

Un modello *in-vitro* per la simulazione del comportamento termomeccanico dello stomaco umano



Carmine Govetosa



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Facoltà di Ingegneria
Dipartimento di Ingegneria Industriale
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica

**Un modello *in-vitro* per la simulazione del
comportamento termomeccanico dello
stomaco umano**

Tesi in
Principi di Ingegneria Chimica

Relatori:

Prof. Ing. Giuseppe Titomanlio

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Correlatore:

Ing. Sara Cascone

Candidato:

Carmine Govetosa

matricola 0622200044

Anno Accademico 2012/2013

*A mio padre, a mia sorella
e alla mia cara mamma
che continua a vegliare su di me...*

Questo testo è stato stampato in proprio, in Times New Roman

La data prevista per la discussione della tesi è il 21/02/2014

Fisciano, 17/02/2014

Sommario

Sommario	I
Indice delle figure	III
Indice delle tabelle	VII
Abstract	IX
Introduzione.....	1
1.1 Introduzione _____	2
1.1.1 Dissoluzione, idratazione, swelling ed erosione	5
1.1.2 Meccanismi di rilascio	11
1.2 Il tratto gastrointestinale _____	13
1.2.1 Lo stomaco: anatomia e fisiologia	13
1.2.2 L'intestino: anatomia e fisiologia	20
1.3 Motilità gastrica _____	22
1.3.1 Fluidodinamica e fenomeni di trasporto	22
1.4 Obiettivi _____	27
Stato dell'arte.....	29
2.1 Motilità gastrica _____	30
2.2 Sistemi USP _____	39
2.3 Sistemi non USP _____	43
Materiali e metodi	55

3.1 Materiali _____	56
3.1.1 Formulazione farmaceutica	56
3.1.2 Mezzi di dissoluzione	59
3.2 Apparecchiature _____	59
3.2.1 Dissolutore	59
3.2.2 HPLC	60
3.3 Metodi _____	60
3.3.1 Metodi di dissoluzione	60
3.3.2 Metodi analitici	62
Progettazione e realizzazione del modello <i>in-vitro</i>	67
4.1 Progettazione e realizzazione della motilità gastrica _____	68
4.2 Progettazione e realizzazione del sistema di controllo ____	75
4.2.1 Controllo di T	76
Risultati e discussione	87
5.1 Rilascio convenzionale _____	88
5.2 Rilascio non convenzionale _____	89
5.2.1 Rilascio non convenzionale a temperatura ambiente	90
5.2.2 Rilascio non convenzionale con controllo di temperatura	94
5.3 Discussione _____	98
Conclusioni	103
6.1 Conclusioni _____	104
Bibliografia	107

Indice delle figure

Figura 1. Ciclo di un farmaco.....	2
Figura 2. Frazione bioaccessibile e biodisponibile dei componenti ingeriti [2].	6
Figura 3. Variazione nel tempo del grado di <i>swelling</i> di compresse senza farmaco, con matrice a base di HEC, HPC e HPMC testate in 900 ml di acqua purificata in un apparato USP 2 a 100 rpm [5].	9
Figura 4. Anatomia dell'apparato digerente.....	13
Figura 5. Conformazione generale dello stomaco [6].	14
Figura 6. Configurazione interna dello stomaco [6].	15
Figura 7. A destra, vista in sezione di un'areola gastrica. A destra vista al SEM di una fossetta gastrica [6].	16
Figura 8. Diagramma schematico dello stomaco umano[9].	23
Figura 9. Ipotetica disposizione dei contenuti luminali dello stomaco a riposo e durante l'attività digestiva. A) Stratificazione e separazione di fase. B) Allontanamento delle particelle e delle goccioline di grasso dalle pareti antrali [10].	25
Figura 10. Meccanismo di propulsione/retropulsione antro-pilorico[7].	25
Figura 11. Geometria dello stomaco ricostruita con l'uso di immagini dell'MRI [8].	31
Figura 12. a) Modello geometrico dello stomaco in condizioni di pienezza e di parziale svuotamento. b) Modellazione dei periodi di svuotamento e di non svuotamento durante l'apertura e la chiusura del piloro [8].	32
Figura 13. (a) Vettori di velocità del flusso gastrico predetti a ogni istante di tempo; (b) Linee di flusso istantanee con tre paia di vortici evidenziati; (c) Flusso di velocità lungo l'asse z mostrato in (a), rappresentato a intervalli di 1 s. La curva riempita sulla destra è la massima velocità di retroflusso attraverso le contrazioni in funzione del tempo. La linea punteggiata segue la propagazione distale delle contrazioni nello spazio e nel tempo [8].	33
Figura 14. Svuotamento gastrico attraverso il <i>Magenstrasse</i> illustrato identificando le posizioni iniziali delle particelle svuotate nei primi 10 min. L'area in grigio si riferisce alle aree con tempi di svuotamento di 10 min [13].	34

