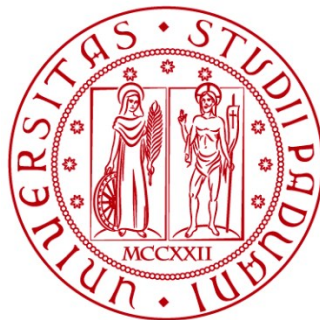


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea magistrale in Biologia Sanitaria



TESI DI LAUREA

**Stabilità di integratori alimentari in compresse:
studio dei profili di disaggregazione e
dissoluzione**

**Relatore: Prof.ssa Arianna Calistri
Dipartimento di Medicina Molecolare**

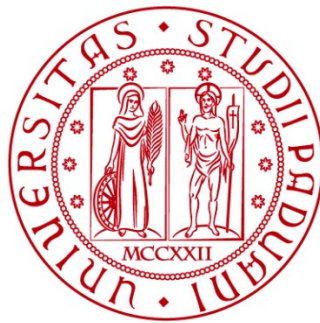
Laureanda: Elena Fornasier

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea magistrale in Biologia Sanitaria



TESI DI LAUREA

**Stabilità di integratori alimentari in compresse:
studio dei profili di disaggregazione e
dissoluzione**

**Relatore: Prof.ssa Arianna Calistri
Dipartimento di Medicina Molecolare**

Laureanda: Elena Fornasier

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Indice

1. ABSTRACT	3
2. INTRODUZIONE	5
2.1 INTEGRATORI ALIMENTARI: definizione ed aspetti normativi	5
2.2 Tipologie di integratori alimentari ammesse dalla Normativa	7
2.2.1 Il rivestimento delle compresse di integratori: funzioni e tipologie.	9
2.2.2 Modalità di rilascio del principio attivo degli integratori alimentari	10
2.3 UNIFARCO: La storia	11
2.3.1 La qualità in UNIFARCO	11
2.3.2 Il laboratorio controllo qualità	12
2.3.3 Gli integratori alimentari in UNIFARCO	13
2.4 Gli studi di stabilità	14
2.4.1 Linee guida ICH	14
2.4.2 Studio di stabilità degli integratori in UNIFARCO	16
2.5 Il saggio di disaggregazione	17
2.6 Il saggio di dissoluzione	18
3. SCOPO DELLA TESI	19
4. MATERIALI E METODI	21
4.1 Materiali	21
4.1.1 Principali strumenti ed apparecchi.....	21
4.1.2 Reagenti chimici.....	26
4.1.3 Materiali di consumo	27
4.1.4 Vetreria	27
4.2 Metodi	27
4.2.1 Messa a punto del saggio di disaggregazione	27
4.2.2 Saggio di resistenza alla rottura applicato alle compresse secondo la farmacopea.....	29
4.2.2.1 Metodo applicato per la valutazione della correlazione tra durezza e tempo di disaggregazione.....	29
4.2.3 Messa a punto del metodo di dissoluzione	30
4.2.4 Analisi HPLC	32
4.2.4.1 Metodo titolazione vitamina C	34
4.2.5 Analisi dei dati di dissoluzione.....	39
4.2.6 Ulteriori verifiche sul profilo di rilascio dell'INTEGRATORE 3 (compresse rivestite).....	40
4.2.7 Prova di confronto tra disaggregazione e dissoluzione.....	41
4.2.7.1 Metodo per la prova di confronto tra disaggregazione e dissoluzione 41	
5. RISULTATI E DISCUSSIONI	43
5.1 Risultati ottenuti nei saggi di disaggregazione	43

5.1.1	Tutte le compresse analizzate hanno mostrato tempo di disaggregazione conforme alle specifiche attese	43
5.1.2	I profili di disaggregazione sono risultati stabili durante la shelf-life dei prodotti	48
5.2	Il tempo di disaggregazione non mostra correlazione lineare con la durezza delle compresse.....	53
5.3	Risultati ottenuti dal saggio di dissoluzione	55
5.3.1	L'INTEGRATORE 6 (compresse immunostimolanti rivestite) mostra un rilascio leggermente inferiore all'atteso ed un profilo di dissoluzione stabile durante la shelf-life	57
5.3.2	L'INTEGRATORE 17 (compresse immunostimolanti non rivestite) mostra un profilo di dissoluzione conforme alle specifiche attese e costante durante la shelf-life	59
5.3.3	L'INTEGRATORE 24 (compresse energizzanti a rilascio modificato) dimostra un profilo di dissoluzione conforme all'atteso e stabile durante la shelf-life	61
5.3.4	L'INTEGRATORE 3 (compresse drenanti rivestite) dimostra un profilo di dissoluzione inferiore all'atteso e variabile durante la shelf-life	63
5.3.5	L'INTEGRATORE 23 (compresse drenanti non rivestite) dimostra un profilo di dissoluzione conforme all'atteso e stabile durante la shelf-life	65
5.4	Ulteriori prove di dissoluzione sull'INTEGRATORE 3 (compresse drenanti rivestite) hanno confermato un rilascio non ottimale	66
5.5	Risultati della prova di confronto tra disaggregazione e dissoluzione	69
5.5.1	L'INTEGRATORE 3 (compresse drenanti rivestite) mostra un rilascio ottimale durante il saggio di disaggregazione	69
5.5.2	L'INTEGRATORE 6 (compresse immunostimolanti rivestite) mostra un rilascio ottimale durante il saggio di disaggregazione.....	70
5.5.3	L'INTEGRATORE 24 (compresse energizzanti a rilascio modificato) mostra un rilascio ottimale durante il saggio di disaggregazione	71
6.	CONCLUSIONI	73
7.	BIBLIOGRAFIA	77
7.1	Referenze bibliografiche.....	77
7.2	Risorse online.....	78
7.3	Normativa.....	78

1. Abstract

In ambito farmaceutico, i saggi di disaggregazione e dissoluzione vengono effettuati sui farmaci in compresse per valutare, rispettivamente, correttezza e riproducibilità del processo produttivo ed il rilascio dei principi attivi contenuti.

Entrambi i saggi non sono, ad oggi, previsti nel controllo routinario degli integratori alimentari. Recenti indagini del settore hanno, tuttavia, evidenziato la necessità di inserire tali controlli nel monitoraggio degli integratori a garanzia del consumatore.

Lo scopo della presente Tesi è stato quello di indagare la conformità dei tempi di disaggregazione rispetto alle specifiche attese in tutti gli integratori alimentari in compresse commercializzati da UNIFARCO, Azienda presso la quale si è svolto questo lavoro. Inoltre, in alcuni di questi prodotti, sono stati valutati i profili di dissoluzione della vitamina C. Per entrambi i saggi sono stati testati sia lotti appena prodotti che lotti invecchiati. Dal test di disaggregazione, condotto applicando la Farmacopea Europea, è emerso che tutti gli integratori testati disaggregano nei tempi definiti durante la fase di sviluppo, confermando il dato anche durante l'invecchiamento. Per il saggio di dissoluzione, invece, è stato sviluppato e validato un metodo interno, che ha consentito di accertare la conformità del profilo di rilascio della vitamina C e la sua stabilità durante la conservazione delle compresse.

I risultati ottenuti in questa Tesi confermano la qualità dei prodotti commercializzati da UNIFARCO e pongono le basi per l'applicazione di routine dei saggi descritti anche agli integratori alimentari, contribuendo quindi ad assicurare ai consumatori prodotti più sicuri e controllati.

2. Introduzione

2.1 INTEGRATORI ALIMENTARI: definizione ed aspetti normativi

A livello europeo, il settore degli integratori alimentari è regolamentato dalla direttiva 2002/46/CE del 10 giugno 2002, nata con il duplice scopo di tutelare un elevato livello della salute pubblica e garantire una circolazione libera di questi prodotti all'interno dell'Unione Europea. Secondo questa direttiva, per integratori alimentari si intendono “prodotti alimentari destinati ad integrare la normale dieta e che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive, quali vitamine e minerali, o di altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico, sia monocomposti che pluricomposti, in forme di dosaggio, vale a dire in forme di commercializzazione quali capsule, pastiglie, compresse, pillole e simili, polveri in bustina, liquidi contenuti in fiale, flaconi a contagocce e altre forme simili, di liquidi e polveri destinati ad essere assunti in piccoli quantitativi unitari” (Dir. 2002/46/CE).

La definizione sopra riportata ha rappresentato una svolta per il settore dell'integratore alimentare, colmando il vuoto normativo esistente prima del 2002.

Dalla definizione emergono aspetti importanti:

- gli integratori alimentari sono alimenti e, in quanto tali, devono sottostare a tutte le normative che di regola vengono applicate in questo settore;
- la funzione di questi prodotti deve essere quella di integrare la dieta normale;
- gli integratori rappresentano delle fonti concentrate di nutrienti o altre sostanze con effetto nutrizionale o fisiologico, utilizzate da sole o in combinazione;
- la commercializzazione degli integratori avviene in forme predosate, in modo tale da essere assunti in quantità ben misurate ai fini dell'apporto massimo giornaliero e, se necessario, facilmente misurabili dal consumatore.

In Italia la normativa è stata recepita e attuata con il decreto legislativo n. 169 del 21 maggio 2004, che ha normalizzato il ruolo e la finalizzazione degli integratori alimentari.

Secondo la definizione adottata dal recepimento della Direttiva Europea, gli integratori sono “prodotti alimentari destinati ad integrare la dieta comune e che costituiscono una fonte concentrata di sostanze nutritive, quali vitamine e minerali, o di altre sostanze aventi un effetto nutritivo o fisiologico, in particolare, ma non in via esclusiva, aminoacidi, acidi grassi essenziali, fibre ed estratti di origine vegetale, sia monocomposti che pluricomposti, in forme predosate” (DLG 21 maggio 2004 n. 169 art. 2).

Per predosate si intendono “forme di commercializzazione quali capsule, pastiglie, compresse, pillole, gomme da masticare e simili, polveri in bustina, liquidi contenuti in fiale, flaconi a contagocce e altre forme simili di liquidi e di polveri destinati ad essere assunti in piccoli quantitativi unitari”.

L'integratore si caratterizza, quindi, per l'effetto nutritivo e fisiologico, che viene supportato da validi presupposti scientifici e deve essere dichiarato, in quanto risulta necessario per orientare il consumatore verso scelte consapevoli e favorirne quindi un utilizzo adeguato.

L'immissione in commercio di qualsiasi integratore alimentare è subordinata alla procedura di notifica al Ministero della Salute dell'etichetta nutrizionale. Una volta superata tale procedura, i prodotti sono inclusi in un apposito elenco con uno specifico codice, i cui estremi possono essere riportati nella stessa etichetta (DLG 21 maggio 2004 n. 169 art. 10).

Per quanto riguarda l'etichettatura, oltre a rispettare necessariamente le norme in vigore per gli alimenti, quella degli integratori deve anche riportare:

- il nome delle categorie di sostanze nutritive che contraddistinguono il prodotto o un'indicazione relativa alla natura di queste sostanze;
- l'effetto nutrizionale o fisiologico attribuito al prodotto sulla base dei suoi costituenti;
- la dose massima raccomandata per l'assunzione giornaliera;
- un'avvertenza a non eccedere le dosi raccomandate giornaliere;
- le quantità delle sostanze nutritive o aventi effetto fisiologico in forma numerica e riferite alla dose giornaliera di prodotto raccomandata dal produttore;
- la raccomandazione di non usare gli integratori come sostituti di uno stile di vita sano e di un'alimentazione varia ed equilibrata;
- l'indicazione che non si tratta di un medicinale;
- l'indicazione nella quale questi prodotti devono essere tenuti fuori dalla portata dei bambini al di sotto dei tre anni di età.

Gli integratori, essendo equiparati agli alimenti, devono sottostare ad una legislazione differente dai farmaci (Direttiva 2002/46/CE, attuata con il decreto legislativo 21 maggio 2004, n. 169). La responsabilità di garantirne la sicurezza spetta all'operatore del settore alimentare che immette il prodotto sul mercato.

Poiché nella comunità scientifica viene comunemente accettato un certo parallelismo tra integratore e farmaco, al fine di condurre diverse analisi di controllo, è uso comune riferirsi al testo della Farmacopea Europea (*PhEur*).

La Farmacopea Europea è il testo contenente le caratteristiche e i requisiti che le sostanze farmaceutiche devono soddisfare e armonizza i testi delle principali farmacopee ufficiali degli stati europei, con lo scopo di assicurare degli standard di qualità comuni. Attualmente è in vigore la 10^a Edizione (1° gennaio 2020) e i successivi supplementi.

Essa riporta tutte le norme per una corretta preparazione dei farmaci e le disposizioni che il farmacista deve seguire per svolgere la propria attività.

In questo testo, vengono inoltre descritti i metodi di analisi, i saggi, i procedimenti tecnologici e le apparecchiature da utilizzare per il controllo dei prodotti farmaceutici.

Oltre al riferimento della Farmacopea Europea, in Italia si applica la Farmacopea Ufficiale (F.U.), che presenta tutte le norme stabilite dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS) della Repubblica Italiana (F.U.I. XII^a Ed. 2008 e successivi aggiornamenti).

2.2 Tipologie di integratori alimentari ammesse dalla Normativa

Nelle Linee Guida Ministeriali gli integratori alimentari vengono comunemente suddivisi in diverse categorie sulla base dei principali ingredienti che li costituiscono:

- **Vitamine e minerali:** l'uso è attualmente disciplinato dal regolamento (CE) 1170/2009 del 30 novembre 2009, che modifica la direttiva 2002/46/CE e il regolamento (CE) 1925/2006, e riporta non solo gli elenchi di vitamine e minerali ammessi, ma anche le forme con cui possono essere aggiunti agli alimenti.
 - Come vitamine possono essere contenute:
vitamina A, vitamine del gruppo B (B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9 e B12), vitamina C, vitamina D, vitamina E, vitamina K.
 - Come minerali:
calcio, magnesio, iodio, ferro, rame, zinco, manganese, sodio, potassio, selenio, cromo, molibdeno, silicio, boro, fluoro e calcio, inseriti tal quali o sottoforma di sali.
- **Probiotici e prebiotici:** il termine probiotico è riservato a "ceppi di microrganismi vivi, rigorosamente selezionati che, somministrati in quantità adeguate, conferiscono un beneficio per la salute dell'ospite". Esempi di ceppi probiotici sono *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*. Per prebiotico si intendono, invece, "sostanze non digeribili di origine alimentare che, se assunte in quantità adeguata, favoriscono selettivamente la crescita e l'attività di uno o più batteri già presenti nel tratto intestinale o assunti insieme al prebiotico". Un esempio è il carboidrato non digeribile inulina (Markowiak P. et al., 2017).
Le indicazioni per alimenti e integratori contenenti microrganismi probiotici o sostanze prebiotiche si trovano nelle Linee Guida Ministeriali su probiotici e prebiotici (revisione marzo 2018).
- **Sostanze e preparati vegetali (*botanicals*):** l'impiego è attualmente disciplinato dal decreto ministeriale (DM) 10 agosto 2018. Nell'allegato 1 di tale DM vengono riportati gli elenchi di sostanze e preparati vegetali che si possono utilizzare negli integratori alimentari (possono trattarsi di piante, alghe, funghi e licheni). Esempi di tali sostanze sono Echinacea spp., Rhodiola rosea e Lichene islandico.
- **Altre sostanze ad effetto nutritivo o fisiologico:** nelle Linee Guida Ministeriali su "Altri nutrienti e altre sostanze ad effetto nutritivo o fisiologico" (revisione settembre 2019) vengono riportate disposizioni per le altre sostanze che possono essere utilizzate, diverse dai *botanicals* (ad esempio, per gli aminoacidi ramificati vengono indicati i limiti di apporto, le avvertenze da riportare in etichetta e le indicazioni per l'utilizzo).

La legislazione è armonizzata a livello europeo per l'utilizzo di vitamine e minerali, mentre nel caso delle altre categorie si applicano le Linee Guida Ministeriali (Ministero della Salute, Linee Guida Ministeriali (LGM), 2022).

Gli integratori alimentari si differenziano anche per le diverse tipologie di commercializzazione: liquido (monodose o multidose), polvere (monodose o multidose), polvere compressa, polvere in capsula, liquidi/semiliquidi in gelatina. Le diverse forme implicano differenti modalità di somministrazione, ad esempio tal quale o ricostituito in liquido (Fig.1).



Figura 1. *Diverse tipologie di integratori alimentari commercializzati da UNIFARCO, l'Azienda presso la quale è stato svolto questo lavoro di Tesi e che verrà meglio descritta al paragrafo 2.3 di questa Introduzione.*

Di interesse per il presente lavoro di Tesi le compresse che sono essenzialmente di due tipi.

1. Le **compresse non rivestite**, descritte dalla farmacopea come “compresse a singolo strato, risultanti da una singola compressione di particelle e compresse multistrato costituite da strati concentrici o paralleli ottenuti per successiva compressione di particelle di differente composizione”. Se si osserva una compressa non rivestita in sezione, si nota una struttura relativamente uniforme (nelle compresse monostrato) o una struttura stratificata (nelle compresse multistrato) ma nessun segno di rivestimento (Fig.2).



Figura 2. *Esempio di compressa multistrato non rivestita a sinistra e compressa a singolo strato non rivestita a destra.*

2. Le **compresse rivestite**, invece, secondo la descrizione della farmacopea sono “compresse ricoperte con uno o più strati di miscele di varie sostanze come resine naturali o sintetiche, gomme, gelatina, cariche inattive e insolubili, zuccheri, plastificanti, polioli, cere, coloranti autorizzati e talvolta aromatizzanti e principi attivi. Le sostanze usate come rivestimento sono di norma applicate come soluzione o sospensione in condizioni in cui si abbia evaporazione del veicolo” (Fig.3).



Figura 3. Esempio di compressa rivestita commercializzata da UNIFARCO.

2.2.1 Il rivestimento delle compresse di integratori: funzioni e tipologie

Nel caso degli integratori commercializzati come compresse, l'uso del rivestimento è a discrezione del produttore che può ricorrere all'uso dello stesso per ottenere specifiche funzioni (Aulton M. E. et al., 2018).

Si parla di rivestimento “cosmetico” quando la presenza dello stesso non interferisce con la cinetica di rilascio dei principi attivi. In questo caso, la funzione del rivestimento può essere quella di:

- proteggere la compressa dall'azione degli agenti atmosferici (come luce e umidità);
- dare al nucleo maggiore resistenza meccanica;
- mascherare odori e sapori sgradevoli, migliorando la presentazione del prodotto;
- facilitare la deglutizione.

Quando, invece, il rivestimento interferisce con la cinetica di rilascio dei principi attivi ed ha come scopo un rilascio ritardato o controllato nel tempo, si parla di rivestimento “funzionale”.

Il rivestimento “funzionale” viene quindi usato per:

- regolare il tempo di cessione del principio attivo del farmaco attraverso adatte coperture e stratificazioni;
- coprire il nucleo con rivestimenti gastro-resistenti nel caso di attivi che:
 - irritano la parete gastrica
 - si decompongono in presenza di acidi
 - devono agire nell'intestino

Entrambi i tipi di rivestimento (cosmetico e funzionale), possono essere ottenuti mediante diverse tipologie produttive:

- confettatura: che permette di ottenere un rivestimento zuccherino, costituito per la maggior parte da saccarosio;
- filmatura (o rivestimento filmogeno): consente di ottenere un rivestimento filmogeno, costituito da polimeri di varia natura, che possono essere applicati sotto forma di soluzione acquosa o organica;
- rivestimento a secco: costituito da uno strato di granulato applicato per compressione attorno ad una compressa già preformata.

Tra queste tipologie di rivestimento, utile ai fini di questa tesi risulta il rivestimento filmogeno, di cui i principali costituenti sono (Aulton M. E. et al., 2018):

- POLIMERI: hanno la funzione di fornire forza meccanica al rivestimento. A seconda della tipologia di rilascio voluta per la compressa, nel rivestimento possono essere utilizzati alternativamente polimeri:
 - Gastrosolubili: Ad es. Idrossipropilmetilcellulosa (HPMC), Metilcellulosa (MC), Idrossietilcellulosa (HEC), acrilati
 - Enterosolubili: Ad es. cellulosa acetofalato, polivinilacetofalato, copolimeri metacrilici-acrilici, Idrossipropilmetilcellulosa ftalato (HPMC ftalato)
 - A rilascio modificato: Ad es. acrilati, cellulose modificate
- SOLVENTI: hanno la funzione di sciogliere o disperdere il polimero. Ad es. acqua, alcoli, idrocarburi clorurati.
- PLASTIFICANTE: hanno la funzione di rendere il film più flessibile e resistente. Ad es. glicole polietilenico, glicole propilenico, glicerina, sorbitolo, trietilcitrate.
- COLORANTI: hanno la funzione di migliorare l'aspetto e facilitare l'identificazione del preparato. Generalmente si tratta di pigmenti insolubili.
- OPACIZZANTI: hanno la funzione di rendere opaco il rivestimento. Si tratta di sostanze inorganiche insolubili in acqua (generalmente bianche) ad es. gel di silice, carbonati.

2.2.2 Modalità di rilascio del principio attivo degli integratori alimentari

Un ulteriore aspetto importante relativo agli integratori alimentari è rappresentato dalla modalità di rilascio dei principi attivi in essi contenuti.

Le forme a **rilascio convenzionale (o immediato)**, sono quelle che mostrano un rilascio della/e sostanze attive non deliberatamente modificato mediante particolari metodi di formulazione. In questo caso il rilascio dipende essenzialmente dalle caratteristiche chimico-fisiche dei principi attivi presenti e il fattore limitante la biodisponibilità è la solubilità del principio attivo e l'assorbimento attraverso le membrane biologiche dell'organismo.

Le preparazioni a **rilascio modificato** invece, hanno come obiettivo quello di modificare la velocità e/o il tempo e/o il sito di rilascio dei principi attivi, mediante specifiche caratteristiche di formulazione. Le forme a rilascio modificato comprendono quelle a rilascio prolungato, a rilascio ritardato e a rilascio ripetuto. In questo caso il fattore limitante la biodisponibilità è appunto la cinetica di rilascio, piuttosto che la cinetica di assorbimento.

2.3 UNIFARCO: La storia

L'azienda UNIFARCO è nata nel 1982 ai *piedi del Parco delle Dolomiti bellunesi*, dalla collaborazione di quattro soci fondatori, tutt'oggi al vertice del direttivo aziendale.

Lo scopo dell'azienda, fin dal principio, è stato quello di fungere da laboratorio per le farmacie locali nella realizzazione soprattutto di preparazioni cosmetiche. Con il passare degli anni è diventata una realtà internazionale, sia grazie alla creazione di una S.p.A., che all'espansione nel mercato estero in Europa e UK.

L'azienda si occupa della produzione interna di prodotti cosmetici e si appoggia a terzisti per la produzione di integratori alimentari, dispositivi medici e make-up.

Nel corso degli anni, la crescita è sicuramente stata determinata da fattori importanti quali: la scelta delle materie prime, la qualità dei prodotti, la sicurezza, il rapporto qualità/prezzo e la qualità dei servizi offerti ai clienti.

Fattore caratterizzante l'azienda è la possibilità che viene data ad ogni farmacia di personalizzare i prodotti con il proprio marchio, grazie al supporto di una rete scientifica formata da agenti e trainer selezionati che collaborano con i farmacisti per una continua formazione e fiducia nell'investire in un prodotto con il proprio nome.

Una combinazione di elementi che ha permesso ad UNIFARCO di raggiungere 366 soci farmacisti in Italia e 5600 farmacie clienti in Europa, di cui 2900 in Italia, che condividono gli stessi valori: ricerca scientifica, sostenibilità e competenza farmaceutica.

2.3.1 La qualità in UNIFARCO

La qualità è un aspetto indispensabile per il successo dei prodotti UNIFARCO.

