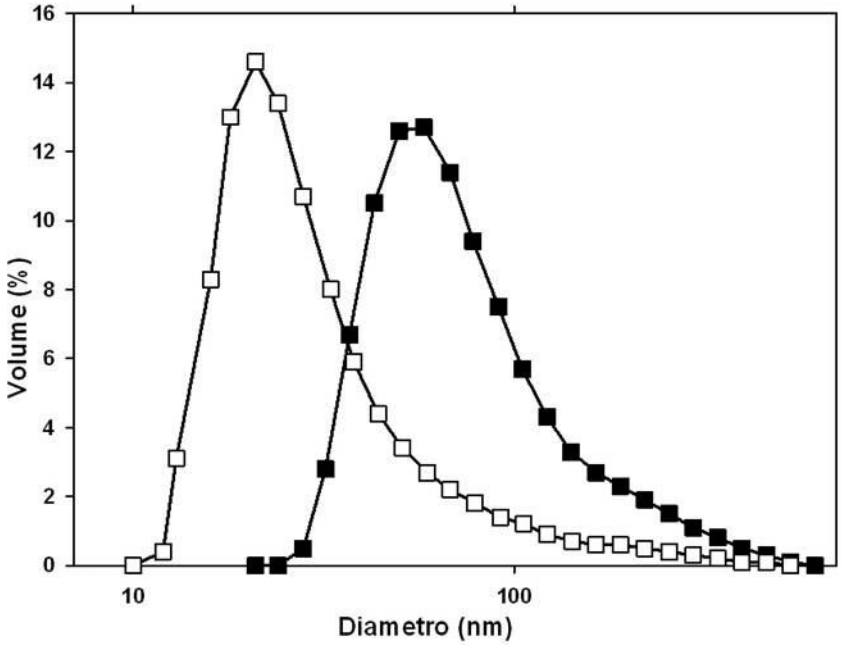
Per confermare che le proprietà in vitro ed ex-vivo di tali sistemi si riscontrano anche in vivo è stata successivamente valutata la biodisponibilità dei principali flavolignani (silibina A e B), contenuti nel sistema autoemulsionante (pellets) e nell'estratto di riferimento.

Sono stati perciò condotti test di assorbimento in vivo dei pellets contenenti il SES e dell'estratto secco, somministrando direttamente nel duodeno del ratto una dose di 100 mg/Kg.

---

[52] G. Cadelli, P. Zarattini, M. Stebel, *Further refinements of tail artery cannulation in conscious rats*, Centro Coordinamento e Sviluppo progetti e Apparecchiature (CSPA), settore stabulario e sperimentazione animale, Università di Trieste, FELASA - ICLAS Joint Meeting - Villa Erba Cernobbio (Co) (2007).

I risultati ottenuti sono riportati nella Figura 47 ed in seguito elaborati, utilizzando un approccio non-compartimentale mediante il software WinNonlin® (Pharsight Corporation, USA) e Microsoft® Excel XP (Microsoft Corporation, Palo Alto, CA 94306 USA come riportati in Tabella 16.



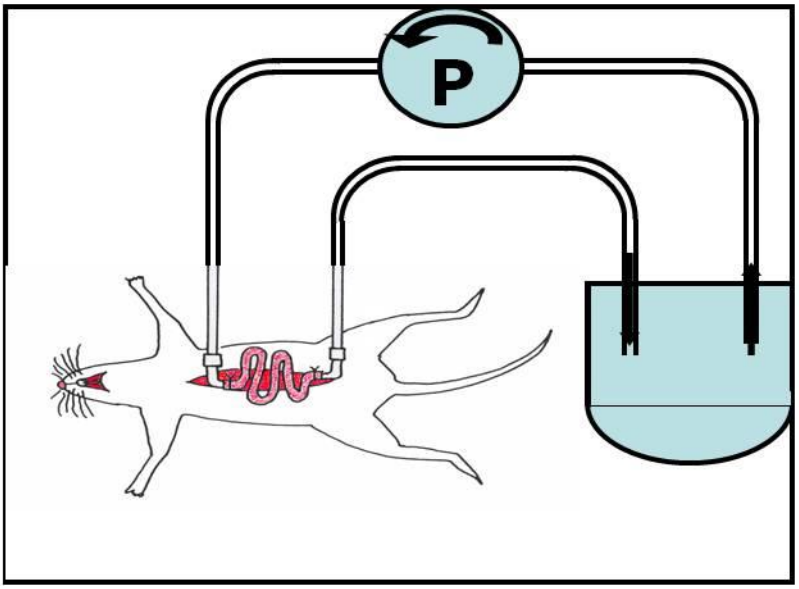


Figura 46. Distribuzione dimensionale delle particelle della fase oleosa dispersa sottoposta a ricircolo per 30 (□) e 60 minuti (■).

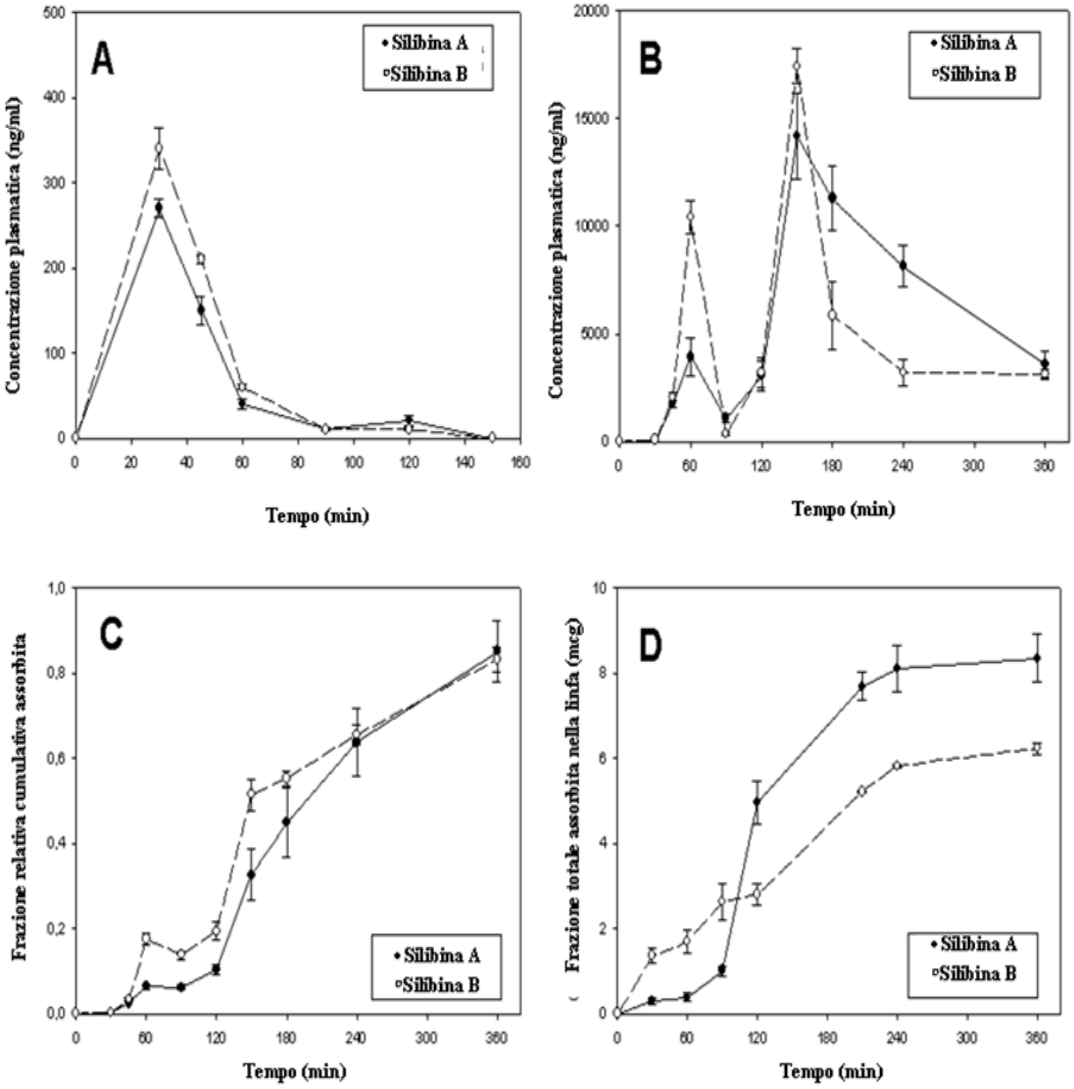


Figura 47. Concentrazione plasmatica della silibina A e B ottenuta dopo somministrazione singola di estratto secco (A) e pellets (B); frazione relativa cumulativa della silibina A e B assorbita nel plasma (C); frazione cumulativa totale della silibina A e B assorbita nella linfa dopo somministrazione dei pellets (D).

Tabella 16. Parametri farmacocinetici ottenuti dopo somministrazione orale di pellets ed estratto secco nei ratti.

		T_{max} (min)	C_{max} (µg/mL)	AUC_z (µgh/mL)	$t_{1/2_Lambda_z}$ (min)
Silibina A					
Estratto secco	Media	30	0.2713	9.84	20.2
	S.D.	0	0.0101	0.52	2.0
SES	Media	150	14.1833	2121.33	110.6
	S.D.	0	2.0116	69.98	30.2
Silibina B					
Estratto secco	Media	30	0.3405	12.70	16.7
	S.D.	0	0.0253	0.67	0.6
SES	media	150	17.4333	1636.10	104.3
	S.D.	0	0.7910	72.45	9.4

Dove:

C_{max}: valore più alto di concentrazione trovato nel plasma;

t_{max}: tempo (dopo la somministrazione) al quale è stato trovato il C_{max};

AUC_z: area sotto la curva di concentrazione plasmatica vs. il tempo, calcolata dal tempo 0 fino all'ultimo punto quantificabile, secondo il metodo trapezoidale log-lineare (lineare fino al C_{max}, logaritmico dopo il C_{max}).

F_{rel}: biodisponibilità relativa (dopo somministrazione orale) dell'emulsione rispetto all'estratto, calcolata, per ciascuna frazione, mediante la seguente equazione:

$$F_{rel} = (AUCz_{\text{frazione X, emulsione}}/Dose_{\text{frazione X, emulsione}}) / (AUCz_{\text{frazione X, estratto}}/Dose_{\text{frazione X, estratto}})$$

I parametri farmacocinetici ottenuti dalle analisi (Tabella 16) dimostrano un significativo aumento della biodisponibilità relativa dei flavolignani in seguito alla somministrazione del SES, rispetto alla semplice sospensione dell'estratto del Cardo mariano. Per la silibina A e B caricate sui pellets si ha una biodisponibilità relativa superiore rispettivamente di 354 e 131 volte rispetto all'estratto secco.

Ci sono due ragioni che spiegano questo miglioramento della biodisponibilità: la composizione del SES, la presenza del tensioattivo e co-tensioattivo, facilita la dissoluzione della silibina A e B nei fluidi gastro-intestinali quindi l'assorbimento [53].

Osservando il grafico raffigurante le concentrazioni rilevate nel plasma in funzione del tempo Ffigura 47 A e B), sia per la silibina A che B si nota un andamento bifasico con due picchi massimi di concentrazione. Tale andamento segnala la presenza di un ricircolo enteroepatico (schematizzato in Figura 48), cioè di una quantità di flavolignani che viene riassorbita attraverso la parete intestinale, dopo esser stata eliminata tramite la via biliare. Questo fenomeno è stato già riscontrato in diversi esperimenti condotti sia su animali che sull'uomo [54,55,56].

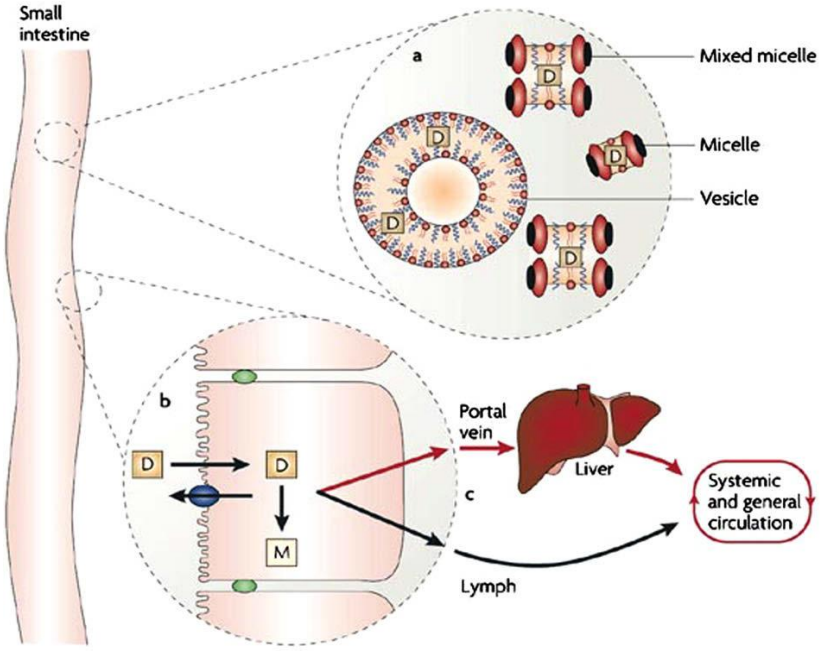


Figura 48. Circolo entero-epatico.

