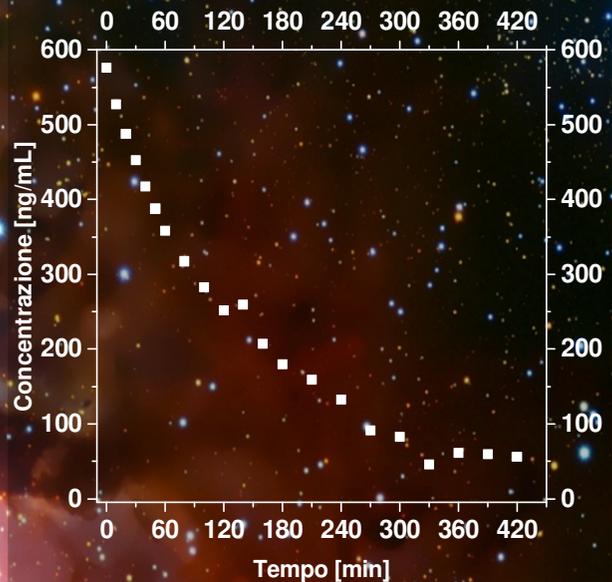


Cinetica di degradazione del Remifentanil: effetto della presenza di esterasi e della temperatura



Mauro Clemente Villani



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

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

**Cinetica di degradazione del Remifentanil:
effetto della presenza di esterasi
e della temperatura**

Tesi in
Principi di Ingegneria Chimica

Relatore:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Candidato:

Mauro Clemente Villani
matricola: 0612200143

Correlatrice:

Ing. Sara Cascone

Anno Accademico 2014/2015

Alla mia famiglia

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

La data prevista per la discussione della tesi è il 21/10/2015
Fisciano 12/10/2015

Sommario

Sommario.....	I
Indice delle figure.....	III
Indice delle tabelle.....	V
Abstract	VII
Introduzione	1
1.1 Oppioidi.....	2
1.1.1 Classificazione degli oppioidi	2
1.1.2 Farmacologia degli oppioidi	3
1.2 Uso degli oppioidi in campo medico.....	4
1.2.1 Caratteristiche analgesiche degli oppioidi	4
1.2.2 Modello di distribuzione ed eliminazione del Remifentanil	7
1.2.3 Farmacologia e farmacodinamica del Remifentanil	8
1.3 Esterasi	12
1.3.1 Classificazione delle esterasi	12
1.3.2 Proprietà delle esterasi dal punto di vista medico	13
1.4 Stato dell' arte	14
1.5 Obiettivi	18
Materiali, apparecchiature e metodi	19
2.1 Materiali	20
2.1.1 Remifentanil ed Ultiva	20

2.1.2 Esterasi	21
2.1.3 Mezzi di dissoluzione	23
2.2 Apparecchiature _____	23
2.2.1 HPLC	23
2.2.2 Agitatori con controllo di temperatura	24
2.3 Metodi _____	25
2.3.1 Preparazione della soluzione madre (S0)	25
2.3.2 Preparazione delle soluzioni enzimatiche	26
2.3.3 Descrizione dell'ambiente fisiologico simulante la degradazione	26
2.3.4 Metodi analitici	27
Risultati e discussione.....	31
3.1 Tarature _____	32
3.1.1 Descrizione e confronto delle tarature Ultiva/Remifentanil	32
3.2 Effetto della temperatura _____	40
3.3 Modellazione _____	44
3.4 Effetto della presenza di esterasi _____	47
3.4.1 Esterasi estratte da fegato di cavallo	47
3.4.2 Esterasi estratte da fegato di maiale	48
Conclusioni.....	51
4.1 Conclusioni _____	52
Bibliografia	55

Indice delle figure

Figura 1. Piramide Rushkie.....	6
Figura 2. Rappresentazione del modello.....	7
Figura 3. Equazioni descriventi il modello e grafico che riporta il fitting dei dati sperimentali.....	8
Figura 4. Molecola di remifentanil e suo metabolita.	9
Figura 5. Confronto delle risposte in base al tempo di infusione tra il remifentanil e gli altri oppioidi.....	11
Figura 6. Cinetiche enzimatiche a diverse temperature.	14
Figura 7. Rappresentazione molecola Remifentanil.	20
Figura 8. Flaconi di Ultiva.	21
Figura 9. Meccanismo d'azione di PLE.	22
Figura 10. Struttura molecolare di PLE.	22
Figura 11. Meccanismo d'azione di HLE.....	22
Figura 12. Rappresentazione schematica di un HPLC. (1) serbatoi per i solventi, (2) degasatore per i solventi, (3) pompa, (4) recipiente di miscelazione, (5) pompa ad alta pressione, (6) alloggiamento campioni, (7) ciclo del campione durante l'iniezione, (8) pre-colonna, (9) colonna di cromatografia, (10) rivelatore ad UV, (11) calcolatore per l'acquisizione dei dati, (12) serbatoio di uscita per i solventi esauriti.	24
Figura 13. Tipico agitatore con piastra magnetica per controllo di temperatura.....	25
Figura 14. Sistema simulante l'ambiente fisiologico.....	27
Figura 15. Esempio di cromatogramma del Remifentanil.....	29
Figura 16. Esempio di retta di taratura di Remifentanil.....	30
Figura 17. Cromatogrammi della Polvere 3 20.07.15 a confronto con quello della Polvere 1 09.10.2014.....	33
Figura 18. Cromatogrammi della Polvere 3 27.07.15.....	33
Figura 19. Cromatogrammi della Polvere 3 16.09.15.....	34

