

# Sistemas de liberación de fármacos auto-microemulsionables (SMEDDS) sólidos a base de aceite de hígado de bacalao para mejorar la biodisponibilidad oral de trans-resveratrol

## Cod liver oil based solid self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) to improve the oral bioavailability of trans-resveratrol

### **Ankita Shah**

Freund-Vector Corporation, 675 44<sup>th</sup> Street, Marion, IA 52302, USA  
[ankita.shah@freund-vector.com](mailto:ankita.shah@freund-vector.com)

### **Marcela Longhi**

Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA), CONICET y Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Ciudad Universitaria, 5000-Córdoba, Argentina  
[mrlonghi@unc.edu.ar](mailto:mrlonghi@unc.edu.ar)

### **Abu Serajuddin**

Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy and Health Sciences, St. John's University, 8000 Utopia Parkway, Queens, NY, USA  
[serajuda@stjohns.edu](mailto:serajuda@stjohns.edu)

### **Carolina Aloisio**

Facultad Departamento de Ingeniería Química, Facultad Regional de San Francisco, Universidad Tecnológica Nacional, 2400- San Francisco, Córdoba, / Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA), CONICET, Argentina  
[carolina.aloisio@gmail.com](mailto:carolina.aloisio@gmail.com)

### **Resumen**

El objetivo de este trabajo fue desarrollar sistemas de administración de fármacos auto-microemulsionables (SMEDDS) utilizando aceite de hígado de bacalao (AHB), para aumentar la solubilidad, la velocidad de disolución y la biodisponibilidad oral del trans-resveratrol. Se construyeron diagramas ternarios de fases de AHB con Kolliphor RH 40 y/o Tween 80 y agua y lo mismo mezclando AHB con monooleato de glicerol (MOG) para identificar las regiones donde se formaron microemulsiones. Se identificaron varias formulaciones que contenían proporciones de lípido/tensioactivo 6:4, 1:1 y 4:6 p/p utilizando la mezcla 1:1 de AHB y MOG como componentes lipídicos y Kolliphor RH 40 o su mezcla con Tween 80 como tensioactivos. y se determinó la solubilidad del trans-resveratrol en estas formulaciones. Los ensayos de dispersión *in vitro* en 250 mL de HCl 0,01 N (pH 2) a 50 rpm, realizados de acuerdo con el método 2 de la USP, mostraron que las formulaciones se dispersaron rápidamente en medios acuosos formando microemulsiones sin precipitación del fármaco.

**Palabras clave:** formulaciones a base de lípidos; microemulsión; SMEDDS; trans-resveratrol; aceite de hígado de bacalao; lípido de cadena larga; monoglicérido de glicerol; tensioactivo; diagrama de fases; solubilidad; ensayo de dispersión.

## Abstract

The aim of this work was to develop self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) using cod liver oil (CLO), to increase the solubility, dissolution rate and oral bioavailability of trans-resveratrol. Ternary phase diagrams of CLO with Kolliphor RH 40 and/or Tween 80 and water and or the same by mixing CLO with glycerol monooleate (GMO) were constructed to identify regions where microemulsions were formed. Several formulations containing 6:4, 1:1, and 4:6 w/w lipid/surfactant ratios using the 1:1 mixture of CLO and GMO as lipid components and Kolliphor RH 40 or its mixture with Tween 80 as surfactants were identified, and trans-resveratrol solubility in these formulations were determined. *In vitro* dispersion testing in 250 mL of 0.01 N HCl (pH 2) according to the USP method 2 at 50 rpm showed that the formulations rapidly dispersed in aqueous media forming microemulsions with no drug precipitation.

**Keywords:** lipid-based formulations; microemulsion; SMEDDS; trans-resveratrol; cod liver oil; long chain lipid; glycerol monoglyceride; surfactant; phase diagram; solubility; dispersion test.

