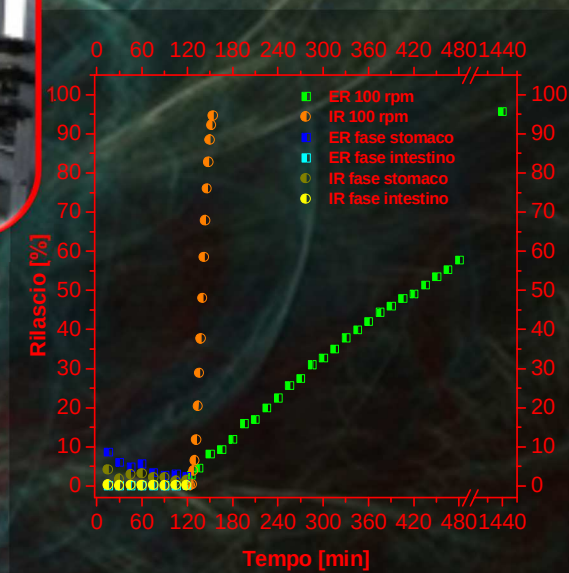


Analisi dei profili di rilascio in un modello *in vitro* simulante il comportamento meccanico dello stomaco umano



Vincenzo Campitelli



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

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

**Analisi dei profili di rilascio in un modello *in vitro*
simulante il comportamento meccanico
dello stomaco umano**

Tesi in
Principi di Ingegneria Chimica

Relatore:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Candidato:

Vincenzo Campitelli

matricola 0612200357

Correlatrice:

Ing. Sara Cascone

Anno Accademico 2014/2015

A zia Margherita

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

La data prevista per la discussione della tesi è il 29/07/2015

Fisciano, 19/07/2015

Sommario

Sommario.....	I
Indice delle figure	III
Indice delle tabelle	V
Abstract.....	VII
Introduzione	1
1.1 Farmacocinetica	2
1.2 Rilascio controllato	3
1.3 Farmacopea	6
1.4 Test di rilascio <i>in-vivo</i> ed <i>in-vitro</i>	6
1.5 Anatomia del tratto gastrointestinale	8
1.5.1 Dissoluzione e metodi di assorbimento	11
1.6 Stato dell'arte	12
1.3.1 Profili di rilascio di Diclofenac a rilascio istantaneo (Voltaren®) in apparato USP II a 100 rpm	12
1.3.2 Apparato <i>in-vitro</i> per simulare gli stress fisici nel SGI (sistema gastro-intestinale)	14
1.3.3 Altri sistemi non USP	16
1.7 Obiettivi	21
Materiali, apparecchiature e metodi	23
2.1 Materiali	24

2.1.1 Diclofenac	24
2.1.2 Mezzi di dissoluzione	25
2.2 Apparecchiature	25
2.2.1 Dissolutore USP II	25
2.2.2 Stomaco artificiale	26
2.2.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	29
2.3 Metodi	31
2.3.1 Metodi di dissoluzione	31
2.3.2 Metodi analitici	32
Risultati e discussione	35
3.1 Compresse a rilascio prolungato	36
3.2 Compresse a rilascio istantaneo	39
3.3 Confronto dei profili di rilascio	43
3.3.1. Compresse a rilascio prolungato	43
3.3.2. Compresse a rilascio Istantaneo	45
3.3.3. Dissoluzione nello stomaco artificiale	46
Conclusioni	49
4.1 Conclusioni	50
Bibliografia	53

Indice delle figure

Figura 1. Rappresentazione delle vie di somministrazione farmacologiche possibili.	2
Figura 2. Concentrazione plasmatica di farmaco risultante dalla somministrazione ripetuta di una forma farmaceutica convenzionale, rispetto a quella ottenuta dalla somministrazione di un farmaco a rilascio controllato.	3
Figura 3. Diffusione progressiva di un farmaco disperso in una matrice polimerica.	5
Figura 4. Le parti costitutive dello stomaco.	8
Figura 5. Fisiologia del tratto gastrointestinale.	10
Figura 6. Profilo di rilascio di una compressa di Diclofenac a rilascio immediato analizzata mediante un dissolutore USP II [7].	14
Figura 7. Schema rappresentativo del dispositivo di test dello stress di dissoluzione sviluppato da Gabacz et al. [8]	16
Figura 8. 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 [9,10].	17
Figura 9. 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 [9,10].	18
Figura 10. Vista frontale del vessel con barra di agitazione e perline quando non è applicata alcuna agitazione [11].	19
Figura 11. Rappresentazione schematica del DGM sviluppato da Vardakou et al. , con la raffigurazione dei principali elementi del modello [12].	20
Figura 12. Struttura molecolare del Diclofenac.	24
Figura 13. Dissolutore Sotax AT7 SMART.	26
Figura 14. Mini-motoriduttore ITE della serie CIG42.	28