Le certificazioni ottenute dall'azienda nel corso degli anni sono:

- Certificazione ISO 9001 per la gestione della qualità che definisce i requisiti minimi che il Sistema di Gestione per la Qualità di un'azienda deve dimostrare di soddisfare per garantire il livello di qualità del prodotto e del servizio che offre. L'azienda, infatti, è sempre stata particolarmente attenta a questo aspetto, ponendosi come obiettivo il graduale miglioramento di tutti i settori aziendali.
- Certificazione ISO 14001 per la gestione ambientale, principio base di tutta la filosofia UNIFARCO. L'azienda, fin dall'inizio dell'attività, ha posto molta attenzione all'ambiente e alla sua salvaguardia. Per questo nel 2021 è diventata Società Benefit assicurando un processo produttivo a basso

impatto ambientale, riducendo le emissioni di CO2 e i consumi idrici, e utilizzando per la sede principale energia proveniente da fonti rinnovabili. UNIFARCO, inoltre, si impegna a ridurre la produzione di scarti e rifiuti ed a introdurre materiali riciclati e riciclabili nei packaging dei prodotti.

- Certificazione ISO 45001 per la gestione della Salute e sicurezza sul Lavoro, che consente di controllare e ridurre al minimo i rischi possibili per la salute dei dipendenti e per migliorare la sicurezza sull'ambiente di lavoro.
- UNIFARCO segue inoltre le Pratiche di Buona Fabbricazione (GMP) e possiede la certificazione ISO 22716. Le GMP sono costituite da un insieme di regole e procedure per ottenere un prodotto sicuro e di qualità. Si focalizzano su diverse attività legate non solo al processo produttivo, ma anche alla documentazione di ogni operazione, alla formazione del personale, al mantenimento delle contaminazioni entro precisi limiti, al controllo delle attrezzature e dei macchinari e intervengono nella gestione della produzione, al fine di assicurare standard di qualità appropriati.

UNIFARCO, forte delle ISO a cui aderisce, pone una severa attenzione alla qualità dei prodotti. Tutti i processi di produzione interni vengono sottoposti a rigidi controlli, dalle materie prime al prodotto confezionato, garantendo piena tracciabilità del prodotto. Allo stesso modo, anche ciò che viene prodotto esternamente (integratori, dispositivi medici e make-up) viene sottoposto a controlli durante vari momenti della filiera produttiva e, in particolare, prima dell'immissione in commercio. Tutti i prodotti esterni, infatti, devono essere inviati al laboratorio di controllo qualità in UNIFARCO dove vengono analizzati sulla base degli standard interni stabiliti.

Questo consente all'azienda di mantenere una qualità elevata dei prodotti ed assicurare una completa tracciabilità in tutte le fasi del processo.

2.3.2 Il laboratorio controllo qualità

Garante della qualità e della sicurezza del prodotto è l'area *Product Quality Assurance* di cui fa parte anche il reparto controllo qualità.

Il laboratorio controllo qualità entra in gioco nella verifica di tutte le fasi di lavorazione dei prodotti, al fine di garantire sia la qualità del prodotto in termini chimico-fisici che la sicurezza del consumatore.

In base alla tipologia di produzione (interna o esterna) ed al tipo di prodotto (cosmetico, integratore, dispositivo medico e make-up), le attività principali che vengono eseguite nel laboratorio di controllo qualità durante le varie fasi sono:

- **analisi chimico-fisiche:** valutano caratteristiche del prodotto come l'organolettica e la sensorialità, la viscosità, la densità e il pH;
- **analisi microbiologiche:** passaggio fondamentale per la sicurezza dei prodotti, vengono eseguite nel laboratorio interno di microbiologia per i prodotti cosmetici, mentre per altri prodotti vengono eseguite presso laboratori esterni;
- **titolazione dei principi attivi presenti nella formula:** utilizzata per valutare la stabilità dei principi attivi presenti negli integratori e dichiarati in etichetta. Alcune titolazioni vengono eseguite e monitorate internamente

attraverso metodi messi a punto dall'azienda, mentre altre vengono eseguite presso laboratori esterni specializzati.

2.3.3 Gli integratori alimentari in UNIFARCO

Ogni prodotto nasce da un progetto ideato dal marketing sulla base di analisi di mercato e dall'elaborazione dei dati di vendita dei prodotti. Il progetto, una volta definito per la scelta di principi attivi, dosaggi e forma di assunzione, viene condiviso con il laboratorio di ricerca e sviluppo per la parte legata alla formulazione del prodotto, allo scouting delle materie prime e per la ricerca e selezione del packaging ottimale per la tipologia di prodotto.

Mentre per il cosmetico la produzione avviene quasi sempre internamente all'azienda, per gli integratori alimentari UNIFARCO si avvale della collaborazione di terzisti specializzati nelle diverse formulazioni.

In alcuni casi il prodotto viene prototipato e sviluppato direttamente dai terzisti sulla base di specifiche preventivamente definite dall'azienda; in altri casi la formulazione viene prima sviluppata e testata internamente dal laboratorio ricerca e sviluppo e poi condivisa con il terzista che fisicamente si occuperà della produzione industriale del prodotto.

Il processo inizia con il vaglio da parte di ricerca e sviluppo delle richieste del marketing quali, ad esempio:

- la funzione specifica del prodotto;
- il target di popolazione cui è rivolto;
- i quantitativi minimi di principi attivi da inserire in formula;
- la volontà di supportare dei claim nutrizionali;
- il tipo di materie prime eventualmente da vantare (es. vegane, ecosostenibili, prive di allergeni, ecc.);
- la forma farmaceutica;
- le modalità di utilizzo;
- il target price.

Seguono approfonditi studi in letteratura al fine di inquadrare la funzione desiderata dell'integratore; possono risultare utili eventuali confronti con specialisti del settore medico/nutrizionale per la valutazione dei principi attivi a sostegno della funzione desiderata e lo *scouting* delle materie prime presenti sul mercato. Parallelamente devono essere anche prese in considerazione questioni prettamente economiche e commerciali.

Una volta scelte le materie prime, segue la valutazione regolatoria interna grazie al supporto dell'ufficio regolatorio che verifica la conformità delle stesse rispetto alla normativa in vigore. Nel caso di integratori sviluppati internamente può essere necessaria anche una verifica qualitativa delle materie prime che verranno utilizzate (es. analisi chimico-fisiche e microbiologiche).

Seguono poi delle prove di laboratorio su piccola scala (definiti prototipi) che permettono sia di valutare la fattibilità della formula ideata, che la parte prettamente qualitativa di alcune variabili quali, ad esempio, la palatabilità, la tipologia di packaging e l'aspetto estetico.

I vari prototipi vengono poi sottoposti a valutazione del marketing.

Una volta scelta la formula definitiva, molto spesso è necessario verificare quello che viene descritto come *scale up* aziendale, ovvero l'applicabilità e la fattibilità della formula anche su scala industriale, con i macchinari del reparto produttivo. Tali produzioni vengono chiamate "pilota" e vengono solitamente eseguite nei locali produttivi dei terzisti.

In questa fase del processo, il reparto di industrializzazione del prodotto valuta l'esecuzione della prova e l'eventuale necessità di ritoccare il processo produttivo, coadiuvato dal laboratorio di controllo qualità che, mediante analisi quali-quantitative sul lotto prodotto al tempo zero e nel corso dei mesi successivi (i cosiddetti "studi di stabilità" [Rif. par. 2.4]), valuta la bontà del prodotto e il comportamento dello stesso nel corso del tempo.

Il processo di sviluppo continua con un ulteriore aumento dei volumi e il passaggio dalla prova "pilota" alla vera e propria produzione industriale, con una formula eventualmente corretta nei quantitativi e/o metodi produttivi.

Lo *scale-up* del prodotto e il controllo in ogni fase del processo in cui vengono variati i volumi di produzione è fondamentale per evitare che le caratteristiche del prodotto sviluppato inizialmente in laboratorio possano variare, considerando le aumentate dimensioni e capacità degli impianti nelle produzioni industriali.

2.4 Gli studi di stabilità

Al fine di garantire un prodotto performante ed efficace lungo tutta la vita dello stesso, dalla produzione all'acquisto da parte del consumatore finale, in azienda vengono eseguiti i cosiddetti studi di stabilità, sia sulle prove pilota quando realizzate, che su tutti i primi lotti industriali prodotti.

Gli studi di stabilità, oltre ad essere un requisito fondamentale per garantire la qualità degli integratori alimentari, sono utili per valutare l'eventuale necessità di migliorare la formula (agendo per esempio sui surdosaggi dei principi attivi inseriti) e per definire la validità da assegnare ai prodotti. È fondamentale, infatti, garantire che il prodotto risulti sicuro e mantenga le caratteristiche quali-quantitative dichiarate in etichetta per tutta la shelf-life, ovvero la "vita a scaffale". Di fondamentale importanza è, pertanto, valutare l'andamento quali-quantitativo del prodotto al passare del tempo.

Con gli studi di stabilità i prodotti vengono sottoposti a condizioni di conservazione "stressati" al fine di ottenere, in un tempo ridotto, una previsione sull'invecchiamento.

Tali condizioni vengono simulate con degli specifici apparecchi chiamati camere climatiche, che permettono di agire su temperatura e umidità di conservazione.

2.4.1 Linee guida ICH

Ci sono più fattori che concorrono ad influenzare la stabilità degli integratori nel tempo: i principi attivi presenti in formula, lo stato fisico della formulazione

(polvere, polvere compressa, liquido, gel), la temperatura, l'umidità e le interazioni con il packaging.

La Conferenza internazionale per l'armonizzazione dei requisiti tecnici per la registrazione dei farmaci ad uso umano (ICH) nel 2003 ha emesso le linee guida Q1A (R2) "Stability testing of new drug substances and products" al fine di armonizzare gli studi di stabilità sui farmaci immessi in commercio (ICH, Q1A R2, 2003).

Come sopra esposto, dal momento che nella comunità scientifica gli integratori alimentari vengono spesso equiparati ai farmaci, le linee guida ICH Q1A (R2) vengono utilizzate frequentemente come spunto per monitorare e valutare il comportamento dei prodotti confezionati al passare del tempo.

In queste linee guida vengono presentate le modalità di esecuzione dello studio di stabilità, sia in termini di condizioni che in termini di tempistiche.

Più precisamente, le linee guida ICH Q1A R2 specificano che gli studi dovrebbero includere analisi per gli aspetti che sono suscettibili a modificazioni durante la conservazione e che possono influenzare la qualità, la sicurezza e/o l'efficacia del prodotto. Lo scopo è, infatti, stabilire come variano gli aspetti presi in esame (dunque la qualità del prodotto) con il passare del tempo e l'influenza di fattori ambientali quali temperatura e umidità. I risultati ottenuti sono indicativi per assegnare la validità del prodotto e le condizioni raccomandate per la conservazione.

Al fine di standardizzare gli studi di stabilità tra i vari Paesi, le linee guida ICH Q1A (R2), sulla base delle condizioni termo-igrometriche annuali medie, suddividono il mondo in cinque differenti zone climatiche a cui corrispondono precise modalità di conservazione dei prodotti per quella che viene definita "long term stability" (Fig.4):

- Zona I: Clima temperato: 21°C / 45% umidità relativa (RH)
- Zona II: Clima subtropicale e mediterraneo: 25°C / 60% RH
- Zona III: Clima caldo e secco: 30°C / 35% RH
- Zona IVA: Clima caldo e umido: 30°C / 65% RH
- Zona IVB: Clima caldo e molto umido: 30°C / 75% RH

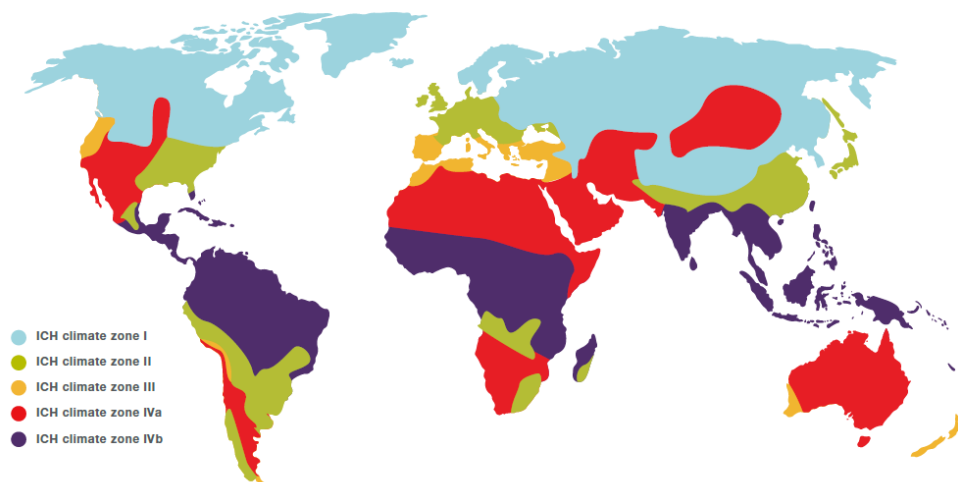


Figura 4. Distribuzione delle zone climatiche nel mondo (ICH Q1A R2). (Da www.thermofisher.com).

2.4.2 Studio di stabilità degli integratori in UNIFARCO

Seguendo le linee guida ICH Q1A (R2), in azienda gli integratori vengono sottoposti in parallelo allo studio di stabilità “accelerata” e allo studio “long-term”.

Lo studio di stabilità “accelerata” consiste nel simulare le condizioni di conservazione più critiche sottoponendo il prodotto a una temperatura di 40°C e 75% umidità relativa (RH) per sei mesi e serve per mimare in breve tempo il comportamento che potrebbe avere il prodotto a fine vita sullo scaffale.

Lo studio di stabilità “accelerata” deve essere affiancato da uno studio “long term”, che viene eseguito in condizioni reali per tutta la presunta durata di vita del prodotto, per monitorarne la conservazione.

Se le caratteristiche chimico fisiche dell’integratore non consentono di effettuare uno studio in condizioni accelerate (ad es. i probiotici), vengono adottate delle condizioni intermedie.

Il laboratorio di controllo qualità in UNIFARCO, per ogni tipologia di integratore, sia in fase di sviluppo che nei primi lotti industriali, avvia lo studio di stabilità stoccando delle campionature di prodotto all’interno di camere climatiche impostate a tre diverse temperature e umidità:

- 1) a 40°C±2 e 75%±5 umidità relativa (RH) per lo studio della stabilità “accelerata”;
- 2) a 30°C±2 e 65%±5 RH per lo studio della stabilità “long term”;
- 3) a 25°C±2 e 60%±5 RH per gli integratori per i quali la conservazione viene consigliata al di sotto di certe temperature (ad es. prodotti probiotici);
- 4) vengono inoltre stoccati dei campioni anche a temperatura ambiente che vengono utilizzati come campioni di riferimento.

Come riportato nella seguente tabella (Tab.1), i controlli a lungo termine generalmente vengono eseguiti con frequenza trimestrale per il primo anno, semestrale nel secondo anno e negli anni successivi, fino al termine del periodo di validità ipotizzato/assegnato.

I controlli in stabilità accelerata, invece, avvengono con frequenza trimestrale fino al sesto mese.

	TEMPI DI CONTROLLO PRESI IN ESAME (mesi)								
STABILITA' IN ESAME	0	3	6	9	12	18	24	30	36
<i>long term</i>	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>accelerata</i>	x	x	x						

Tabella 1. Vengono riportati in tabella e segnalati con “x” i diversi tempi di controllo presi in esame per lo studio di stabilità long term e accelerata, stabiliti sulla base delle linee guida ICH Q1A (R2).

Tra i parametri che vengono monitorati durante gli studi di stabilità ci sono:

- integrità della confezione;
- caratteristiche organolettiche (colore, odore, sapore);
- caratteristiche fisiche (umidità, pH di prodotti semisolidi o liquidi, peso, AW, densità);

- caratteristiche chimiche (titolazione dei principi attivi presenti dichiarati in etichetta);
- parametri microbiologici (es. conta aerobica totale, muffe e lieviti, assenza di patogeni) che solitamente vengono controllati al termine della stabilità.

2.5 Il saggio di disaggregazione

È noto che un integratore (così come un farmaco) somministrato in forma solida deve disaggregarsi per liberare efficacemente il suo principio attivo (o più principi attivi se presenti), in modo tale da renderlo disponibile per l'assorbimento da parte dell'organismo (Fig.5).

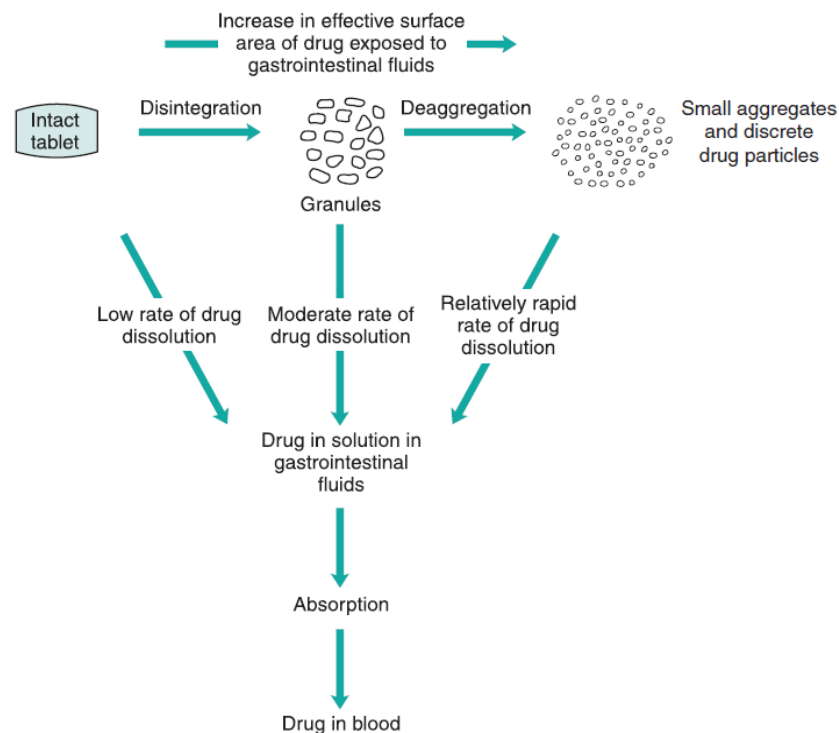


Figura 5. Schema esemplificativo e riassuntivo della disaggregazione e passaggio in soluzione del principio attivo contenuto una compressa (Da Aulton M. E. et al., 2018).

Le compresse a rilascio convenzionale, una volta arrivate nello stomaco, cominciano a disintegrarsi. Esistono specifici eccipienti compresi nella formulazione dell'integratore che consentono di avviare la disaggregazione e facilitare questo processo.

Durante la disaggregazione, mediata dall'ambiente acido e dalla peristalsi, la compressa comincia a rompersi formando dei pezzi più piccoli, detti granuli, che a loro volta tendono a frantumarsi per formare delle piccole particelle. In questo stato, il principio attivo non potrà essere assorbito perché, ai fini dell'assorbimento stesso, il principio attivo deve prima solubilizzarsi, ossia deve passare in soluzione.

Con la disaggregazione aumenta la superficie di contatto della compressa con il solvente e, di conseguenza, aumenta la quantità di principio attivo che può solubilizzarsi ed essere assorbito dall'organismo (Al-Gousous J., et al., 2015).

Il saggio di disaggregazione, mimando fisicamente i movimenti peristaltici del tratto digerente, risulta importante per verificare che la compressa sia stata fabbricata in maniera corretta e che disaggreghi entro i tempi prestabiliti in fase di sviluppo formula, in modo che il principio attivo possa giungere nel tratto digerente deputato all'assorbimento ottimale dello stesso (Aulton M. E. et al., 2018).

Anche se non ci sono evidenze scientifiche di una correlazione diretta tra saggio di disaggregazione e biodisponibilità, dal momento che vari fattori influenzano la solubilità, verificare la disaggregazione di una compressa risulta importante per valutare e verificare che la forma di dosaggio non ostacoli fisicamente la capacità del principio attivo di passare in soluzione ed essere assorbito dall'organismo.

2.6 Il saggio di dissoluzione

La dissoluzione è il processo fisico con cui una sostanza si scioglie in un determinato solvente per formare una soluzione.

La qualità degli integratori alimentari in forma di compresse dipende dalla loro capacità di rilasciare i principi attivi in mezzi acquosi in modo riproducibile, rendendoli così disponibili per l'assorbimento (Gray V. A., 2018).

Il test di dissoluzione è uno strumento estremamente prezioso che permette di studiare e monitorare quantitativamente la cinetica di rilascio del principio attivo nel tempo, mimando le condizioni che si creano in vivo (Azarmi S. et al., 2007).

Nelle industrie farmaceutiche questo test viene usato anche in fase di pre-formulazione o di formulazione per studiare i profili ottenuti da più matrici, allo scopo di selezionare quelle più biodisponibili (Carli F. et al., 1982).

Il saggio di dissoluzione è importante anche per controllare la stabilità chimico-fisica delle formulazioni: potrebbe accadere che si verifichi nel tempo un cambiamento del profilo di rilascio senza modificazioni apparenti di titolo.

Stabilire, quindi, delle specifiche di dissoluzione appropriate è importante perché assicura che la forma di dosaggio sia coerente con il profilo che ha dimostrato possedere un'adeguata efficacia e che sia riproducibile in ogni unità di dosaggio all'interno del lotto e durante tutto il ciclo di vita del prodotto.

3. Scopo della Tesi

Con la crescente popolarità degli integratori alimentari è aumentata l'attenzione rivolta alla sicurezza dei consumatori e, di conseguenza, la necessità di effettuare controlli sempre più accurati e performanti.

I saggi di disaggregazione e dissoluzione non rappresentano, ad oggi, uno step di controllo vincolante per gli integratori, come avviene invece in ambito farmaceutico.

Tuttavia, grazie anche alla mobilitazione di associazioni di categoria, si sta riponendo sempre più attenzione a questo tipo di analisi.

A livello nazionale, infatti, sono emerse alcune pubblicazioni, tra cui un'indagine sul saggio di disaggregazione condotta dall'Università Federico II di Napoli eseguita su un ristretto campione di integratori alimentari, poi pubblicata dalla rivista *"il Salvagente"* nel mese di maggio 2022 (Cinotti E., 2022). L'articolo pone l'attenzione su alcuni integratori che non hanno superato il test di disaggregazione condotto seguendo le specifiche previste per i farmaci dalla farmacopea.

Alla luce di queste criticità, il 28 aprile 2022, il Ministero Italiano della Salute ha pubblicato una nota ministeriale relativa alla necessità di garantire la qualità degli integratori anche sotto il punto di vista del test di disaggregazione.

Nel dettaglio si legge: *"pur consapevoli che il test di disaggregazione presente nella Farmacopea Ufficiale della Repubblica italiana XII è applicabile al campo farmaceutico e non a quello alimentare, si ritiene che la capacità delle compresse di disgregarsi debba essere monitorata (insieme anche ad altri parametri che garantiscano la qualità degli integratori stessi) dagli operatori per garantire il consumatore e tutelarne anche la sicurezza"*.

Attualmente nell'Azienda UNIFARCO, presso la quale è stato svolto il presente lavoro di Tesi, il tempo di disaggregazione viene stabilito in modo qualitativo dal gruppo di ricerca e sviluppo durante la fase di formulazione degli integratori, sulla base dei principi attivi presenti, dei rispettivi quantitativi e sulla presenza di particolari agenti di rivestimento introdotti al fine di modificare il rilascio della compressa. Il tempo di disaggregazione viene poi controllato dal laboratorio dell'azienda terzista e riportato nel certificato analitico che viene emesso ad ogni lotto di produzione. Ad oggi, non sono mai state eseguite internamente all'azienda delle prove di contro-verifica da parte del laboratorio di controllo qualità.