## Introducción

El resveratrol (3,5,40-trihidroxiestilbeno) es un compuesto polifenólico no flavonoide que se encuentra en el maní, las uvas, las moras, los arándanos, el vino tinto y varias plantas que generalmente se consumen como parte de la dieta humana (McEvoy *et al.*, 2014). El isómeros *trans* (trans-resveratrol) es farmacológicamente activo y más estable que el *cis*-resveratrol (McEvoy *et al.*, 2014). En la literatura se ha informado de una amplia gama de propiedades farmacológicas del compuesto, como efectos antioxidantes, anticancerosos, cardioprotectores, neuroprotectores y antiinflamatorios, entre otros (Behrens *et al.*, 1996; Grove, *et al.*, 2006). Sin embargo, el trans-resveratrol se absorbe poco después de la administración oral debido a la baja solubilidad en agua en el rango de pH gastrointestinal (0,06 mg/ml a pH 1,2-7,4) (Desai *et al.*, 2020). Dado que es un compuesto con baja solubilidad en agua, el desarrollo de sus formas de dosificación oral terapéuticamente eficaces resulta un desafío. Durante más de medio siglo, ha habido mucho interés en las formulaciones a base de lípidos por su capacidad para aumentar la velocidad de disolución y la solubilidad intestinal aparente de fármacos lipofílicos, poco solubles en agua y nutracéuticos, aumentando así su absorción y biodisponibilidad oral (Feeney *et al.*, 2016). Los sistemas de administración de fármacos auto-microemulsionables (SMEDDS) son mezclas isotrópicas de aceite, tensioactivo y habitualmente co-tensioactivo en el que un fármaco es solubilizado (Goddeeris *et al.*, 2006; Hintzen *et al.*, 2014). Estos sistemas forman microemulsiones en presencia de agua o fluidos gastrointestinales tras la administración oral, facilitado por la leve agitación del tracto gastrointestinal (Djekic & Primorac, 2008; Li *et al.*, 2005; Q. Li *et al.*, 2015; Mekjaruskul *et al.*, 2013; Sprunk, Strachan & Graf, 2012). El objetivo principal de este trabajo fue el desarrollo de formulaciones auto-microemulsionables [self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS)], utilizando aceite de hígado de bacalao, para aumentar la solubilidad de trans-resveratrol. Este aceite es un lípido de contiene ácidos grasos de cadena larga (Pouton, 2006) que tiene la atracción adicional como vehículo del trans-resveratrol porque contiene ácidos grasos poliinsaturados omega-3 con posibles beneficios para la salud (Chen *et al.*, 2010; Prajapati *et al.*, 2012).

## Desarrollo

**Diagramas pseudo-ternarios de fases:** Se construyeron diagramas pseudo-ternarios de fases, a 37 °C utilizando AHB o una mezcla 1:1 p/p con MOG. Se utilizaron Kolliphor RH 40, Tween 80 o su mezcla 1: 1 p/p como tensioactivos (Tabla 1). Se visualizaron diferentes fases, y luego se realizó el análisis del tamaño de los gotículas en mezclas seleccionadas de lípido-surfactante a 80, 90, 95 y 99% (p/p) de contenido de agua. A partir de los *Sistemas A, B, C y E*, no se observó la formación de microemulsiones (Figura 1 A, B, C y E). Sin embargo, utilizando los *Sistemas D y F*, se observó la formación de microemulsiones (Figura 1 D y F), caracterizados por sistemas transparentes. Los resultados de la determinación del tamaño del gotículas (Tabla 1) también indicaron la formación de

microemulsiones, debido a que presentaron tamaño <300 nm. Estos resultados demostraron que Kolliphor RH 40 fue el tensioactivo más eficaz entre Kolliphor RH 40, Tween 80 o su mezcla 1: 1.

**Estudios de solubilidad:** Los *Sistemas D y F* fueron seleccionados para determinar la solubilidad del trans-resveratrol. También se determinó su solubilidad en los componentes individuales. Las solubilidades del trans-resveratrol en AHB y Tween 80 a 25 °C fueron  $1,0 \pm 0,1$  y  $83 \pm 19$  mg/g, respectivamente. A 45 °C, las solubilidades del compuesto por gramo de AHB, MOG, Kolliphor RH 40 y Tween 80 fueron 1,0, 4,7, 12 y 78 mg/g, respectivamente. Para los *Sistemas D y F*, se observó un aumento en la solubilidad de saturación del trans-resveratrol en SMEDDS con el aumento en la concentración de surfactante. Aunque Tween 80 por sí solo proporcionó una solubilidad muy alta para el trans-resveratrol, una comparación entre los valores de solubilidad en los Sistemas D y F mostró que no había ninguna ventaja específica de usar Tween 80 en una formulación ya que la solubilidad en los dos sistemas era comparable. Para ambos sistemas, las solubilidades de trans-resveratrol más altas se observaron en una relación de aceite a tensioactivo de 4:6 (67 y 58 mg/g en los Sistemas D y F, respectivamente). Considerando que la solubilidad del trans-resveratrol es solo 0.05-0.06 mg/mL en medios acuosos (Hauer *et al.*, 2008), los resultados representan incrementos importantes en la solubilidad del compuesto en SMEDDS.