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

[54] Wu, W., Wang, Y., Que, L., *Enhanced bioavailability of silymarin by self-microemulsifying drug delivery system.* Eur. J. Pharm. Biopharm., 63, 288-294 (2006).

[55] Morazzoni, P., Montalbetti, A., Malandrino, S., Pifferi, G., *Comparative pharmacokinetics of silipide and sylimarin in rats*. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 18, 289-297 (1993).

[56] Z. Wen, T.E. Dumas, S.J. Schreiber, R.L. Hawke, M.W. Fried, P.C. Smith., *Pharmacokinetics and metabolic profile of free, conjugated and total silymarin flavolignans in human plasma after oral administration of milk thistle extract.* DMD., 36, 65-72, (2008).

Come riportato in Figura 47 (Figura 47 c) l'assorbimento della silibina A e B (silimarina) nel plasma si protrae per più di 6 ore dalla somministrazione, mentre l'assorbimento dell'estratto secco si completa nell'arco di 1 ora.

Come si nota dalla Figura 47 D per quanto riguarda il SES, dove il fitocomplesso è più solubile, la presenza del ricircolo enteroepatico prolunga notevolmente il periodo di attività del farmaco. Nel caso dell'estratto come tale invece, la sua bassa solubilità non permette l'assorbimento di elevate quantità di fitocomplesso, quindi anche la presenza del ricircolo enteroepatico è meno significativa.

Una molecola lipofila, dopo essere assorbita dall'enterocita, può raggiungere la circolazione sistemica attraverso due vie: trasporto linfatico e sistema portale.

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 [57].

La quantità totale di silibina A e silibina B assorbita attraverso il sistema linfatico è rispettivamente di 8 e 6 µg.

Il vantaggio dell'assorbimento del farmaco attraverso il sistema linfatico intestinale è quello di poter bypassare il metabolismo 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.

La silimarina risulta essere un buon candidato anche per quest'aspetto infatti questi studi preliminari dimostrano che lo sviluppo di SES caricati su pellets attraverso la tecnica della estrusione/sferonizzazione pongono le basi per un successivo sviluppo nella formulazione di estratti fitoterapici.

Per verificare e/o confermare i risultati di biodisponibilità ottenuti in vivo nei ratti, lo studio è stato indirizzato, sempre in vivo, su 15 volontari sani (7 di sesso maschile e 8 di sesso femminile, età compresa 24-50 anni di peso 50-90 Kg).

A quest'ultimi sono state somministrate tre capsule di gelatina dura di tipo "00", contenenti ognuna 700 mg di estruso preparato con l'estrusore a pistone.

---

[57] A.J. Humberstone, W.N. Charman., *Lipid-based vehicles for the oral delivery of poorly water soluble drugs*. Drug Dev. and Ind. Pharm., 25, 103-128 (1997).

Nello stesso erano presenti 329 mg del sistema SES (contenente 22.40 mg silibina A e 14.93 mg silibina B), caricato su 371 mg di cellulosa microcristallina e lattosio.

La quantità di silibina A e B libera e totale, trovata nei campioni dei singoli soggetti, è riportata in Tabella 17a e Tabella b mentre nel grafico di Figura 49 osserviamo l'andamento temporale della concentrazione ematica media della silibina A e B libera e totale. In una successiva analisi del grafico, si nota un andamento bifasico, con due picchi massimi di concentrazione. Tale andamento segnala la presenza di un ricircolo enteroepatico: una quantità di silibina A e B, dopo esser stata eliminata tramite la via biliare, viene idrolizzata da una β-glicuronidasi e viene poi riassorbita attraverso la parete intestinale. In questo modo il composto si mantiene nell'organismo finché non viene ulteriormente metabolizzato o escreto per via renale, permettendo un aumento della durata dell'attività farmacologica. E' proprio la Figura 50 a rappresentare in maniera schematica il circolo entero-epatico.

Tabella 17a : Silibina A e B libera e totale trovata nei campioni in seguito ad analisi HPLC-MS.

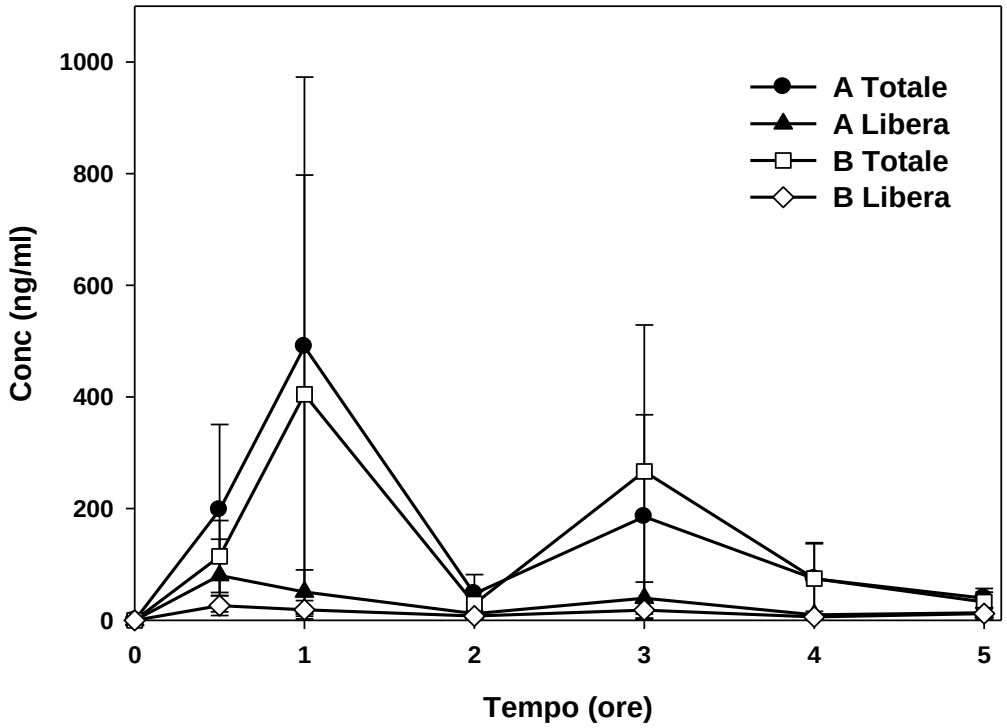
Silibina A Totale																	
Soggetti (n = 15)																	
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Media	SD
Ore	ng/ml																
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	380,8	81,4	48,6	101,8	544,4	208,3	62,4	260,7	99,9	72,4	137,8	385	23,6	265,2	290,8	197,5	153,2
1	119,6	435,4	1625	7,6	7,6	385,4	932,1	361,3	1079,4	340,8	65,1	240	1130	139,2	482	490,0	482,7
2	87	20,4	25,6	14,4	2,8	28,7	35,4	40,9	40,2	28,1	97,1	28,5	55,6	101,7	108,9	47,7	34,3
3	92,4	687,4	64,8	13,2	8,2	189,6	97,6	180,1	106,5	379	265,5	38,6	78,9	381,9	200,1	185,6	182,4
4	59,3	193,4	3,6	71	16,2	68,2	26,6	68,7	18,6	160,9	80,5	22	40	198,7	87,3	74,3	62,9
5	51,4	12,4	54,4	67	12,2	27	47	49	36,7	24,4	23,8	34,2	64,4	53	38	39,7	17,4

Silibina A libera																	
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Media	SD
Ore	ng/ml																
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	220	46	35,6	40,8	36,6	111,9	33,9	132	22,4	45,1	31,8	184,2	13,8	97,7	149,9	80,1	65,1
1	69,8	60,2	26,6	6,6	0,8	14,5	88,5	88,1	129,9	22,9	4,4	92,9	78,5	29,3	47,6	50,7	39,5
2	15,9	10,3	15,8	11,6	0	7,9	17,9	12,8	8,3	5,5	14,7	9,6	15	12,1	20	11,8	5,1
3	55,2	12,4	19	3,4	3,2	32,5	26,4	53,3	21,7	87,3	66,5	15,7	44,2	62,2	91,3	39,6	28,7
4	2	3,8	2	16,6	13	7,9	0,4	14,9	6,4	14,4	9,5	8	11,9	15,3	21,7	9,9	6,2
5	36,8	6,8	12	7,8	7,8	11,3	0	16,7	14,6	7,7	11,1	21,3	22,6	21	6,8	13,6	9,0

Tabella 17b : Silibina B libera e totale trovata nei campioni in seguito ad analisi HPLC-MS.

Silibina B totale																	
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Media	SD
Ore	**ng/ml**																
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	132	95,8	49,8	28,4	222,8	177,2	79,1	211,3	199,5	113	66,3	33,8	147,1	72	86,9	114,3	64,5
1	40,2	253,2	1185,6	14,8	14,4	40,4	791,7	333,8	98,1	656,9	1019,1	796,9	456,8	99,5	269,4	404,7	392,8
2	60	13,2	33,4	11,8	3,8	5,9	54,2	9,5	21,2	17,6	44,9	55,9	71,6	11	24,1	29,2	22,4
3	132,6	950,4	53,2	13,2	19,4	127,8	564,8	214,2	109,6	416,9	370,1	555	259,2	61,8	148,9	266,5	262,4
4	72,2	247,4	9,6	69,6	13	29	125,4	58,2	44,6	89,3	19,9	142	77,1	8	114,8	74,7	64,1
5	43,6	11,1	48,2	30,2	27,4	16,9	54,7	51,7	10,9	34,8	9,9	51,6	39,8	4,4	55,4	32,7	17,8

Silibina B Libera																	
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Media	SD
ore	**ng/ml**																
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,5	45,2	10,6	37,4	12,4	5	48,1	8,6	50,5	49,9	44,4	29,8	9,9	18,7	12,1	11,9	26,3	17,7
1	6,7	7,8	37,8	0,4	10,2	13,2	24,6	14,7	14,4	37,6	60,4	6,6	32,6	4,9	11,1	18,9	16,5
2	11,7	3,8	17,2	9,8	0	3,4	6,8	2,8	10,1	12,7	16,9	4,1	8,8	2,4	3,7	7,6	5,4
3	66,6	8,4	11,2	4,4	4,8	9,7	13,1	18,2	6,1	27,8	44,3	23,9	8,3	11,5	12,4	18,0	17,1
4	9,6	3,6	2	3,4	4,4	5,2	2,9	3,9	7,5	6,1	11,2	10	6,4	2,2	10,8	5,9	3,2
5	40	8	14,4	0	9,8	15	1,9	9,4	9	19,9	2,8	22,5	11,8	0	13,9	11,9	10,7



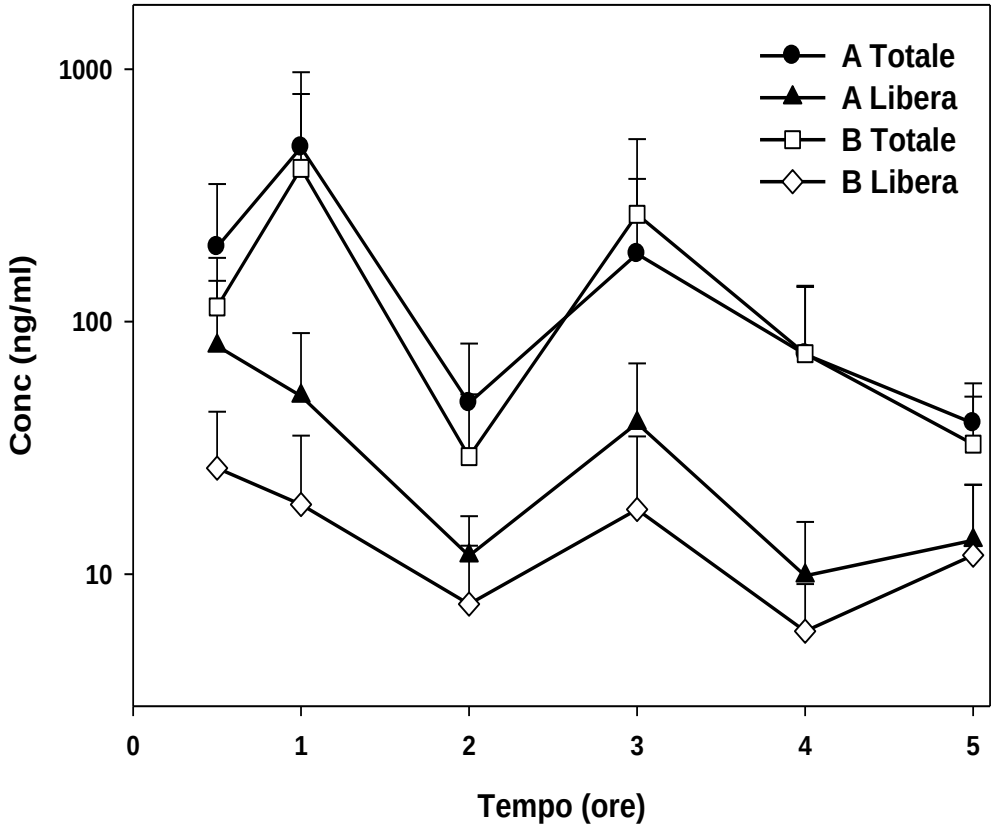


Figura 49 . Profili della concentrazione plasmatica (logaritmo della concentrazione) della silibina A e B libera e totale ottenuti con il sistema SES (media.±SD)