Alla luce di tutto questo, vista la crescente attenzione posta sul saggio di disaggregazione, con il seguente progetto di Tesi si è deciso di condurre un'analisi massiva su tutti gli integratori alimentari presenti in forma di compresse commercializzati da UNIFARCO per verificare innanzitutto che i tempi di disaggregazione siano conformi ai certificati rilasciati dai terzisti e anche per confrontare i dati ottenuti con le specifiche che sarebbero previste dalla Farmacopea Europea, pur consapevoli, come citato dal Ministero della Salute, che tali specifiche sono state stabilite per i farmaci e non per gli integratori. Al fine di conoscere in modo più approfondito il comportamento della disaggregazione delle compresse, è stato deciso di eseguire l'analisi non solo su lotti freschi, appena

prodotti, ma anche su campioni sottoposti allo studio di stabilità. Assunto che la disaggregazione non presenta una diretta correlazione con la biodisponibilità dei principi attivi, per alcuni integratori di riferimento, nello specifico alcune compresse che contengono vitamina C come principio attivo, è stato valutato anche il profilo di dissoluzione.

Anche il saggio di dissoluzione è un'analisi non prevista per gli integratori alimentari. Non esistono, pertanto, protocolli di riferimento per il saggio e tantomeno specifiche da rispettare. Nel laboratorio controllo qualità in UNIFARCO viene monitorata la titolazione di alcuni principi attivi presenti negli integratori posti in stabilità: per molti di questi, quali le vitamine idrosolubili, l'analisi viene condotta internamente mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). Il monitoraggio è utile sia a verificare l'effettiva presenza della molecola attiva nel quantitativo dichiarato in etichetta nutrizionale, sia la sua stabilità nel tempo. Ad oggi, tuttavia, non sono mai stati eseguiti in azienda studi di stabilità che approfondissero anche il comportamento del profilo di dissoluzione: la presente Tesi ha aiutato a colmare tale mancanza permettendo di collezionare dati relativi ai profili di dissoluzione del principio attivo vitamina C declinato in diverse formule e forme farmaceutiche. Anche in questo caso, come per il test di disaggregazione, è stato deciso di eseguire il saggio di dissoluzione non solo su compresse fresche, appena prodotte, ma anche su compresse sottoposte allo studio di stabilità, per valutare l'andamento dei profili di dissoluzione durante la shelf-life dei prodotti.

Sulla base di quanto sopra riportato, nell'ambito degli integratori alimentari in UNIFARCO, gli scopi del presente lavoro sono stati:

- mettere a punto un metodo per il saggio di disaggregazione;
- mettere a punto un metodo per il saggio di dissoluzione;
- raccogliere dati sui tempi di disaggregazione di tutti gli integratori alimentari in compressa prodotti da UNIFARCO;
- raccogliere dati sul profilo di dissoluzione della vitamina C in un gruppo di integratori alimentari in compresse;
- valutare il comportamento dei profili di disaggregazione durante lo studio di stabilità di integratori in compresse;
- valutare il comportamento dei profili di dissoluzione durante lo studio di stabilità di integratori in compresse contenenti vitamina C;
- valutare l'eventuale correlazione tra il parametro durezza delle compresse ed il tempo di disaggregazione;
- valutare la possibile relazione tra il saggio di disaggregazione e il saggio di dissoluzione comparando i profili di dissoluzione del principio attivo vitamina C ottenuti mediante i due saggi.

4. Materiali e Metodi

In questo capitolo si riportano i materiali e gli strumenti utilizzati nel presente progetto di Tesi, nonché i metodi messi a punto per effettuare la disaggregazione su tutti gli integratori in compresse prodotti da UNIFARCO e per eseguire il saggio di dissoluzione su cinque diversi integratori di riferimento in compresse.

4.1 Materiali

4.1.1 Principali strumenti ed apparecchi

I principali apparecchi utilizzati nel progetto di tesi sono:

a) Disaggregatore (Erweka ZT 320. Fig.6)



Figura 6. *Disaggregatore (Erweka ZT 320) utilizzato per eseguire il saggio di disaggregazione nel presente lavoro di Tesi.*

Il disaggregatore utilizzato nel presente lavoro di Tesi per determinare il tempo di disaggregazione è conforme alle specifiche previste dalla Farmacopea Europea. Esso è costituito da due apparati: l'apparato A (Fig.7) presenta 6 tubi aperti e viene usato per testare le compresse che presentano una lunghezza inferiore a 18 mm; l'apparato B (Fig.8) è formato da 3 tubi aperti e viene usato per testare le compresse che presentano una lunghezza maggiore di 18 mm.

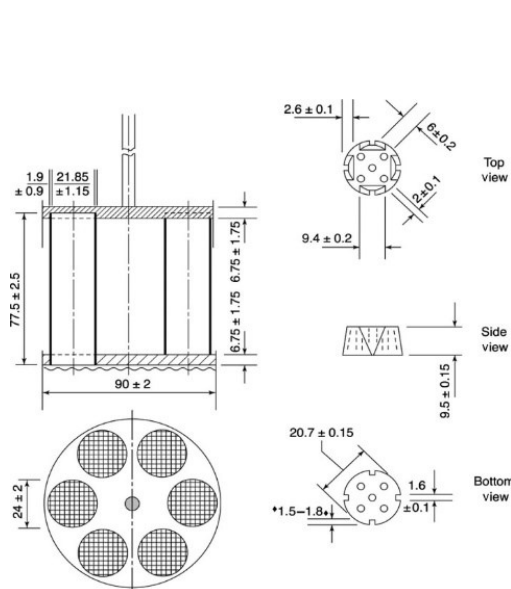


Figura 7. Apparato A
[Farmacopea Europea 10.0]

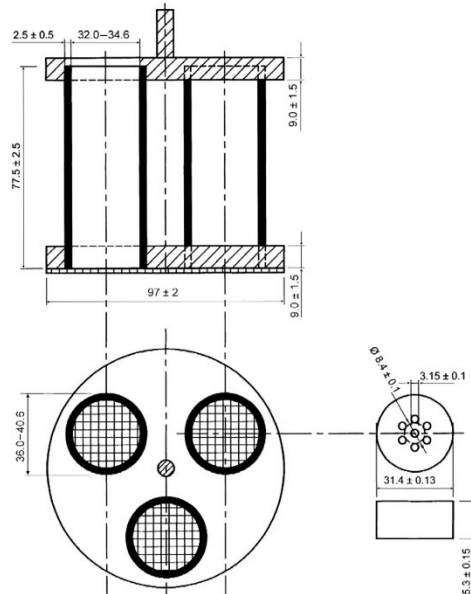


Figura 8. Apparato B
[Farmacopea Europea 10.0]

In entrambi gli apparati, i tubi sono mantenuti in posizione verticale da due dischi di plastica, ciascuno di 90 mm di diametro e 6 mm di spessore, recanti 3 o 6 fori equidistanti dal centro e l'uno dall'altro. Sotto al disco inferiore è fissata una rete di acciaio inossidabile con aperture quadrate di 2 mm. Ogni tubo è provvisto di un disco di materiale plastico che funge da peso.

Il cestello è collegato, tramite un'asta, ad un motore che permette il movimento verticale che è specificato per mantenersi costante a una velocità di 29–32 cicli al minuto su una distanza di 53–57 mm in modo regolare con la velocità uguale sia per la salita che per i colpi discendenti. Il cestello si alza ed abbassa dentro un becher contenente il mezzo di disaggregazione, termostato a $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ (*PhEur*).

Il becher viene riempito con il fluido di disaggregazione in modo tale che nel punto più alto della corsa verso l'alto la rete metallica rimanga almeno 15 mm al di sotto della superficie del fluido, e scenda a non meno di 25 mm dal fondo durante la corsa verso il basso.

In ciascuno dei tubi viene inserita una compressa, e successivamente, viene appoggiato il disco di materiale plastico. Entrambi gli apparati presentano dischi cilindrici di plastica trasparente con una densità relativa di 1,18–1,20. Quelli dell'apparato A sono più piccoli e, a differenza di quelli dell'apparato B, hanno piani di forma trapezoidale tagliati nella superficie laterale del cilindro.

b) Dissolutore (AGILENT 708-DS Dissolution Apparatus. Fig.9)

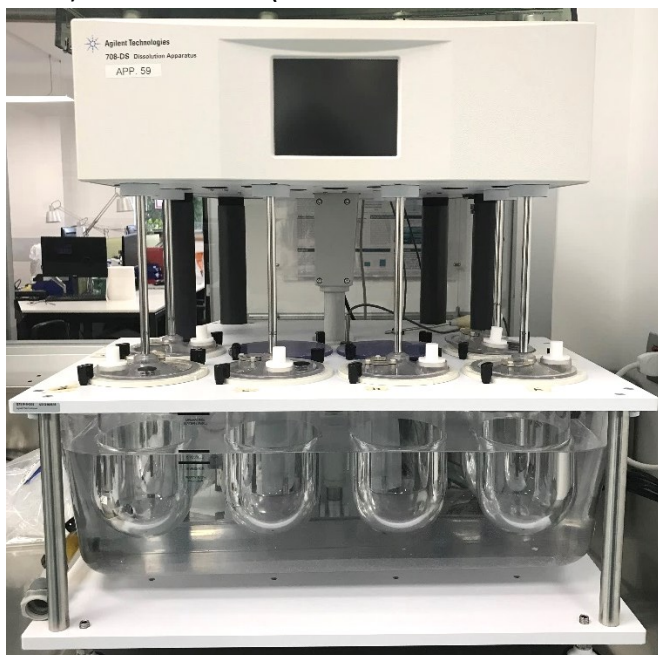


Figura 9. Dissolutore (AGILENT 708-DS Dissolution Apparatus) utilizzato per eseguire il saggio di dissoluzione nel presente lavoro di Tesi.

Lo strumento utilizzato nel presente lavoro di Tesi per eseguire la prova di dissoluzione è conforme alle specifiche previste dalla Farmacopea Europea ed è costituito da due apparati.

L'apparato 1 (Fig.10) è composto da: sei provette cilindriche con fondo semisferico di vetro, dotate di coperchi removibili; un motore; un albero di trasmissione in metallo e un cestello cilindrico come elemento agitatore. È presente un dispositivo di riscaldamento che, mantenendo il fluido del bagno in movimento costante e regolare, consente di mantenere l'ambiente termostato alla temperatura desiderata $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante tutta la durata della prova.

L'albero motore è posizionato in modo che il suo asse non si scosti più di 2 mm dall'asse verticale della provetta e ruota senza intoppi e senza creare oscillazioni significative che potrebbero influire sui risultati. Viene utilizzato un dispositivo di regolazione della velocità che consente di selezionare e mantenere la velocità di rotazione specifica entro $\pm 4\%$.

I componenti dell'albero motore e del cestello come elemento agitatore sono fabbricati in acciaio inossidabile, tipo 316 o in altro materiale inerte.

All'inizio di ogni prova un'unità di dosaggio viene posta all'interno di ogni cestello. La distanza tra il fondo interno della provetta e il fondo del cestello è mantenuta a 25 ± 2 mm durante la prova (*PhEur*).

L'apparato 2 (Fig.11) è composto dalle stesse componenti sopra descritte per l'apparato 1, tranne per il fatto che, come elemento agitatore, viene utilizzata una paletta.

L'asse e la lama della paletta sono rivestiti in modo tale da renderli inerti. All'inizio di ogni analisi, prima di avviare la rotazione della pala, l'unità di dosaggio affonda sul fondo del recipiente (*PhEur*).

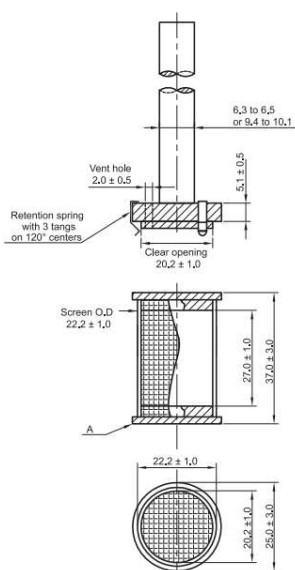


Figura 10. – Apparatus 1
[Farmacopea Europea 10.0]

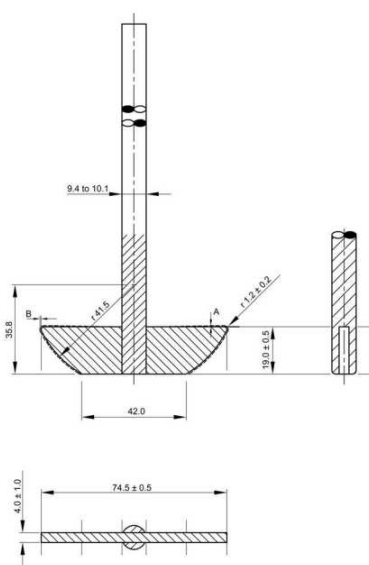


Figura 11. – Apparatus 2
[Farmacopea Europea 10.0]

c) HPLC (AGILENT 1260 INFINITY DAD. Fig.12)



Figura 12. HPLC (AGILENT 1260 INFINITY DAD) utilizzato per la quantificazione del principio attivo in esame nel presente lavoro di Tesi.

Per determinare la concentrazione del principio attivo nei campioni analizzati è stata utilizzata la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC).

L'HPLC è uno strumento analitico che permette di separare e quantificare i componenti di campioni preventivamente solubilizzati. Ne deriva la possibilità di effettuare sia una analisi qualitativa che un'analisi quantitativa, previa costruzione della retta di taratura.

Questa tecnica deriva dalla cromatografia classica e si basa sugli stessi principi: nella cromatografia classica il componente principale è la colonna che contiene la fase stazionaria all'interno della quale viene fatta eluire la fase mobile rappresentata dal solvente. Il campione viene immesso nella colonna trasportato dalla fase mobile e i suoi diversi componenti si separano in virtù della diversa

affinità che presentano per la fase stazionaria e per la fase mobile (ripartizione). Maggiore è l'affinità di un composto per la fase stazionaria, maggiore sarà il tempo che passerà in colonna e, quindi, maggiore il tempo di ritenzione.

Le colonne per HPLC di solito sono costruite in acciaio e sono impaccate con particelle di diametro variabile dai 3 ai 5 μm . Il materiale più comune usato per supportare o legare chimicamente la fase stazionaria è la silice, preparata per agglomerazione di particelle di diametro inferiore al micron sotto condizioni che portano a particelle più grandi con diametri uniformi. Le particelle risultanti sono spesso rivestite con sottili film di composti organici, legati alla superficie tramite legami chimici o fisici.

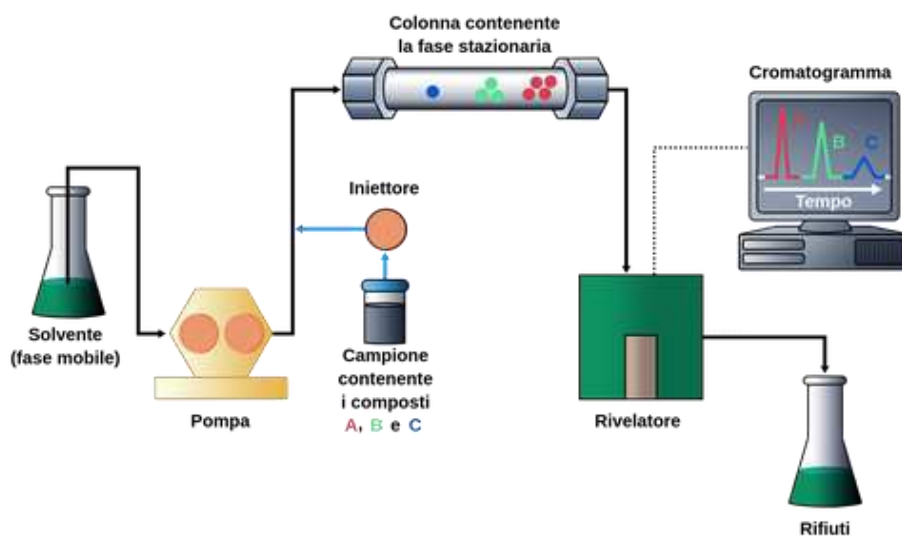


Figura 13. Schema del funzionamento della cromatografia liquida ad alte prestazioni. (Da www.theory.labster.com).

Nell'HPLC (Fig.13), l'utilizzo di colonne molto corte e con fase stazionaria fortemente impaccata necessita di una particolare forza affinché l'eluente possa scorrere nella colonna: tale forza viene fornita dalla pressione applicata da una pompa in testa alla colonna, che forza la fase mobile a fluire in continuazione all'interno della fase stazionaria. Ne consegue che la pressione con cui il solvente viene spinto in colonna deve necessariamente essere elevata. La progettazione di sistemi ad elevata pressione ha permesso non solo di rendere il processo più rapido, ma anche di ottenere una migliore risoluzione nella separazione dei composti.

Il campione che progressivamente esce dalla colonna viene poi spinto verso il rivelatore. I rivelatori più usati per HPLC si basano sulla misura dell'assorbimento della luce ultravioletta o della luce visibile da parte del campione. Vengono impiegati sia rivelatori a filtri (fotometri) che a monocromatore (spettrofotometri). In particolare, i rivelatori di tipo spettrofotometrico permettono letture ad ogni lunghezza d'onda nell'intervallo operativo dello strumento: la luce UV proveniente dalla lampada a Deuterio viene scissa nelle sue componenti attraverso un monocromatore a gradini. L'intensità della luce

trasmessa è misurata attraverso un fotodiode ed è proporzionale alla concentrazione dell'analita.

Il rivelatore è collegato alla stazione dati del computer, che registra il segnale elettrico necessario per generare il cromatogramma sul display.

Una volta uscita dal rivelatore, la fase mobile può essere inviata alla raccolta dello scarico.

UNIFARCO possiede un HPLC modulare con rivelatore UV a diode array (DAD): la luce UV proveniente dalla lampada a Deuterio passa attraverso una cella a flusso prima che venga scissa nelle sue componenti attraverso un monocromatore a gradini. L'intensità della luce trasmessa ad ogni lunghezza d'onda è misurata simultaneamente attraverso un array di alcune centinaia di fotodiodi.

Lo strumento possiede una pompa binaria ed è dotato di autocampionatore con vassoio da 99 pozzetti porta campione che può essere refrigerato; possiede, inoltre, un modulo degassatore utile per minimizzare la presenza di eventuali bolle d'aria presenti nelle fasi mobili prima dell'ingresso in colonna analitica.

Gli altri strumenti utilizzati durante il progetto di tesi sono i seguenti:

- pH-metro (SEVEN COMPACT)
- Bilancia analitica di precisione (BILANCIA JEWELRY METTLER TOLEDO)
- Bilancia analitica (BILANCIA SARTORIUS)
- Pipettatore elettronico
- Agitatore meccanico
- Ancoretta magnetica
- Cappa chimica
- Pipetta (Pipet Lite 1000XLS Mettler Toledo)
- Pipettatore elettronico

4.1.2 Reagenti chimici

I principali reagenti chimici utilizzati sono:

- H₂O depurata, derivante dalla rete idrica comunale. È stata utilizzata come mezzo di disaggregazione
- H₂O di osmosi, ottenuta mediante impianto di osmosi inversa interno all'azienda che permette di ottenere acqua depurata dai sali minerali e con una carica batterica abbattuta. È stata utilizzata durante i saggi di dissoluzione e per la preparazione dei campioni analizzati mediante HPLC
- H₂O Acqua-RS-Per UHPLC-MS (Carlo Erba). Si tratta di acqua ultrapura (UPW), purificata sia da un punto di vista dei sali minerali, sia di carica microbica. Presenta un livello di purezza più elevato rispetto all'acqua di osmosi ed è stata utilizzata per la preparazione delle fasi mobili dell'HPLC al fine di evitare danneggiamento e/o contaminazioni delle parti dello strumento
- HCl al 37% v/v (Carlo Erba) per la preparazione del mezzo di dissoluzione acido

- NaOH (Sigma) 5M e 3M per aggiustare il pH del mezzo di dissoluzione acido
- KH_2PO_4 (Sigma) per la preparazione del tampone fosfato come mezzo di dissoluzione
- K_2HPO_4 (Sigma) per la preparazione del tampone fosfato come mezzo di dissoluzione
- Acetonitrile al 100% v/v (VWR)
- Acido formico (Acros organics) 10% v/v
- Acido ascorbico (vitamina C) titolata al 99 -101% (Faravelli)
- Soluzioni a titolo noto per taratura pH-metro

4.1.3 Materiali di consumo

I principali materiali di consumo utilizzati sono:

- Siringhe in plastica sterili da 2 ml
- Filtri Sartorius minisart RC25 con membrana filtrante in cellulosa rigenerata idrofila a pori da 0,45 μm di diametro
- Pipette Pasteur di vetro
- Puntali di plastica

4.1.4 Vetreria

La vetreria utilizzata è:

- Provette per HPLC da 1,5 ml
- Mortaio e pestello
- Matracci in vetro (volumi vari)
- Becher in vetro (volumi vari)
- Cilindri graduati (volumi vari)

4.2 Metodi

4.2.1 Messa a punto del saggio di disaggregazione

Il test di disaggregazione è stato eseguito su tutti gli integratori alimentari in forma di compressa distribuiti da UNIFARCO, per un totale di 25 composti di riferimento. Non essendoci un metodo specifico per il saggio di disaggregazione da applicare agli integratori, il test è stato eseguito seguendo quanto presente in Farmacopea Europea. Le indicazioni della farmacopea prevedono di eseguire il test su 6 compresse. A seconda della tipologia di rilascio della compressa il mezzo di disaggregazione e il tempo previsto per la disaggregazione possono essere differenti (Almukainzi M.et al., 2010).

Di seguito vengono riportate le specifiche per i farmaci (Tab. 2).

TIPO DI COMPRESSA	MEZZO DI DISAGGREGAZIONE	TEMPO DI DISAGGREGAZIONE (minuti)
Non rivestita	H2O depurata 37°C	≤ 15
Rivestita non con film	H2O depurata 37°C	≤ 60
Rivestita con film	H2O depurata 37°C	≤ 30
Gastroresistente	• HCl 0.1 M 37°C	• No disaggregazione per 120 min
	• Tampone fosfato pH 6.8 37°C	• Disaggregazione ≤ 60 min

Tabella 2. Specifiche del tempo di disaggregazione previste dalla Farmacopea Europea per i diversi tipi di compresse.

Per ogni tipo di compressa in esame sono stati testati più lotti, sia appena prodotti che derivanti da studi di stabilità, verificando che il tempo di disaggregazione rilevato rispettasse le specifiche attese dal certificato analitico fornito dal laboratorio dell'azienda terzista e verificando anche l'eventuale allineamento ai tempi previsti dalla farmacopea per il tipo di compressa in esame. È stato inoltre valutato l'andamento del profilo di disaggregazione durante la shelf-life per studiare la stabilità del tempo di disaggregazione durante il periodo di validità dei prodotti.

Per ogni analisi, come previsto dalla farmacopea, sono state testate 6 compresse utilizzando l'apparato A per le compresse di diametro inferiore a 18 mm e l'apparato B per quelle di dimensioni superiori. Come mezzo di disaggregazione contenuto nei becher per tutti gli integratori analizzati sono stati usati 800 ml di acqua depurata a 37°C.

La rilevazione del tempo di disaggregazione (Fig.14) è stata fatta coincidere con il minuto in cui tutte le compresse si sono disaggregate, ovvero, secondo quanto previsto dalla farmacopea, quando non rimane alcun residuo nella rete del cestello; fanno eccezione i casi in cui permangono frammenti insolubili del rivestimento oppure una massa molle priva di nucleo palpabile solido (*PhEur*).