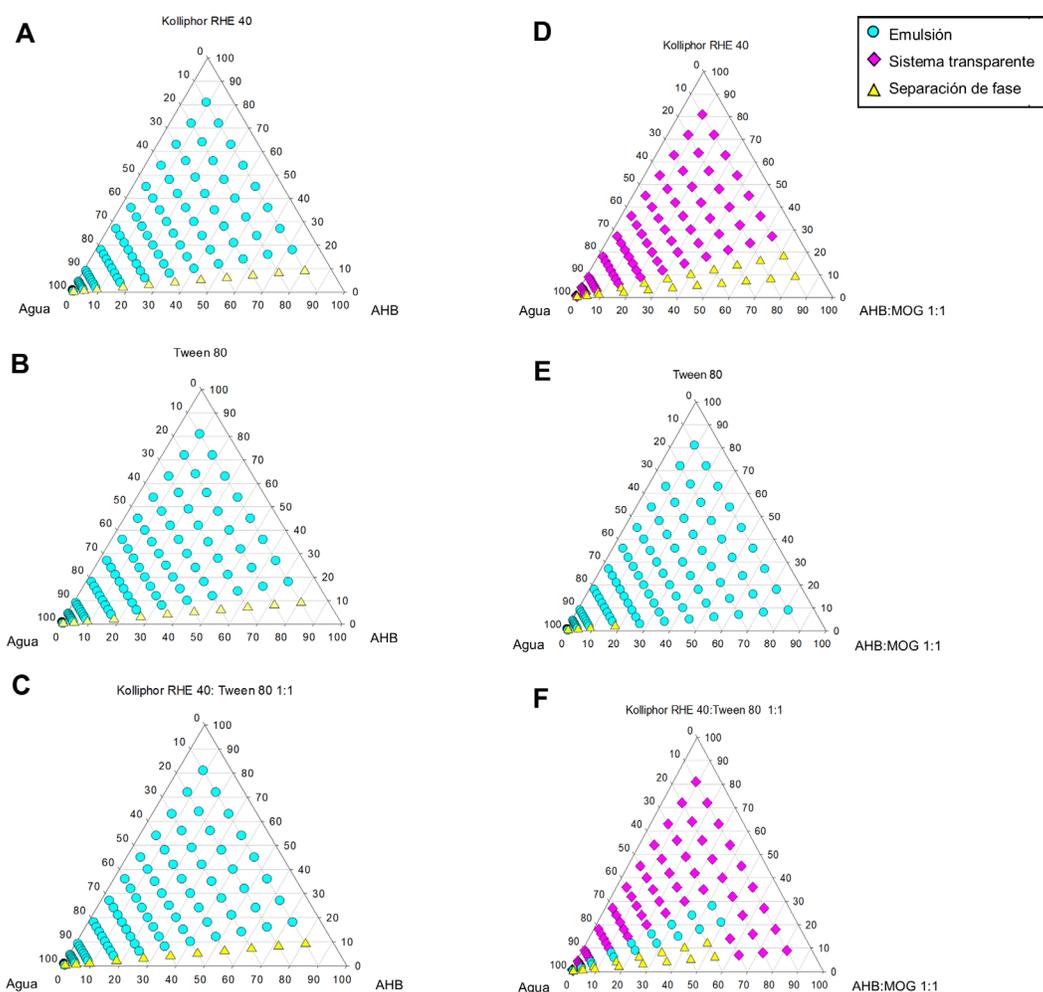


Figura 1. Diagramas pseudo-ternarios de fase de mezclas de AHB y agua con: (A) Kolliphor RH 40, (B) Tween 80, (C) Kolliphor RH 40/Tween 80 (1:1); y de (D) MOG-Kolliphor RH 40, (E) MOG-Tween 80 y (F) MOG-Kolliphor RH 40/Tween 80 (1: 1).