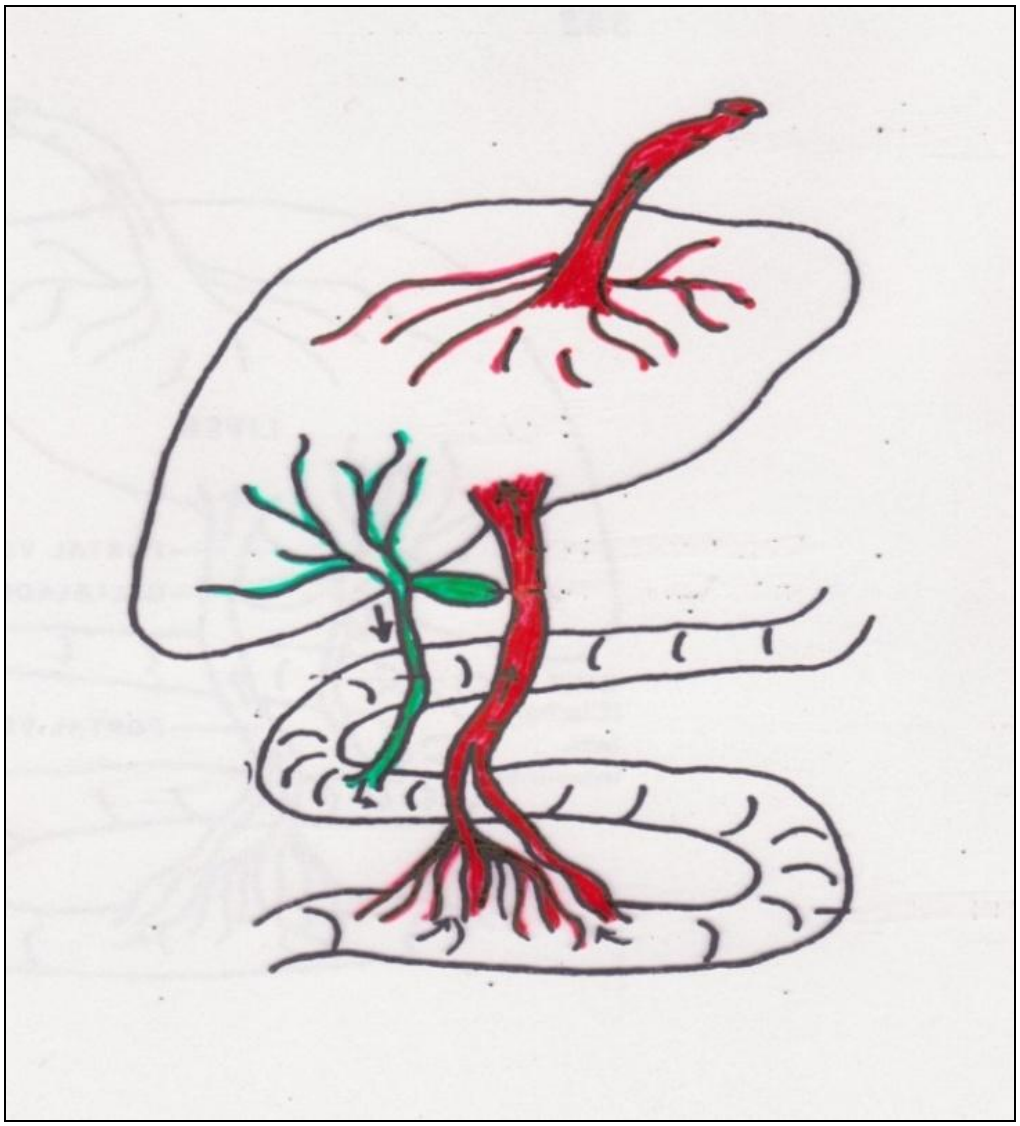


Figura 50. Circolo entero-epatico. In rosso è rappresentato il circolo sanguigno mentre in verde è rappresentata la via biliare.

I dati in vivo, sono stati successivamente utilizzati per stimare dei parametri farmacocinetici, quali: tempo in cui in cui si manifesta il picco ematico (tmax); valore in concentrazione del picco ematico (C_{max}); area sotto la curva che descrive il profilo ematico ($AUC_{0\rightarrow5}$) e il tempo di semivita della fase di scomparsa terminale ($t_{1/2}$)

Il calcolo di questi parametri è necessario non solo per eseguire confronti tra i singoli profili plasmatici, ma anche per poter confrontare questi ultimi con quelli ottenuti in seguito a somministrazione di altre forme farmaceutiche. I risultati, così ottenuti, vengono riportati in Tabella 18 a,b,c,d.

Tabella 18a: Parametri farmacocinetici della silibina A libera ottenuti dopo somministrazione del SES contenenti 67,2 mg di silibina A e 44,8 mg di silibina.

Silibina A Libera					
Soggetto	**T_{max} (h)**	**C_{max} (ng/mL)**	**$AUC_{t=5}$ (ng*h/mL)**	**$t_{1/2}$ (h)**	**AUC_{inf} (ng*h/mL)**
1	0,50	220,00	253,85	1,28	322,05
2	1,00	60,20	98,05	1,29	110,74
3	0,50	35,60	80,55	1,75	110,80
4	0,50	40,80	60,85	3,92	104,95
5	0,50	36,60	39,00	1,36	54,27
6	0,50	111,90	120,78	2,10	154,94
7	1,00	88,50	127,83	0,44	128,08
8	0,50	132,00	221,43	1,63	260,72
9	1,00	129,90	152,33	1,50	183,85
10	3,00	87,30	150,78	0,57	157,18
11	3,00	66,50	115,45	0,77	127,85
12	0,50	184,20	205,73	1,34	246,86
13	1,00	78,50	148,18	2,55	231,21
14	0,50	97,70	170,93	1,28	209,61
15	0,50	149,90	247,05	0,53	252,29
Media	**0,97**	**101,31**	**146,18**	**1,49**	**177,02**
SD	**0,85**	**54,21**	**64,90**	**0,89**	**74,34**

Tabella 18b: Parametri farmacocinetici della silibina A totale ottenuti dopo somministrazione del SES contenenti 67,2 mg di silibina A e 44,8 mg di silibina B.

Silibina A Totale					
Soggetto	**T_{max} (h)**	**C_{max} (ng/mL)**	**$AUC_{t=5}$ (ng*h/mL)**	**$t_{1/2}$ (h)**	**AUC_{inf} (ng*h/mL)**
1	0,50	380,80	544,50	3,34	792,53
2	3,00	687,40	1274,65	0,35	1280,83
3	1,00	1625,00	1364,25	0,79	1426,38
4	0,50	101,80	188,70	1,33	317,35
5	0,50	544,40	311,20	1,74	341,77
6	1,00	385,40	693,20	0,71	720,91
7	1,00	932,10	913,38	1,11	988,45
8	1,00	361,30	715,53	1,07	790,81
9	1,00	1079,40	1043,15	0,92	1091,87
10	3,00	379,00	872,00	0,51	889,79
11	3,00	265,50	572,73	0,57	592,46
12	0,50	385,00	478,70	1,23	539,20
13	1,00	1130,00	1066,00	1,14	1172,29
14	3,00	381,90	945,80	0,70	999,47
15	1,00	482,00	922,20	0,83	967,95
Media	**1,40**	**608,07**	**793,73**	**1,09**	**860,80**
SD	**1,02**	**409,63**	**335,78**	**0,72**	**323,36**

Tabella 18c: Parametri farmacocinetici della silibina B libera ottenuti dopo somministrazione del SES contenenti 67,2 mg di silibina A e 44,8 mg di silibina B.

Silibina B Libera					
Soggetto	**T_{max} (h)**	**C_{max} (ng/mL)**	**$AUC_{t=5}$ (ng*h/mL)**	**$t_{1/2}$ (h)**	**AUC_{inf} (ng*h/mL)**
1	3,00	66,60	135,52	2,72	292,44
2	0,50	10,60	30,95	8,62	130,45
3	1,00	37,80	84,65	1,70	119,93
4	0,50	12,40	22,40	1,31	28,82
5	1,00	10,20	24,25	2,36	57,58
6	0,50	48,10	59,75	3,47	134,75
7	1,00	24,60	46,50	0,72	48,47
8	0,50	50,50	65,87	2,36	97,82
9	0,50	49,90	63,95	2,20	92,46
10	0,50	44,40	106,95	2,67	183,51
11	1,00	60,40	134,00	0,50	136,03
12	3,00	23,90	59,15	2,29	804,64
13	1,00	32,60	63,20	2,95	113,39
14	0,50	12,10	24,72	2,67	33,20
15	5,00	13,90	48,12	0,84	64,98
Media	**1,30**	**33,20**	**64,67**	**2,49**	**155,90**
SD	**1,32**	**19,37**	**36,67**	**1,91**	**191,41**

Tabella 18d: Parametri farmacocinetici della silibina B totale ottenuti dopo somministrazione del SES contenenti 67,2 mg di silibina A e 44,8 mg di silibina B.

Silibina B Totale					
Soggetto	**T_{max} (h)**	**C_{max} (ng/mL)**	**$AUC_{t=5}$ (ng*h/mL)**	**$t_{1/2}$ (h)**	**AUC_{inf} (ng*h/mL)**
1	3,00	132,60	382,75	1,25	461,15
2	3,00	950,40	1454,35	0,31	1459,34
3	1,00	1185,60	1034,40	0,91	1097,39
4	4,00	69,60	135,00	0,83	171,17
5	0,50	222,80	172,10	1,36	225,91
6	0,50	177,20	290,05	0,69	306,76
7	1,00	791,70	1405,07	0,59	1451,94
8	1,00	333,80	663,75	0,98	736,49
9	0,50	199,50	354,17	0,60	363,62
10	1,00	656,90	1090,37	0,56	1118,40
11	1,00	1019,10	1237,32	0,38	1242,79
12	1,00	796,90	1393,27	0,58	1436,72
13	1,00	456,80	843,95	0,74	886,43
14	1,00	99,50	193,62	0,52	196,95
15	1,00	269,40	561,00	1,40	673,07
Media	**1,37**	**490,79**	**747,41**	**0,78**	**788,54**
SD	**1,06**	**375,46**	**489,17**	**0,34**	**486,53**

Per valutare l'efficacia dell'assorbimento della silibina A e B abbiamo confrontato i risultati ottenuti, con uno studio presente in letteratura riguardante il profilo metabolico e farmacocinetico dell'estratto di Cardo mariano, in seguito a somministrazione orale. Ciò per poter dimostrare come l'assorbimento della silibina A e B, in seguito alla somministrazione del SES, risulti maggiore o uguale a quello riportato in letteratura, dove i soggetti e il disegno sperimentale sono diversi. Qui ad ogni singola somministrazione a 3 volontari sani, di 600 mg di estratto secco di Cardo Mariano, corrisponde una dose pari a 75,4 mg di silibina A e 117 mg di silibina B. I risultati così ottenuti e i parametri farmacocinetici vengono riportati in Tabella 19.

Tabella 19: Parametri farmacocinetici della silibina A e B libera e totale nel plasma umano ottenuti dopo un'unica somministrazione di 600 mg di estratto secco contenente 75,4 mg di silibina A e 117 mg di silibina B (media±SD).

SILIBINA A	**C_{max} (ng/ml)**	**T_{max} (h)**	**$t_{1/2}$ (h)**	**AUC_{inf} (mg*h/l)**
Libera	23 ± 7,9	1,0 ± 0,4	1,3 ± 0,5	63 ± 38
Totale	45 ± 1,6	1,3 ± 0,3	5,3 ± 2,3	260 ± 95
SILIBINA B	**C_{max} (ng/ml)**	**T_{max} (h)**	**$t_{1/2}$ (h)**	**AUC_{inf} (mg*h/l)**
Libera	15 ± 7,4	0,83 ± 0,1	2,3 ± 0,7	51 ± 19
Totale	131 ± 28	1,3 ± 0,3	3,4 ± 0,8	647 ± 234

Per poter eseguire un confronto, anche se non statistico, con i dati da noi ottenuti in vivo, mediante somministrazione orale dei SES, sono stati utilizzati i dati normalizzati secondo la dose somministrata. I valori ottenuti sono riportati in Tabella 20.

Il parametro preso come riferimento è stata l'AUC_{inf}, poiché considerato il più rilevante. Da questi dati emerge come la quantità di silibina A e B, assorbita in seguito a somministrazione dei SES risulta effettivamente maggiore rispetto a quella assorbita in seguito ad assunzione delle capsule contenente l'estratto secco.

Tabella 20. Parametri farmacocinetici normalizzati dei SES e delle capsule di riferimento (media ± SD).