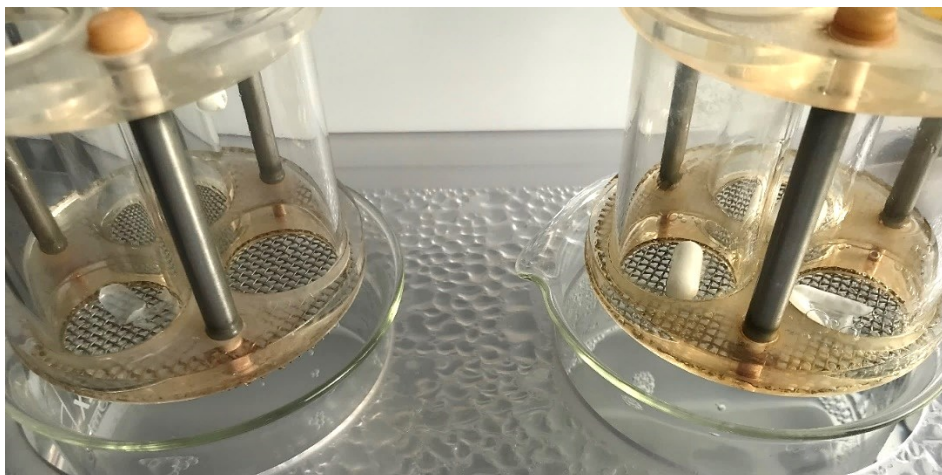


Figura 14. *Nel cestello a sinistra è possibile vedere che le tre compresse si sono completamente disaggregate; infatti, per due compresse non è rimasto alcun residuo e per una compressa è rimasto solo un frammento del rivestimento. Nel cestello a destra, invece, la disaggregazione non è ancora stata completata in quanto le compresse presentano ancora una massa compatta.*

4.2.2 Saggio di resistenza alla rottura applicato alle compresse secondo la farmacopea

Questo saggio viene eseguito per determinare, in condizioni definite, la resistenza alla rottura delle compresse, misurando la forza necessaria per provocarne la rottura (*PhEur*).

L'apparecchio utilizzato per eseguire questa misurazione è il durometro, di cui esistono versioni manuali e automatizzate. Lo strumento restituisce come risultato il peso espresso in Kg che determina la rottura della compressa (minimo accettabile 2 Kg). Questa misurazione, indice della durezza della compressa, è importante non solo per garantire la qualità, ma è fondamentale anche nel processo di produzione per valutare se la lavorazione sta procedendo in modo corretto.

4.2.2.1 Metodo applicato per la valutazione della correlazione tra durezza e tempo di disaggregazione

Nel presente studio è stata valutata anche la correlazione tra la durezza delle compresse ed il relativo tempo di disaggregazione, ipotizzando che all'aumentare della durezza potesse aumentare anche il tempo di disaggregazione. Per svolgere questa valutazione, sono stati raccolti dalle schede tecniche di UNIFARCO (ovvero i documenti nei quali sono descritte tutte le caratteristiche tecniche dei prodotti) i dati relativi alla durezza (in kg) delle compresse, per gli integratori di riferimento in cui il dato era presente. Per tutte queste referenze sono stati messi a confronto i dati della durezza con i tempi di disaggregazione medi ottenuti dalle prove svolte a temperatura ambiente ed è stata condotta un'analisi statistica, calcolando il coefficiente di correlazione di Pearson.

Questa tecnica statistica serve per valutare la correlazione tra due variabili quantitative, appaiate sugli stessi casi (in questo caso la durezza e il tempo di

disaggregazione) e fornisce informazioni sia sulla forza, che sulla direzione della correlazione.

Il coefficiente di correlazione di Pearson (r) si calcola con la seguente formula (eq.1):

$$r = \frac{\sum [(x_i - \bar{x}) (y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 * \sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad (\text{eq.1})$$

L'indice r è sempre compreso tra i valori -1 e +1.

- - 1 indica una perfetta relazione negativa lineare tra le due variabili
- + 1 indica una perfetta relazione positiva lineare tra le due variabili
- Un valore pari a 0 indica che non è presente una relazione lineare tra le due variabili.

Più r ha un valore vicino allo zero e più la relazione è debole, più si avvicina a -1 oppure a + 1 più la relazione è forte.

4.2.3 Messa a punto del metodo di dissoluzione

Per eseguire il saggio di dissoluzione, la Farmacopea Europea prevede un procedimento analogo sia per l'apparato 1, sia per l'apparato 2 del dissolutore (Rif. par. 4.1.1). In particolare, prevede che all'inizio del test le provette dello strumento vengano riempite con il mezzo di dissoluzione ($\pm 1\%$). Si lascia equilibrare il mezzo di dissoluzione nell'ambiente termostato a $37^\circ\text{C} \pm 0,5$ e si colloca una unità di dosaggio all'interno di ogni provetta; si aziona quindi lo strumento secondo la velocità specificata nel metodo. Ad intervalli di tempo definiti, viene prelevato da ogni provetta un campione di un quantitativo definito del mezzo di dissoluzione: il prelievo deve essere fatto utilizzando una siringa posizionata a metà tra la superficie del mezzo di dissoluzione e la parte superiore del cestello o della palette, a non meno di 1 cm dalla parete della provetta.

Per la messa a punto del metodo in UNIFARCO, sono state eseguite delle analisi utilizzando entrambi gli apparati descritti (Rif. par. 4.1.1), per valutare se il diverso elemento agitatore potesse influire sul risultato dell'analisi (Mayet-Cruz L. et al., 2021). Nello specifico, per quattro diversi integratori di riferimento, è stato valutato il rilascio della vitamina C svolgendo l'analisi in parallelo sia mediante l'apparato 1, che presenta il cestello, che mediante l'apparato 2, che presenta invece la palette.

La temperatura del bagnetto è stata impostata a $37^\circ\text{C} \pm 0,5$ e la velocità di rotazione dell'elemento agitatore a 50 giri per minuto (rpm). Come mezzo di dissoluzione, ogni provetta è stata riempita con 900 ml di HCl 0,03 M a pH $2 \pm 0,05$ per simulare i fluidi gastrici. All'interno di ogni provetta è stata posizionata la compressa di integratore presa in esame. Una volta attivato lo strumento, l'analisi è proseguita per due ore con il mezzo di dissoluzione acido. Sono stati eseguiti campionamenti di 1 ml da ogni provetta ad intervalli di tempo definiti internamente per ogni

analisi. Il liquido prelevato è stato filtrato mediante filtro idrofilo con pori da 0,45 µm di diametro e successivamente analizzato mediante HPLC.

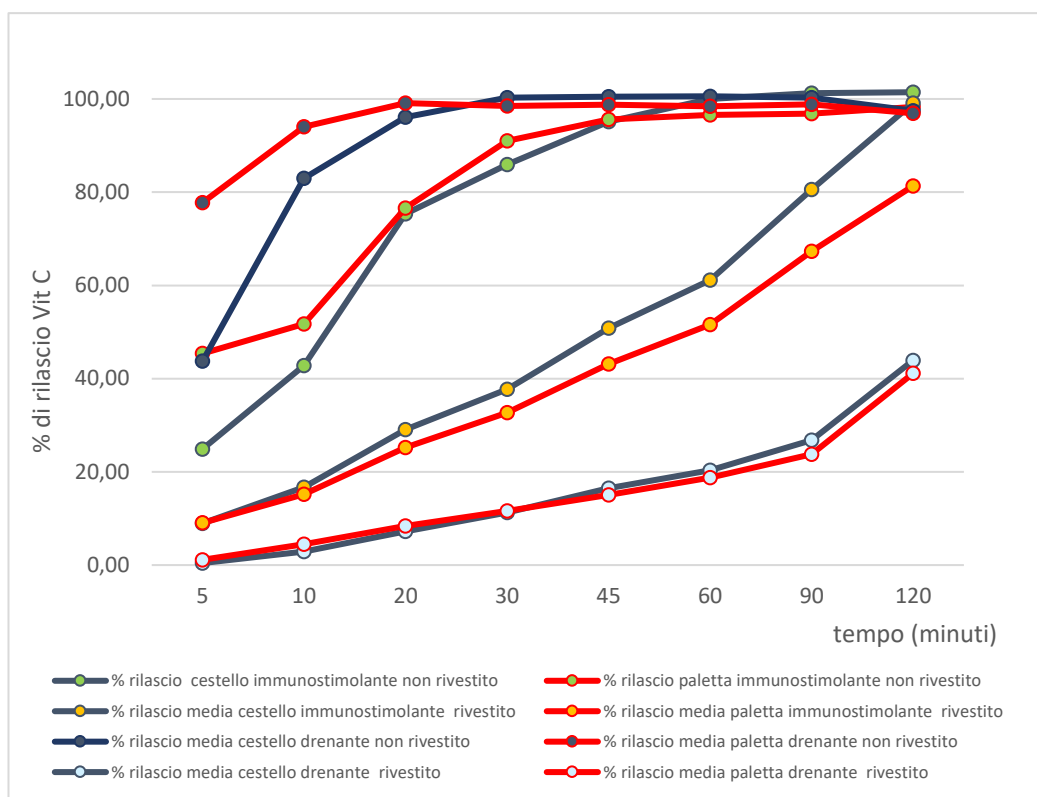


Figura 15. CONFRONTO CESTELLO (apparato 1) - PALETTA (apparato 2): Sovrapposizione dei profili di dissoluzione dei quattro integratori di riferimento presi in esame per comparare l'andamento ottenuto con l'apparato 1 (profili in blu) e l'apparato 2 (profili in rosso). Non vengono riportate barre di errore nei dati in quanto sono state svolte delle prove singole.

Nel grafico soprastante (Fig.15) sono riportati i profili di rilascio della vitamina C in soluzione mettendo a confronto, per ognuna delle compresse di riferimento, il profilo ottenuto con entrambi gli apparati. Nel caso delle compresse non rivestite, è visibile una differenza nella percentuale di rilascio della vitamina C soprattutto nei primi due prelievi, dopo 5 e 10 minuti, dovuta al fatto che le compresse si disaggregano velocemente (tempo di disaggregazione medio inferiore ai 15 minuti); inoltre, la diversa disaggregazione delle compresse (che dalle analisi effettuate può differire di qualche minuto anche tra le compresse di uno stesso lotto) determina conseguentemente una variazione nel profilo di rilascio. Complessivamente, comparando l'intero profilo di rilascio, la differenza tra i due apparati non è risultata significativa sia per le compresse non rivestite che per le compresse rivestite.

Alla luce di questi risultati, è stato deciso quindi di eseguire tutte le analisi successive con l'apparato 2, che presenta la paletta come elemento agitatore. Le modalità con cui sono state svolte tutte le successive prove hanno mantenuto le stesse impostazioni sopracitate per la temperatura del bagnetto e la velocità di rotazione dell'elemento agitatore. L'intero apparato, inoltre, è stato coperto con

un telo nero durante l'intera prova di dissoluzione per prevenire la degradazione del principio attivo in esame.

Il test di dissoluzione si articola in due fasi al fine di simulare il transito completo nell'apparato gastrointestinale. La prima fase prevede l'uso di un mezzo di dissoluzione ad un valore di pH che simula il liquido gastrico (pH da 1.5 a 3), mentre la seconda prevede l'uso di un mezzo di dissoluzione che simula il pH intestinale (pH da 5.6 a 8.5). Esistono in commercio soluzioni già pronte all'uso contenenti miscele di enzimi che permettono di simulare in modo più accurato i succhi gastrici e l'ambiente intestinale ma internamente, per la messa a punto del metodo, si è deciso di utilizzare 900 ml di HCl 0,03 M a pH 2 ± 0.05 per simulare i fluidi gastrici e 900 ml di tampone fosfato a pH 6.8 ± 0.05 per simulare il fluido intestinale.

Il mezzo di dissoluzione acido è stato preparato utilizzando come soluzione madre HCl al 37% v/v 12,08 M e calcolando, ad ogni analisi, i volumi di acido necessari per ottenere una molarità pari a 0,03 con la formula: $C_i V_i = C_f V_f$. Il pH è stato poi aggiustato a $2 \pm 0,05$ con NaOH 3 M e verificato con pH-metro.

Invece, la preparazione del tampone fosfato è stata eseguita con la seguente procedura: 0,44 g KH_2PO_4 e 0,54 g K_2HPO_4 sono stati sciolti ogni 100 ml di acqua di osmosi, posti in agitatore meccanico e miscelati con ancoretta magnetica. Al termine di ogni preparazione è stato verificato che il pH fosse $6.8 \pm 0,05$ con il pH-metro.

Secondo il protocollo messo a punto internamente la durata della prova in ambiente acido è stata definita di due ore. Le compresse che al termine delle due ore non risultavano disintegrate, mantenendo consistenza, sono state prelevate e poste nel secondo mezzo di dissoluzione (Limberg J. et al., 2013) per circa 3 ore.

La prova di dissoluzione per valutare il profilo di rilascio della vitamina C è stata eseguita su un totale di cinque integratori di riferimento in compressa:

- 1) integratore immunostimolante non rivestito
- 2) integratore immunostimolante rivestito
- 3) integratore con beneficio drenante non rivestito
- 4) integratore con beneficio drenante rivestito
- 5) integratore energizzante a rilascio modificato

L'analisi è stata eseguita sul prodotto fresco, sul prodotto al termine di validità (dove presente) e su compresse sottoposte allo studio di stabilità a $30^\circ\text{C}/65\%$ umidità relativa (RH) e $40^\circ\text{C}/75\%$ RH, al fine di comparare i risultati e poter fare delle previsioni sull'eventuale variazione del profilo di rilascio della vitamina C durante la vita a scaffale dei prodotti.

4.2.4 Analisi HPLC

I campioni prelevati dal mezzo di dissoluzione sono stati analizzati mediante HPLC utilizzando il metodo già messo a punto dall'azienda per la titolazione della vitamina C (Tab.3).

Il metodo prevede una eluizione a gradiente dove due solventi di differenti polarità, acido formico 0,1% e acetonitrile 100%, vengono miscelati dallo

strumento in proporzioni prestabilite: il rapporto fra i due solventi viene fatto variare durante la corsa cromatografica. Questo tipo di eluizione generalmente aumenta l'efficienza della separazione dei componenti del campione che si ripartiscono tra le due fasi (stazionaria e mobile), in base alla diversa affinità. Vengono di seguito riportate le caratteristiche del metodo applicato (Tab.3).

NOME METODO	Vit_C_C3			
Colonna	C3 Zorbax SB-C3 4.6x150mm, 5µm (Agilent)			
T°C colonna	30°C			
T°C termostato	5°C			
Fasi mobili	0,1% acido formico (A) / Acetonitrile (B)			
Tipologia separazione	gradiente			
Descrizione metodo	%A	%B	Tempo (min)	Flusso (ml/min)
	95	5	0	0,4
	95	5	5	0,4
	70	30	10	0,4
	95	5	11	0,4
Volume di iniezione	10 µl			
Assorbanza massima	260 nm			
Tempo di ritenzione (tR)	Circa 4,7 min			
Pressione al tempo 0	Circa 30 bar			

Tabella 3. Metodo HPLC UNIFARCO applicato per la titolazione della vitamina C in tutti i campioni analizzati.

Per ogni analisi, al fine di poter eseguire la quantificazione del principio attivo, è stato preparato lo standard a concentrazione nota, pesando una quantità predefinita di vitamina C titolata al 99-101% e sciogliendola in acido formico allo 0,1% (Tab.4). La preparazione dello standard è fondamentale sia in quanto funge da controllo positivo per l'analisi (verifica il tempo di ritenzione e lo spettro UV del principio attivo in analisi), sia per poter eseguire una analisi quantitativa mediante creazione della retta di taratura. Il protocollo analitico aziendale affida la creazione della retta di taratura direttamente allo strumento, mediante il prelievo di quantitativi decrescenti di volume a partire dalla soluzione standard madre.

Lo standard a concentrazione nota viene preparato fresco ad ogni sessione analitica: in questo modo, anche in caso di minime variazioni delle condizioni cromatografiche (es. decadimento potenza lampada, variazioni pressione, problemi colonna, ecc.) standard e campioni sono effettivamente misurati nelle stesse identiche condizioni.

Al fine di verificare la qualità delle fasi mobili e la pulizia della colonna, per ogni sessione analitica è stato analizzato anche un campione definito "bianco" corrispondente al controllo negativo dell'analisi quali-quantitativa e costituito dal solvente di estrazione utilizzato.

Ad ogni analisi di dissoluzione è stata eseguita parallelamente anche la titolazione della vitamina C presente sulle compresse in esame: tale passaggio è necessario

per poter confrontare la quantità di principio attivo rilasciato durante la dissoluzione rispetto al quantitativo realmente presente.

4.2.4.1 Metodo titolazione vitamina C

Il protocollo interno, utilizzato per la titolazione della vitamina C nei campioni in esame, consiste nel frantumare e polverizzare cinque compresse precedentemente pesate e, dalla polvere così ottenuta, pesare una quantità predefinita per ciascun integratore di riferimento (Tab.4) che verrà poi diluita in matraccio, utilizzando come solvente di estrazione acido formico allo 0,1%. Dopo la completa solubilizzazione, circa 1 ml di liquido viene prelevato con siringa e filtrato con filtri monouso 0,45 µm e posto in una provetta ambrata per HPLC. Per prevenire la degradazione della vitamina C il vassoio dell'autocampionatore è stato impostato a 5°C.

INTEGRATORE	Tipologia	Pesata (mg)	Volume (ml)	Solvente
Immunostimolante non rivestito	standard	15-18	100	Acido Formico 0,1%
	campioni	80	50	
Immunostimolante rivestito	standard	15-18	100	
	campioni	20	50	
Drenante non rivestito	standard	15-18	100	
	campioni	50	50	
Drenante rivestito	standard	15-18	100	
	campioni	100	50	
Energizzante a rilascio modificato	standard	25	50	
	campioni	30	50	

Tabella 4. Pesate dello standard e dei campioni relativi a ciascuno degli integratori di riferimento analizzati.

Per ottenere i profili di dissoluzione del principio attivo, tutti i campioni prelevati ad intervalli di tempo precedentemente definiti, sono stati filtrati con filtro idrofilo monouso a pori da 0,45µm e messi a loro volta in una provetta per HPLC. Per ciascun campione iniettato, lo strumento restituisce un cromatogramma con un picco caratteristico del principio attivo in analisi (Fig.16).

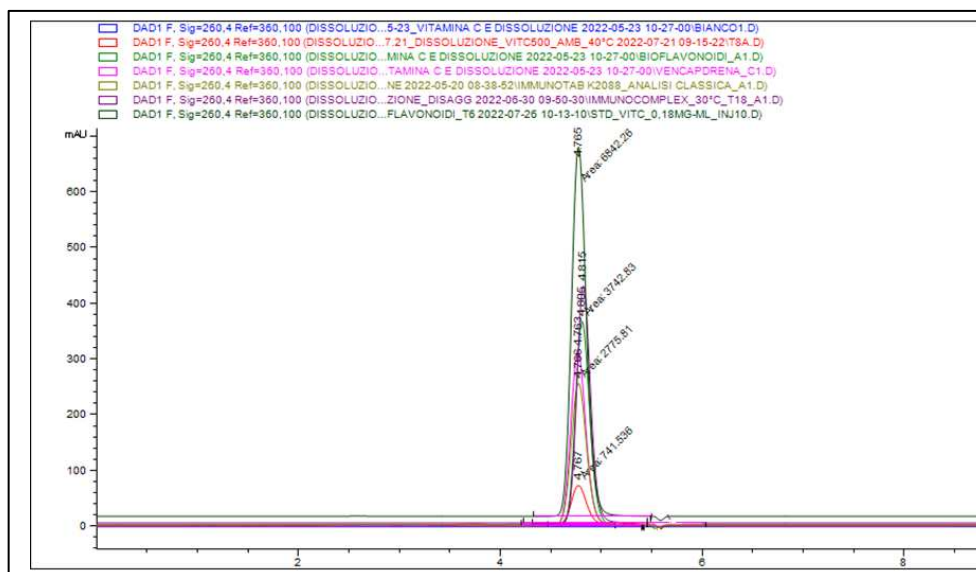


Figura 16. Cromatogramma esemplificativo in cui sono state sovrapposte le corse cromatografiche di alcune analisi eseguite durante il presente lavoro di Tesi: si può notare la completa sovrapposizione del picco corrispondente al principio attivo vitamina C (al minuto 4,7 circa) rilevabile nel campione di standard (controllo positivo) e degli integratori di riferimento. Non si nota, invece, presenza di alcun picco per il campione bianco (controllo negativo).

L'area sottesa dal picco sul cromatogramma è proporzionale alla concentrazione del principio attivo in esame.

Per ogni campione analizzato sono state integrate le aree del picco relativo alla vitamina C e sono state calcolate le concentrazioni dei campioni, utilizzando e risolvendo l'equazione della retta di taratura $Y = mX + q$, dove:

Y = area del picco

X = concentrazione dello standard (mg/ml)

m = pendenza della curva

q = intercetta con l'asse y

Per determinare la bontà della retta di taratura costruita è stato, inoltre, considerato il coefficiente di determinazione R^2 , accettando solo valori ≥ 0.99 .

La procedura di calcolo per determinare il titolo della vitamina C presente realmente nella compressa (T) è la seguente:

- equazione della retta di taratura: $Y = mX + q$
- d = peso medio 5 compresse (mg)
- p = peso campione di compressa macinata (mg)
- V = volume matraccio (ml)
- Y = area sottesa dal picco cromatografico del campione
- C = concentrazione principio attivo (mg/ml)
- a = principio attivo disciolto in matraccio (mg)
- T = titolo principio attivo (mg/compressa)

Si ricava c (eq.2), la concentrazione del principio attivo in mg/ml dalla retta di taratura dello standard e si calcola a (eq.3), il principio attivo disciolto nel matraccio (mg):

$$c = \frac{Y - q}{m} \quad (\text{eq.2})$$

$$a = c V \quad (\text{eq.3})$$

Si calcola T (eq.4), il titolo del principio attivo in mg presente in una compressa:

$$T = \frac{a d}{p} \quad (\text{eq.4})$$

La procedura di calcolo per determinare la percentuale di vitamina C rilasciata in ogni campione prelevato durante la dissoluzione è la seguente:

- equazione della retta di taratura: $Y_i = mX + q$
- d = peso della compressa posta nella provetta (mg)
- V_i = volume provetta al prelievo i (ml) [si tiene conto nei calcoli la diminuzione progressiva del volume dovuto al prelievo di 1 ml ad ogni intervallo]
- Y_i = area sottesa dal picco cromatografico del campione (i)
- C_i = concentrazione principio attivo mg/ml nel campione (i)
- A_i = principio attivo disciolto nella provetta al prelievo(i) in mg
- R_i = percentuale del principio attivo disciolto nella provetta al prelievo(i) rispetto all'atteso (T)
- T = titolo principio attivo (mg)/compressa

Si ricava la concentrazione del principio attivo C_i in mg/ml (eq.5) dalla retta di taratura standard e si calcola X_i (eq.6), il principio attivo disciolto nella provetta al prelievo (i) in mg:

$$C_i = \frac{Y_i - q}{m} \quad (\text{eq.5})$$

$$A_i = C_i V_i \quad (\text{eq.6})$$

Si calcola R_i (eq.7), la percentuale di principio attivo disciolto nella provetta al prelievo (i) rispetto all'atteso:

$$R_i = \left(\frac{A_i}{T} \right) * 100 \quad (\text{eq.7})$$

Per ciascun campione prelevato dal mezzo di dissoluzione è stata quindi calcolata la percentuale di vitamina C rilasciata rispetto all'atteso ed è stata determinata la

media delle tre compresse analizzate parallelamente, tenendo conto dell'errore assoluto calcolato attraverso la semidispersione massima.

È stato, quindi, costruito il profilo di dissoluzione utilizzando la percentuale di rilascio media ottenuta ad ogni prelievo durante il corso dell'analisi.