Figura 15. A sinistra, massima occlusione dovuta alla terza contrazione; a destra posizione di completa opposizione del terzo rullo rispetto allo stomaco.....	28
Figura 16. Vista laterale del dispositivo di azionamento meccanico applicato allo stomaco artificiale e misure correlate al movimento delle cinghie.	29
Figura 17. Immagine dell'HPLC.	30
Figura 18. Esempio di cromatogramma. I punti sono gli estremi d'integrazione, la linea grigia è la linea di base del picco e l'area tratteggiata è l'integrale del segnale.	33
Figura 19. Profilo di rilascio di una compressa di Diclofenac a rilascio prolungato analizzato mediante dissolutore USP II a 50 rpm.....	36
Figura 20. Profilo di rilascio della compressa di Diclofenac in apparato dissolutore USP II con velocità delle pale a 100 rpm.....	37
Figura 21. Da sinistra a destra, le varie fasi di contrazione della sacca di latex simulante lo stomaco umano dovute dalle cinghie azionate dal motore.	38
Figura 22. Profilo di rilascio di Diclofenac a rilascio prolungato nel sistema stomaco <i>in-vitro</i> /dissolutore.....	38
Figura 23. Profilo di rilascio di Voltaren [®] in un dissolutore USP II con velocità di rotazione delle pale a 50 rpm.	40
Figura 24. Dissoluzione di una compressa di Voltaren [®] 50 mg a rilascio istantaneo, in un dissolutore USP II.....	41
Figura 25. Profilo di rilascio di una compressa di Voltaren [®] 50 mg a rilascio istantaneo, nel sistema di dissoluzione stomaco/dissolutore.....	42
Figura 26. Confronto tra i profili di rilascio di Diclofenac a rilascio prolungato nei vari dispositivi di analisi utilizzati.....	43
Figura 27. Confronto dei profili di rilascio di Voltaren [®] 50 mg effettuati in: 1) USP II 50 rpm; 2) sistema stomaco/dissolutore 100 rpm; 3) USP II 100 rpm.	45
Figura 28. Confronto dei profili di rilascio ottenuti nel modello simulante il comportamento meccanico dello stomaco/dissolutore, usando Diclofenac Doc Generici 100 mg(ER) e Voltaren [®] 50 mg (IR).....	46

Indice delle tabelle

Tabella 1. Principali vantaggi e svantaggi della sperimentazione animale (<i>in-vivo</i>).....	7
Tabella 2. Vantaggi e Svantaggi della sperimentazione <i>in-vitro</i>	8
Tabella 3. Fattori che influenzano la biodisponibilità.....	11
Tabella 4. Dati chimici, fisici e farmacocinetici del diclofenac sodium.....	25
Tabella 5. Parametri del metodo HPLC per la rilevazione del diclofenac.	32
Tabella 6. Valori delle costanti di taratura a determinati pH del mezzo di dissoluzione.	34

Abstract

The definition of standards and equipments that can guarantee an efficient testing of drugs before the clinical trials, is fundamental to assess the effectiveness of a drug. Those standards range from toxicological tests to the development of system that can simulate *in-vitro* behavior of the human body; thus avoiding the use of tests *in-vivo* based on animal experiments.

The aim of this work was to study the release profile of different commercial pharmaceutical forms in an *in-vitro* model (artificial stomach) simulating the mechanical behavior of the human stomach combined with a USP apparatus II. The release profiles of two pharmaceutical formulation were compared: Diclofenac Doc Generici 100 mg (extended release) and Voltaren[®] 50 mg (immediate release).

The drug release over time was evaluated by taking samples from dissolution medium and analyzing their drug concentration by HPLC. In the artificial stomach series of samples were taken both from the upper area of the model, and from the lower part, to check the mixing conditions in the device.

Concerning the extended release pharmaceutical formulation, the results showed a different release profile in the artificial stomach compared to the USP II. The slope of the release curve over time in the stomach/USP system was higher than the conventional one, as well as the percentage of final release was different: at the end of the test (after 8 hours) it reached 57% of drug released in artificial stomach, compared to the 37% in the USP II. For the immediate release pharmaceutical formulation, the results revealed no fundamental differences between the behavior of the artificial stomach and the USP system, both in term of trends of the release profile, and in term of percentages of drug release at the end of the test.