- Figura 15. Effetto della viscosità sulla formazione del *retropulsive-jet like motion* e dei vortici [9].
- Figura 16. Effetto delle proprietà reologiche dei contenuti gastrici sul valore medio di vorticità predetto nella regione antro-pilorica [9].
- Figura 17. Schema dell'attività della pressione antrale che contribuisce ai periodi di pompa peristaltica e di pompa di pressione dello svuotamento gastrico [13].
- Figura 18. Variazioni di pressione misurate nella regione antrale (A) e pilorica (B) [13].
- Figura 19. Apparato USP 1.
- Figura 20. Apparato USP 2.
- Figura 21. Apparato USP 3.
- Figura 22. Apparato USP 4.
- Figura 23. Modello di assorbimento di Sartorius [17].
- Figura 24. Modello di dissoluzione di Sartorius: a) siringa di plastica, b) timer, c) lucchetto di sicurezza, d) connettore cavo, e) tubi di silicone, f) anelli di silicone, g) filtro di metallo, h) reattore [17].
- Figura 25. Profilo pH durante digestione *in-vitro* del latte. n = numero di esperimenti. A) 143 mM HCl, 1.5 mL/min, agitazione costante; B) 143 mM HCl, 2.0 mL/min, agitazione costante; C) 143 mM HCl, 2.0 mL/min, agitazione irregolare; D) 286 mM HCl, 3.0 mL/min, agitazione regolare [17].
- Figura 26. Modello *in-vitro* sviluppato da Minekus et al. a) compartimento gastrico; b) compartimento duodenale; c) compartimento digiuno; d) compartimento ileo; e) unità base; f) camicia di vetro; g) parete flessibile; h) pompa rotatoria; i) bagno d'acqua; j) pompa-valvola peristaltica; k) pompa peristaltica; l, m) elettrodi pH; n, o) pompe a siringa; p) dispositivo a fibre cave [18].
- Figura 27. Simulazione delle onde peristaltiche nel modello Minekus et al. 1) unità 2,3) camera di pressione; 4) pezzo intermedio; 5) parete flessibile; 6) spazio tra la parete rigida e flessibile 8, 9, 10, 11) connettori [19].
- Figura 28. Primo stadio (il fondo) del modello di Wickham e Faulks [17].
- Figura 29. Secondo stadio (antro) del modello di Wickman e Faulks [17].
- Figura 30. Vista frontale del vessel con barra di agitazione e perline quando non è applicata alcuna agitazione [17].
- Figura 31. Vista frontale dell'HGS. (1) Motore; (2) rivestimento in lattice; (3) Sacchetto a rete; (4) tubi di secrezione; (5) rullo; (6) cinghia; (7) lampadina per il controllo termico; (8) isolamento in schiuma plastica [12].
- Figura 32. Rappresentazione schematica del DGM sviluppato da Vardakou et al. A sinistra, raffigurazione dei principali elementi del modello. A destra, illustrazione della meccanica della digestione [15].