FORMULAZIONE	**AUC_{inf}/D (ng/h/mL/mg)**
SES Libera A	2,63 ±1,11
Riferimento[1] Libera A	0,83±0,503
SES Libera B	3,48±4,27
Riferimento[1] Libera B	0,43±0,16
SES Totale A	12,81±4,81
Riferimento[1] Totale A	3,44±1.25
SES Totale B	17,60±10,86
Riferimento[1] Totale B	5,52±2

La spiegazione di tale fenomeno può essere ricondotta al percorso effettivo che la silibina segue per rendersi maggiormente biodisponibile.
Per quanto riguarda il SES, dove il fitocomplesso è più solubile, la presenza del ricircolo enteroepatico prolunga notevolmente il periodo di attività del farmaco. Nel caso dell'estratto come tale invece, la sua bassa solubilità non permette l'assorbimento di elevate quantità di fitocomplesso, quindi anche la presenza del ricircolo enteroepatico è meno significativa.

4.2. Vinpocetina

Per la **Vinpocetina**, dopo alcune prove preliminari, è stato progettato un piano sperimentale (Tabella 21), dove le 9 formulazioni previste dal piano stesso sono state poi emulsionate con 10, 20, 30, 40 % di acqua, per determinarne la stabilità dell'emulsione stessa.Dall'analisi dei risultati si evince che dispersa con il 40 % di acqua, il sistema autoemulsionante (SES) formato dal 50% di polisorbato 80, dal 30% di olio vegetale e 20% di mono-di-gliceridi, e in cui la percentuale del tensioattivo è la più alta tra i componenti, è la più stabile in quanto lasciandola a riposo 24 ore, non dimostra fenomeni di coalescenza, né di creaming né di flocculazione né di separazione di fase.

Tabella 21. Variazione dei componenti della fase lipidica.

N° Exp.	**OLIO VEGETALE (%)**	**POLISORBATO 80 (%)**	**MONO-DI-GLICERIDE (%)**
1.	30	50	20
2.	40	40	20
3.	50	30	20
4.	60	40	/
5.	70	30	/
6.	50	50	/
7.	60	20	20
8.	60	30	10
9.	70	20	10

Per ottenere una massa plastica successivamente estrudibile, una volta determinate le concentrazioni dei componenti del sistema autoemulsionante (miscela di mono di-gliceridi/olio vegetale/polisorbato 80), è stato necessario trovare le concentrazioni ideali degli altri due eccipienti: la cellulosa microcristallina e il lattosio.

La cellulosa microcristallina infatti modifica le proprietà reologiche della formulazione conferendole un adeguato grado di plasticità e resistenza, tenendo sotto controllo il movimento dell'acqua all'interno della massa umida durante il processo.

Ad accrescere ulteriormente la qualità della miscela destinata ad essere estrusa e sferonizzata, concorre anche la presenza del lattosio che, a causa della sua ridotta distribuzione granulometrica, permette una migliore miscelazione riducendo lo stato di friabilità dell'estruso.

Una volta determinate le proporzioni e la composizione della formulazione contenente il SES (mono di-gliceride, polisorbato 80, olio vegetale e vinpocetina in rapporto 20.0:49.4:30.0:0.6 p/p - formulazione A), è stato notato che quest'ultima formulazione, dopo prove preliminari, doveva essere fissa al 35% p/p.

Il lavoro è proseguito quindi verso la determinazione delle percentuali di lattosio, cellulosa microcristallina ed acqua per l'ottenimento di una formulazione inerte processabile (formulazione B).

A causa della complessità dello studio è stato progettato un disegno sperimentale e una serie di prove sono state condotte sulla fattibilità della preparazione di estrusi basati sulla formulazione A e B; determinando così le limitazioni formulative di ogni componente presente nella formulazione (Tabella 22 e 23, Figura 51 e 52).

Dopo aver verificato la fattibilità dei due disegni sperimentali progettati, sono state effettuate 13 prove per la formulazione A e 10 prove per la formulazione B, i risultati ottenuti sono riportati sempre in Tabella 23.

Tabella 22. Piano sperimentale per la determinazione della composizione ottimale del SES (formulazione A) e della formulazione inerte (formulazione B).

	Componenti	Limitazioni inferiori (%) (p/p)	Limitazioni superiori (%) (p/p)
Formulazione A[a]	Acqua (X_1)	13.0	31.0
	MCC (X_2)	2.0	33.0
	Lattosio (X_3)	2.0	32.5
Formulazione B (inerte)	Acqua (X_1)	36.0	47.2
	MCC (X_2)	24.3	34.0
	Lattosio (X_3)	24.3	34.0

[a]composta da: mono di-gliceride, polisorbato 80, olio vegetale e vinpocetina in rapporto 20.0:49.4:30.0:0.6 p/p e mantenuta ad un valore costante del 35% (M.P.O.).

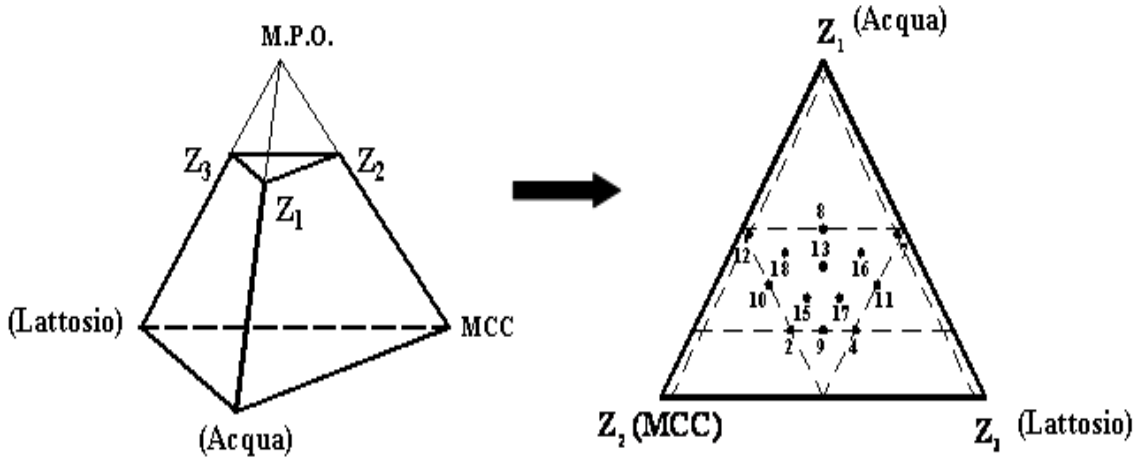


Figura 51: Disegno sperimentale progettato per l'ottimizzazione della formulazione A

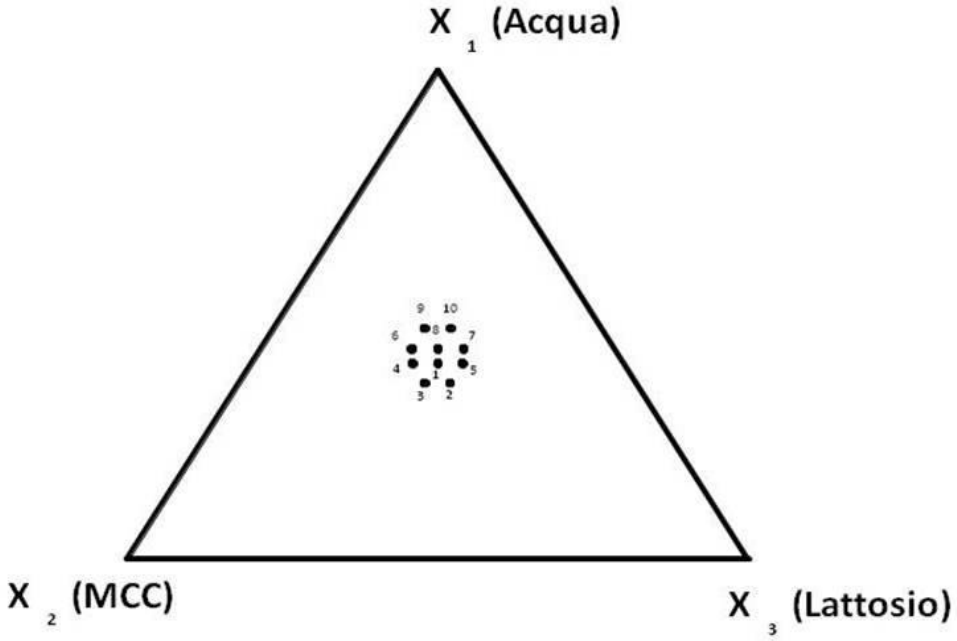


Figura 52: Disegno sperimentale progettato per l'ottimizzazione della formulazione B

Tabella 23. Composizione in % p/p delle 23 formulazioni testate con i corrispondenti profili d'estrusione.

N° Exp	Acqua X_1 (%)	MCC X_2 (%)	Lattosio X_3 (%)	Forza d'estrusione (kN)[a]	Profilo d'estrusione[b]
Formulazione A					
1	13.0	32.5	19.5		No
2	13.0	19.5	32.5		IF
3	31.0	2.0	32.0		No
4	32.5	16.0	16.5		No
5	13.0	26.0	26.0	12	SS
6	22.0	33.0	10.0	<10	SS
7	22.0	11.0	32.0	<10	SS
8	31.5	31.5	2.0		No
9	25	20	10.0		No
10	19	27	19.0	<10	SS
11	28	11	26.0		No
12	19	19	27.0	<10	SS
13	28	26	11.0		No
Formulazione B (inerte)					
1	40.0	30.0	30.0		FF
2	36.0	30.0	34.0	10	SS/IF
3	36.0	34.0	30.0		FF
4	40.0	34.0	26.0		FF
5	40.0	26.0	34.0		FF
6	43.0	24.3	32.7		FF
7	43.0	32.7	24.3		FF
8	43.0	28.5	28.5	10	SS/IF
9	47.2	28.5	24.3		FF
10	47.2	24.3	28.5		FF

FF = flusso forzato
No= formulazione non estrudibile
I.F.= flusso irregolare
SS = stadio stazionario costante

Dalle prove sperimentali sulle suddette formulazioni si evince che non tutte le formulazioni A sono estrudibili e quindi adatte alla produzione di semplici estrusi.

La migliore si è dimostrata essere la formulazione A n° 5, che presentava una corretta ed uniforme consistenza e una sufficiente fluidità che ne consente un libero flusso

durante la lavorazione con una forza di 12kN ed una durata dello stato stazionario di 120 mm (Figura 53), costituita dal 26% di cellulosa microcristallina (MCC) e lattosio con una bagnatura del 13% di acqua e con un caricamento della fase oleosa del 35% p/p (olio-tensioattivo).

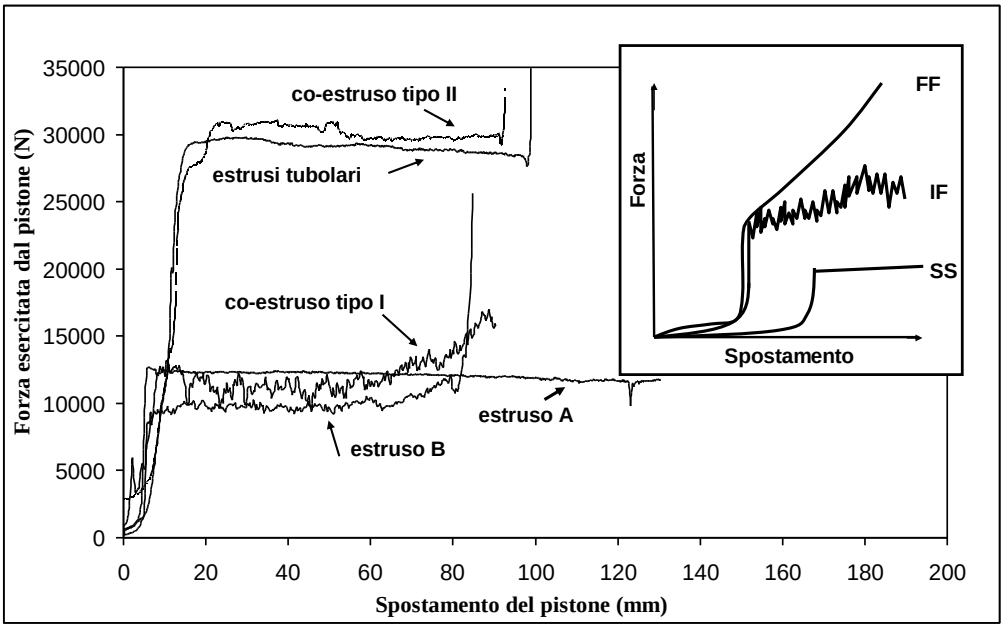


Figura 53. Profili d'estrusione di estrusi, estrusi tubulari e coestrusi con specifici esempi di FF = flusso forzato; No= formulazione non estrudibile; I.F.= flusso irregolare; SS = stadio stazionario costante.