**Selección de SMEDDS de trans-resveratrol:** en base a los diagramas de fase y la solubilidad del fármaco, se seleccionaron formulaciones con mezclas de lípido-surfactante 6:4 a 4:6 correspondientes a los *Sistemas D y F* para estudios posteriores, en los que se disolvió trans-resveratrol de tal manera que las concentraciones se mantuvieron

en aproximadamente un 80% de saturación de la solubilidad. Los suplementos dietarios de trans-resveratrol se suministran en dosis de 20 a 50 mg (Walle *et al.*, 2004) y la dosis sería menor si se mejora su biodisponibilidad con SMEDDS.

**Ensayo de dispersión in vitro:** Se realizaron ensayos de dispersión con trans-resveratrol disuelto en los preconcentrados con proporciones de lípidos a tensioactivos de 6:4, 5:5 y 4:6. Este estudio indicaría la facilidad con la que los preconcentrados se emulsionarían en medios acuosos y permitirían medir el tamaño de los glóbulos de microemulsiones o emulsiones formadas. También se puede determinar cualquier precipitación potencial de trans-resveratrol midiendo su concentración en la fase dispersa. La Figura 4 muestra las concentraciones del compuesto en el medio de dispersión en función del tiempo tras la filtración del medio de dispersión (poro de 0,45  $\mu\text{m}$ ). Al menos el 80% de trans-resveratrol se dispersó de todas las formulaciones en 15 min, excepto para la formulación 4:6, donde ~70% del compuesto se dispersó en 15 min. Estos resultados demuestran que al menos el 70-80% de las formulaciones se dispersaron como microemulsiones o glóbulos finos que pasaron a través del filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ , es decir, tenían un tamaño de glóbulo <450 nm. Se observó que el índice de polidispersidad (PDI) durante la determinación del tamaño de los glóbulos fue alto, lo que es una indicación de que los glóbulos posiblemente no se distribuyeron uniformemente. De hecho, se observó en otro estudio que cuando se agregaba agua a SMEDDS o preconcentrados de microemulsión, primero se formaban geles, que luego se convertían en materiales cristalinos líquidos y finalmente en microemulsiones. Dado que solo se utilizó la agitación suave de 50 rpm durante la prueba de dispersión, es posible que todo el gel no se rompa en glóbulos finos de microemulsión y, por lo tanto, sea responsable de un alto PDI y una liberación incompleta del fármaco al filtrar los medios de dispersión. Es posible que el fármaco remanente quede atrapado en partículas cristalinas líquidas más grandes. Se puede esperar que todo el fármaco finalmente se disperse después de la administración oral y se libere durante la transición a través del tracto gastrointestinal.