Figura 33. Formula di struttura del dimero dell'HEC.	56
Figura 34. Formula di struttura del Diclofenac sodico.	57
Figura 35. Dissolutore Sotax AT7 SMART.	59
Figura 36. Tipico cromatogramma del diclofenac in un mezzo di dissoluzione a pH 6.8.	63
Figura 37. Cromatogrammi della soluzione madre e della diluizione 1:5 per la taratura a pH 1.00.	65
Figura 38. Relazione tra l'integrale dell'assorbanza e la concentrazione di diclofenac in una soluzione tampone di acido cloridrico a pH 1.00.	65
Figura 39. Cromatogrammi della soluzione madre e delle sue diluizioni per la taratura a pH 6.76.	66
Figura 40. Relazione tra l'integrale dell'assorbanza e la concentrazione di diclofenac in una soluzione tampone di sale fosfato tribasico a pH 6.76.	66
Figura 41. Sacca di lattice originale.	69
Figura 42. Mini-motoriduttore ITE della serie CIG42.	70
Figura 43. A sinistra, massima occlusione dovuta alla terza contrazione; a destra posizione di completa opposizione del terzo rullo rispetto allo stomaco.	72
Figura 44. a) Particolare dell'albero a camme senza cinghie; b) particolare dell'albero a camme con cinghie montate; c) assemblaggio motoriduttore-albero a camme.	73
Figura 45. Stomaco in lattice con elementi di contrazione.	74
Figura 46. Vista frontale e vista laterale del dispositivo di azionamento meccanico applicato allo stomaco artificiale.	75
Figura 47. Schema dei canali di connessione I/O della NI USB-6008.	76
Figura 48. Schema del sistema di condizionamento della temperatura.	77
Figura 49. Diagramma a blocchi del controllo in <i>feedback</i> sulla temperatura del mezzo di dissoluzione.	78
Figura 50. Percentuale di accensione della ventola in funzione della temperatura di esercizio.	80
Figura 51. <i>Screenshot</i> del <i>front panel</i> del VI per il controllo di temperatura.	81
Figura 52. <i>Screenshot</i> del <i>block diagram</i> del VI per il controllo di temperatura.	82
Figura 53. <i>Case true</i> e <i>case false</i> della struttura selettiva annidata.	83
Figura 54. Relè allo stato solido Crydom D2410 utilizzato per il controllo del termoconvettore.	84
Figura 55. Modello in-vitro e sistema di controllo e acquisizione dati.	85
Figura 56. Profilo di rilascio medio nel tratto gastrointestinale di una compressa di diclofenac a rilascio prolungato testata con metodo convenzionale.	88

- Figura 57. Profili di rilascio in testa e sul fondo dello stomaco artificiale ottenuti da una prova sperimentale a T ambiente e a pH 1.07.
- Figura 58. Profilo di rilascio nel tratto gastrointestinale ottenuto con metodo di dissoluzione non convenzionale.
- Figura 59. Profili di rilascio ottenuti con dissoluzione non convenzionale a T ambiente con due diversi tipi di cinghie poste a contatto con le pareti dello stomaco artificiale.
- Figura 60. Profili di rilascio qualitativi nel tratto gastrointestinale ottenuti con due tipi di cinghie poste a contatto con le pareti dello stomaco artificiale.
- Figura 61. Profili di rilascio di due prove non convenzionali: una con controllo di temperatura e pH 1.05 e una a temperatura ambiente e pH 1.07.
- Figura 62. Profili di rilascio nel tratto gastrointestinale di due prove non convenzionali.
- Figura 63. Profili di rilascio medi all'interno dello stomaco artificiale ottenuti con il modello *in-vitro*.
- Figura 64. Profili di rilascio medi nel tratto gastrointestinale ottenuti con metodo di dissoluzione non convenzionale.
- Figura 65. Profili di rilascio medi nel tratto gastrointestinale ottenuti con metodi di dissoluzione convenzionali e non.
- Figura 66. Rigonfiamento della compressa per effetto dell'idratazione a 120 min (a sinistra) e 480 min (a destra).
- Figura 67. Viste frontali e dall'alto di due compresse dissolte nel modello *in-vitro* (a sinistra) e di una compressa dissolta nell'apparato USP 2 dopo 120 min (a destra).
-