Le formulazioni n° 1, 3, 4, 8, 9, 11, 13 invece, richiedendo una forza superiore alle possibilità del pistone quindi non possono essere estruse, mentre la formulazione n° 2 è caratterizzata da un intenso flusso irregolare che consiste in un ondeggiamento del profilo durante l'estrusione ed infine le formulazioni n° 6, 7, 10, 12 anche se queste dimostrano uno stadio stazionario costante è richiesta per l'estrusione una forza minima, inferiore ai 10kN che è il valore minimo richiesto per ottenere estrusi di buona qualità (Tabella 23).

Per quanto riguarda invece la formulazione B, la velocità d'estrusione programmata è stata di 150 mm/min. Questo è dovuto al fatto che tra le due formulazioni A e B vi è la presenza di una differente percentuale di acqua.

In entrambi i casi infatti per raggiungere un'omogenea distribuzione di acqua all'interno del cilindro, come dimostrano diversi autori [58,59], la formulazione B contenendo più acqua della formulazione A dev'essere processata con una velocità maggiore.

Infatti, più bassa è la velocità d'estrusione, più elevata è la quantità di acqua in movimento nel cilindro, fenomeno questo da evitare.

Tra le 10 formulazioni della formulazione B, seguendo gli stessi criteri adottati per la formulazione A, sono state scelte le formulazioni n° 1 e n° 8. Queste formulazioni infatti avendo una composizione simile persentano un profilo d'estrusione quasi sovrapponibile (Tabelle 23) con uno stadio stazionario costante e lungo e con un piccolo tratto di flusso irregolare.

In particolare la formualzione n° 8 è stata scelta per la buona qualità degli estrusi e per il miglior profilo d'estrusione che dimostra una fase di plateau lunga con una forza stazionaria costante di 10 kN (Figura 53).

Per le altre formulazioni n° 9 e 10 invece, si è verificata spesso un'irregolarità di superficie definita come fenomeno dello shark-skinning.

Tale fenomeno consiste nella formazione di un estruso con tante piccole creste superficiali, distribuite su una struttura ad elica in modo trasversale rispetto alla direzione di flusso che possono comportare la rottura dell'estruso durante la sferonizzazione (Figura 54)[60].

Di conseguenza la formulazione n° 5 del tipo A e la formulazione n° 8 del tipo B sono state successivamente selezionate per verificare la fattibilità della produzione di estrusi tubulari e/o coestrusi; questo per verificare la possibilità di aumentare la quantità di caricamento della vinpocetina e/o derivati (estratto secco della Vinca minor) nei due strati (coestruso) e/o in uno strato singolo (estruso tubolare).

Per la preparazione degli estrusi tubolari è stato necessario effettuare una modifica della camera d'estrusione inserendo lo stampo interno riportato in Figura 55 ed in seguito, utilizzando solo il cilindro esterno del coestrusore (Figura 56), è stata effettuata

---

[58] G. Tomer, J.M. Newton., *Water movement evaluation during extrusion of wet powder masses by collecting extrudate fractions*. Int. J. Pharm., 182, 71-77, (1999).

[59] P.E. Knight., *Evaluation of binding agents for the preparation spherical granules by extrusion/spheronisation.* Ph. D. thesis, University of London, 1993.

[60] K.E. Fielden, J.M. Newton, R.C. Rowe., *The effect of lactose particle size on extrusion properties of microcrystalline/lactose mixtures.* J. Pharm. Pharmacol., 41, 217-221, (1989).

l’estrusione sia della formulazione A sia della formulazione B ottenendo così estrusi tubolari (Figura 57).

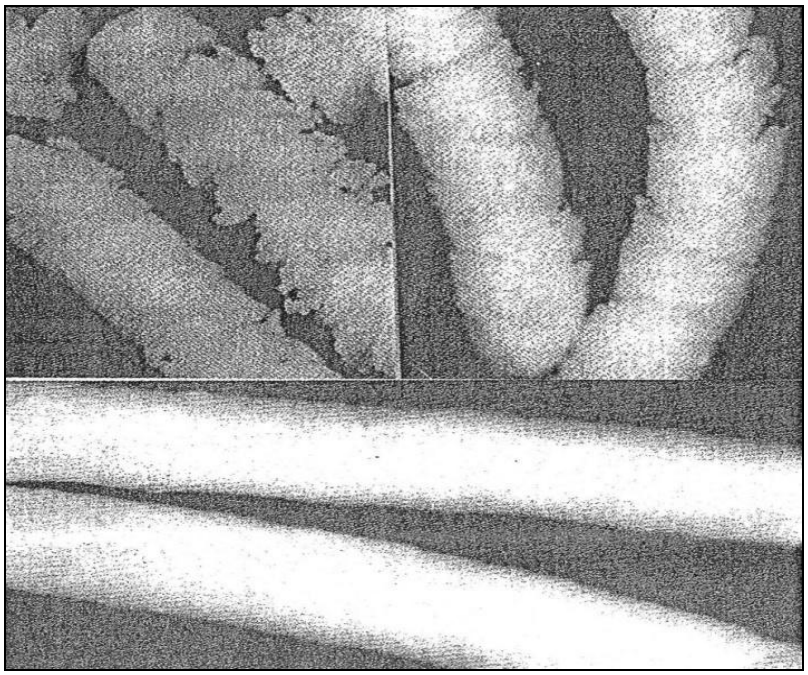


Figura 54. Fenomeno dello shark-skinning.

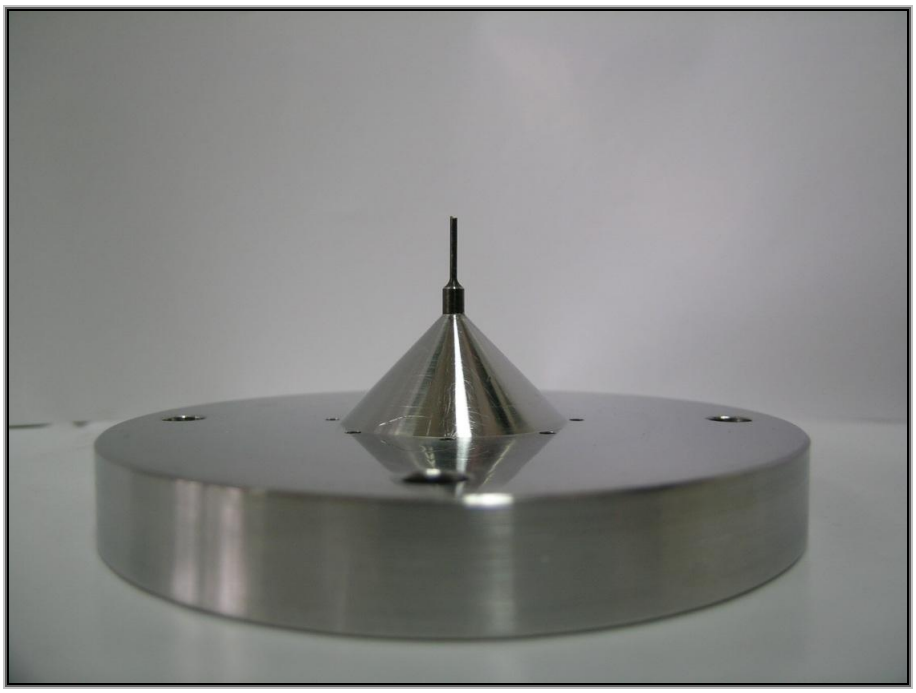


Figura 55. Stampo interno necessario per la preparazione di estrusi tubolari

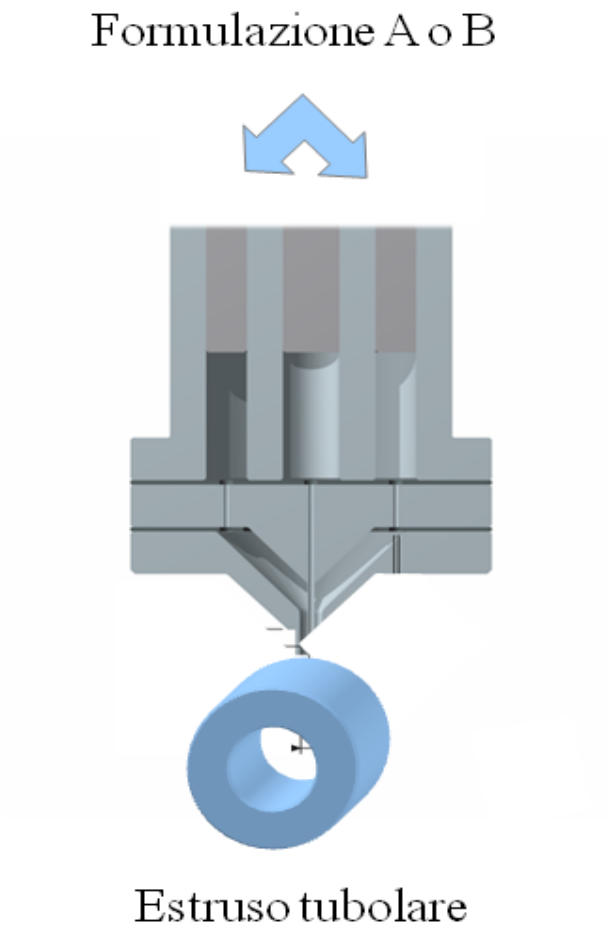


Figura 56. Diagramma di flusso per la preparazione di estrusi tubolari.

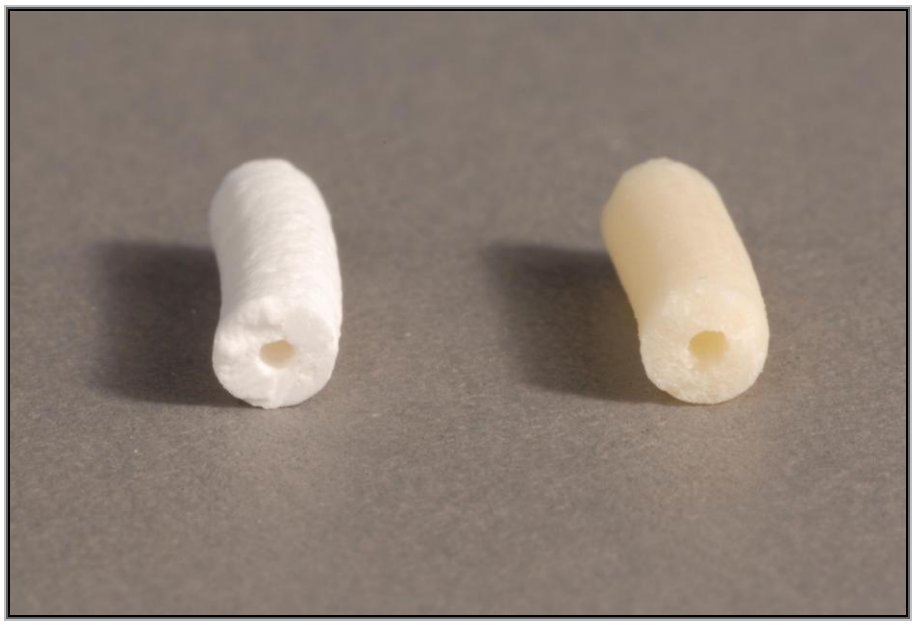


Figura 57. Estrusi tubolari; a sinistra formulazione B, a destra formulazione A.

Anche in questo caso il profilo d'estrusione ottenuto per entrambe le formulazioni prese in esame si è dimostrato ottimale, pur aumentando la forza d'estrusione fino a 35 kN (Figura 53). Fenomeno questo dovuto al fatto che l'estrusione del materiale dal cilindro esterno è molto più complessa rispetto all'estrusione dal cilindro interno[61].

La quantità di materiale, infatti, inserita nel cilindro esterno è molto più elevata (110g) e il percorso della massa prima di raggiungere lo stampo è molto più complesso.

Tuttavia gli estrusi tubolari non sono adatti ad essere processati successivamente alla sferonizzazione infatti, una volta immessi nello sferonizzatore, una consistente quantità si rompe in piccoli segmenti mentre la rimanente, si arrotonda e, in alcuni l'orifizio centrale si chiude, in altri la punta rimane aperta.

Dopo aver verificato la fattibilità e i vari inconvenienti tecnologici riscontrati durante la preparazione di estrusi semplici e tubolari, il passo successivo è stato quello di verificare la possibilità di ottenere coestrusi composti sia dalla formulazione A, sia dalla formulazione B.

Per la formulazione dei suddetti sistemi è stato caricato prima il cilindro esterno con la formulazione B e il cilindro interno con la formulazione A, in seguito il cilindro esterno

[61] J.F. Pinto, M.H. Lameiro, P. Martins., *Investigation on the co-extrudability and spheronization properties of wet masses. Int. J. Pharm.*, 227, 71-80, (2001).

è stato caricato con la formulazione A e il cilindro interno con la formulazione B ottenendo rispettivamente *coestrusi serie I* e *coestrusi serie II* (Figura 58).

I coestrusi così ottenuti presentano una superficie estremamente liscia ed uniforme, senza imperfezioni che potrebbero rendere inutili le operazioni successive di sferonizzazione, determinandone una rottura in frammenti irregolari.