Negli integratori oggetto di studio per i quali l'analisi è proseguita anche dopo le due ore in acido, continuando la dissoluzione nel mezzo tampone fosfato, sono stati sommati i milligrammi di principio attivo rilasciati in tampone a quelli rilasciati in acido ed è stata calcolata la percentuale totale di rilascio media ad ogni prelievo fino al termine dell'analisi.

Per ciascun integratore, sono stati confrontati i profili di dissoluzione delle compresse fresche, appena prodotte, e compresse sottoposte allo studio di stabilità, per valutare l'andamento del profilo di dissoluzione del principio attivo durante la shelf-life del prodotto.

Si riporta di seguito un esempio dei calcoli eseguiti nel corso di ogni sessione di analisi per determinare il titolo di vitamina C medio presente nelle compresse:

- 1) È stato preparato lo standard a concentrazione nota, diluendo 18,01 mg di vitamina C titolata al 99 -101% (Faravelli), in 100 ml di acido formico 0,1% (Tab.5). Il campione è stato successivamente analizzato mediante HPLC (Tab.6) per costruire la retta di taratura (Fig.17).

Preparazione dello standard: MP = VITC 99-101%	
Pesata MP (mg):	18,01
Vol. matraccio (ml)	100
Conc. MP (mg/ml)	0,180

Tabella 5. Concentrazione standard Vitamina C.

Retta di taratura			
Injection	Conc. mg/ml	area (260nm)	tempo di ritenzione (min)
10	0,180	6841,8	4.4-5.4
5	0,090	3469,4	4.4-5.4
2	0,036	1397,00	4.4-5.4
1	0,018	705,3	4.4-5.4

Tabella 6. Concentrazione standard Vitamina C e relative aree sottese dai picchi cromatografici alle varie diluizioni.

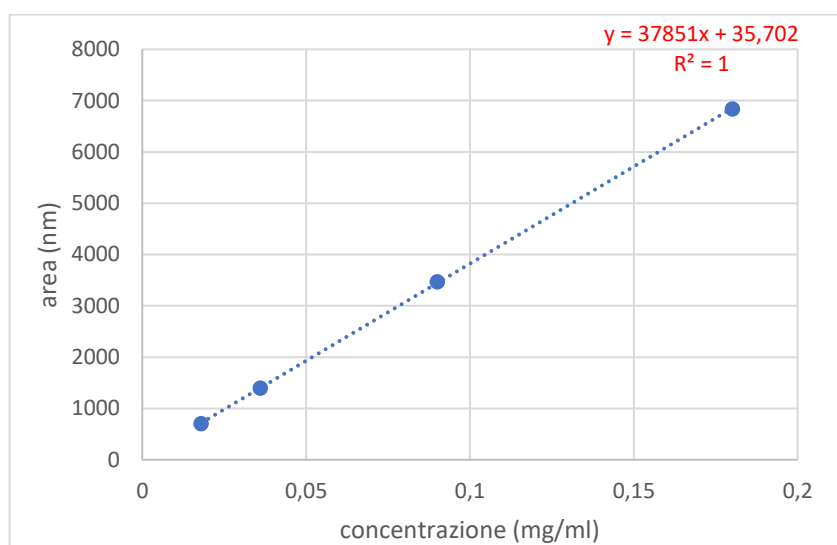


Figura 17. Retta di taratura ottenuta dallo standard di Vitamina C a concentrazione nota.

2) Sono state pesate 5 compresse (Tab.7) e successivamente macinate in mortaio. Circa 50 mg di polvere (riferimento preciso al peso in Tab.8) sono stati diluiti in 50 ml di acido formico 0,1%. Questa procedura è stata eseguita in triplicato ottenendo tre campioni che sono stati analizzati mediante HPLC.

n° compressa	Peso compresse (mg)
A	1114,1
B	1112,7
C	1102,4
D	1117,1
E	1087,9
media	1106,8
semi-dispersione max	7,3

Tabella 7. *Peso di 5 compresse dell'INTEGRATORE 23 (compresse drenanti non rivestite).*

3) Durante l'analisi in HPLC, per ogni campione lo strumento ha eseguito 3 iniezioni. A partire dai cromatogrammi ottenuti, è stato possibile integrare l'area del picco corrispondente alla vitamina C (Tab.8) e calcolare il titolo di vitamina C medio presente nelle compresse.

vit c 260 nm											
Campione	Nome interno	peso medio cpr (mg)	pesata (mg)	volume matraccio (ml)	tempo di ritenzione (min)	area picco (λ : 260 nm)	concentrazione attivo (mg/ml)	attivo disciolto (mg)	titolo attivo/dose (mg)	media titolo attivo/dose (mg)	semi-dispersione max
DRENANTE non RIVESTITO t6_T40°C	A1	1106,8	50,8	50,0	4.3-5.4	4242,0	0,1	5,6	121,1	117,4	3,4
	A2	1106,8	50,8	50,0	4.3-5.4	4248,0	0,1	5,6	121,2		
	A3	1106,8	50,8	50,0	4.3-5.4	4244,2	0,1	5,6	121,1		
	B1	1106,8	50,2	50,0	4.3-5.4	3974,2	0,1	5,2	114,7		
	B2	1106,8	50,2	50,0	4.3-5.4	3967,8	0,1	5,2	114,5		
	B3	1106,8	50,2	50,0	4.3-5.4	3962,8	0,1	5,2	114,4		
	C1	1106,8	50,8	50,0	4.3-5.4	4083,9	0,1	5,3	116,5		
	C2	1106,8	50,8	50,0	4.3-5.4	4083,4	0,1	5,3	116,5		
	C3	1106,8	50,8	50,0	4.3-5.4	4081,6	0,1	5,3	116,4		

Tabella 8. *Calcoli effettuati per determinare il titolo di vitamina C medio presente nelle compresse: La concentrazione del principio attivo è stata ricavata a partire dalla retta di taratura (eq.2). È stato poi determinato il principio attivo disciolto nel matraccio (eq.3) e il titolo di vitamina C medio per ogni compressa (eq.4).*

- 4) Per determinare il profilo di rilascio della vitamina C durante il saggio di dissoluzione, i campioni prelevati dal mezzo di dissoluzione a intervalli predefiniti, sono stati analizzati mediante HPLC ed è stata calcolata la percentuale di vitamina C rilasciata rispetto alla quantità attesa (Tab.9).

vit c 260 nm in DRENANTE NON RIVESTITO _t6_T40°C													
PRELIEVI (min)	NOME PROVETTA	peso medio compressa (mg)	vit C attesa/dose (mg)	volume provetta (ml)	tempo di ritenzione (min)	area (λ: 260 nm)	concentrazione attivo in provetta mg/ml	attivo disciolto (mg)	% vitC rilasciata	% rilascio media al prelievo	SEMI-DISPERSIONE % RILASCIO	media attivo disciolto (mg)	SEMI-DISPERSIONE mg disciolti
5	D - t1	1106,8	117,4	900,0	4,8	4701,7	0,1	110,9	94,5	87,4	6,6	102,6	7,8
	E - t1	1106,8	117,4	900,0	4,8	4048,0	0,1	95,4	81,3				
	F - t1	1106,8	117,4	900,0	4,8	4302,1	0,1	101,4	86,4				
15	D - t2	1106,8	117,4	899,0	4,8	5137,8	0,1	121,2	103,2	99,6	3,9	116,9	4,6
	E - t2	1106,8	117,4	899,0	4,8	4752,1	0,1	112,0	95,4				
	F - t2	1106,8	117,4	899,0	4,8	4982,7	0,1	117,5	100,1				
25	D - t3	1106,8	117,4	898,0	4,8	5169,6	0,1	121,8	103,8	100,4	3,4	117,9	3,9
	E - t3	1106,8	117,4	898,0	4,8	4837,1	0,1	113,9	97,0				
	F - t3	1106,8	117,4	898,0	4,8	5003,2	0,1	117,9	100,4				
30	D - t4	1106,8	117,4	897,0	4,8	5133,8	0,1	120,8	102,9	98,4	4,5	115,5	5,3
	E - t4	1106,8	117,4	897,0	4,8	4686,2	0,1	110,2	93,9				
	F - t4	1106,8	117,4	897,0	4,8	4909,6	0,1	115,5	98,4				
45	D - t5	1106,8	117,4	896,0	4,8	4994,5	0,1	117,4	100,0	96,6	3,5	113,4	4,2
	E - t5	1106,8	117,4	896,0	4,8	4643,8	0,1	109,1	92,9				
	F - t5	1106,8	117,4	896,0	4,8	4838,6	0,1	113,7	96,9				
60	D - t6	1106,8	117,4	895,0	4,8	5026,5	0,1	118,0	100,5	96,8	3,7	113,6	4,4
	E - t6	1106,8	117,4	895,0	4,8	4656,5	0,1	109,3	93,1				
	F - t6	1106,8	117,4	895,0	4,8	4840,0	0,1	113,6	96,8				
90	D - t7	1106,8	117,4	894,0	4,8	4957,6	0,1	116,2	99,0	96,4	2,5	113,2	3,0
	E - t7	1106,8	117,4	894,0	4,8	4706,6	0,1	110,3	94,0				
	F - t7	1106,8	117,4	894,0	4,8	4814,9	0,1	112,9	96,2				
120	D - t8	1106,8	117,4	893,0	4,8	4930,0	0,1	115,5	98,4	94,8	3,3	111,3	3,9
	E - t8	1106,8	117,4	893,0	4,8	4600,4	0,1	107,7	91,7				
	F - t8	1106,8	117,4	893,0	4,8	4725,3	0,1	110,6	94,3				

Tabella 9. Calcoli effettuati per determinare il titolo della vitamina C rilasciata nel mezzo di dissoluzione ad ogni prelievo: La concentrazione del principio attivo è stata ricavata a partire dalla retta di taratura (eq.5). È stato poi determinato il principio attivo disciolto nella provetta del dissolutore (eq.6) e la percentuale del principio attivo rilasciata nella provetta rispetto all'atteso (eq.7).

4.2.5 Analisi dei dati di dissoluzione

Per ogni integratore oggetto di studio sono stati confrontati i profili di dissoluzione della vitamina C sia di compresse fresche che sottoposte a studio di stabilità. Inoltre, nei casi in cui erano soddisfatte le condizioni di applicabilità, è stato calcolato il fattore di similarità f_2 (eq.8). Secondo questa formula i profili di dissoluzione possono essere considerati simili in virtù della similarità ad ogni *time-point* di dissoluzione (Graffner C. et al., 2006).

$$f_2 = 50 * \log \left(\frac{100}{\sqrt{1 + \frac{\sum_{t=1}^{t=n} [\bar{R}(t) - \bar{T}(t)]^2}{n}}} \right) \quad (\text{eq.8})$$

Dove:

- n = numero di punti di confronto tra le due curve
- $R(t)$ = media della percentuale di principio attivo rilasciato da una formulazione a ogni punto di campionamento
- $T(t)$ = media della percentuale di principio attivo rilasciato da un'altra formulazione a ogni punto di campionamento

Se f_2 assume valori compresi tra 50 e 100, i due profili di dissoluzione in esame vengono considerati simili.

Se f_2 risulta, invece, minore di 50 allora i due profili sono diversi.

Va sottolineato, tuttavia, che se la quantità totale del principio attivo disciolto entro 15 minuti è $\geq 85\%$, si può concludere che i profili di dissoluzione sono simili senza il calcolo di f_2 (Logreco A., 2022).

Per poter calcolare il fattore di similarità f_2 è necessario che le seguenti condizioni siano rispettate:

- utilizzare un minimo di tre *time-points* (zero escluso);
- i *time-points* devono essere gli stessi per le due formulazioni in esame;
- effettuare il calcolo con i dati di dissoluzione di almeno 12 unità. (Questa condizione nello specifico non è stata rispettata in quanto per ragioni legate alle tempistiche necessarie per eseguire l'analisi, il profilo di dissoluzione è stato costruito testando tre unità per volta);
- utilizzare non più di una misurazione superiore all'85% di rilascio del principio attivo;
- la deviazione standard relativa deve essere inferiore al 20% per il primo time point e inferiore al 10% dal secondo all'ultimo *time-point* preso in esame per il calcolo (Logreco A., 2022).

4.2.6 Ulteriori verifiche sul profilo di rilascio dell'INTEGRATORE 3 (comprese rivestite)

Nel caso dell'INTEGRATORE 3, costituito da compresse drenanti rivestite, sono state effettuate ulteriori prove di dissoluzione procedendo come segue:

- 1) prova di dissoluzione su una compressa costituita dal solo nucleo, quindi priva di rivestimento, per valutare se la presenza del rivestimento potesse essere in grado di variare il profilo di rilascio del principio attivo;

- 2) prova su una compressa, macinata e resa polvere, per verificare che la vitamina c presente nella compressa riuscisse a passare totalmente in soluzione nel mezzo di dissoluzione.

Il metodo applicato per eseguire la dissoluzione e calcolare il profilo di rilascio del principio attivo è stato il medesimo descritto precedentemente (Rif. par. 4.2.3).

4.2.7 Prova di confronto tra disaggregazione e dissoluzione

Le linee guida ICH Q6A (ICH, Q6A, 2000) stabiliscono che il saggio di dissoluzione può essere sostituito dal test di disaggregazione nel caso di principi attivi molto solubili (come la vitamina C presa in esame), a patto che venga dimostrata una relazione tra i risultati ottenuti dai due saggi oppure nel caso in cui il test di disaggregazione risulti più dimostrativo rispetto a quello di dissoluzione (Gupta A. et al., 2009).

Per tre integratori di riferimento, è stato studiato il profilo di rilascio della vitamina C ottenuto eseguendo il test di disaggregazione usando, però, come mezzo acquoso il medesimo fluido gastrico simulato (HCl 0,03 M, pH $2\pm 0,05$) usato per la dissoluzione.

Gli integratori oggetto di studio sono stati:

- integratore a beneficio drenante rivestito (INTEGRATORE 3)
- integratore immunostimolante rivestito (INTEGRATORE 6)
- integratore energizzante a rilascio modificato (INTEGRATORE 24)

Lo scopo della prova è stato quello di confrontare i risultati dei due diversi saggi e indagare se la simulazione dei movimenti peristaltici, realizzata dal disaggregatore, potesse essere in grado di modificare il profilo di rilascio del principio attivo dalle compresse.

4.2.7.1 Metodo per la prova di confronto tra disaggregazione e dissoluzione

Per ciascun integratore oggetto di studio sono state testate parallelamente due compresse, ciascuna collocata all'interno di un cestello del disaggregatore.

Come mezzo di disaggregazione sono stati utilizzati 800 ml di HCl 0,03 M pH $2\pm 0,05$. L'apparato ha operato in ambiente termostato a $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

L'analisi è stata protratta per un'ora, durante la quale sono stati eseguiti 5 prelievi dal mezzo di disaggregazione rispettivamente a 5, 15, 30, 45, 60 minuti. Ad ogni prelievo, 1 ml di soluzione del mezzo di disaggregazione è stato filtrato con filtro idrofilo monouso a pori da $0,45\ \mu\text{m}$ e trasferito in una provetta per successiva analisi in HPLC.

Per ognuno dei campioni è stata calcolata la vitamina C rilasciata rispetto all'atteso ed è stata determinata la media delle due compresse analizzate parallelamente. È stato quindi costruito il profilo di rilascio della vitamina C nel corso della disaggregazione.

5. Risultati e discussioni

5.1 Risultati ottenuti nei saggi di disaggregazione

5.1.1 Tutte le compresse analizzate hanno mostrato tempo di disaggregazione conforme alle specifiche attese

In questo paragrafo vengono riportati i risultati delle prove di disaggregazione eseguite su tutte le compresse analizzate. In particolare, vengono illustrati e discussi i risultati relativi alle compresse rivestite e non rivestite che sono stati confrontati con i relativi tempi di disaggregazione previsti in fase di formulazione e stabiliti come specifica di riferimento (riportata nella scheda tecnica di ciascun integratore); è stato valutato, inoltre, anche l'eventuale allineamento con i tempi di disaggregazione che sarebbero previsti dalla farmacopea per la tipologia di compresse in esame (Rif. Tab.2 par. 4.2.1).

Ad oggi UNIFARCO commercializza 25 integratori alimentari in forma di compressa, 16 prodotti presentano rivestimento filmogeno, mentre 9 prodotti sono privi di rivestimento. In particolare, si tratta delle compresse contenenti i seguenti principali ingredienti e principi attivi (Tab.10).

INTEGRATORE DI RIFERIMENTO	PRINCIPALI INGREDIENTI, PRINCIPI ATTIVI e QUANTITATIVI (1 dose)
INTEGRATORE 1	Fico d'India polvere (200,0 mg), Paullinia cupana Kunth. Semi e.s. (45,0 mg) di cui caffeina (4,5 mg), D-biotina (7,5 µg)
INTEGRATORE 2	Biancospino e.s. (100 mg) di cui flavonoidi (2,5 mg), Coenzima Q10 (5 mg)
INTEGRATORE 3	Centella e.s (150 mg) di cui terpeni (30 mg), Vite e.s. (100 mg) di cui polifenoli (95 mg), Ortosifon e.s. (100 mg), Ginkgo e.s. (50 mg), Vitamina C (20 mg)
INTEGRATORE 4	Riso rosso fermentato (58 mg) di cui monacoline (2,9 mg), Coenzima Q10 (25 mg)
INTEGRATORE 5	Carruba (50 mg), Cromo (6 µg)
INTEGRATORE 6	Echinacea pallida e.s. radice (100 mg) da cui Echinacoside (2 mg), Acerola e.s (160 mg) da cui vitamina C (80 mg)
INTEGRATORE 7	Carciofo foglie e.s. (100 mg) di cui Ac. caffeilchinici (6 mg) e Acido clorogenico (4 mg)
INTEGRATORE 8	Passiflora incarnata (300 mg) di cui flavonoidi (15 mg)
INTEGRATORE 9	Valeriana e.s. (350 mg) di cui acido valerenoico (2,8 mg), Melatonina (1 mg)
INTEGRATORE 10	Melatonina (1 mg), Vitamina B6 (2,1 mg)
INTEGRATORE 11	Curcuma longa e.s. (500mg) di cui di curcuminoidi (90 mg)
INTEGRATORE 12	Rhodiola Rosea e.s. (200 mg) di cui Rosavine (10 mg) di cui Salidroside (3,6 mg)
INTEGRATORE 13	Potassio (150 mg), Magnesio (28,1 mg)

INTEGRATORE DI RIFERIMENTO	PRINCIPALI INGREDIENTI, PRINCIPI ATTIVI e QUANTITATIVI (1 dose)
INTEGRATORE 14	L-glutammina (500 mg), boswellia (50 mg) di cui AKBA (5 mg)
INTEGRATORE 15	Acido alfa-lipoico (300 mg), Cannella e.s.(250 mg)
INTEGRATORE 16	Mio-inositolo (500 mg)
INTEGRATORE 17	Quercetina (100 mg), Lattoferrina (75 mg), Vitamina C (40 mg)
INTEGRATORE 18	Senna e.s. (83,3 mg) di cui idrossiantraceni (sennoside B) pari a (6,3 mg), Tamarindo e.s. (33,3 mg)
INTEGRATORE 19	Vitamina D3 (50 µg)
INTEGRATORE 20	L-Leucina (0,67 mg), Vitamina B6 (0,23 mg)
INTEGRATORE 21	Idrossimetilbutirrato (HMB) (750 mg)
INTEGRATORE 22	Picnogenolo (75 mg)
INTEGRATORE 23	Citrus aurantium frutto (250 mg) di cui Diosmina (225 mg) e Esperidina (25 mg), Vitamina C (90 mg)
INTEGRATORE 24	Vitamina C (420 mg), Acerola e.s. (160 mg) di cui vitamina C (80 mg)
INTEGRATORE 25	Riso rosso fermentato (58 mg) di cui monacoline (2,9 mg), Coenzima Q10 (50 mg), Acido folico (200 µg)

Tabella 10. Integratori alimentari in compressa presi in esame per il saggio di disaggregazione.

Il test di disaggregazione eseguito sulle compresse con rivestimento filmogeno ha ottenuto i seguenti risultati (Tab.11)

NOME PRODOTTO	TEMPERATURA (°C)	Tempi di controllo (mesi)	Tempo di DISAGGREGAZIONE (min)	tempo di DISAGGREGAZIONE medio (min)	tempo previsto dalla scheda tecnica (min)	tempo previsto dalla farmacopea (min)	
INTEGRATORE 1	Ambiente	0	40	42,3	≤ 60	≤ 30	
		3	44				
		12	43				
	30	3	43	44,0			
		12	45				
		3	41				41,0
INTEGRATORE 2	Ambiente	6	29	24,7	≤ 30		
		12	24				
		36	21				
INTEGRATORE 3	Ambiente	0	46	44,3	≤ 60		
		4	44				
		24	43				
	30	24	35	35,0			
		40	6			43,0	
		43	43,0				
INTEGRATORE 4	Ambiente	0	8	5,7	≤ 15		
		6	4				
		12	5				
	30	6	6	6,0			
		40	6			6,0	
		6	6				
INTEGRATORE 5	Ambiente	0	20	20,7	≤ 30		
		3	21				
		6	21				
	30	3	20	20,5			
		6	21				
		3	20			20,5	
40	3	20					
	6	21					

NOME PRODOTTO	TEMPERATURA (°C)	Tempi di controllo (mesi)	Tempo di DISAGGREGAZIONE (min)	tempo di DISAGGREGAZIONE medio (min)	tempo previsto dalla scheda tecnica (min)	tempo previsto dalla farmacopea (min)
INTEGRATORE 6	Ambiente	3	51	56,4	≤ 60	≤ 30
		3	55			
		6	58			
		12	58			
	36	60				
	30	3	49	54,5		
40	3	56	47,5			
	6	39				
INTEGRATORE 7	Ambiente	0	28	28,0	≤ 30	
		6	28			
		24	29			
		36	27			
	40	3	30	29,5		
6	29					
INTEGRATORE 8	Ambiente	6	20	22,0	≤ 30	
		9	22			
		18	24			
	30	9	20	22,0		
INTEGRATORE 9	Ambiente	0	59	59,5	≤ 60	
		6	60			
INTEGRATORE 10	Ambiente	0	59	59,3	≤ 60	
		6	60			
		9	60			
		24	58			
	40	3	34	37,0		
		6	40			
INTEGRATORE 11	Ambiente	0	58	59,0	≤ 60	
		6	60			
		3	59			
	40	6	58	58,5		
INTEGRATORE 12	Ambiente	0	29	28,0	≤ 30	
		6	30			
		24	26			
		36	27			
	30	3	30	29,0		
		6	28			
	40	3	30	29,0		
6		28				
INTEGRATORE 13	Ambiente	0	18	18,8	≤ 30	
		3	18			
		6	19			
		36	20			
	30	3	19	19,0		
		6	19			
	40	3	20	19,0		
6		18				
INTEGRATORE 14	Ambiente	3	6	6,3	≤ 30	
		24	7			
		30	6			
	30	24	6	6,0		
INTEGRATORE 15	Ambiente	3	23	20,0	≤ 30	
		30	17			
	30	3	26	26		
	40	3	27	27		
INTEGRATORE 16	Ambiente	0	7	7,0	≤ 30	
		3	8			
		6	6			
	30	3	7	7,0		
		6	7			
	40	3	7	6,5		
6		6				

Tabella 11. Risultati ottenuti dalle prove di disaggregazione sulle compresse rivestite ai diversi tempi di controllo presi in esame. Le prove sono state eseguite su campioni di compresse appena prodotte e su campioni sottoposti a stabilità e conservati a temperatura ambiente, a 30°C/65% RH e a 40°C/75% RH.

Il test di disaggregazione eseguito invece sulle compresse non rivestite ha ottenuto i seguenti risultati (Tab.12).