Indice delle tabelle

Tabella 1. Fattori che influenzano la biodisponibilità.	7
Tabella 2. Tabella riassuntiva della divisione funzionale dello stomaco.	19
Tabella 3. Dati chimici, fisici e farmacocinetici del Diclofenac sodico.	58
Tabella 4. Solubilità del diclofenac sodico (in mg/ml) in soluzioni tampone preparate secondo le prescrizioni dell'USP 26 e forza ionica del mezzo di dissoluzione a temperatura ambiente [21].	58
Tabella 5. Parametri del metodo HPLC per la rilevazione del diclofenac.	62
Tabella 6. Caratteristiche del motore e del motoriduttore.	70
Tabella 7. Misure del diametro di riposo, del diametro della massima contrazione e del grado di occlusione percentuale.	72
Tabella 8. Misure dei segmenti di cinghia utilizzate per realizzare ciascuna contrazione.	74

Abstract

The study of controlled drug release is very important for the development of pharmaceutical dosage forms which allow controlling the in-vivo drug release. To this purpose, tests are performed with conventional devices, following the methodologies prescribed by the Pharmacopoeia, or with unconventional models, which simulate more precisely the release in the gastrointestinal tract. In this work an in-vitro model for the simulation of thermo-mechanical behavior of the human stomach and the evaluation of its influence on the drug release from pharmaceuticals has been realized. Human gastric anatomy, physiology and fluid dynamics have been studied. The gastric motility has been reproduced by coupling an epicycloid gear motor, with rotational speed chosen to match the antral contractions frequency, to a camshaft, in order to deform the artificial stomach walls, represented by a decreasing section latex bag. The structure has been placed into an enclosure thermally isolated, in order to realize a *feedback* control system to keep the dissolution medium temperature at 37°C. The control system is composed by: a thermocouple, an amplifier, a DAQ card, a control program in Labview, a solid state relay, a final control element. The trends of the gastrointestinal release pattern have been investigated by running a series of dissolution tests on a commercial tablet DOC Generic Diclofenac 100 mg. The conventional tests have been performed with a conventional USP apparatus 2, placing the tablet in a solution at pH 1 to simulate the gastric environment for two, hours which is the average retention time of the stomach. Then, the dissolution medium has been neutralized to pH 6.8 to simulate the passage of the dosage form in the intestine. The unconventional tests have been divided in two steps, which simulate the gastric release in the in-vitro model and the intestinal one inside the standard device, using the same solutions of the conventional method. In the conventional case, the samples have been taken at regular instant of

time, both for gastric and intestinal release. In the unconventional case, samples have been withdrawn from the top and from the bottom of the stomach, while for intestinal release the sampling is equal to the previous case. The samples withdrawn during the tests have been analysed by high performance liquid chromatography (HPLC) in order to trace dissolved drug concentration in time. The results of standard and unconventional tests show two different trends between gastric and intestinal release patterns. During the first two hours, the conventional release profile of the gastrointestinal tract is constant and exhibits low values, due to the presence of an enteric coating. The intestinal release pattern increases linearly and the release rate is constant. In the case of unconventional release, in the stomach always present a double release profile, due to the fluid dynamic segregation between the proximal and distal regions, which confirms the non-perfect mixing of the model stomach, which would be close to the behaviour of the real stomach. The top shows a constant profile with low percentage of drug release. The bottom exhibits an almost constant profile with an average value of 1.7% and an average concentration of about 2.3 mg/l. The highest percentages which have been found in the bottom depend on the external damages and deformations of the tablet, generated by the mechanics and fluid dynamics reproduced by the model. The intestinal release pattern shows a different trend from that obtained with conventional method and occurs at varying rate. Again, these differences are due to dosage form damage, which improve water uptake, swelling and erosion. The method comparisons confirm the influence of fluid dynamics that takes place in the *in-vitro* model on the global drug release, particularly, it determines a non-negligible erosion contribution in the gastric bottom and intestinal drug release profiles.