Figura 20. Confronto tra le rette di taratura di polvere 3.	35
Figura 21. Retta di taratura polvere 1.	36
Figura 22. Confronti S0 della polvere 3.....	37
Figura 23. Confronto tra rette di taratura della polvere 2 a distanza di circa due settimane.....	38
Figura 24. Confronto S1 polvere 2.....	38
Figura 25. Cromatogrammi della polvere 2 del 25.09.14.	39
Figura 26. Cromatogrammi della polvere 2 del 07.10.14.	40
Figura 27. Cinetica di degradazione a 34°C.....	41
Figura 28. Cinetica di degradazione a 37°C.....	41
Figura 29. Cinetica di degradazione a 40°C.....	42
Figura 30. Confronto delle prove senza enzima a diverse temperature.	43
Figura 31. Prova di degradazione a 37°C principio attivo puro.	44
Figura 32. Modello di fitting a 34°C.	46
Figura 33. Modello di fitting a 40°C.	46
Figura 34. Modello predittivo dei dati sperimentali a 37°C.....	47
Figura 35. Cinetica di degradazione enzimatica con HLE a 37°C.	48
Figura 36. Cinetica di degradazione enzimatica con PLE.....	49
37. Confronto tra dati sperimentali di prove di degradazione con enzima.....	49
Figura 38. Confronto tra le prove di degradazione in presenza o meno di enzima. ...	50

Indice delle tabelle

Tabella 1. Tabella descrittiva dei parametri del modello.	7
Tabella 2. Proprietà identificative del remifentanil.	10
Tabella 3. Tabella raffigurante la potenza analgesica dei vari oppioidi.	12
Tabella 4. Costituzione Ultiva per iniezione.	21
Tabella 5. Parametri del modello di analisi dell'HPLC.	28
Tabella 6. Tabella riassuntiva prove sperimentali.	32

Abstract

Remifentanil is a drug used to overcome the main problem found in anesthetic area, especially regarding intra-post surgery operations, among them, the impossibility to administrate to patients affected by hepatic and renal problems and the spontaneous recovery of respiratory activity are the main ones.

This thesis goal was to identify the drug's kinetic degradation and its changing due to the alteration of physiological parameters as temperature and to the in physiological fluids of esterases (using enzymes of animal origin: porcine and horse liver esterases).

The first part of the experimental part consisted in the analysis of the main differences between the commercial drug known as Ultiva and the pure active substance. The comparison of calibration curves showed a very strong degradation in few days; main solutions were compared every week during an established period. The results showed the same degradation in both cases.

The next phase was the development of a system simulating of physiological behavior of the drug. To this purpose the influence of temperature on the degradation kinetics of Ultiva was studied, verifying through the analysis of the experimental data taken by tests on 3 different temperatures, that the changing of temperature affect weakly the degradation kinetics. A model was realized, consisted of two parts: a fitting one, calibrated on two different temperatures, and a predictive one, which used the parameters found in the first part, that predicted the degradation kinetics at a different temperature. The model showed good agreement with experimental data.

Finally the effect of the presence of esterases was tested. The result was that the experimental data were very similar each others for all the conditions tested, and these are comparable at every time for all of the

cases analyzed. This indicates that the tested enzymes do not affect the degradation kinetics.

Bibliografia

1. Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics 12^a ed. Brunton, Chabner e Knollman, McGraw Hill
2. Mastronardi P. Scanni E. Cafiero T. Maresca A. Farmacologia dei moderni farmaci oppioidi Minerva Anestesiologica vol. 71, suppl. 1 al N.10: 153 – 155.
3. Farmacologia degli analgesici: la teoria incontra la pratica, Antonello Bufalari, PhD Chiara Maggio, DVM Ilaria Cerasoli, DVM 63 Congresso Nazionale scivac Sabato, 30 Maggio ore 13:40
4. Navapurkar VU “Metabolism of remifentanil during liver transplantation” Br.J Anaesth. 1998;81:881
5. Miller R. ,MD, L.Eriksson, et al., *Miller's Anesthesia*, sez.III cap. 25, Churchill Livingston (2009).
6. GLI ANESTETICI OPPIACEI DI NUOVA GENERAZIONE Antonello Bufalari, DMV, PhD, Chiara Adami, DMV, Salvatore Padua, DMV Antonio Di Meo, DMV. Sezione di Clinica Chirurgica e Radiodiagnostica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria di Perugia Congresso Nazionale scivac
7. Ultiva Anaesthesia Technical Monograph, Glaxxo Welcome
8. Pharmacokinetics of Remifentanil: a three-compartmental modeling approach Sara Cascone, Gaetano Lamberti, Giuseppe Titomanlio, Ornella Piazza
9. Activity of Lipases and Esterases towards Tertiary Alcohols: Insights into Structure Function Relationships Erik Henke, Jürgen Pleiss, and Uwe T. Bornscheuer
10. Haidar S. H., et al., *Determination of remifentanil, an ultra-short-acting opioid anesthetic, in rat blood by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14, p. 1727,1996.
11. Remifentanil concentration during target-controlled infusion of propofol, D.P. Crankshaw, C. Chan, K. Leslie, A.R. Bjorksten