NOME PRODOTTO	TEMPERATURA (°C)	Tempi di controllo (mesi)	tempo di DISAGGREGAZIONE (min)	tempo di DISAGGREGAZIONE medio (min)	tempo previsto dalla scheda tecnica (min)	tempo previsto dalla farmacopea (min)
INTEGRATORE 17	Ambiente	0	15	14,5	≤ 15	≤ 15
		6	13			
		12	15			
		24	15			
	30	18	18	15		
40	6	14	14			
INTEGRATORE 18	Ambiente	0	35	36	≤ 45	
		6	37			
	30	6	35	35		
	40	6	43	43		
INTEGRATORE 19	Ambiente	0	8	7,5	≤ 15	
		6	7			
		18	8			
		24	7			
	30	18	7	7		
40	6	6	6			
INTEGRATORE 20	Ambiente	0	7	11	≤ 15	
		12	15			
	30	12	14	14		
40	6	14	14			
INTEGRATORE 21	Ambiente	0	24	27	≤ 45	
		12	30			
	30	12	26	26		
40	6	24	24			
INTEGRATORE 22	Ambiente	0	15	15	≤ 30	
		3	16			
		6	14			
	30	3	14	13		
	40	6	12	10,5		
3		15				
6	6					
INTEGRATORE 23	Ambiente	0	6	6	≤ 30	
		3	5			
		6	7			
	30	3	6	4,5		
	40	6	3	3		
3		3				
6	3					
INTEGRATORE 24	Ambiente	0	58	58,4	≤ 60	
		9	60			
		12	57			
		24	59			
		30	58			
	30	30	59	59		
40	6	57	57			
INTEGRATORE 25	Amb	24	28	26,5	≤ 30	
		36	25			

Tabella 12. Risultati ottenuti dalle prove di disaggregazione sulle compresse non rivestite ai diversi tempi di controllo presi in esame. Le prove sono state eseguite su campioni di compresse appena prodotte e su campioni sottoposti a stabilità e conservati a temperatura ambiente, a 30°C/65% RH e a 40°C/75% RH.

I tempi di disaggregazione rilevati in tutti 25 gli integratori di riferimento analizzati sono risultati in accordo con le specifiche previste dalle schede tecniche e stabilite durante la fase di formulazione.

Durante lo sviluppo delle compresse, UNIFARCO si pone come obiettivo il rispetto delle specifiche previste dalla Farmacopea Europea per il tipo di compressa prodotta. Tali specifiche (Rif. Tab.2 par. 4.2.1), obbligatorie per i farmaci, non sempre possono essere rispettate dagli integratori, come sottolineato anche dalla nota ministeriale emessa ad aprile 2022 (Rif. cap. 3). Infatti, dal momento che gli integratori spesso sono caratterizzati da una matrice complessa, con nucleo potenzialmente composto da materie prime scarsamente solubili in acqua, alcuni prodotti possono scostarsi dalle specifiche della farmacopea. Tali deviazioni, tuttavia, vengono considerate accettabili in quanto note già in fase di formulazione.

I risultati ottenuti, sono stati quindi confrontati con il tempo di disaggregazione previsto dalla Farmacopea Europea sia per le compresse rivestite (Tab.11), che per le compresse non rivestite (Tab.12).

Per le compresse rivestite con rivestimento filmogeno, il tempo di disaggregazione previsto corrisponde ad un massimo di 30 minuti (*PhEur*). Delle 16 compresse con rivestimento filmogeno analizzate:

- 10/16 sono risultate conformi
- 6/16 non sono risultate conformi poiché il tempo di disaggregazione è risultato superiore ai 30 minuti

Per le compresse non rivestite invece, il tempo di disaggregazione massimo previsto dalla farmacopea coincide con 15 minuti (*PhEur*). Delle 9 compresse senza rivestimento analizzate:

- 5/9 sono risultate conformi
- 4/9 non sono risultate conformi e il tempo di disaggregazione è risultato superiore ai 15 minuti

Non tutti gli integratori analizzati hanno, pertanto, mostrato completo allineamento alle specifiche presenti in farmacopea.

Tuttavia, come sopra esposto, bisogna considerare che gli integratori alimentari contengono spesso materie prime naturali, che in molti casi sono presenti in combinazione, determinando la formazione di una matrice complessa. Inoltre, molti estratti vegetali utilizzati nella formulazione sono scarsamente solubili in acqua e, di conseguenza, possono rallentare il processo di disaggregazione.

Ad esempio, l'INTEGRATORE 11 (compresse con rivestimento filmogeno) presenta un tempo di disaggregazione che supera il limite di 30 minuti previsto dalla farmacopea. Analizzando la composizione degli ingredienti presenti (riportati in Tab.10), si nota che circa il 36% della compressa è composta dall'estratto di *Curcuma longa* che presenta scarsa solubilità nel mezzo acquoso (De Moraes Carvalho D. et al., 2015). Anche l'INTEGRATORE 6 (compresse con rivestimento filmogeno) supera le specifiche previste da farmacopea e verificandone la composizione (Tab. 10), si nota che è composto per il 18% circa dall'estratto di radice di *Echinacea pallida* che risulta solo parzialmente solubile in acqua. L'INTEGRATORE 25 (compresse non rivestite) supera di circa 15 minuti la specifica presente in farmacopea: tale risultato potrebbe derivare dalla concomitante

presenza nella formula del coenzima Q10 (che costituisce il 17% della compressa) insolubile in acqua e del riso rosso fermentato (circa il 35% della compressa) anch'esso solo parzialmente solubile in acqua.

Oltre alla presenza di materie prime insolubili, che possono limitare l'ingresso dell'acqua nella compressa rallentando il processo di disaggregazione, va considerata anche la presenza di diversi eccipienti nel nucleo e degli agenti di rivestimento che possono avere diversa solubilità, oltre alle dimensioni della compressa stessa.

Pertanto, nell'ambito dell'integratore alimentare, tempi di disaggregazione più lunghi, non sempre paragonabili a quelli ottenuti nel caso dei farmaci, sono da attendersi e possono essere accettati purché previsti in fase di formulazione. Tuttavia, a garanzia del consumatore, è importante che un monitoraggio puntuale verifichi la riproducibilità del dato atteso nei lotti industriali.

5.1.2 I profili di disaggregazione sono risultati stabili durante la shelf-life dei prodotti

Per approfondire il comportamento della disaggregazione durante l'intero periodo di validità delle compresse e valutare se tale dato si mantiene costante nel tempo, sono stati confrontati i tempi di disaggregazione ottenuti dalle compresse sottoposte allo studio di stabilità. In particolare, per ogni integratore oggetto di studio, sono stati confrontati i risultati ottenuti da compresse appena prodotte, compresse a fine validità conservate a temperatura ambiente (per gli integratori di riferimento in cui presente) e compresse conservate a 30°C/65% umidità relativa (RH) e 40°C/75% RH.

a. COMPRESSE CONSERVATE A TEMPERATURA AMBIENTE

Per tutte le compresse conservate a temperatura ambiente, il tempo di disaggregazione, riscontrato ai diversi punti di controllo previsti dallo studio di stabilità, si è mantenuto costante sia per le compresse rivestite, che per le compresse non rivestite, restando conforme alla specifica stabilita durante la fase di formulazione.

Molto significativo è stato il fatto che il tempo di disaggregazione ottenuto dalle compresse a fine vita (per gli integratori in cui presente) è rimasto stabile rispetto al dato delle compresse appena prodotte e conforme alle specifiche previste. Risultato, dunque, che permette di garantire al consumatore che le caratteristiche di disaggregazione rimangono conformi per tutta la durata di vita delle compresse.

b. COMPRESSE CONSERVATE A 30°C/65% RH e 40°C/75% RH

Per ogni integratore di riferimento, è stato valutato l'andamento della disaggregazione nelle compresse conservate a 30°C/65% RH e 40°C/75% RH.

In particolare, è stato preso in considerazione lo studio di stabilità "accelerata" a 40°C/75% RH, che simula condizioni di conservazione critiche per mimare in breve tempo il comportamento che il prodotto potrebbe avere al termine della validità, al fine di valutare se effettivamente il dato potesse essere predittivo.

In tutte le compresse conservate a 30°C/65% RH e 40°C/75% RH, il risultato è stato conforme alle specifiche stabilite in fase di formulazione (risultati consultabili in Tab.11 e Tab.12). Confrontando i tempi di disaggregazione delle compresse conservate per 6 mesi a 40°C/75% RH e quelle a fine validità (per gli integratori in cui presente) è emerso che tutti i dati sono risultati costanti eccetto tre casi in cui si evidenzia un lieve disallineamento (INTEGRATORI 6, 10, 22 Rif. Tab.11 e Tab.12). La differenza tra i tempi rilevati, tuttavia, non è stata considerata una variazione significativa in quanto il risultato è rientrato in ogni caso all'interno delle specifiche stabilite in fase di formulazione.

L'esito del saggio di disaggregazione eseguito sulle compresse conservate per 6 mesi a 40°C/75% RH ha permesso, dunque, di stabilire che, per gli integratori analizzati, le condizioni adottate per lo studio di stabilità "accelerata" risultano efficaci per definire, in un tempo di conservazione minore, il comportamento della disaggregazione a fine validità.

Al fine di visualizzare meglio l'andamento della disaggregazione durante lo studio di stabilità, di seguito vengono riportati dei grafici esemplificativi e rappresentativi delle diverse categorie di integratori prese in esame: compresse rivestite (INTEGRATORE 7 e INTEGRATORE 14) e compresse non rivestite (INTEGRATORE 17 e INTEGRATORE 19). I grafici riportati (da Fig.18 a Fig.25) sono stati costruiti attraverso i risultati delle singole prove effettuate sulle compresse e pertanto non presentano barre di errore.

- **INTEGRATORE 7 (compressa a sostegno della funzionalità epatica rivestita):**

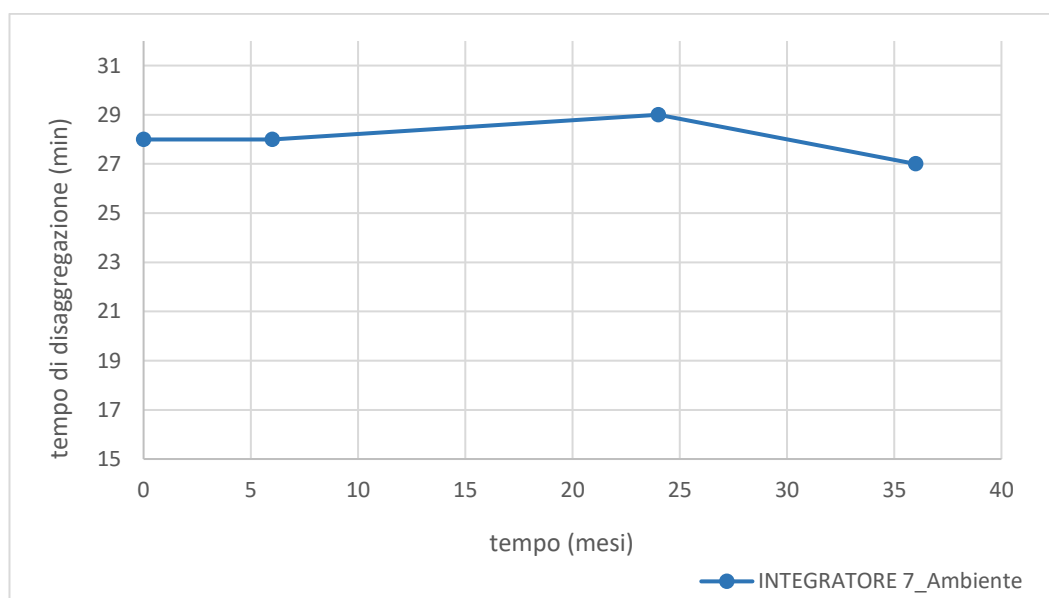


Figura 18. PROFILO di DISAGGREGAZIONE INTEGRATORE 7 conservato a temperatura ambiente: il grafico mostra l'andamento del profilo di disaggregazione nel tempo dell'integratore 7. Si può notare che, ai diversi tempi di controllo presi in considerazione a temperatura ambiente, il tempo di disaggregazione resta pressoché costante dal prodotto fresco, fino al prodotto in scadenza, testato a 36 mesi dalla produzione.

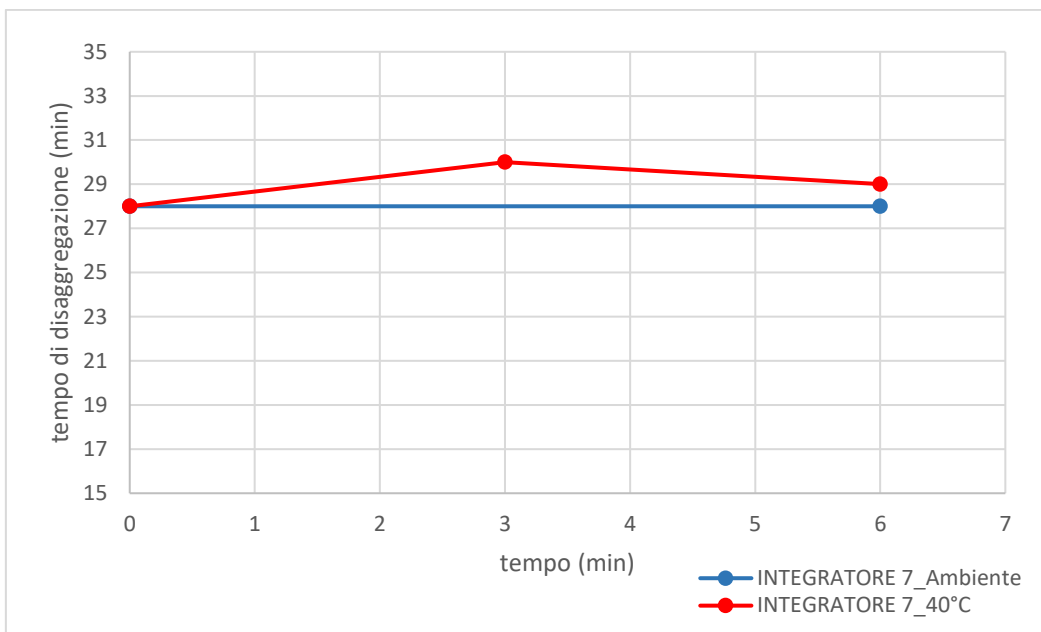


Figura 19. SOVRAPPOSIZIONE dei PROFILI di DISAGGREGAZIONE dell'INTEGRATORE 7 conservato a temperatura ambiente e a 40°C: il grafico mostra la sovrapposizione del profilo di disaggregazione dell'integratore 7 conservato per 6 mesi a temperatura ambiente e il profilo del medesimo integratore conservato per 6 mesi a 40°C e 75% RH. La variazione non è risultata significativa.

- **INTEGRATORE 13 (compressa a sostegno della funzione muscolare rivestita):**

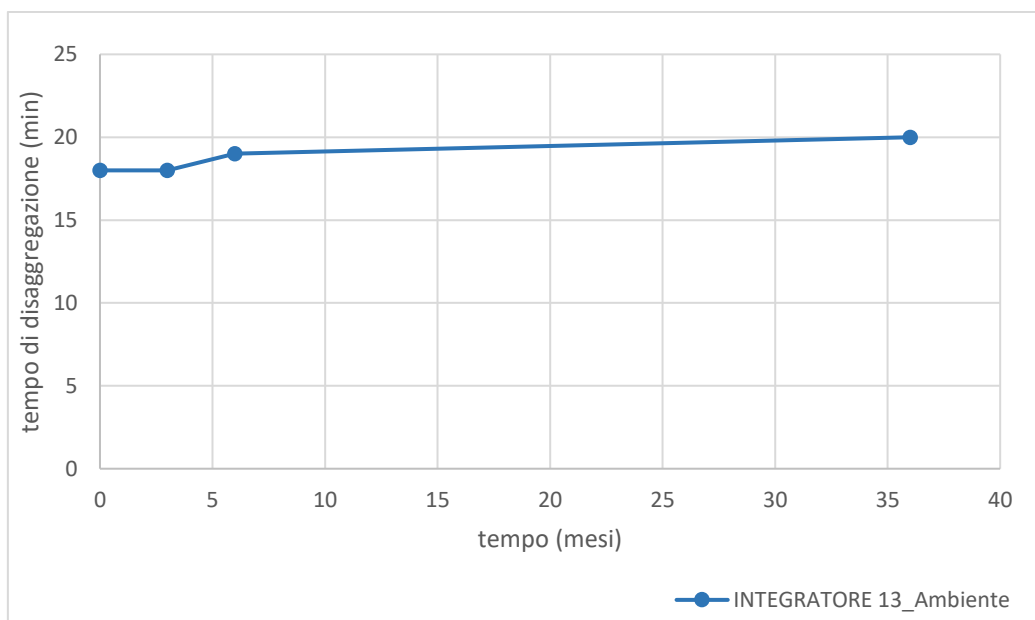


Figura 20. PROFILO DI DISAGGREGAZIONE INTEGRATORE 13 conservato a temperatura ambiente: Il grafico mostra l'andamento del profilo di disaggregazione nel tempo dell'integratore 13. Si può notare che, ai diversi tempi di controllo presi in considerazione a temperatura ambiente, il tempo di disaggregazione resta pressoché costante dal prodotto fresco, fino al prodotto in scadenza, testato a 36 mesi dalla produzione.

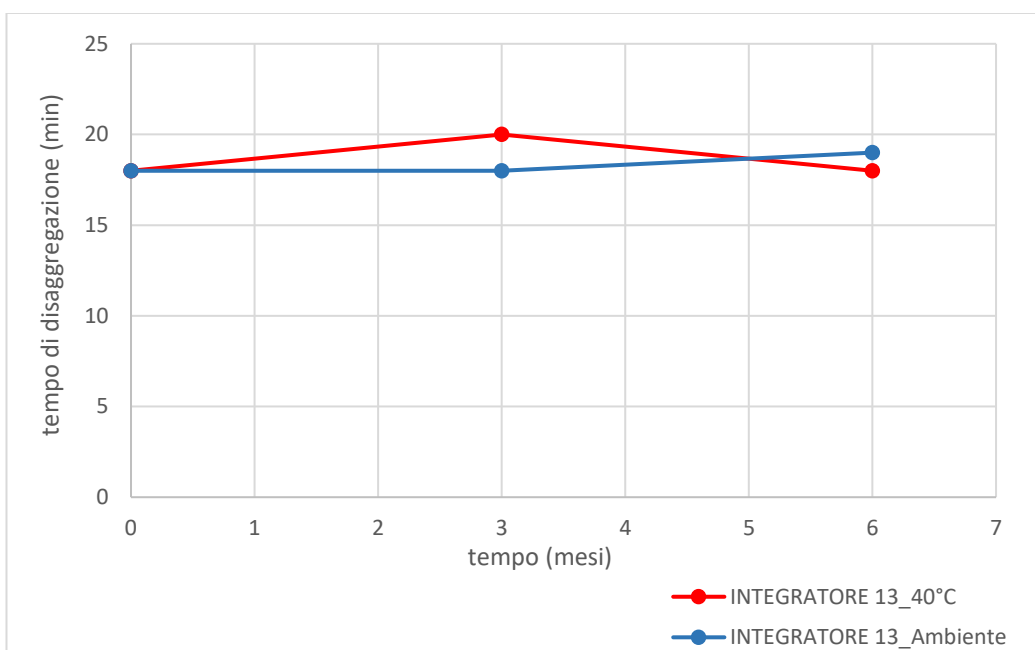


Figura 21. SOVRAPPOSIZIONE dei PROFILI di DISAGGREGAZIONE dell'INTEGRATORE 13 conservato a temperatura ambiente e a 40°C: Il grafico mostra la sovrapposizione del profilo di disaggregazione dell'integratore 13 conservato per 6 mesi a temperatura ambiente e il profilo del medesimo integratore conservato per 6 mesi a 40°C e 75% RH. La variazione non è risultata significativa.

- **INTEGRATORE 17 (compressa immunostimolante non rivestita):**

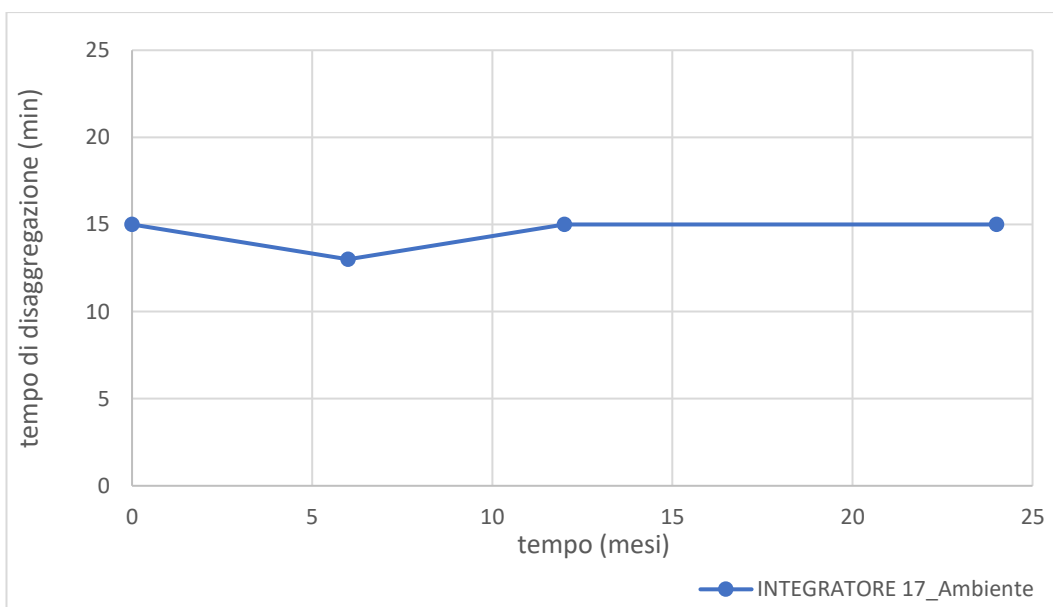


Figura 22. PROFILO di DISAGGREGAZIONE INTEGRATORE 17 conservato a temperatura ambiente: Il grafico mostra l'andamento del profilo di disaggregazione nel tempo dell'integratore 17. Si può notare che, a temperatura ambiente, il tempo di disaggregazione resta pressoché costante ai diversi tempi di controllo presi in considerazione, dal prodotto fresco, fino al prodotto testato a 24 mesi dalla produzione.

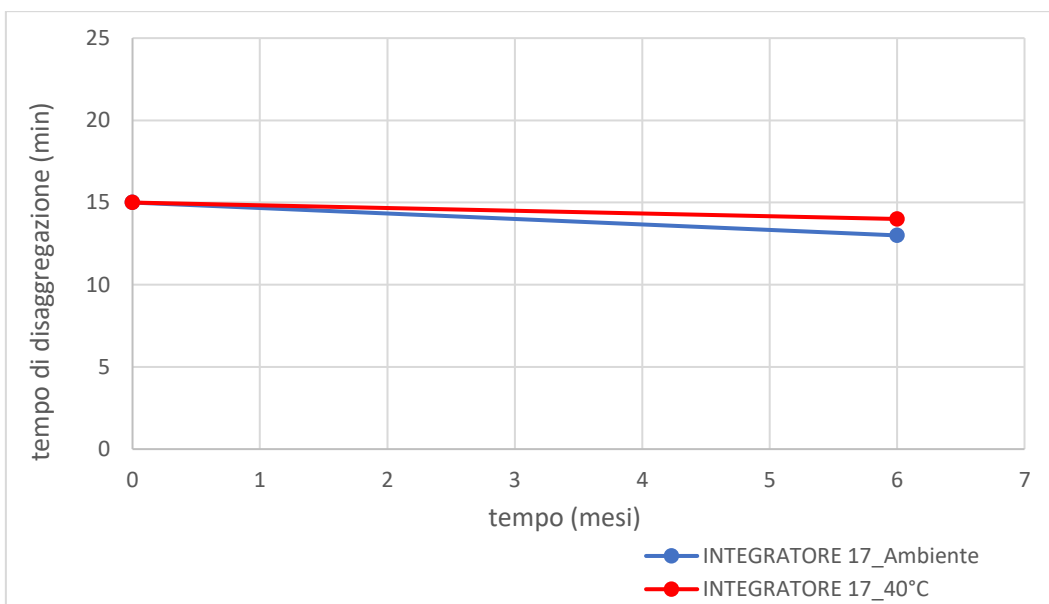


Figura 23. SOVRAPPOSIZIONE dei PROFILI di DISAGGREGAZIONE dell'INTEGRATORE 17 conservato a temperatura ambiente e a 40°C: il grafico mostra la sovrapposizione del profilo di disaggregazione dell'integratore 17 conservato per 6 mesi a temperatura ambiente e il profilo del medesimo integratore conservato per 6 mesi a 40°C/75% RH. Si può notare che i due profili sono pressoché sovrapponibili.