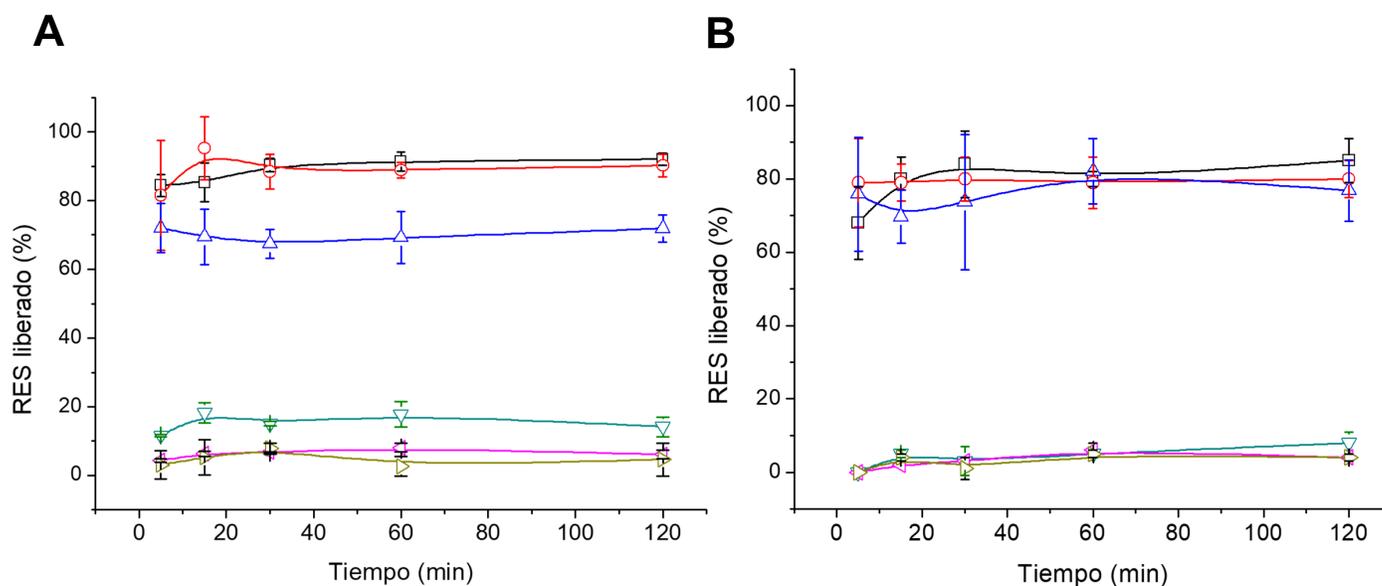


Figura 2. Porcentaje de trans-resveratrol (RES) liberado a partir de preconcentrados de microemulsiones durante ensayos de dispersión en 250 mL de HCl 0,01 M a 37 °C y 50 rpm, según el método de disolución 2 de la USP. (A) Sistema D: □, Formulación 1 (6:4 lípido-tensioactivo); ○, Formulación 2 (5:5 lípido-tensioactivo); △, Formulación 3 (4:6 lípido-tensioactivo). (B) Sistema F: □, Formulación 4 (6:4 lípido-tensioactivo); ○, Formulación 5 (5:5 lípido-tensioactivo); △, Formulación 6 (4:6 lípido-tensioactivo). Cada valor representa la media  $\pm$  S.D. de  $n \geq 3$ .

**Discusión:** En la presente investigación, se observó que utilizar solo AHB, con un surfactante, no conduciría a la formación de microemulsiones. Es esencial que un monoglicérido (MOG) también esté presente en el sistema junto con el triglicérido (AHB). El posible mecanismo del efecto del monoglicérido puede ser análogo al observado

con los lípidos de cadena media, donde Prajapati *et al* [25] postularon que el monoglicérido participa con el tensioactivo en la formación de una curvatura que rodea los glóbulos de aceite en las microemulsiones. En la presente investigación, hemos demostrado que es posible formar microemulsiones sin la adición de alcoholes de cadena corta. Los resultados de la presente investigación también destacan una posible limitación del uso de triglicéridos de cadena larga, ya que se observó que la solubilidad del trans-resveratrol en el aceite de hígado de bacalao fue baja. Sin embargo, el preconcentrado de microemulsión o SMEDDS también contiene monoglicéridos y tensioactivos en la formulación, y la presencia de tales componentes puede tener una influencia importante sobre la solubilidad del trans-resveratrol en las formulaciones. Los valores experimentales de solubilidad en estas mezclas fueron 17, 44, 67 y 58 mg/g, respectivamente, demostrando así que existe un gran efecto sinérgico de la mezcla AHB-Kolliphor RH 40 sobre la solubilidad del trans-resveratrol. La diferencia entre el efecto de Kolliphor RH 40 y su mezcla 1:1 con Tween 80 se debe posiblemente a que Kolliphor RH 40, al ser un éster de lípido de cadena larga (aceite de ricino), tiene una similitud estructural con el AHB y el MOG y, por lo tanto, actúa sinérgicamente con los lípidos en la solubilización del compuesto. Los resultados del presente estudio confirman que es esencial determinar la solubilidad real de un compuesto en el SMEDDS, en lugar de estimar la solubilidad a partir de la solubilidad en los componentes individuales. No existe consenso en la literatura sobre cuál es la dosis humana óptima de trans-resveratrol. Los resultados de la presente investigación demuestran que es factible el desarrollo de formulaciones a base de lípidos con al menos 50 m/g de contenido de fármaco. Dado que el fármaco permanece en forma solubilizada después de la dispersión en medios acuosos, se espera que la absorción oral de tal producto sea alta.