Bibliografia

1. D.S.Roy and B.D. Rohera, Comparative evaluation of hydration and matrix erosion of HEC and HPC and study of drug release from their matrices, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **16**, 193-199(2002).
2. A. Guerra, L. Etienne-Mesmin, V. Livrelli, S. Denis, S. Blanquet-Diot¹, and M. Alric, Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion, *Trends in Biotechnology*, **30**(11), 591-600 (2012).
3. Grassi, M., Understanding drug release and absorption mechanisms: a physical and mathematical approach, *CRC* (2007).
4. J. Siepmann, A. Göpferich, Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **48**, 229-247 (2001).
5. B. Sařsa, P. Odon, S. Stane, K. Julijana, Analysis of surface properties of cellulose ethers and drug release from their matrix tablets, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **27**, 375–383 (2006).
6. G. Anastasi, S. Capitani, M.L. Carnazza, S. Cinti, R. De Caro, R.F. Donato, V.F. Ferrario, L. Fonzi, A.T. Franzi, E. Gaudio, R. Geremia, G. Giordano Lanza, C.E. Grossi, M. Gulisano, F.A. Manzoli, G. Mazzotti, F. Michetti, S. Miscia, V. Mitolo, A. Montella, G. Orlandini, A. Paparelli, T. Renda, D. Ribatti, A. Ruggeri, P. Sirigu, A. Soscia, G. Tredici, M. Vitale, D. Zaccheo, G. Zauli, S. Zecchi, Trattato di anatomia umana, *Edi.Ermes*, Milano (2007).
7. The gastrointestinal system, Handbook of physiology, **1**, *American Physiological Society*, Maryland (1989).
8. A. Pal, K. Indireskumar, W. Schwizer, B. Abrahamsson, M. Fried and J. G. Basseur, Gastric flow and mixing studied using computer simulation, *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **271**(1557), 2587-2594 (2004).
9. M. J. Ferrua and R. P. Singh, Modeling the fluid Dynamics in a human stomach to gain insight of food digestion, *Journal of food science*, **75**(7), R151-R162 (2010).

10. F. Marra, M. J. Ferrua, R. P. and Singh, Experimental characterization of the fluid dynamics in an *in-vitro* system simulating the peristaltic movement of the stomach wall, *Procedia Food Science*, **1**, 1473-1482 (2011).
 11. K. Schulze, Imaging and modelling of digestion in the stomach, *Neurogastroenterol Motil*, **18**, 172-183 (2006).
 12. F. Kong and R. P. Singh, A human gastric simulator (HGS) to study food digestion in human stomach, *Journal of Food Science*, **75**(9), E627-E632 (2010).
 13. K. Indireshkumar, J. G. Brasseur, H. FAAS, G. S. Hebbard, P. KUNZ, DENT, C. Feinle, M. LI, P. Boesiger, M. Fried and W. Schwizer, Relative contributions of “pressure pump” and “peristaltic pump” to gastric emptying, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **278**, G604–G610 (2000).
 14. Pal, A., J.G. Brasseur, and B. Abrahamsson, A stomach road map: “Magenstrasse” for gastric emptying. *Journal of biomechanics*, **40**, 1202-1210 (2007).
 15. M. Vardakou, A. Mercuri, S. A. Barker, D. Q. M. Craig, R. M. Faulks, M. S. J. Wickham, Achieving antral grinding forces in biorelevant *in-vitro* models: comparing the USP dissolution apparatus II and the dynamic gastric model with human *in-vivo* data, *American Association of Pharmaceutical Scientists*, **12**(2), 620-626 (2011).
 16. XXIII, U. *The United States Pharmacopeia*. 1995.
 17. S. Cascone, *In-vitro and in-silico models in pharmacokinetic studies*, *Tesi di dottorato*, 2013.
 18. M. Minekus, P.M., R. Havenaar and J. H. J. Huis in't Veld, Multicompartmental Dynamic Computer - controlled Model Simulating Stomach and Small Intestine. *Alternatives to Laboratory Animals*, **23**, 199-209 (1995).
 19. Minekus, M. and R. Havenaar, *In-vitro* model of an *in-vivo* digestive tract. *US Patent* 5,525,305 (1996).
 20. R. Jain, A. Pandey, S. S. Pandeya, Dr. H.S. Gour University, Sagar (M.P.), INDIA, Veterinary College Mhow (M.P.), INDIA, Mechanism of the dissolution of delayed release formulation of diclofenac sodium. *Chemistry*, **18** (4), 131-138 (2009).
 21. M. Kincl, M. Meleh, M. Veber, and F. Vrečer, STUDY OF THE PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS AFFECTING THE RELEASE OF DICLOFENAC SODIUM FROM LIPOPHILIC MATRIX TABLETS. *Acta Chim. Slov*, **51**, 409–425 (2004).
-