- **INTEGRATORE 19 (compressa vitaminica non rivestita):**

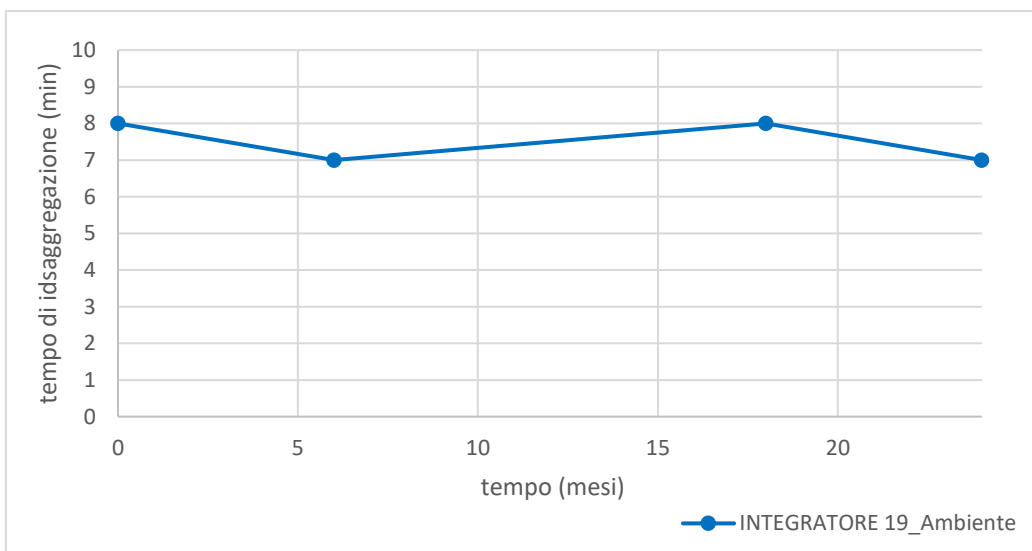


Figura 24. PROFILO DI DISAGGREGAZIONE dell'INTEGRATORE 19 conservato a temperatura ambiente: il grafico mostra l'andamento del profilo di disaggregazione nel tempo dell'integratore 19. Si può notare che, ai diversi tempi di controllo presi in considerazione a temperatura ambiente, il tempo di disaggregazione resta pressoché costante dal prodotto fresco, fino al prodotto testato a 24 mesi dalla produzione.

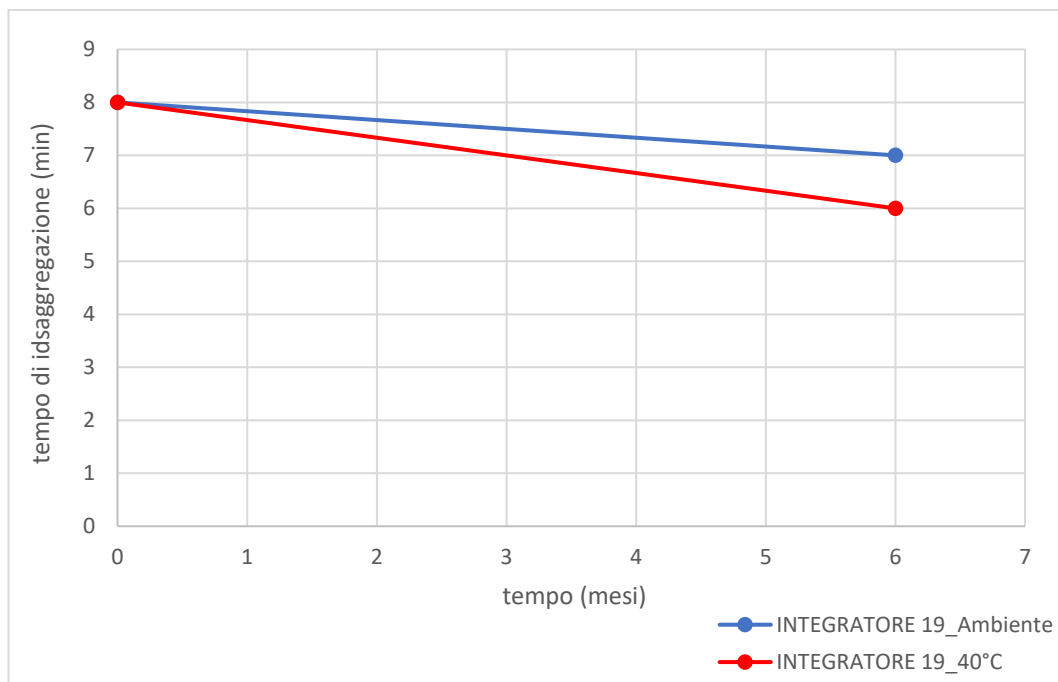


Figura 25. SOVRAPPOSIZIONE dei PROFILI di DISAGGREGAZIONE dell'INTEGRATORE 19 conservato a temperatura ambiente e a 40°: il grafico mostra la sovrapposizione del profilo di disaggregazione dell'integratore 19 conservato per 6 mesi a temperatura ambiente e il profilo del medesimo integratore conservato per 6 mesi a 40°C/75% RH. La variazione non è risultata significativa.

I risultati emersi permettono nel complesso di dedurre che i profili di disaggregazione delle compresse testate si mantengono stabili durante la shelf-life dei prodotti e mantengono le specifiche stabilite durante la fase di formulazione. Risultato, dunque, che garantisce al consumatore che le caratteristiche di disaggregazione rimangono conformi per tutto il periodo di validità delle compresse. Si evidenzia inoltre che i dati ottenuti dallo studio di stabilità "accelerata" a 40°C/75% RH a 6 mesi risultano allineati con quelli riportati dalle stesse compresse a fine validità, rendendo dunque questo studio predittivo del comportamento della disaggregazione a fine validità, per le compresse di riferimento analizzate.

5.2 Il tempo di disaggregazione non mostra correlazione lineare con la durezza delle compresse

Per valutare l'ipotesi che all'aumentare del tempo di disaggregazione aumentasse anche la durezza delle compresse, è stata condotta un'indagine statistica per studiare la correlazione tra la resistenza alla rottura e il tempo di disaggregazione medio rilevato a temperatura ambiente.

È stato calcolato il coefficiente di correlazione di Pearson (Rif. par. 4.2.2.1) considerando i dati dei 19 integratori di riferimento per i quali, in scheda tecnica, era presente il valore della durezza (Tab.13).

NOME INTEGRATORE	RESISTENZA ALLA ROTTURA (kg)	tempo di disaggregazione medio a T Ambiente (min)
INTEGRATORE 1	23	42
INTEGRATORE 2	19	25
INTEGRATORE 5	20	21
INTEGRATORE 6	17	56
INTEGRATORE 7	10	28
INTEGRATORE 8	20	22
INTEGRATORE 9	12	60
INTEGRATORE 10	17	59
INTEGRATORE 11	20	59
INTEGRATORE 12	20	28
INTEGRATORE 13	17	19
INTEGRATORE 14	18	6
INTEGRATORE 15	18	20
INTEGRATORE 16	12	7
INTEGRATORE 18	50	36
INTEGRATORE 19	10	8
INTEGRATORE 22	40,9	15
INTEGRATORE 23	31,1	6
INTEGRATORE 24	21	58

Tabella 13. La tabella riporta i dati della resistenza alla rottura e il tempo di disaggregazione medio rilevato a temperatura ambiente per ogni integratore considerato.

L'indice di correlazione di Pearson è risultato di -0,057: il valore assoluto molto basso indica l'assenza di correlazione lineare tra le due variabili prese in considerazione, ovvero durezza e tempo di disaggregazione. Anche il grafico a dispersione sottostante (Fig.26) sottolinea l'assenza di una relazione lineare tra le due variabili.

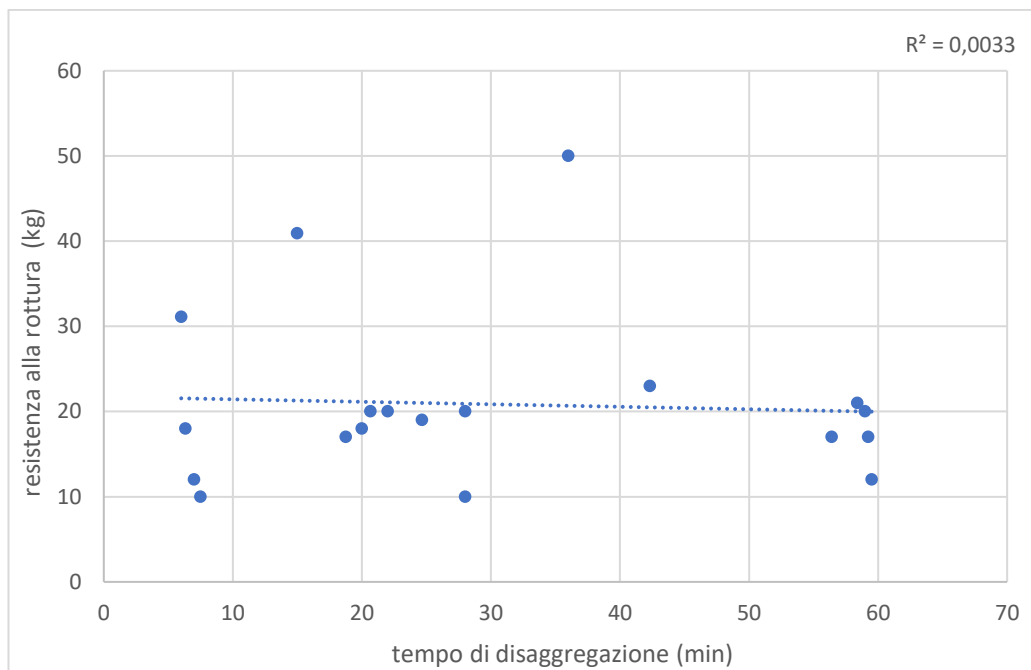


Figura 26. CORRELAZIONE tra la RESISTENZA ALLA ROTTURA e il TEMPO di DISAGGREGAZIONE: il grafico a dispersione mostra la relazione tra la resistenza alla rottura e il tempo di disaggregazione e sottolinea l'assenza di una relazione lineare tra le due variabili.

La conferma dell'assenza di correlazione lineare tra la durezza e il tempo di disaggregazione viene supportata anche da una più approfondita ricerca in letteratura. Emerge, infatti, che durante la lavorazione delle compresse possono intervenire diversi processi che agiscono su una variabile, senza intoccare l'altra. Ad esempio, possono variare il tempo di disaggregazione (attraverso l'uso di una maggior percentuale di disaggreganti nella formulazione) senza influire sulla durezza della compressa (Mizumoto T. et al., 2005).

5.3 Risultati ottenuti dal saggio di dissoluzione

In questo paragrafo, per ognuno dei cinque integratori di riferimento presi in esame, vengono riportati e discussi i profili di rilascio della vitamina C ottenuti nel corso del saggio di dissoluzione.

In particolare, per ogni integratore di riferimento sono stati confrontati i profili ottenuti da:

- compresse fresche, appena prodotte
- compresse stoccate a magazzino per più mesi a temperatura ambiente
- compresse conservate nelle camere climatiche per 6 mesi a 40°C /75% RH.

Per eseguire le prove di dissoluzione è stato, innanzitutto, messo a punto il metodo che verrà utilizzato come protocollo interno all'azienda UNIFARCO per le future analisi di monitoraggio (Rif. par. 4.2.3).

Lo scopo dell'esperimento è stato duplice: verificare che tutta la vitamina C presente nelle compresse venisse rilasciata nel corso della dissoluzione e valutare l'andamento dei profili di dissoluzione durante la shelf-life dei prodotti.

Il rilascio di vitamina C ottenuto al termine della prova di dissoluzione è stato comparato anche con le specifiche previste dalla Farmacopea Europea per i farmaci (5.17.1. *PhEur.10.0*). Inoltre, è stato valutato se il profilo ottenuto dalle compresse conservate a 40°C/75% RH per 6 mesi, durante lo studio di stabilità "accelerata", potesse essere predittivo del risultato riportato dalle compresse a fine validità conservate a temperatura ambiente (per gli integratori di riferimento in cui presente). Al fine di valutare l'eventuale sovrapposizione dei risultati, i profili di dissoluzione sono stati confrontati attraverso il calcolo del fattore di similarità **f2**, applicato agli integratori di riferimento per cui sono risultate soddisfatte le condizioni di applicabilità (Rif. par. 4.2.5), ovvero a:

- compresse a beneficio drenante rivestite (INTEGRATORE 3)
- compresse immunostimolanti rivestite (INTEGRATORE 6)
- compresse immunostimolanti non rivestite (INTEGRATORE 17)
- compresse energizzanti a rilascio modificato (INTEGRATORE 24)

I profili di dissoluzione ottenuti dall'INTEGRATORE 23 (compresse a beneficio drenante non rivestite) non sono stati confrontati mediante il calcolo del fattore **f2** in quanto, presentando un rilascio molto rapido del principio attivo, non hanno rispettato le condizioni di applicabilità della formula.

Di seguito vengono riportati e discussi tutti i risultati ottenuti dalle prove di dissoluzione eseguite sugli integratori di riferimento presi in esame (Tab.14).

NOME INTEGRATORE	TEMPERATURA (°C)	Tempi di controllo (mesi)	DURATA DISSOLUZIONE (min)	MEZZO DI DISSOLUZIONE	% di rilascio Vit C	semi-dispersione max
IMMUNO-STIMOLANTE NON RIVESTITO	Ambiente	0	120	Acido	94,2	4,4
		12			90,1	9,7
	30	18			97,7	1,6
	40	6			89,5	3,0
IMMUNO-STIMOLANTE RIVESTITO	Ambiente	3	360	Acido + tampone	77,9	9,8
		6			87,8	8,5
	30	6			85,9	3,6
	40	6			81,4	6,0
DRENANTE NON RIVESTITO	Ambiente	0	120	Acido	97,1	0,5
		6			98,8	1,9
	30	3			98,0	1,5
	40	3			94,5	4,5
DRENANTE RIVESTITO	Ambiente	0	300	Acido + tampone	57,1	11,0
		24			77,0	3,1
	40	6			74,3	5,1
	ENERGIZZANTE A RILASCIO CONTROLLATO	Ambiente			0	360
30			69,5	0,4		
30		30	75,5	2,0		
40		6	70,8	4,7		

Tabella 14. Risultati delle prove di dissoluzione eseguite per ognuno dei cinque integratori di riferimento presi in esame.

5.3.1 L'INTEGRATORE 6 (compresse immunostimolanti rivestite) mostra un rilascio leggermente inferiore all'atteso ed un profilo di dissoluzione stabile durante la shelf-life

Nel caso dell'INTEGRATORE 6 (compresse immunostimolanti rivestite), la prova di dissoluzione è stata eseguita in ambiente acido (HCl 0,03 M, pH 2±0,05) per due ore e in tampone fosfato (pH 6,8±0,05) per ulteriori quattro ore.

Per costruire il profilo di rilascio durante l'intera dissoluzione, sono stati sommati i milligrammi di principio attivo rilasciati nella fase in tampone a quelli rilasciati precedentemente in acido.

Tutte le compresse analizzate hanno mostrato, al termine della prova, un rilascio ≥ 80% della vitamina C attesa.

Per questo integratore di riferimento sono stati confrontati i profili di rilascio ottenuti da:

- compresse conservate a temperatura ambiente per 3 mesi (*cpr_t3_Tamb*)
- compresse conservate a temperatura ambiente per 6 mesi (*cpr_t6_Tamb*)
- compresse conservate per 6 mesi a 40°C /75% RH (*cpr_t6_40°C*)

In ciascun caso sono state analizzate parallelamente tre compresse ed è stato considerato il profilo di rilascio ottenuto dalla media dei dati. L'errore assoluto rappresentato nel seguente grafico (Fig.27) dalle barre di errore, è stato calcolato determinando la semidispersione massima.

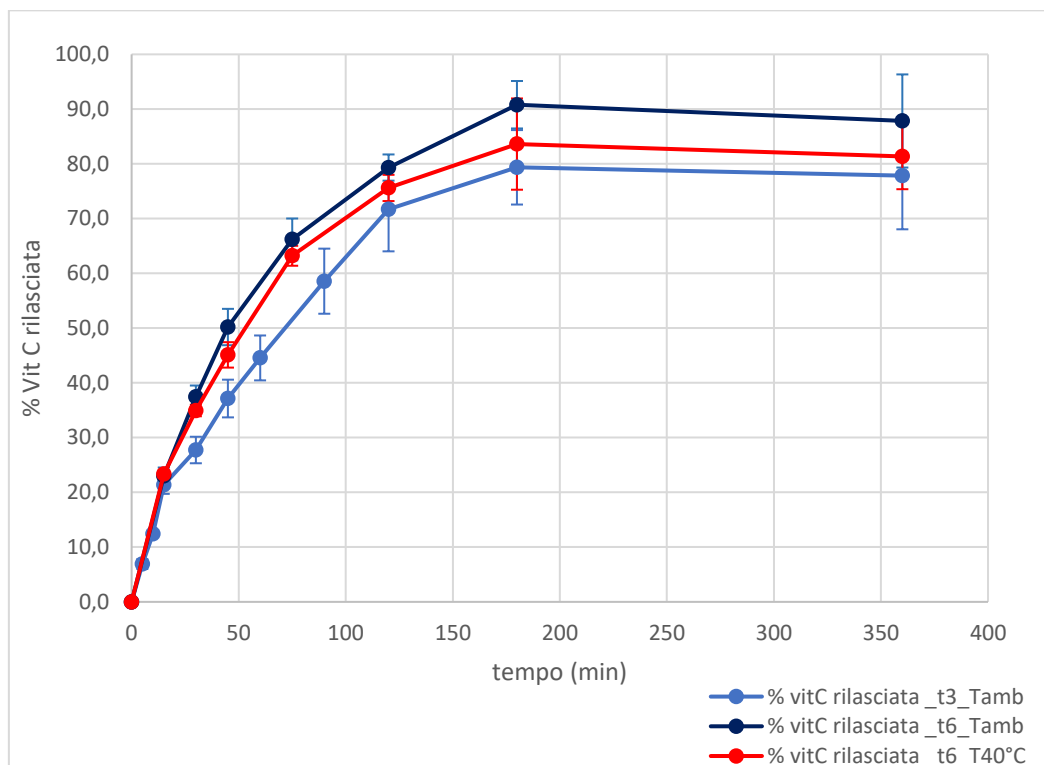


Figura 27. RILASCIO della VITAMINA C in integratore IMMUNOSTIMOLANTE (compresse rivestite): Per l'INTEGRATORE 6 si riporta la sovrapposizione dei profili di rilascio ottenuti dalle compresse conservate per 3 mesi a temperatura ambiente, compresse conservate a temperatura ambiente per 6 mesi e compresse conservate per 6 mesi a 40°C /75% RH.

Il calcolo del fattore **f2** con $n = 4$ (prelievi ai minuti: 15, 30, 120 e 360), ha portato ai seguenti risultati:

- confronto tra *cpr_t3_Tamb* e *cpr_t6_Tamb*: **f2** = 54,7
- confronto tra *cpr_t3_Tamb* e *cpr_t6_40°C*: **f2** = 66,5
- confronto tra *cpr_t6_Tamb* e *cpr_t6_40°C*: **f2** = 69,6

In tutti i casi **f2** è maggiore di 50 e pertanto i profili di dissoluzione possono essere considerati simili tra loro nelle tre condizioni testate.

Nell'INTEGRATORE 6, come visibile nel grafico sopra riportato (Fig.27), il test condotto ha dimostrato, al termine di tutte le prove di dissoluzione, un rilascio $\geq 80\%$ del principio attivo presente nella compressa. Il passaggio in soluzione della vitamina C non avviene in modo immediato, ma presenta un rilascio graduale nei primi 180 minuti e in seguito, il titolo di vitamina C rimane costante nel mezzo di dissoluzione fino al termine della prova.

In particolare, in tutte le compresse analizzate per questo integratore di riferimento, si rileva una leggera diminuzione del titolo della vitamina C all'ultimo

prelievo effettuato in tampone. Diversi sono i fattori che potrebbero essere responsabili della lieve diminuzione: errore analitico dell'operatore, il tampone fosfato potrebbe non essere il mezzo ideale per l'estrazione della vitamina C oppure il principio attivo potrebbe essere in parte andato incontro a degradazione. La vitamina C è, infatti, termolabile e fotosensibile e durante la prova di dissoluzione è stata mantenuta a 37 °C per simulare la temperatura dell'organismo per sei ore. Questo aspetto, unito al fatto che la prova non è stata effettuata al buio (ma l'apparato è stato semplicemente coperto con un telo nero), potrebbe essere responsabile di una lieve diminuzione del titolo.

Sulla base dei dati raccolti, i profili di rilascio si sono mantenuti stabili nel tempo, considerando anche i dati ottenuti dalle compresse conservate per 6 mesi a 40°C /75% RH.

5.3.2 L'INTEGRATORE 17 (compresse immunostimolanti non rivestite) mostra un profilo di dissoluzione conforme alle specifiche attese e costante durante la shelf-life

Nel caso dell'INTEGRATORE 17 (compresse immunostimolanti non rivestite), la prova di dissoluzione è stata eseguita solo in ambiente acido (HCl 0,03 M, pH 2±0,05), poiché, al termine delle due ore, le compresse risultavano completamente disaggregate.

Per costruire il profilo di dissoluzione sono stati eseguiti i prelievi a 5, 10, 20, 30, 45, 60, 75 e 120 minuti.

Tutte le compresse prese in esame hanno mostrato, al termine della prova, un rilascio ≥ 90% della vitamina C attesa. Per questo integratore di riferimento sono stati confrontati i profili di rilascio ottenuti da:

- compresse recentemente prodotte a temperatura ambiente (*cpr_t0_Tamb*)
- compresse conservate a temperatura ambiente per 12 mesi (*cpr_t12_Tamb*)
- compresse conservate per 6 mesi a 40°C /75% RH (*cpr_t6_40°C*)

In ciascun caso sono state analizzate parallelamente tre compresse ed è stato considerato il profilo di rilascio ottenuto dalla media dei dati. L'errore assoluto rappresentato nel seguente grafico (Fig.28) dalle barre di errore, è stato calcolato determinando la semidispersione massima.