Tabla 1. Tamaños promedio de gotículas (nm) de emulsiones y microemulsiones formadas tras la dilución de mezclas de lípidos y tensioactivos con agua al 80 a 99% p/p. Los asteriscos indican dispersiones demasiado viscosas para la determinación del tamaño de partícula.

Sistema	Agua %	Relación lípido:surfactantes						
		1:9	2:8	3:7	4:6	5:5	6:4	7:3
<b>Sistema A</b>	80	5300	3020	1009	800	813	721	552
Lípido: AHB	90	9245	748	476	380	403	445	353
Surfactante: Kolliphor RH 40	95	948	710	458	967	437	452	361
	99	2745	1373	3260	1104	1032	1799	894
	80	836	1976	4361	3862	4567	6952	*
<b>Sistema B</b>	90	7623	416	1535	1654	857	1282	411
Lípido: AHB	95	4668	1297	1200	822	2462	527	381
Surfactante: Tween 80	99	1389	370	417	4212	492	689	417
<b>Sistema C</b>	80	484	2303	2619	2511	8073	4799	2619
Lípido: AHB	90	372	1784	1668	1318	1950	1944	1619
Surfactante: Kolliphor RH 40- Tween 80, 1:1	95	313	763	696	414	735	915	1024
	99	266	331	319	271	371	482	529
	80	1714	4398	1222	351	1754	351	462
<b>Sistema D</b>	90	671	450	673	289	640	289	272
Lípido: AHB-MOG, 1:1	95	295	276	387	220	367	220	239
Surfactante: Kolliphor RH 40	99	142	199	256	173	207	173	187
	80	613	2320	1479	1582	1339	502	833
<b>Sistema E</b>	90	528	1407	1211	785	759	502	573
Lípido: AHB-MOG, 1:1	95	383	1582	1230	774	803	471	739
Surfactante: Tween 80	99	1011	2223	4160	1785	2788	1504	2872

<b>Sistema F</b>	80	1720	1441	1485	1807	637	490	*
Lípido: AHB-MOG, 1:1	90	827	618	382	339	188	245	1659
Surfactante: Kolliphor RH 40-Tween 80, 1:1	95	100	325	159	252	145	162	756
	99	334	623	98	220	105	108	414

## Conclusiones

Resveratrol es un fármaco BCS Clase II con escasa solubilidad en agua y alta permeabilidad. En este estudio, se identificaron con éxito las composiciones de varios sistemas auto-microemulsionables de su forma farmacológicamente activa, trans-resveratrol. Las formulaciones desarrolladas contenían soluciones de fármacos en mezclas de lípidos y tensioactivos sin agua añadida, y se esperaba que formaran microemulsiones en contacto con medios acuosos en el tracto gastrointestinal tras de la ingesta oral. El AHB es un lípido de cadena larga y, aunque existen productos comercializados importantes en los que se han utilizado lípidos de cadena larga, no hay informes publicados sobre cómo se desarrollaron dichos productos. Además, como informó Pouton (Pouton, 2006), se incorporan comúnmente grandes cantidades de codisolventes orgánicos en formulaciones a base de lípidos para aumentar la solubilidad del fármaco y permitir formulaciones de dispersión en medios acuosos. Sin embargo, hay muchos informes que indican que la presencia de codisolventes orgánicos puede conducir a la precipitación del fármaco tras la dilución con medios acuosos, y también puede haber problemas de estabilidad con las formas de dosificación desarrolladas. Los resultados de la presente investigación muestran que pueden desarrollarse formulaciones auto-microemulsionables sin utilizar codisolventes. Las formulaciones que contienen la mezcla 1:1 de AHB y MOG como lípidos y Kolliphor RH 40 como tensioactivo proporcionaron los resultados más óptimos con respecto a la formación de microemulsiones. Las formulaciones proporcionaron una solubilidad aceptable de trans-resveratrol y se dispersaron rápidamente en medios acuosos como microemulsiones sin precipitación del fármaco.