In both cases, there was a difference between the release profiles obtained in the *in-vitro* model, both in the upper and lower parts of the artificial stomach and the conventional profiles. In these analyses, it appears that in the drug samples taken in the lower part of the model at the beginning of the dissolution there is a release, which however decrease with time, probably due to mixing in the artificial stomach. On the other hand, in the lower part of the artificial stomach the release is very low and remains constant. This behavior confirmed a non-homogeneous mixing within the mode: since the tablet residing in the lower part of the artificial stomach, near the withdrawal zone, the drug was not distributed homogeneously in the dissolution medium, despite the peristaltic movements; therefore failed to reach the upper area.

A future development of this work could be to analyze the effect of the position of the tablet on the release profiles both in the upper and in the lower zone of the artificial stomach.

Bibliografia

1. [Tecnologia in pillole. Una 'forma farmaceutica' per il rilascio controllato]
http://www.alambicco.unito.it/A/Feb12/2_2_3_Tecnologia_in_pillole.html
2. Dipartimento di chimica e tecnologie del farmaco, *Università Sapienza (Roma)*.
3. [Studi di tossicità]
http://farmacia.unich.it/farmacologia/didattica/tossicologia/dia/studi_tossicita_bn.pdf.
4. S. Cascone, *In vitro and in silico models in pharmacokinetic studies*, Tesi di dottorato, 2013
5. Grassi, M., *Understanding drug release and absorption mechanisms: A physical and mathematical approach*. 2007: CRC
6. Banakar, U., *Pharmaceutical dissolution testing. Drugs and the pharmaceutical sciences*, 1991. 49: p. 1-426.
7. E. Marrone, *Confronto dei profili di rilascio di Diclofenac da formulazioni farmaceutiche utilizzando differenti apparati di dissoluzione*, Tesi in Principi di Ingegneria Chimica, 2014/2015.
8. G. Garbacz et al, *Irregular absorption profiles observed from diclofenac extended release tablets can be predicted using a dissolution test apparatus that mimics in vivo physical stresses*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 70 (2008) 421–428;
9. M. Minekus, P.M., R. Havenaar and J. H. J. Huis in't Veld, *A Multicompartmental Dynamic Computer - controlled Model Simulating the Stomach and Small Intestine. Alternatives to Laboratory Animals*, 23, 197–209 (1995).
10. Minekus, M. and R. Havenaar, *In-vitro model of an in-vivo digestive tract*. US Patent 5,525,305 (1996).
11. Bogataj M. et al. , *Peristaltic movement simulating stirring device for dissolution testing*. WO Patent WO/2010/014,046 (20109).

-
12. M. Vardakou et al. , *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).
 13. [Sotax (Solutions for pharmaceutical testing), USP II]
<http://www.sotax.com/products/dissolution-testing/usp-1-2-5-6/>
 14. C.Govetosa, *Un modello in-vitro per la simulazione del comportamento termomeccanico dello stomaco umano*, Tesi in Principi di Ingegneria Chimica, 2012/2013.
 15. F. Kong, R.P.Singh, *A Human Gastric Simulator (HGS) to Study Food Digestion in Human Stomach*, *Journal of Food Science*, 75 (2010) E627-E634.
 16. Wickham et al., *Dynamic Gastric Model*, United States Patent, patent no. US 8,435,036 B2 (2013).
-

Ho sempre considerato il percorso individuale della vita come una lunga escursione su un sentiero montano, fino alla cima; dove ogni postazione di osservazione rappresenta un traguardo, e se il suo esito sia negativo o positivo, lo si valuta dal panorama scorto a quell'altezza. La fine di tale viaggio, è un po' come nel "viandante sul mare di nebbia", ti ritrovi in cima, con il totale delle tue esperienze accumulate finora che ti si presentano nella massima forma del sublime; e sei lì a rimirarle tutte e a farti rapire dalla loro immensità. Oggi posso dire di ritrovarmi agli inizi di tale sentiero, e ho trovato una delle mie prime postazioni di osservazione. Soffermandomi a ripensare ai momenti fino ad ora trascorsi, mi rendo conto che è stato fatto parecchio, ma c'è molto altro da fare, ma certo fin qui non sarei riuscito ad arrivarci da solo.

Comincio col ringraziare il prof. Gaetano Lamberti, che mi ha concesso l'opportunità di tale lavoro di tesi, sempre presente e disponibile per ogni difficoltà riscontrata lungo il percorso di tesi; un grazie di cuore a Sara Cascone, che oltre ad adempiere il ruolo di correlatrice, con tanta pazienza e gentilezza, mi ha seguito e guidato in tutto il mio percorso di tesi, un punto di riferimento e esempio di professionalità. Rimanendo nell'ambito del laboratorio, non posso non chiamare in causa anche Pietro, Diego e Giovanni; con tutti voi ho trovato una vera e propria famiglia in cui subito ho trovato un piccolo spazio.