12. Analysis of Remifentanil with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and an Extensive Stability Investigation in EDTA Whole Blood and Acidified EDTA Plasma Remco A. Koster, BSc,* Hugo E. M. Vereecke, MD, PhD,† Ben Greijdanus, BSc,* Daan J. Touw, PhD, PharmD,* Michel M. R. F. Struys, MD, PhD,† and Jan Willem C. Alffenaar, PhD, PharmD*
 13. Small doses of remifentanil and alfentanil in continuous total intravenous anesthesia in major abdominal surgery, E. Iannuzzi, M.Iannuzzi, V.Cirillo, G.Viola, R.Parisi,M.Chiefari
 14. Westmoreland, C.L, et al., *Pharmacokinetics of remifentanil(GI87084B) and its major metabolite (GI90291) in patients undergoing elective inpatient surgery*. Anesthesiology, 1993. **79**(5):p.893.
 15. Krechel SW, Bildner J. (1995) CRIES: a new neonatal postoperative pain measurement score. Initial testing of validity and reliability. Pediatric Anesthesia. 5:53-61
 16. Piera Della Porta, *Studio della cinetica di degradazione enzimatica del Remifentanil*, Laurea in Ingegneria Chimica, matr. 0612200216 , 24/07/2013, Relatori: Prof. Ing. Gaetano Lamberti, Prof. Ornella Piazza, Correlatore: Ing. Sara Cascone
-

Alla fine di questo tortuoso percorso di studi, che ha rappresentato un percorso di profonda crescita e conoscenza della mia persona, è doveroso per me dedicare qualche riga alle persone che mi hanno maggiormente sostenuto, in particolare nei periodi più difficili. Devo dire innanzitutto grazie al professore Lamberti, le cui lezioni e consigli, che sono ben impressi nella mia memoria, fanno parte dei bei ricordi della mia esperienza universitaria, ed a tutto il gruppo TPP, che mi hanno sostenuto (e soprattutto sopportato!) durante questo anno; grazie a loro ho imparato molto, soprattutto cosa vuol dire “vivere” un laboratorio, e mi hanno dato sempre più di un valido motivo per evitare di mollare, anche quando i momenti che ho attraversato sono stati particolarmente difficili. Hanno sempre dispensato consigli e rimbrotti (ovviamente meritati!) di cui farò tesoro per le mie prossime esperienze e che spero possano rappresentare le pietre miliari della mia crescita professionale e non solo. Ho cercato sempre di fare del mio meglio e di mostrarmi per la persona che sono, coerentemente con la mia filosofia di vita, sperando di poter lasciare in minima in loro un piacevole ricordo. Devo ovviamente menzionare i miei compagni di avventura, Roberto ed Igino, con i quali ho avuto il piacere di condividere non solo il percorso universitario, ma ben di più. Loro rappresentano il punto di contatto tra la persona che è entrata all’età di 17 anni in un ambiente che aveva probabilmente sottovalutato, e la persona che finisce questo percorso, che ha preso coscienza, anche grazie alla loro amicizia, di alcuni valori di cui non aveva pienamente compreso il senso. Devo ovviamente ringraziare anche tutti gli altri miei colleghi, come Elio, Maria, Luca ed

altri che hanno condiviso con me parte di questo percorso di studi.

Menzione a parte va a colei che ci è sempre stata, nonostante la vita ad un certo punto ci abbia riservato percorsi differenti, che è stata colei con cui mi sono aperto maggiormente nei momenti difficili. Alessia è semplicemente la rappresentazione del sostegno perfetto, dimostrando che fare parte di un mondo totalmente diverso dal mio e nonostante le scelte di vita differenti, non significa non riuscire a condividere e a sostenere le problematiche che si verificavano giorno per giorno. I ringraziamenti da farle risulteranno semplicemente troppo pochi ed esigui, qualsiasi cosa io possa scrivere, per ciò che ha fatto e rappresenta per me.

Dulcis in fundo, dopo tutte le peripezie affrontate, bisogna ringraziare la mia famiglia, fonte principale della mia forza e che mi ha sempre messo a disposizione tutte le risorse necessarie per poter raggiungere questo obiettivo. Nonostante il mio atteggiamento troppo spesso duro e polemico nei loro confronti, sanno benissimo che li voglio bene, e che questo sentimento rimarrà per sempre rinforzandosi maggiormente col passare del tempo, con la speranza di realizzare nella mia vita almeno il 10% di quello che hanno realizzato invece loro con sacrifici immensi e con risorse decisamente minori.