Il profilo di coestrusione si differenzia dal semplice profilo di estrusione perché nella coestrusione, dopo una breve fase di compressione, si denotano due *steady state*: uno che si riferisce all' estrusione del materiale presente nel cilindro interno, l'altro che corrisponde invece alla simultanea estrusione del materiale da entrambi i cilindri (Figura 53).

Siccome con la coestrusione i due pistoni devono comprimere le due masse contemporaneamente, la forza richiesta è molto più alta (35 kN e 25 kN) rispetto alla forza necessaria per effettuare la semplice estrusione (20 kN).

Per la produzione di *coestrusi serie I*, è stato necessario effettuare un maggior controllo in termini di velocità e forza del processo, determinando condizioni di velocità e di forza piuttosto basse (velocità 100 mm/min e forza di 25 kN).

La formulazione B infatti contiene una percentuale di acqua maggiore rispetto alla formulazione A ed essendo presente in quantità maggiori perché caricata nel cilindro esterno (più capiente del cilindro interno), alla discesa del pistone si ha un movimento d'acqua all'interno del sistema e, come si nota nelle Figura 53, la forza richiesta per comprimere la massa non è omogenea e il secondo steady state presenta picchi e flusso irregolari.

Per la produzione, invece, di *coestrusi serie II* sono state scelte forza e velocità alte, rispettivamente di 35 kN e 150 mm/min perchè la componente lipidica che funge da lubrificante, promuove facilmente, durante la fase di compressione e di *steady state*, lo spostamento del pistone e all'aumentare della pressione la densità del materiale assume un valore costante rapidamente.

I coestrusi così ottenuti sono stati sferonizzati per 20 minuti con una velocità di 1000 rpm ottenendo *pellets serie I* (con formulazione A nel core centrale e B nel rivestimento esterno) e *pellets serie II* (con formulazione B nel core centrale e A nel rivestimento esterno).

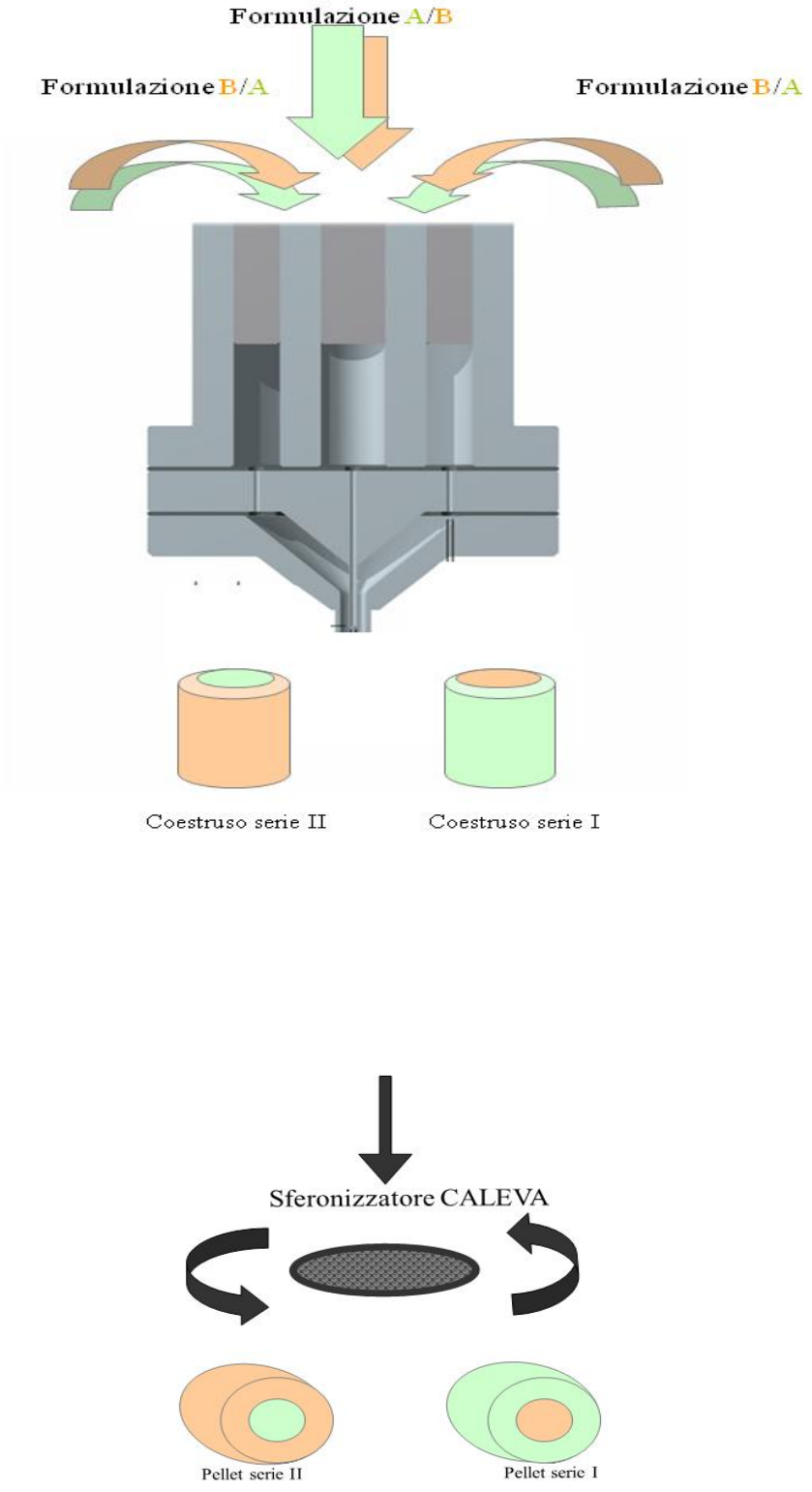


Figura 58. Diagramma di flusso per la preparazione di coestrusi

Tutti i pellets ottenuti, sia di *serie I* sia di *serie II* presentano caratteristiche ottimali (Figura 59), a dimostrazione del fatto che, non sempre, l'ottenimento di pellets di buona qualità coincide con la presenza nel grafico di fasi di steady state perfettamente omogenee.

Figura 59. Coestrusi e pellets serie I e serie II.

Dimostrata la fattibilità del processo di coestrusione e successiva sferonizzazione di entrambe le formulazioni, il passo successivo è stato quello di analizzare la struttura sia dei coestrusi sia dei pellets ottenuti, effettuando un taglio trasversale per verificare la presenza sia di un core interno sia di un rivestimento esterno come dimostrato in Figura 60 e 61.

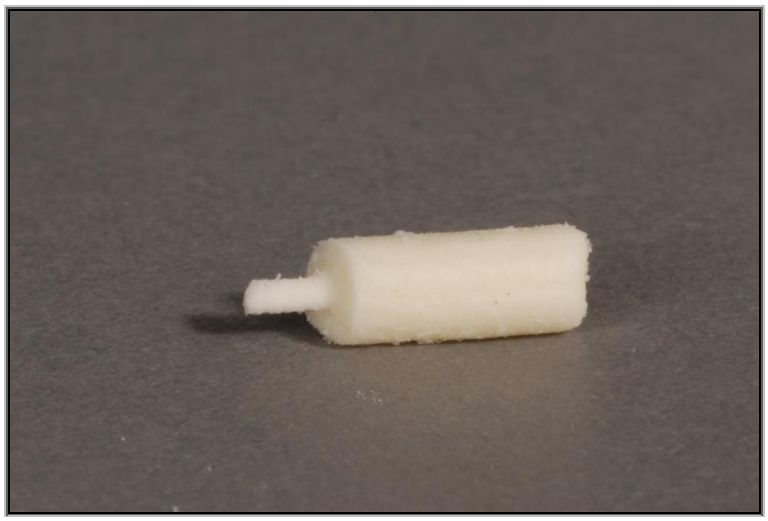


Figura 60. Coestruso serie II.

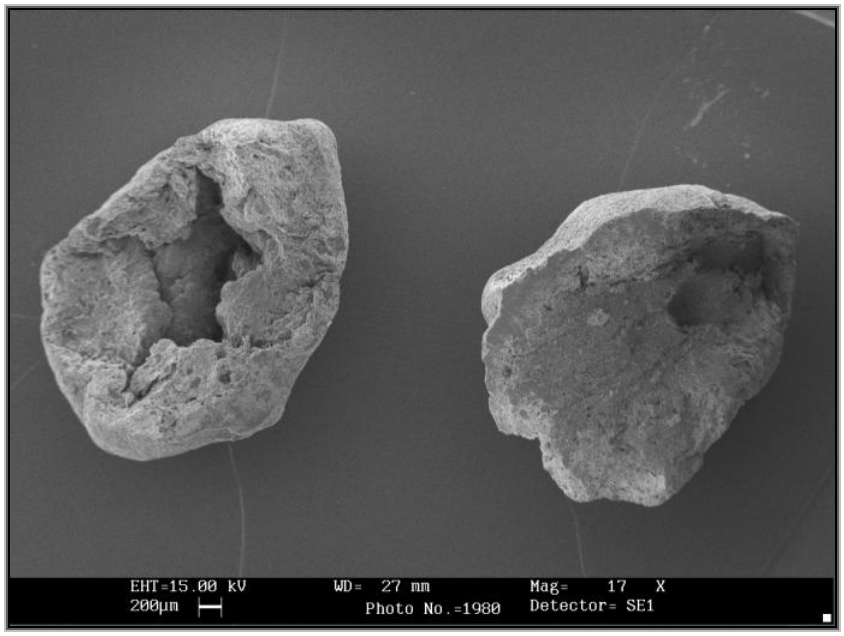


Figura 61. *Pellet serie II* in sezione.

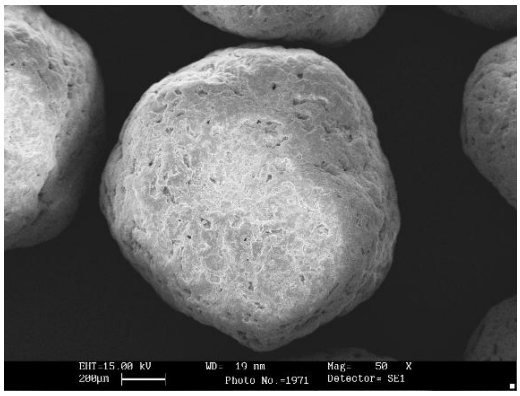
Le caratteristiche tecnologiche dei *pelIets serie I e serie II* sono riportate in Tabella 24 dove si denota che il diametro medio geometrico ponderale di entrambe le formulazioni è di 1400 µm, mentre il tempo di disgregazione varia a seconda del tipo di formulazione: 37 minuti per i *pellets serie I* e 5 minuti per i *pellets serie II*.

Questa differenza è dovuta ai diversi componenti presenti nel rivestimento esterno, infatti per i pellets serie I il tempo di disgregazione aumenta per la presenza di lattosio e cellulosa microcristallina che, se sottoposti a stress meccanico, formano un rivestimento altamente compatto come si evince anche dai dati di densità e durezza.
Poiché la velocità di dissoluzione aumenta con l'aumentare dell' area specifica di superficie è evidente che per l'assorbimento di farmaci poco solubili in acqua, come nel nostro caso, è importante ottenere al più presto possibile la disgregazione dei pellets.

Tabella 24. Caratteristiche tecnologiche dei pellets serie I e serie II.

Classe dimensionale (µm)	**Percentuale di pellets**		
	tipo I	**tipo I + 2% p/p CS**	**tipo II**
> 2000	31.99	0	6.94
2000-1400	66.33	13.81	69.98
1400-1000	1.59	69.43	20.73
1000-715	0.08	14.19	2.38
715-500	0	2.57	0

Per migliorare il tempo di disgregazione dei *pellets serie I* è stata adottata una nuova strategia formulativa aggiungendo nella formulazione B un disgregante al 2%, ampiamente utilizzato in campo farmaceutico quale il Sodio Croscaramellosio (CS), variando così il tempo di disgregazione da 37 minuti a 14 minuti.
Questo miglioramento è dovuto all'ottenimento di una superficie più porosa (Figura 62) che permette la penetrazione del fluido nel granulo, promuovendone subito la rottura.



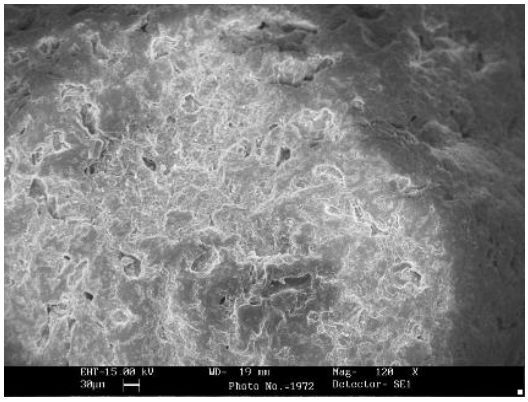


Figura 62. Pellets serie I con disgregante.