Una consuetudine diffusa cominciare col traguardo, che è la cosa che per prima vedi quando sopraggiungi; subito dopo giri le spalle e guardi la strada percorsa finora. E quando lo faccio, i primi che vengono all'attenzione sono i miei genitori, mentori insostituibili e meritevoli di ogni encomio, sempre lì a sostenermi per le scelte intraprese, presenti nei momenti di difficoltà e sconforto, sapendo sempre cosa dire, e a darmi la loro più totale fiducia; e altresì presenti nei momenti felici e di celebrazione; supporto saldo e onnipresente. A mio fratello, sempre lì con le sue domande e la sua curiosità, ha mantenuto in allenamento la mia attitudine di studente scientifico, sempre curioso ai perché del mondo che ci circonda. A Marilena e Luigi, che mi hanno ispirato a intraprendere questo sentiero, sì pieno di ostacoli, ma che porta ad una crescita personale e didattica non indifferente; ai piccoli Simona e Andrea, fonti di spensieratezza e uno specchio all'infanzia, una fase della vita di vitale importanza, dove ogni bambino è nel suo piccolo uno scienziato, con la loro voglia di scoprire e sperimentare. Ad Anna, e ai suoi racconti

esilaranti. A mia zia Margherita, la persona più determinata e forte che abbia mai conosciuto; esempio di come si può prendere la propria vita nelle proprie mani e forgiarla secondo i propri desideri, non avendo la minima preoccupazione di tutto ciò che potrebbe fermarti durante il percorso. Alla mia famiglia, il ringraziamento per esser cresciuto con voi, e per il vostro continuare ad esserci.

Il percorso quindi continua a tratti, un po' in pianura, un po' impervio con salite e discese più o meno ripide, fino all'inizio della mia esperienza universitaria. Un'avventura iniziata come un naufragio su un'isola deserta, da solo e senza risorse per sopravvivere alla notte, e arrivato fin qui dopo aver trovato altri sopravvissuti ed avendo condiviso un'esperienza che ci ha lanciati senza preavvisi in un mondo molto più ampio e vario, di quello che era la realtà precedentemente percepita a occhio nudo. Il primo pensiero va ad Angelo e Francesco, le prime facce amiche ritrovate ai corsi, e i migliori amici che un uomo possa avere, leali e sinceri come pochi altri; insieme abbiamo condiviso birre in spensieratezza, e sessioni d'esami ai limiti del sostenibile; sempre pronti ad ascoltare e consigliare, ragazzi rimanete gagliardi così. Christian, o tu giullare di corte, la vena di ilarità e distrazione che è sempre ben accetta l'hai portata tu, e chi meglio di te poteva gestire tale compito. Si continua con Pietro, eterno puntiglioso; non posso certo togliermi di mente gli esami preparati insieme, e i nostri complimenti reciproci che volavano già da prima mattina; Gigi, grande amico sincero, con la sua filosofia di vita leggera e spensierata. E Giacomino, più capelli che persona, più "sfasuleggio" che serietà; "compà" sei un grande. Gli anni così son passati, e come cresceva il carico di esperienza sulle mie spalle, così è cresciuta la nostra piccola comunità: le eterne chiacchiere con Maria e Giusy nella speranza di ritrovare la voglia di studiare dopo una lunga pausa; il mio trio cavese preferito: Federica, Serena e Valentina; sempre gentili e sorridenti, e che mi sopportano ogni giorno; le nuove "leve", Mariachiara, Domenico, Ottavio e Rosario, persone open-minded con i quali ogni conversazione portava a nuovi punti di vista e considerazioni; alla vecchia guardia conosciuta troppo tardi, ma sempre felice di averli conosciuti: Biagio, Libero, Gaetano e Pierfrancesco, sempre pronti per una bevuta in compagnia, o per discorsi sui massimi sistemi.

Agli amici e ai nemici, a quelli vecchi e quelli nuovi, andati o ancora a venire... Si dice che un uomo è la somma dell'esperienze che ha vissuto, di tutto ciò che riesce a far suo dal mondo a lui di fronte; così

ho fatto e ho preso il meglio da ognuno di voi, ritrovandomi la persona che sono ora, cosciente di ciò che è e ben convinto di ciò che vuol diventare. A voi tutti, un grazie sincero, di cuore, per aver condiviso parte del vostro tempo insieme a me, ed aver reso il mio percorso fino ad ora, il più interessante e piacevole possibile.

Un grazie ed un augurio, nel rivederci tutti insieme alla fine del percorso, sulla vetta del sentiero montano, a rimirare insieme il panorama che ci si presenterà dinanzi.

*“Improvement makes straight roads,
But the crooked roads without Improvement
Are roads of Genius”
(Cit. William Blake)*

