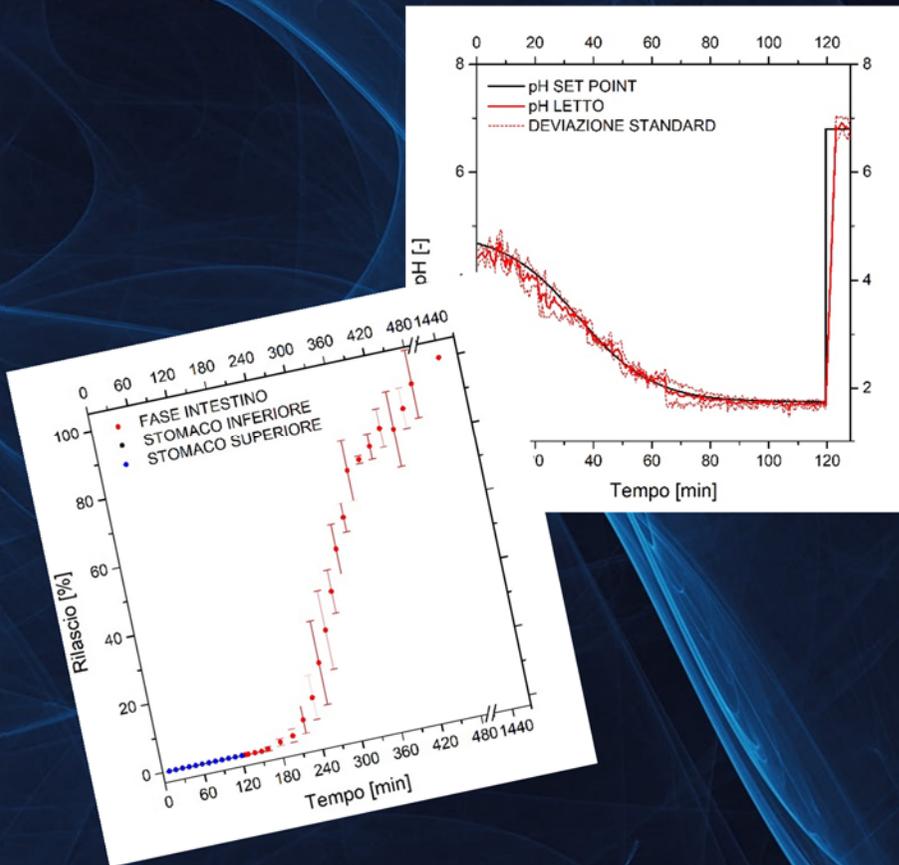


# Simulazione della fisica e della meccanica del lume gastrico in un modello *in-vitro* non convenzionale

Simulazione della fisica e della meccanica del lume gastrico in un modello *in-vitro* non convenzionale



Vincenzo Campitelli

Vincenzo Campitelli



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

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

**Simulazione della fisica e della meccanica  
del lume gastrico in un modello *in-vitro*  
non convenzionale**

Tesi in  
**Fenomeni di trasporto**

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Ing. Sara Cascone

Candidato:

Vincenzo Campitelli

matricola 0622200441

**Anno Accademico 2017/2018**



*Ad Alfonso, mio fratello.*

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

La data prevista per la discussione della tesi è il 26.07.2018

Fisciano, 18.07.2018

# Sommario

<b>Sommario .....</b>	<b>I</b>
<b>Indice delle figure .....</b>	<b>V</b>
<b>Indice delle tabelle .....</b>	<b>IX</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>XI</b>
<b>Introduzione .....</b>	<b>1</b>
1.1 Generalità .....	2
1.1.1 Farmacopea .....	2
1.2 Anatomia del tratto gastrointestinale .....	3
1.3 Stato dell'arte .....	5
1.3.1 Dynamic Gastric Model (DGM) .....	5
1.3.1.1 Comportamento gastrico di differenti rivestimenti farmaceutici.....	8
1.3.2 Un simulatore gastrico umano (HGS) per lo studio della digestione dei cibi all'interno dello stomaco umano .....	10
1.3.3 Sviluppo di un modello in-vitro avanzato dello stomaco e confronto con la fisiologia gastrica umana .....	13
1.3.4 Sviluppo e convalida di un nuovo modello TIM dinamico controllato da computer simulante lo stomaco e il piccolo intestino umano .....	16
1.7 Obiettivi .....	22
<b>Programma sviluppato in ambiente LabView .....</b>	<b>23</b>
2.1 Descrizione generale del programma .....	24