Tabella 25. Caratteristiche tecnologiche dei pellets tipo I e II.

	tipo I[a]	tipo I + 2% p/p CS[b]	tipo II[a]
Densita (g/cm^3) (n=3)	1.34	1.48	1.28
Resistenza(kg) (n=10)	0.719	0.220	0.043
Tempo di disgregazione (min) (n=6)	37	14	5

[a] frazione granulometrica: 2000-1400 µm
[b] frazione granulometrica: 1400-1000 µm

L'analisi morfologica dei *pellets serie I* e *serie II* mette in evidenza l'effetto che i diversi componenti, quali cellulosa microcristallina e soluzione lipidica, hanno sulla superficie.

Il *pellet serie I* presenta un aspetto levigato dovuto alle caratteristiche tecnologiche della cellulosa microcristallina che presenta un effetto spugna, assorbendo dapprima il liquido granulante e, successivamente, quando le particelle vengono sottoposte a stress meccanico, promuovendo il rilascio del liquido a livello superficiale, così le particelle si uniscono tra loro formando una superficie più liscia e più levigata (Figura 63 e 64).

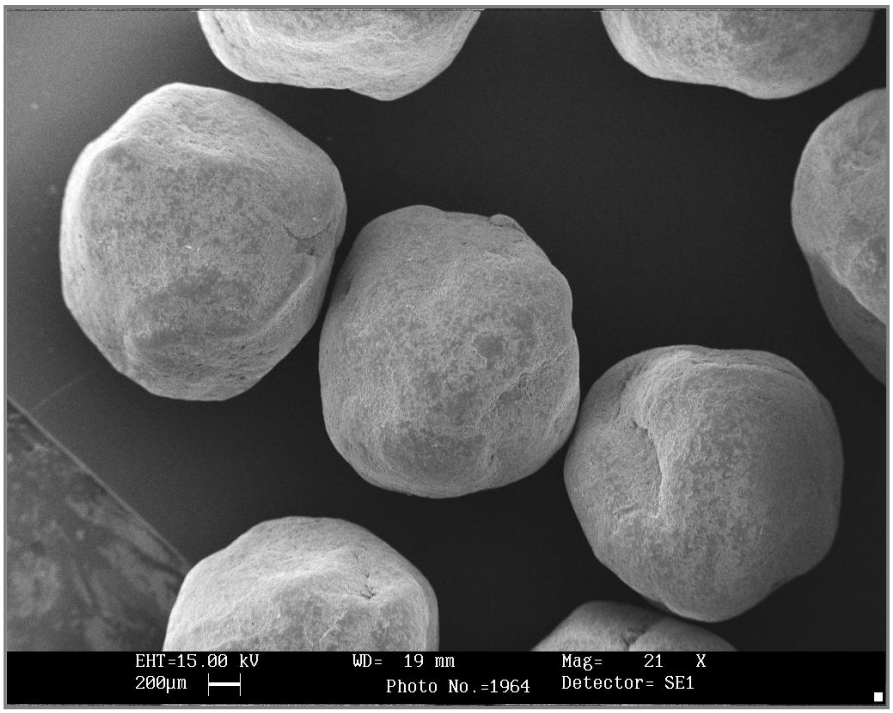


Figura 63. *Pellets serie I.*

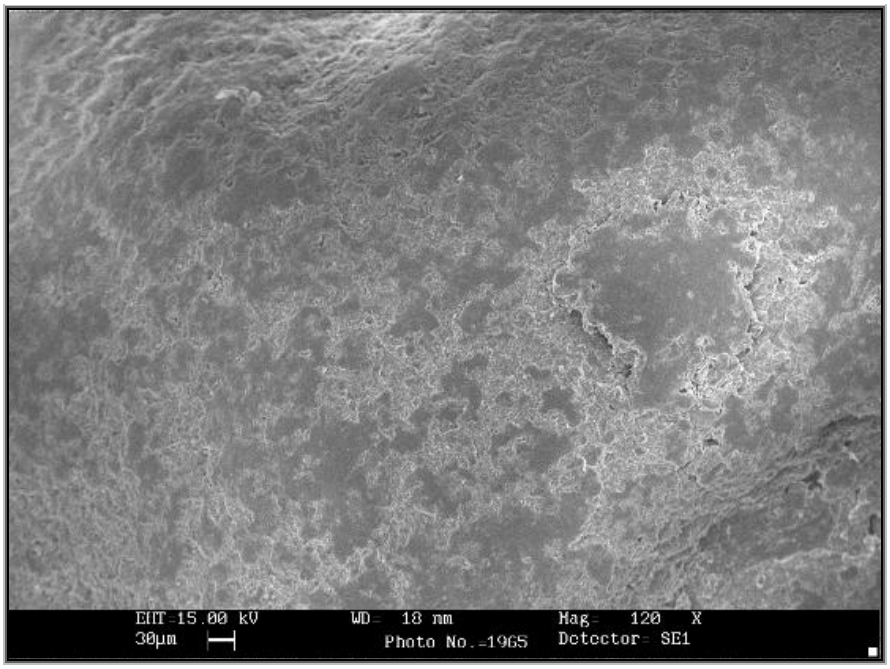


Figura 64. Superficie *pellet serie I.*

Mentre nel *pellet serie II*, si possono notare delle creste frastagliate in rilievo che rendono la superficie più rugosa a causa della sospensione di lattosio e cellulosa microcristallina nella fase lipidica (Figura 65 e 66).

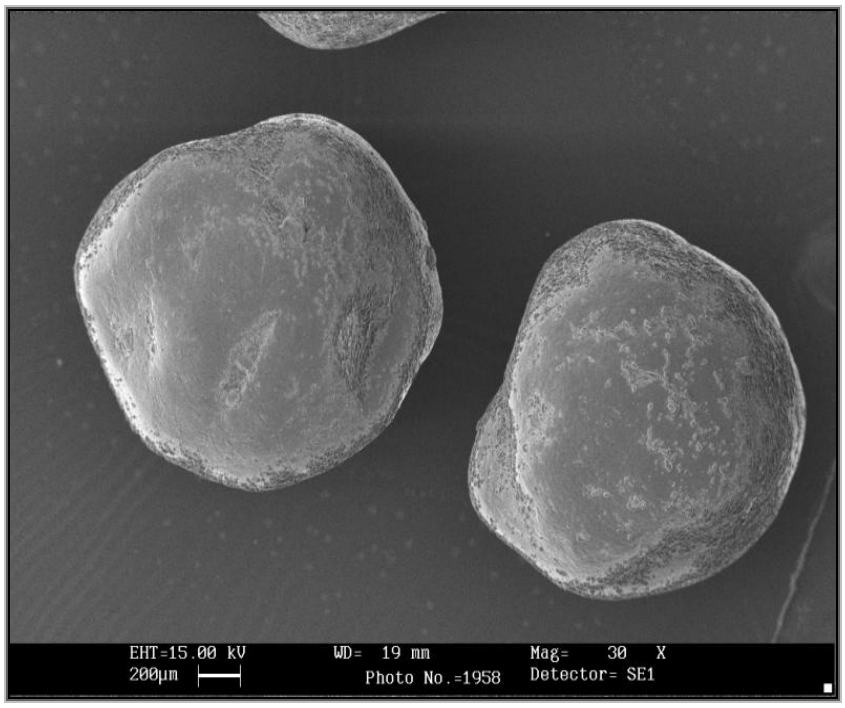


Figura 65. *Pellets serie II*.

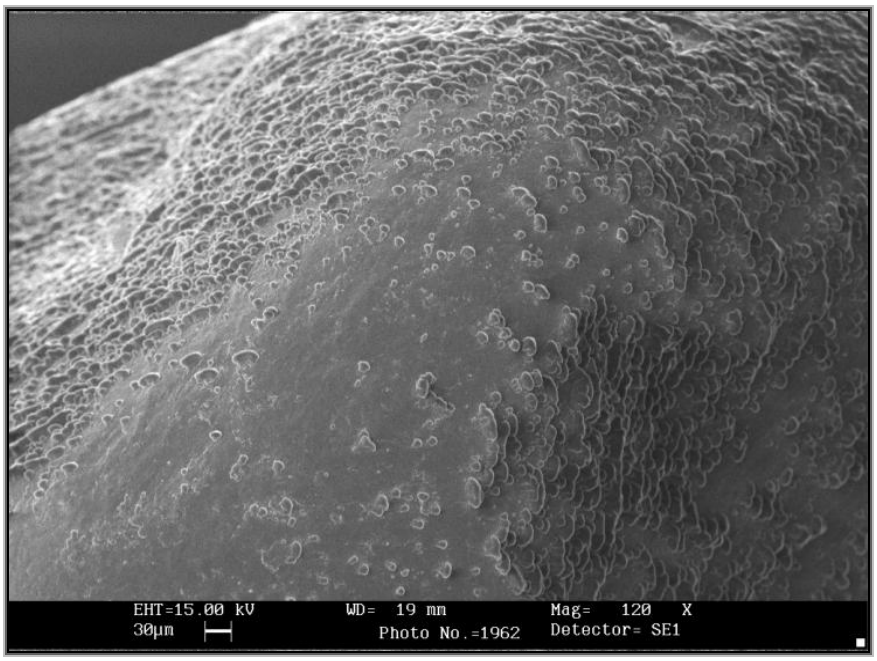


Figura 66. Superficie *pellet serie II*.

Da quanto esposto nella parte introduttiva, i sistemi autoemulsionanti sono caratterizzati dalla capacità di emulsionarsi in soluzione acquosa in condizioni di blanda agitazione.
Al contrario delle emulsioni normali, le emulsioni derivanti dalle esposizione del SES nella fase acquosa, si formano spontaneamente perché sono sistemi termodinamicamente stabili, grazie a un ridotto volume della fase oleosa dispersa.
La *performance* di rilascio dei *pellets serie I* e *serie II* è stata ottenuta eseguendo la metodica "cinetica di solubilizzazione" per evidenziare le potenzialità raggiunte da tali composti nei confronti della rispettiva sospensione acquosa.
Dai risultati riportati in Figura 67 si evince che a differenza della sospensione acquosa, entrambe i *pellets (sia serie I che serie II)* rilasciano il 100% di principio attivo entro 60 minuti anche se con una cinetica differente: il principio attivo dissolve dai pellets serie I entro 30 minuti e, dai pellets serie II entro 20 minuti.
Questo fenomeno si verifica per la composizione della formulazione presente nel rivestimento esterno che ritarda la rottura del granulo, di conseguenza la liberazione del principio attivo. Successivamente è stata investigata la biodisponibilità in vivo della vinpocetina, principio attivo poco solubile in acqua (6 μg/ml) con un basso indice terapeutico (con dosi tipiche di 5 o 10 mg/die), effettuando studi di permeazione intestinale con il metodo del ricircolo *ex vivo*.
E' stata saggiata una sospensione acquosa (25 ml di soluzione fisiologica con 0,55 mg di vinpocetina) e una soluzione con i *pellets serie II* (25 ml di soluzione fisiologica con 90 mg di pellet con titolo 0.6%), con lo 0,2% di acido taurodesossicolico, che è la concentrazione media di sali biliari che si trovano in questo tratto intestinale a digiuno.
I risultati della permeazione intestinale "in situ" ottenuti con il sistema sopra descritto sono riportati in Figura 68 e dimostrano che a parità di concentrazione di principio attivo i *pellets serie II* aumentano notevolmente la solubilità della vinpocetina raggiungendo valori di 19,83 μg/ml rispetto ai 4,66 μg/ml della sospensione acquosa non variando però in modo significativo sia la permeabilità del principio attivo stesso che le dimensioni della fase dispersa, dove quest'ultima presenta valori di 100nm, come dimostrato dai valori riportati in Tabella 26 e Figura 67.