Ed eccomi qui per i ringraziamenti, al termine di un percorso di studi che mi ha riservato molte soddisfazioni, ma anche qualche piccola delusione e, che allo stesso tempo, mi ha permesso di conoscere tante persone, ognuna delle quali ha contribuito in maniera più o meno corposa alla mia crescita personale.

Desidero ringraziare il Prof. Gaetano Lamberti (Gaetano) per avermi concesso l'opportunità di lavorare su uno dei temi che contraddistingue la sua attività di ricerca, ma soprattutto per la sua disponibilità e professionalità, per essermi stato da guida e, in alcuni casi, anche da amico nell'arco della mia esperienza universitaria.

L'Ing. Sara Cascone (Sara), che mi ha seguito durante l'attività di tesi, dispensandomi consigli non solo di natura tecnica.

L'Ing. Felice De Santis (Felice) che mi ha assistito nella realizzazione del sistema di controllo, curando la parte elettronica e software del modello.

L'Ing. Pietro Apicella (Pietro) che ha allietato le giornate in laboratorio e con il quale mi sono spesso fermato a dibattere su vari argomenti, in compagnia degli altri membri e frequentatori del LabT5A.

Ringrazio tutti quelli che mi hanno accompagnato e supportato durante la laurea magistrale, a partire da mio padre, mia sorella, i miei cugini e il resto della famiglia, passando per gli amici di sempre e quelli conosciuti strada facendo, prima al Liceo e poi all'Università.

Andrea, Daniele, Alessandro, Fabrizio, Francesco, Nicola, Aniello, Giancarlo, Aniello, Pierpaolo, Fiore, Dario e Daniela, con i quali ho condiviso gioie e momenti meno felici al di fuori del mondo accademico.

Antonio, Biagio, Mirko e Margherita, in compagnia dei quali ho vissuto i momenti più belli e divertenti di tutta la mia esperienza universitaria. In particolare Antonio, Biagio e Mirko che si sono rivelati dei veri e propri amici, sempre sinceri e leali.

I membri del "gruppo formaldeide", Diego, Marino, Alessandra, Veronica e Concetta, con i quali ho condiviso gran parte del percorso magistrale. In particolare Diego, compagno

di corso e di laboratorio, che si è dimostrato saper essere anche una persona fidata.

Tutti gli altri colleghi di corso e non, conosciuti di recente e negli anni precedenti, alcuni dei quali sono assidui frequentatori della 105.

Guardavo fisso nel sole splendente...

... Mentre i semi della vita

e i semi del cambiamento venivano piantati...

...Sapevo che era arrivato il momento

Di uccidere il passato e ritornare a vivere...

...Sapevo che l'attesa era iniziata

E sono andato dritto...nel sole splendente.

Pink Floyd, "Coming back to life", The Division Bell (1993)

...E so che niente di buono arriva in modo facile...

E tutto ciò che è buono, ha bisogno di tempo...

Bon Jovi, "Dry County", Keep the faith (1994).