---

2.2 Logica di controllo _____	24
2.3 Strumentazione _____	26
2.3.1 Catetere pH pHTip™ (Unisensor AG)	26
2.3.2 Elettrodo di pH Orion™ Economy 912600 flask	28
2.4.3 Termocoppia	29
2.3.3 Sistema di pompaggio delle soluzioni intraluminiche	30
2.3.4 Scheda di acquisizione dati NI USB 6008	30
2.4 Manuale utente _____	31
2.4.1 Sezione di Input	32
2.4.2 Sezione di output	33
2.5 Manuale del Programmatore _____	33
2.5.1 Sezione di acquisizione dei dati di set point	34
2.5.2 Sezione di acquisizione dei segnali	37
2.5.3 Sezione di spegnimento delle pompe peristaltiche	40
<b>Materiali, apparecchiature e metodi .....</b>	<b>41</b>
3.1 Materiali _____	42
3.1.1 Mesalazina	42
3.1.2 Mezzi di dissoluzione	43
3.2 Apparecchiature _____	43
3.2.1 Dissolutore USP II	44
3.2.2 Stomaco artificiale	44
3.2.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	48
3.3 Metodi _____	49
3.3.1 Metodi di dissoluzione	49
3.3.2 Metodi analitici	51
<b>Risultati e discussione .....</b>	<b>55</b>
4.1 Prove di simulazione dell'evoluzione di pH nello stomaco <i>in-vitro</i> _____	56
4.2 Prove di dissoluzione _____	58
4.2.1 Prove di dissoluzione all'interno dell'apparato dissolutore USP II	58

---

Sommario e indici.	Pag. III
4.2.2 Prove di dissoluzione all'interno dello stomaco in-vitro	59
4.3 Confronto dei profili di rilascio _____	64
<b>Conclusioni.....</b>	<b>67</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>71</b>



## Indice delle figure

Figura 1. Le parti costitutive dello stomaco [2].....	3
Figura 2. Fisiologia del tratto gastrointestinale [2].....	4
Figura 3. Schema del DGM (non in scala). L'unità replica il volume interno di uno stomaco umano medio, opera in tempo reale e nei range fisiologici di riferimento [3]. .....	7
Figura 4. Performance dei gusci delle capsule. Rilascio percentuale cumulativo del paracetamolo da tre tipi di capsule: HPMC con carragenina come agente gelificante (HPMC-C), HPMC con gomma Gellan (HPMC-G), e gelatina dura (HG). Le capsule sono state testate in (A) apparato di dissoluzione USP, (B) DGM in condizioni di digiuno, e (C) DGM in condizioni di sazietà [4].....	9
Figura 5. HGS. (1) Motore; (2) rivestimento in lattice; (3) sacca a rete; (4) tubi di secrezione; (5) rulli; (6) cintura; (7) bulbo per la lettura della temperatura; (8) isolamento a schiuma plastica [5].....	10
Figura 6. Relazione lineare fra le forze applicate sul bulbo di gomma misurate dal texture analyzer e la pressione sviluppata all'interno del bulbo misurata dal manometro digitale [5]. .....	11
Figura 7. Variazione di pH nei campioni prelevati durante la digestione <i>in-vitro</i> del riso utilizzando l'HGS (media su tre prove) [5]. .....	12
Figura 8. Rappresentazione del TIMagc: (A) corpo; (B) antro prossimale; (C) antro distale; (D) sfintere pilorico [6].....	14
Figura 9. Simulazione della motilità antrale nel TIMagc. (A) fase di propulsione; (B) fase di miscelazione e svuotamento; (C) fase di retropropulsione [6]. .....	15
Figura 10. (A) output dei succhi gastrici; (B) output della pepsina; (C) output HCl nel sistema TIMagc (linea tratteggiata) confrontati con dati <i>in-vivo</i> [6]. .....	16
Figura 11. Visuale generale del modello ESIN. (A) pompe di transito ("Pa", frecce verdi) e pompe di secrezione ("Pb", pompe nere). (B) fotografia del prototipo. (C) Rappresentazione schematica del sistema di dialisi [8]. .....	18
Figura 12. Comportamento <i>in-vivo</i> e <i>in-vitro</i> delle compresse a rilascio immediato di paracetamolo. (A) dissoluzione del paracetamolo nell'USP II; (B)	