## Referencias

- Behrens, D., Fricker, R., Bodoky, A., Drewe, J., Harder, F., & Heberer, M. (1996). Comparison of cyclosporin A absorption from LCT and MCT solutions following intrajejunal administration in conscious dogs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(6), 666–668.
- Chen, F., Etzler, F., Ubben, J., Birch, A., Zhong, L., Schwabe, R., & Dudhedia, M. (2010). Effects of lipophilic components on the compatibility of lipid-based formulations with hard gelatin capsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(1), 128–141.
- Desai, H. H., Bu, P., Shah, A. V., Cheng, X. & Serajuddin, A. T. M. (2020). Evaluation of Cytotoxicity of Self-Emulsifying Formulations Containing Long-Chain Lipids Using Caco-2 Cell Model: Superior Safety Profile Compared to Medium-Chain Lipids. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109 (5), s. 1752–1764. doi:10.1016/j.xphs.2020.01.031
- Djekic, L. & Primorac, M. (2008). The influence of cosurfactants and oils on the formation of pharmaceutical microemulsions based on PEG-8 caprylic/capric glycerides. *International Journal of Pharmaceutics*, 352 (1–2), s. 231–239. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.10.041
- Feeney, O. M., Crum, M. F., McEvoy, C. L., Trevaskis, N. L., Williams, H. D., Pouton, C. W., Charman, W. N., Bergström, C. A. S., & Porter, C. J. H. (2016). 50 years of oral lipid-based formulations: Provenance, progress and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 101, 167–194. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2016.04.007>
- Goddeeris, C., Cuppo, F., Reynaers, H., Bouwman, W. G., Mooter, G. van den, & van den Mooter, G. (2006). Light

- scattering measurements on microemulsions: Estimation of droplet sizes. *International Journal of Pharmaceutics*, 312, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.01.037>
- Grove, M., Müllertz, A., Nielsen, J.L. and Pedersen, G. P. (2006). Bioavailability of seocalcitol: II: development and characterisation of self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral administration containing medium and long chain triglycerides. *European journal of pharmaceutical sciences*, 28 (3), s. 233–242.
- Hauer, B., Meinzer, A., Posanski, U. and Richter, F., S. K. (1994). *Pharmaceutical compositions comprising cyclosporins*. USA.
- Hintzen, F., Perera, G., Hauptstein, S., Müller, C., Laffleur, F., & Bernkop-Schnürch, A. (2014). In vivo evaluation of an oral self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for leuprorelin. *International Journal of Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.05.047>
- Li, P., Ghosh, A., Wagner, R. F., Krill, S., Joshi, Y. M., & Serajuddin, A. T. M. (2005). Effect of combined use of nonionic surfactant on formation of oil-in-water microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 288, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.08.024>
- Li, Q., Zhai, W., Jiang, Q., Huang, R., Liu, L., Dai, J., Gong, W., Du, S., & Wu, Q. (2015). Curcumin-piperine mixtures in self-microemulsifying drug delivery system for ulcerative colitis therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 490(1–2), 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.008>
- McEvoy, C., Trevaskis, N., Edwards, G., Perlman, M., Ambler, C., Mack, M., Brockhurst, B., & Porter, C. (2014). In vitro–in vivo evaluation of lipid based formulations of the CETP inhibitors CP-529,414 (torcetrapib) and CP-532,623. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88(3), 973–985. Pouton, C. . (2006). Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *European journal of pharmaceutical sciences*, 29 (3–4), s. 278–287.
- Prajapati, H., Dalrymple, D. & Serajuddin, A. (2016). In vitro dispersion test that could serve as a predictive method for assessing performance of lipid-based drug delivery systems. *Journal of Excipients and Food Chemicals*, 4 (4), s. 1009.
- Prajapati, H. N., Dalrymple, D. M. & Serajuddin, A. T. M. (2012). A comparative evaluation of mono-, di- and triglyceride of medium chain fatty acids by lipid/surfactant/water phase diagram, solubility determination and dispersion testing for application in pharmaceutical dosage form development. *Pharmaceutical Research*, 29 (1), s. 285–305. doi:10.1007/s11095-011-0541-3
- Rane, S. S. & Anderson, B. D. (2008). What determines drug solubility in lipid vehicles: Is it predictable? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 (6), s. 638–656. doi:10.1016/j.addr.2007.10.015
- Sprunk, A., Strachan, C. J. & Graf, A. (2012). Rational formulation development and in vitro assessment of SMEDDS for oral delivery of poorly water soluble drugs. *European journal of pharmaceutical sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 46 (5), s. 508–15. doi:10.1016/j.ejps.2012.04.001
- Walle, T. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos*, 32 (12), s. 1377–1382.