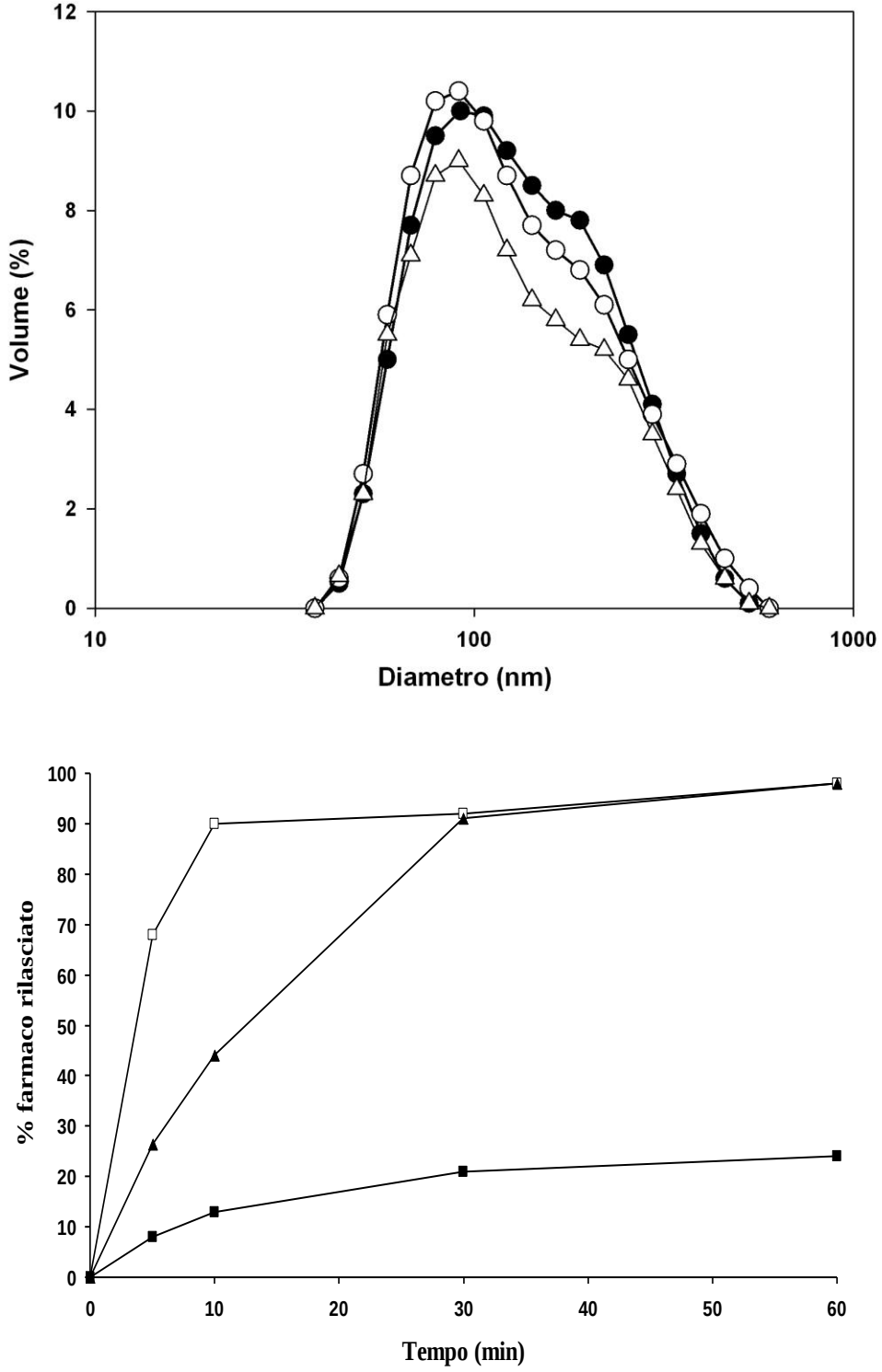


Figura 67. Profilo dissolutivo dei pellet serie I (▲); pellet con disgregante (□); sospensione acquosa (■) e caratteristiche dimensionali della microemulsione formata: dal SES liquido (Δ), dai pellets tipo I dopo 30 (▲) e 60 (■) minuti di dissoluzione.

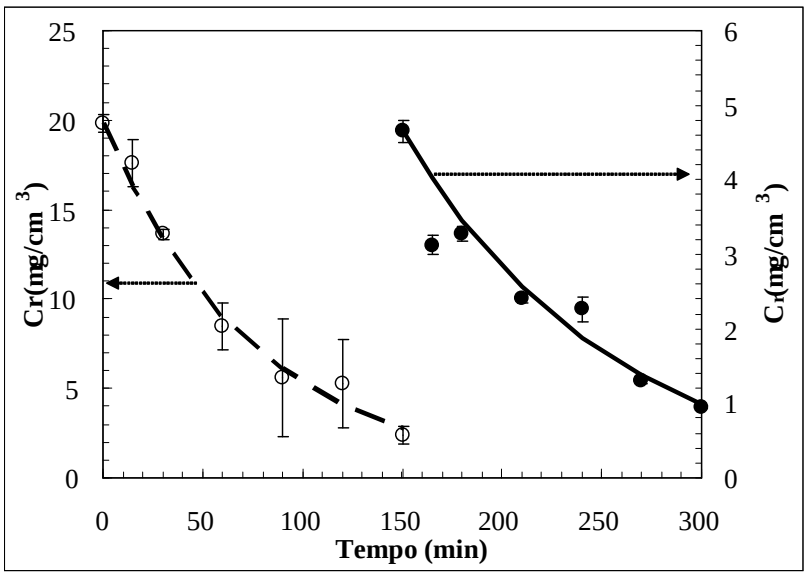


Figura 68. Profilo della permeazione intestinale della vinpocetina determinata mediante il metodo del ricircolo: *pellets serie II* (◦) e della sospensione acquosa (•).

Tabella 26. Variazione temporale del principio attivo nei due compartimenti.

	sospensione acquosa	*pellet serie II*
t(min)	Cr(μg/ml)	Cr(μg/ml)
0	4,66	19,83
15	3,12	17,62
30	3,27	13,62
60	2,41	8,45
90	2,26	5,6
120	1,3	5,25
150	0,95	2,41
P_{app} (cm/s)***	1,10*10-4	1,16*10-4

***** 25 ml si soluzione tampone con 0,55 mg di p.a.
****** 25 ml di soluzione tampone con 90 mg di pellet serie II con titolo 0.6%
******* Permeabilità apparente calcolata con l'equazione:

$$P_{app} = \frac{\left(\frac{dC}{dt} \cdot V_r\right)}{AC_o}$$

dC/dt= variazione di concentrazione nel compartimento ricevente;
V_r = volume del compartimento ricevente (25 ml);
A = area di superficie della parete intestinale (4 cm^2);
C_o = concentrazione iniziale nel compartimento donatore (19,83; 4,66 μg/ml)

Dai dati di permeazione, attraverso intestino di ratto, si può notare come la solubilità della vinpocetina risulti fortemente incrementata se formulata in sistemi autoemulsionanti.

Per confermare che le proprietà in vitro ed ex-vivo di tali sistemi si riscontrano anche in vivo, è stata successivamente valutata la biodisponibilità della vinpocetina, contenuta nel sistema autoemulsionante (pellets) e nella miscela fisica di riferimento.
Sono stati quindi condotti test di assorbimento in vivo dei due suddetti sistemi, somministrando mediante intubazione gastrica una singola dose di 40 mg/kg appartenente a una sospensione di una miscela fisica (composta da vinpocetina, lattosio e cellulosa microcristallina) e di una sospensione di pellets tipo II.

I risultati, così ottenuti, sono riportati nella Figura 69 e successivamente sono stati elaborati utilizzando sempre un approccio non-compartimentale, mediante il software WinNonlin® (Pharsight Corporation, USA) e Microsoft® Excel XP (Microsoft Corporation, Palo Alto, CA 94306 USA come riportati in Tabella 27; dove risulta come la biodisponibilità della vinpocetina, formulata in un sistema autoemulsionante sotto forma di pellets, sia raddoppiata rispetto a quella ottenuta con la somministrazione della miscela fisica.

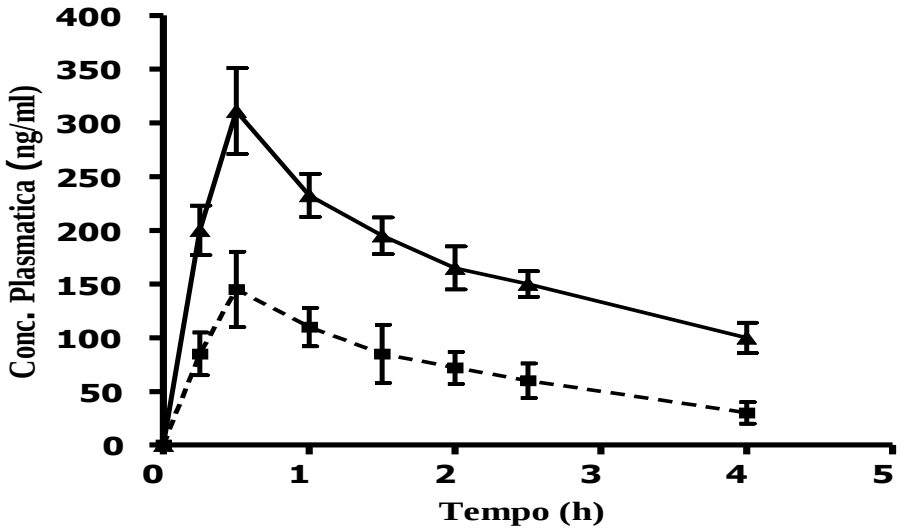


Figura 69. Profili plasmatici ottenuti dopo somministrazione di una dose di 40 mg/kg di vinpocetina sottoforma di pellets tipo II (▲) e miscela fisica (■).

Tabella 27. Parametri farmacocinetici ottenuti dopo somministrazione dei pellets tipo II e della miscela fisica

	Pellets tipo II	Miscela fisica
AUC (ng h/ml)	687.0	291.6
t_{max} (h)	0.5	0.5
C_{max} (ng/ml)	311.0	145.0

5. CONCLUSIONI

I risultati degli studi, descritti in questa tesi, hanno messo in luce l'utilità del metodo dell'estrusione-sferonizzazione e della coestrusione, per la preparazione di sistemi autoemulsionanti solidi, con l'utilizzo di un estrusore a pistone per realizzare pellets semplici, coestrusi e pellets bifasici. uest'ultimi sistemi autoemulsionanti sono costituiti da una fase oleosa, tensioattivo e acqua, incorporati successivamente su una matrice composta da cellulosa microcristallina e lattosio.

E' stata valutata la possibilità di processare diverse formulazioni per ottenere estrusi singoli, tubulari e coestrusi, mediante una valutazione della relazione che intercorre tra la forza di estrusione, richiesta dai diversi sistemi formulativi e lo spostamento del pistone, nella camera di estrusione.

Tali sistemi, in seguito a studi in vivo ed in vitro, hanno dimostrato un aumento sia delle performance dissolutive che della biodisponibilità di principi attivi poco solubili, come la vinpocetina e la silimarina.

Questa performance farmacocinetica è attribuibile a svariati fattori:

a) il sistema autoemulsionate somministrato forma una microemulsione a livello fisiologico, migliorando così l'assorbimento del principio attivo;

b) la presenza del fenomeno del ricircolo enteroepatico;

c) un probabile assorbimento concomitante attraverso la via linfatica, evita il metabolismo di first-pass epatico.

Visti i risultati positivi così ottenuti, tale tecnica può essere utilizzata a livello tecnologico per una valida alternativa alle formulazioni classiche, questo per migliorarne la bassa solubilità, e la non alta biodisponibilità e il limitato assorbimento di sostanze di natura lipofila.

6. INDICE

CAPITOLO I – INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESTI…….....…2

1. Sistemi Autoemulsionanti 2

1.1. Digestione lipidica e processi di assorbimento 4

1.2. Assorbimento da parte del sistema linfatico 6

1.3. Classificazione delle formulazioni lipidiche 9

1.3.1. Formulazioni lipidiche di tipo I 9

1.3.2. Importanza del tensioattivo 12

1.3.3. Formulazioni lipidiche di tipo II 18

1.3.4. Formulazioni lipidiche di tipo III 18

1.4. Processi tecnologici 19

1.5. Scopo della tesi 20

CAPITOLO II – PRINCIPI ATTIVI SELEZIONATI.....22

2.1. Silimarina (fitocomplesso del Cardo Mariano) 22

2.1.1. Complessazione con un fosfolipide 27

2.1.2. Inserimento in capsule di gelatina molle 28

2.1.3. Complessazione con la β - ciclodestrina 29

2.1.4. Formulazione di una microemulsione 30

2.1.5. Processazione mediante spray - drying 31

2.1.6. Utilizzo nella preparazione di compositi con polimeri reticolati 32

2.1.7. Utilizzo nella preparazione di Dispersioni Solide 33

2.2. Vinpocetina 33

2.2.3. Metodo della granulazione a umido o Kneading.....38

2.2.4. Coevaporazione.....38

2.2.5. Liofilizzazione.....39

CAPITOLO III – PARTE SPERIMENTALE..... 44

3.1. Materiali 44

3.2. Preparazione del sistema lipidico liquido 45

3.2.1. Preparazione del sistema autoemulsionante 45

3.2.2. Determinazione delle dimensioni della fase dispersa con Laser Light Scattering.. 47

3.2.3. Apparecchiatura utilizzata per gli studi preformulativi di estrusione 48
3.3. Preparazione dei pellets 53
3.4. Caratterizzazione dei pellets 53
3.4.1. Analisi granulometrica 53
3.4.2. Studi morfologici 53
3.4.3. Determinazione della densità vera 53
3.4.4. Test di disaggregazione 56
3.4.5. Test di compressione 57
3.4.6. Test di dissoluzione *in vitro* 57
3.5. Studi *in vivo* 58
3.5.1. Silimarina (fitocomplesso del Cardo Mariano) 58
3.5.2. Determinazione del contenuto di Silibina nell'estratto secco,nel SES e nei pellets 59
3.5.3. Preparazione dei campioni plasmatici e linfatici 59
3.5.4. Condizioni per l'analisi cromatografica 60
3.6. Vinpocetina 62
3.6.1. Determinazione del contenuto di vinpocetina nei pellets 63
3.6.2. Trattamento dei campioni plasmatici e metodo di analisi per la vinpocetina 63
CAPITOLO IV – RISULTATI E DISCUSSIONE 65
4.1. Silimarina (fitocomplesso del Cardo Mariano) 65
4.2. Vinpocetina 91
5. Conclusioni 114
6. Indice 115