assorbimento di paracetamolo in-vivo; (C)confronto delle curve di assorbimento di paracetamolo nel modello ESIN e nei prelievi in-vivo [8].	21
Figura 13. Schema esemplificativo del processo di acquisizione dati.	25
Figura 14. Rappresentazione schematica di un sensore ISFET [10].	27
Figura 15. Catetere pHTip™ della Unisensor AG.	28
Figura 16. Catetere di pH della Orion™ [].	28
Figura 17. Termocoppia di tipo T (Rame-Costantana) della Omega™ utilizzata nel presente lavoro di tesi [12].	29
Figura 18. Da sinistra: pannello con le pompe peristaltiche; dettaglio di una pompa peristaltica [13].	30
Figura 19. Scheda di acquisizione dati NI USB 6008 [14].	30
Figura 20. Front panel del programma LabView.	31
Figura 21. Comando “Numeric” del front panel.	32
Figura 22. Comando “milliseconds to wait” del front panel.	32
Figura 23. Comando “dt pH” del front panel.	32
Figura 24. Comando “load set point” del front panel.	33
Figura 25. Comando “save history” del front panel.	33
Figura 26. Sezione di acquisizione dei dati di set point.	34
Figura 27. Sequenza iniziale del SubVi “pH Test”. In particolare, viene visualizzato il blocco “False” del <i>case structure</i> di controllo.	34
Figura 28. Sequenza iniziale del SubVi caso “True”.	35
Figura 29. Sequenza finale del SubVi.	35
Figura 30. Struttura del file .txt sorgente dei dati di set point.	36
Figura 31. Vista della sezione d’elaborazione del block diagram.	37
Figura 32. Zona orientale della sezione di acquisizione.	39
Figura 33. Zona meridionale della sezione di acquisizione.	39
Figura 34. Sezione finale del VI per lo spegnimento delle pompe peristaltiche.	40
Figura 35. Struttura molecolare della mesalazina [15].	42
Figura 36. Dissolutore Sotax AT7 SMART [1].	44
Figura 37. Mini-motoriduttore ITE della serie CIG42 [9].	46
Figura 38. A sinistra, massima occlusione dovuta alla terza contrazione; a destra posizione di completa opposizione del terzo rullo rispetto allo stomaco [9].	46
Figura 39. Vista laterale del dispositivo di azionamento meccanico applicato allo stomaco artificiale e misure correlate al movimento delle cinghie [18].	47

---

Figura 40. Disposizione all'interno del modello dell'elettrodo di pH rivestito da un involucro esterno protettivo, della termocoppia e dei tubi delle pompe peristaltiche. ....	47
Figura 41. Immagine dell'HPLC. ....	49
Figura 42. Esempio di cromatogramma. I punti sono gli estremi d'integrazione, la linea inferiore è la linea di base del picco e l'area colorata è l'integrale del segnale. ....	52
Figura 43. Schematizzazione della configurazione dell'apparato di sensoristica all'interno del modello <i>in-vitro</i> . ....	56
Figura 44. Simulazione dell'evoluzione di pH nello stomaco <i>in-vitro</i> . ....	57
Figura 45. Profilo di rilascio di una compressa di Mesavancol® a rilascio prolungato analizzato mediante dissolutore USP II a 100 rpm. ....	59
Figura 46. Profilo di pH rilevato durante le prove di dissoluzione della compressa di Mesavancol® all'interno del modello <i>in-vitro</i> . ....	61
Figura 47. Profili di rilascio della mesalazina all'interno del modello <i>in-vitro</i> /dissolutore. ....	62
Figura 48. Dettaglio del profilo di rilascio della mesalazina durante le due ore di permanenza all'interno del modello <i>in-vitro</i> . ....	63
Figura 49. Dissoluzione di una compressa di Mesavancol® 1200 mg a rilascio controllato, durante le sei ore di residenza all'interno dell'apparato dissolutore USP II. ....	64
Figura 50. Confronto tra i profili di rilascio di Mesavancol® nei vari dispositivi di analisi utilizzati. ....	65



## Indice delle tabelle

Tabella 1. Specifiche tecniche Catetere pH pHTip™ (Unisensor AG). .....	28
Tabella 2. Caratteristiche principali dell'elettrodo di pH della Orion™. ....	29
Tabella 3. Specifiche tecniche della scheda di acquisizione dati NI USB 6008 [14]. .....	31
Tabella 4. Caratteristiche dei blocchi di acquisizione utilizzati.....	38
Tabella 5. Dati chimici, fisici e farmacocinetici della mesalazina [16]......	43
Tabella 6. Parametri del modello HPLC per la rivelazione della mesalazina.....	51
Tabella 7. Valori delle costanti di taratura a determinati pH del mezzo di dissoluzione. ....	53



## Abstract

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

The aim of this work was to study the effects of pH evolution on the release profile of a pharmaceutical form using an *in-vitro* model (artificial stomach) simulating the human stomach. Such pH variation was realized thanks to a software developed in LabView, which had the task of control and regulation of that parameter through the online comparison between the pH of the dissolution medium, and the pH value of set point. Once the pH values were compared, the control system dosed inside the dissolution medium certain amounts of acid or basic solutions in order to adjust the pH. The unconventional model was accompanied by a traditional dissolution apparatus USP II. The release profile thus obtained, has been compared to the one obtained from a conventional dissolution test (USP II). An extended release formulation, Mesavanco<sup>®</sup> 1200 mg (extended release), has been analyzed using both dissolution systems.

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

Trials carried out in the *in-vitro* model showed the capability of the software developed in LabView to realize, within the dissolution medium, a realistic pH profile compared to set point curve, although

there was some deviation due to signal jamming of the instrumentation.

The release profiles obtained from both dissolution systems revealed no significant differences. The curve slopes of the two systems are similar, as well as the active ingredient release percentage of the analysed pharmaceutical formulations, reaching 94% of drug release after 8 hours, and after 24 hours they reached the complete dissolution.

The final analysis revealed that, within the unconventional model, there was not a trend difference between the release profiles obtained both in the upper and lower parts of the artificial stomach, confirming the gastro-resistant behaviour of the pharmaceutical formulation in the range of pH 4.8 – 1.

---

## Bibliografia

1. [Sotax (Solutions for pharmaceutical testing), USP II] <http://www.sotax.com/products/dissolution-testing/usp-1-2-5-6/>.
2. S. Cascone, In vitro and in silico models in pharmacokinetic studies, Tesi di dottorato in Ingegneria Chimica, 2013
3. Wickham, M. J. S., R. M. Faulks, J. Mann, and G. Mandalari, *The Design, Operation, and Application of a Dynamic Gastric Model*. *Dissolution Technologies* **19** 15–22 (2012).
4. Vardakou, M.; Mercuri, A.; Naylor, T. A.; Rizzo, D.; Butler, J. M.; Connolly, P. C.; Wickham, M. S. J.; Faulks, R. M., *Predicting the human in vivo performance of different oral capsule shell types using a novel in vitro dynamic gastric model*. *Int. J. Pharm.* **419** (1–2), 192–199 (2011).
5. Kong, F., and R. P. Singh, *A Human Gastric Simulator. (HGS) to Study Food Digestion in Human Stomach*. *Journal of Food Science* **75** E627–E635 (2010).
6. Bellmann, S., J. Lelieveld, T. Gorissen, M. Minekus, and R. Havenaar, *Development of an advanced in vitro model of the stomach and its evaluation versus human gastric physiology*. *Food Research International*. **88** 191–198 (2016)
7. Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R., & Huis in't Veld, J.H.J, *A multi compartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine*. *Alternatives to Laboratory Animals*, **23** 197–209 (1995).
8. Guerra, A., S. Denis, O. le Goff, V. Sicardi, O. Francois, A. F. Yao, G. Garrat, A. P. Manzi, E. Beyssac, M. Alric, and S. Blanquet-Diot, *Development and validation of a new dynamic computer-controlled model of the human stomach and small intestine*. *Biotechnology and Bioengineering* **113** 1325–1335 (2016).
9. C.Govetosa, *Un modello in-vitro per la simulazione del comportamento termomeccanico dello stomaco umano*, Tesi in Ingegneria Chimica, 2012/2013.
10. [Robust nonglass pH electrode] <https://www.all-about-ph.com/nonglass-ph-electrode.html>.

11. [Orion™ Economy Series pH Combination Electrodes]  
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/913600>.
  12. [what is a termocouple?]  
<https://www.omega.co.uk/prodinfo/thermocouples.html>.
  13. E. Mauriello, *Un modello fisico dell'apparato digerente umano: regolazioni di temperature e pH nello stomaco*, Tesi in Ingegneria Chimica, 2008/2009.
  14. [NI USB 6008, Specifications]  
<http://www.ni.com/pdf/manuals/375295c.pdf>
  15. Larsen GL, Henson PM., *Mediators of inflammation*. Annual Review of Immunology **1** 335-359 (1983).
  16. Mario Eandi et al., *Mesalazina: profilo farmacologico, terapeutico e farmacoeconomico*, Farmacoeconomia e percorsi terapeutici; **4** (4): 201-216 (2003).
  17. De Vos M., *Clinical pharmacokinetics of slow release mesalazine*. Clinical Pharmacokinetics **39** 85-97 (2000).
  18. S. Cascone, F. De Santis, G. Lamberti, *Mimicking the contractions of a human stomach and their effect on pharmaceuticals*, Journal of Drug Delivery Science and Technology (2017).
-

*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. Un grazie di cuore a Sara Cascone, che mi ha guidato e consigliato costantemente durante questo viaggio con gentilezza, pazienza e professionalità. Ringrazio Diego Caccavo, per il suo supporto morale e tecnico nei momenti di difficoltà.. Un ringraziamento grande a Maria Chiara, che ha condiviso con me l'intera esperienza di laboratorio, tra risate e giornate a volte infinite, per esserci sopportati e supportati a vicenda. A Ciro, e le sue birre, anzi le sue crio-birre mai bevute. Non ho trovato un laboratorio, ma letteralmente una famiglia in cui lascio un pezzo di cuore. R'amen a tutti voi ragazzi!*

*Ringrazio di cuore i miei genitori, sempre presenti e sempre disposti nell'ascoltarmi, consigliarmi, supportarmi. A mio fratello, che mi ha insegnato la più grande delle lezioni: non importa quanto la vita possa buttarti a terra, fintanto che si ha una forza d'animo e una voglia di combattere, si riuscirà sempre a trovare un nuovo inizio sempre e comunque. A mia zia Aurora, sempre presente; e a zia Margherita, che non lo è più. Alle mie cugine Marilena e Anna, e ai piccoli Andrea e Simona. Grazie per essere la mia famiglia.*

*A questo punto viene il turno degli amici, e come giustamente Seneca proferì "nessun bene senza amico ci dà gioia", io aggiungerei che senza amici non si cresce, né ci si migliora. Un grazie grande agli amici di sempre, compagni di trincea tra i banchi, della compagnia 105: Christian e le sue continue acconciature inguardabili, ma*

*nonostante ciò si fa comunque apprezzare; Francesco che fuori appare duro, ma in fondo è più affettuoso di un “orsetto del cuore”; Gigi e tutto il suo essere “Gigi De Vivo”, i suoi aforismi, le storie, e il suo essere sempre spensierato; lo zoccolo duro della 105 Pietro, una persona che sicuramente non può mancare nelle proprie giornate. Un grazie alle mie due cavese preferite, Serena e Federica, che nonostante il luogo di provenienza, risultano anche simpatiche all’occorrenza.*

*Agli amici della “vita reale”, quella al di fuori Ingegneria: a Silvana e Lisa, le migliori amiche che potessi mai trovare; a Nicola, una tra le persone più sensibili che conosca; ad Achille e al suo ciuffo che non taglia mai; a Luigi e Stefano. Grazie ragazzi.*

*“The Road goes ever on and on down  
from the door where it began.*

*Now far ahead the Road has gone,  
and I must follow, if I can, pursuing it  
with eager feet, until it joins some  
larger way where many paths and  
errands meet.*

*And whither then? I cannot say.”*

*(Cit. J.R.R.Tolkien)*