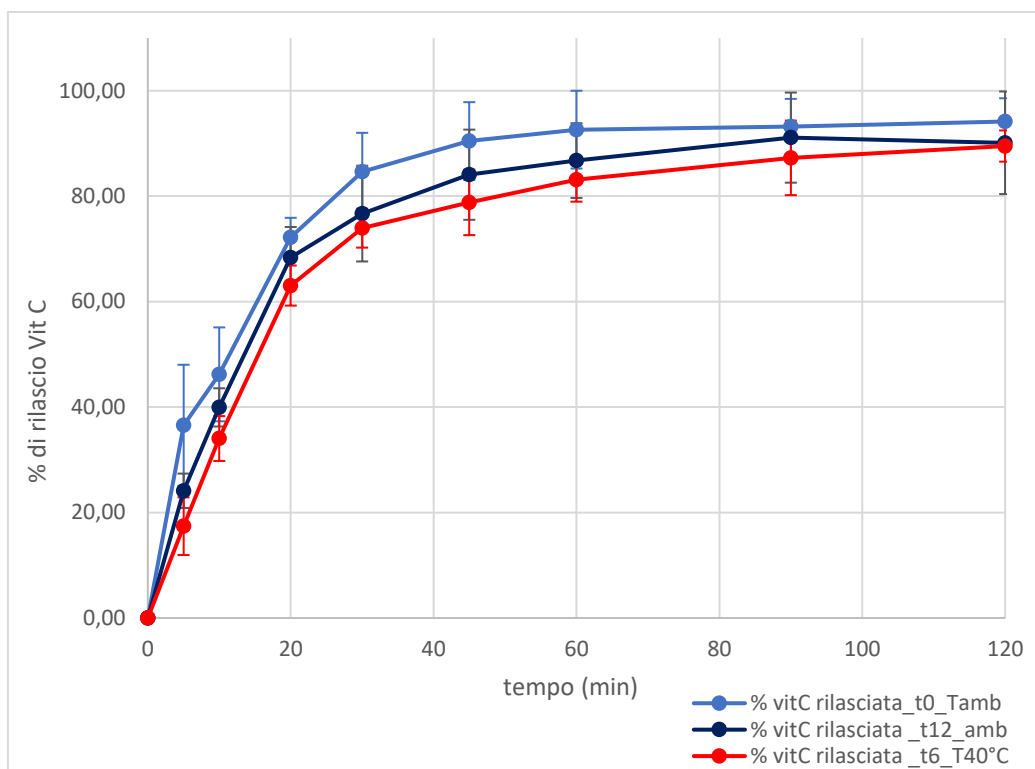


Figura 28. RILASCIO della VITAMINA C nell'integratore IMMUNOSTIMOLANTE (compresse non rivestite): Per l'INTEGRATORE 17 si riporta la sovrapposizione dei profili di rilascio ottenuti dalle compresse recentemente prodotte, compresse conservate a temperatura ambiente per 12 mesi e compresse conservate per 6 mesi a 40°C /75% RH.

Il calcolo del fattore **f2** con $n = 3$ (prelievi ai minuti: 10, 20 e 90), ha portato ai seguenti risultati:

- confronto tra cpr_t0_Tamb e cpr_t12_Tamb : **f2** = 67,3
- confronto tra cpr_t0_Tamb e $cpr_t6_40°C$: **f2** = 51,1
- confronto tra cpr_t12_Tamb e $cpr_t6_40°C$: **f2** = 64,2

In tutti i casi **f2** è maggiore di 50 e quindi i profili di dissoluzione possono essere considerati simili tra loro nelle tre condizioni testate.

Come si evince dal grafico (Fig.28), per l'INTEGRATORE 17 il passaggio in soluzione della vitamina C è stato ottimale ed è risultato piuttosto rapido in tutte le compresse analizzate.

In questo caso, il profilo di dissoluzione risulta anche in linea con le specifiche previste dalla Farmacopea Europea per i farmaci in compressa a rilascio convenzionale. Tale specifica, infatti, prevede che l'80% del principio attivo passi in soluzione entro 45 minuti e viene rispettata da tutte le compresse prese in esame per l'INTEGRATORE 17.

Sulla base dei dati ottenuti, inoltre, il profilo di dissoluzione è risultato stabile durante l'invecchiamento del prodotto. Non emergono variazioni significative anche considerando i risultati dalle compresse conservate per 6 mesi a 40°C /75% RH, che dovrebbero mimare in breve tempo il comportamento che potrebbe avere il prodotto a fine vita sullo scaffale.

5.3.3 L'INTEGRATORE 24 (comprese energizzanti a rilascio modificato) dimostra un profilo di dissoluzione conforme all'atteso e stabile durante la shelf-life

L'INTEGRATORE 24 (comprese energizzanti non rivestite a rilascio modificato), è una compressa bi-strato: è formato da uno strato definito *fast*, a rilascio più rapido, e uno strato *slow*, a rilascio lento. È stato formulato in modo da rilasciare almeno il 40% della vitamina C presente entro 45 minuti e il restante 60% in 8 ore di dissoluzione.

La prova di dissoluzione è stata eseguita in ambiente acido (HCl 0,03 M, pH $2\pm 0,05$) per due ore e in tampone fosfato (pH $6,8\pm 0,05$) per ulteriori quattro ore.

Per costruire il profilo di dissoluzione sono stati eseguiti i prelievi a 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 e 360 minuti e sono stati sommati i milligrammi di principio attivo rilasciati nella fase in tampone a quelli rilasciati precedentemente in acido. Tutte le compresse analizzate hanno mostrato un rilascio di vitamina C conforme alle specifiche attese sopra riportate. Per questo integratore di riferimento sono stati confrontati i profili di rilascio ottenuti da:

- compresse appena prodotte a temperatura ambiente (*cpr_t0_Tamb*)
- compresse conservate a temperatura ambiente per 30 mesi (*cpr_t30_Tamb*)
- compresse conservate per 6 mesi a 40°C /75% RH (*cpr_t6_40°C*)

In ciascun caso sono state analizzate parallelamente tre compresse ed è stato considerato il profilo di rilascio ottenuto dalla media dei dati. L'errore assoluto rappresentato nel seguente grafico (Fig.29) dalle barre di errore, è stato calcolato determinando la semidispersione massima.

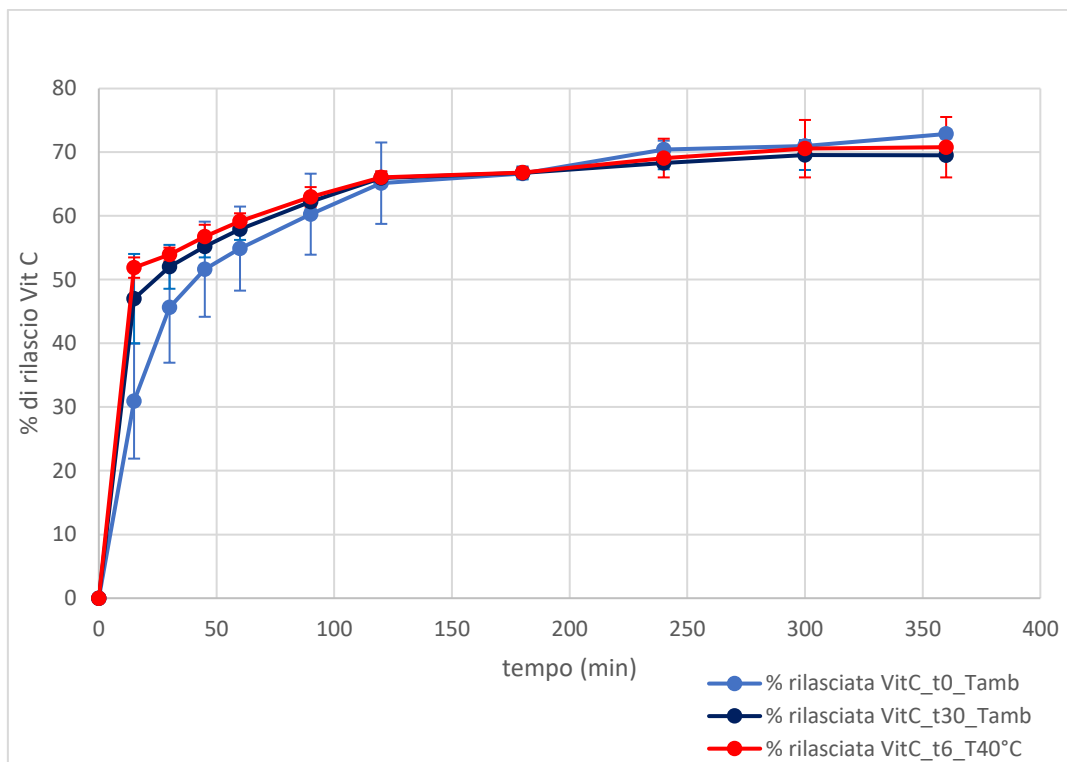


Figura 29. RILASCIO della VITAMINA C nell'integratore ENERGETICO a RILASCIO MODIFICATO: Per l'INTEGRATORE 24 si riporta la sovrapposizione dei profili di rilascio ottenuti dalle compresse appena prodotte a temperatura ambiente, dalle compresse conservate a temperatura ambiente per 30 mesi e dalle compresse conservate per 6 mesi a 40°C/75% RH.

Il calcolo del fattore **f2** con $n = 4$ (prelievi ai minuti: 30, 60, 120 e 360), ha portato ai seguenti risultati:

- confronto tra *cpr_t0_Tamb* e *cpr_t30_Tamb*: **f2** = 69,8
- confronto tra *cpr_t0_Tamb* e *cpr_t6_40°C*: **f2** = 65,6
- confronto tra *cpr_t30_Tamb* e *cpr_t6_40°C*: **f2** = 89,0

In tutti i casi **f2** è maggiore di 50 e quindi i profili di dissoluzione possono essere considerati simili tra loro nelle tre condizioni testate.

Le prove di dissoluzione eseguite hanno avuto una durata massima di sei ore e hanno permesso di verificare la conformità del rilascio della vitamina C dello strato *fast* in tutti i casi testati (> 40% entro 45 minuti). Al termine della prova di dissoluzione, il rilascio è stato circa del 70% e risulta in linea con il dato atteso in 6 ore, considerando che, per ragioni legate al tempo necessario per eseguire la prova, non è stato possibile continuare l'analisi per un totale di 8 ore.

Sulla base dei risultati raccolti, i profili di rilascio si sono mantenuti stabili nel tempo e quello ottenuto dalle compresse conservate per 6 mesi a 40°C/75% RH è risultato in linea con il prodotto a fine vita. Pertanto, per questo integratore di riferimento, lo studio di stabilità "accelerata" risulta effettivamente predittivo del risultato riportato dalle compresse a fine validità.

5.3.4 L'INTEGRATORE 3 (compresse drenanti rivestite) dimostra un profilo di dissoluzione inferiore all'atteso e variabile durante la shelf-life

Nel caso dell'INTEGRATORE 3 (compresse drenanti rivestite), la prova di dissoluzione è stata eseguita in ambiente acido (HCl 0,03 M, pH $2\pm 0,05$) per due ore e in tampone fosfato (pH $6,8\pm 0,05$) per ulteriori tre ore.

Per costruire il profilo di rilascio durante l'intera dissoluzione, sono stati sommati i milligrammi di principio attivo rilasciati nella fase in tampone a quelli rilasciati precedentemente in acido.

Le compresse recentemente prodotte hanno mostrato, al termine della prova, un rilascio intorno al 60% della vitamina C attesa.

Per questo integratore di riferimento sono stati confrontati i profili di rilascio ottenuti da:

- compresse appena prodotte a temperatura ambiente (*cpr_t0_Tamb*)
- compresse conservate a temperatura ambiente per 24 mesi (*cpr_t24_Tamb*)
- compresse conservate per 6 mesi a 40°C /75% RH (*cpr_t6_40°C*)

In ciascun caso sono state analizzate parallelamente tre compresse ed è stato considerato il profilo di rilascio ottenuto dalla media dei dati. L'errore assoluto rappresentato nel seguente grafico (Fig.30) dalle barre di errore, è stato calcolato determinando la semidispersione massima.

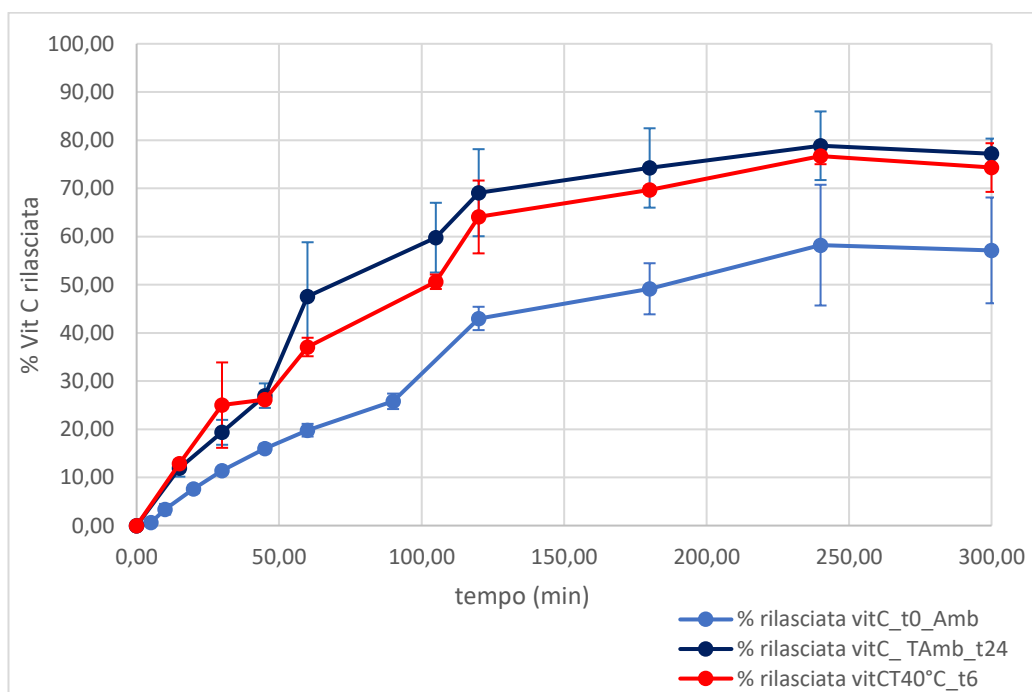


Figura 30. RILASCIO della VITAMINA C nell'integratore DRENANTE (compresse rivestite): Per l'INTEGRATORE 3 si riporta la sovrapposizione dei profili di rilascio ottenuti dalle compresse appena prodotte a temperatura ambiente, dalle compresse conservate a temperatura ambiente per 24 mesi e dalle compresse conservate per 6 mesi a 40°C /75% RH.

Il calcolo del fattore **f2** con $n = 4$ (prelievi ai minuti: 30, 60, 120 e 300), ha portato ai seguenti risultati:

- confronto tra cpr_t0_Tamb e cpr_t24_Tamb : **f2** = 33,0
- confronto tra cpr_t0_Tamb e $cpr_t6_40^{\circ}C$: **f2** = 37,8
- confronto tra cpr_t24_Tamb e $cpr_t6_40^{\circ}C$: **f2** = 58,7

Dai valori di **f2** ottenuti, si può dedurre che c'è una differenza significativa tra i profili delle compresse appena prodotte e le compresse conservate per 24 mesi a temperatura ambiente. Anche le compresse sottoposte allo studio di stabilità per 6 mesi a 40°C /75% RH hanno mostrato un profilo di rilascio diverso rispetto alle compresse appena prodotte.

Il profilo delle compresse conservate per 24 mesi a temperatura ambiente è invece risultato simile a quello delle compresse conservate per 6 mesi a 40°C /75% RH. Inoltre, durante la dissoluzione, le compresse recentemente prodotte si sono mantenute più compatte rispetto agli altri casi testati (Fig.31 e Fig.32).

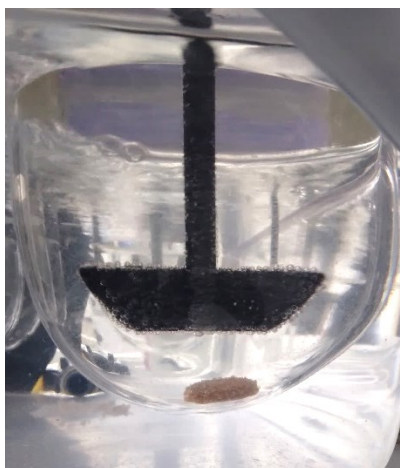


Figura 31. È possibile vedere la compressa cpr_t0_Tamb dopo 2 ore di dissoluzione in HCl 0,03 M, pH $2\pm 0,05$. La compressa si presenta ancora molto compatta.

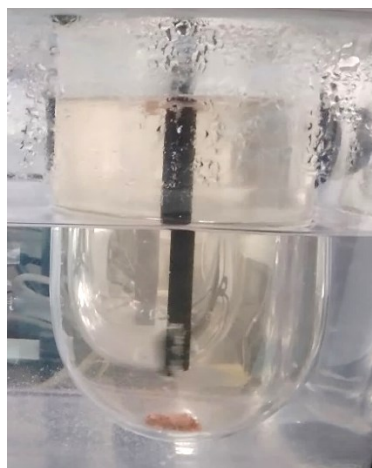


Figura 32. È possibile vedere la compressa $t24_Tamb$ dopo 2 ore di dissoluzione in HCl 0,03 M, pH $2\pm 0,05$. La compressa si presenta con una consistenza molle.

Il profilo del dell'INTEGRATORE 3 appena prodotto non è risultato ottimale perché al termine del saggio di dissoluzione, condotto per cinque ore, il rilascio del principio attivo è risultato inferiore al 60% dell'atteso ed è risultato anche significativamente diverso da quello ottenuto dalle stesse compresse conservate per 24 mesi a temperatura ambiente.

Visto il risultato insolito, lo studio di queste compresse è stato approfondito con ulteriori prove (Rif. par. 5.4.).

5.3.5 L'INTEGRATORE 23 (compresse drenanti non rivestite) dimostra un profilo di dissoluzione conforme all'atteso e stabile durante la shelf-life

Nel caso dell'INTEGRATORE 23 (compresse drenanti non rivestite), la prova di dissoluzione è stata eseguita solo in ambiente acido (HCl 0,03 M, pH=2 ± 0,05), poiché al termine delle due ore, le compresse risultavano completamente disaggregate.

Tutte le compresse prese in esame hanno mostrato, al termine della prova, il rilascio di circa il 100% della vitamina C attesa.

Per questo integratore di riferimento sono stati confrontati i profili di rilascio ottenuti da:

- compresse appena prodotte a temperatura ambiente (*cpr_t0_Tamb*)
- compresse conservate a temperatura ambiente per 6 mesi (*cpr_t6_Tamb*)
- compresse conservate per 6 mesi a 40°C /75% RH (*cpr_t6_40°C*)

In ciascun caso sono state analizzate parallelamente tre compresse ed è stato considerato il profilo di rilascio ottenuto dalla media dei dati. L'errore assoluto rappresentato nel seguente grafico (Fig.33) dalle barre di errore, è stato calcolato determinando la semidispersione massima.

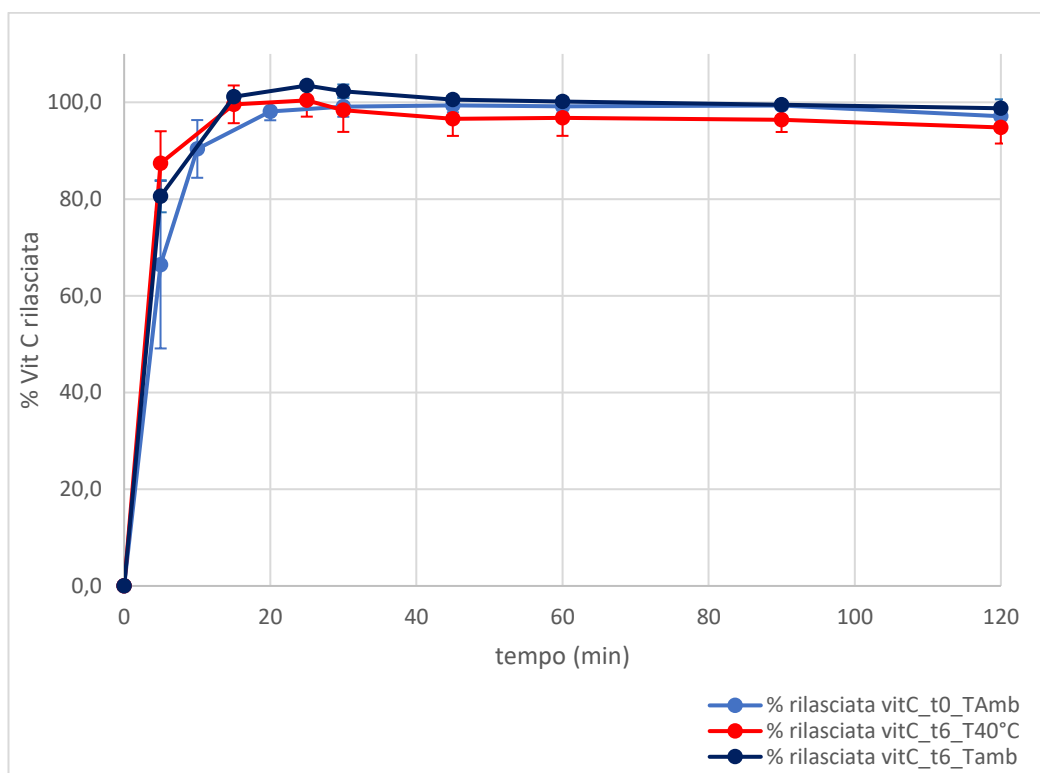


Figura 33. RILASCIO della VITAMINA C nell'integratore DRENANTE (compresse non rivestite): Per l'INTEGRATORE 23 si riporta la sovrapposizione dei profili di rilascio ottenuti dalle compresse appena prodotte a temperatura ambiente, dalle compresse conservate a temperatura ambiente per 6 mesi e dalle compresse conservate per 6 mesi a 40°C /75% RH.

In questo caso i profili non sono stati confrontati attraverso il calcolo del fattore di similarità f_2 perché la quantità totale del principio attivo disciolto entro 15 minuti è risultata $\geq 85\%$ e di conseguenza, si può concludere che i profili di dissoluzione sono simili senza il calcolo di f_2 (Rif. par. 4.2.5).

Per l'INTEGRATORE 23, il passaggio in soluzione della vitamina C è stato ottimale ed è risultato molto rapido, con un rilascio intorno al 100% entro 20 minuti in tutte le compresse analizzate. Risultato, dunque, che risulta anche conforme alle specifiche che sarebbero previste dalla Farmacopea Europea per le compresse a rilascio convenzionale.

Sulla base dei dati ottenuti, il profilo di dissoluzione è risultato stabile durante la conservazione delle compresse a temperatura ambiente e non emergono variazioni significative anche considerando i dati ottenuti dalle compresse conservate per 6 mesi a 40°C /75% RH.

5.4 Ulteriori prove di dissoluzione sull'INTEGRATORE 3 (compresse drenanti rivestite) hanno confermato un rilascio non ottimale

Nel caso dell'INTEGRATORE 3, a seguito di un profilo di rilascio non ottimale ottenuto mediante il saggio di dissoluzione, sono state effettuate delle ulteriori prove di dissoluzione sulle compresse recentemente prodotte.

a. DISSOLUZIONE eseguita sul NUCLEO dell'INTEGRATORE 3

È stata eseguita una prova di dissoluzione su una compressa costituita dal solo nucleo, quindi priva di rivestimento, per valutare se la presenza del rivestimento (composto da: HPC, HPMC, talco, glicerolo e carbonato di calcio) potesse essere in grado di variare il profilo di rilascio del principio attivo.

La prova di dissoluzione è stata eseguita in ambiente acido (HCl 0,03 M, pH $2\pm 0,05$) per due ore e in tampone fosfato (pH $6,8\pm 0,05$) per ulteriori quattro ore.

Per costruire il profilo di rilascio durante l'intera dissoluzione, sono stati sommati i milligrammi di principio attivo rilasciati nella fase in tampone a quelli rilasciati precedentemente in acido (Fig.34).

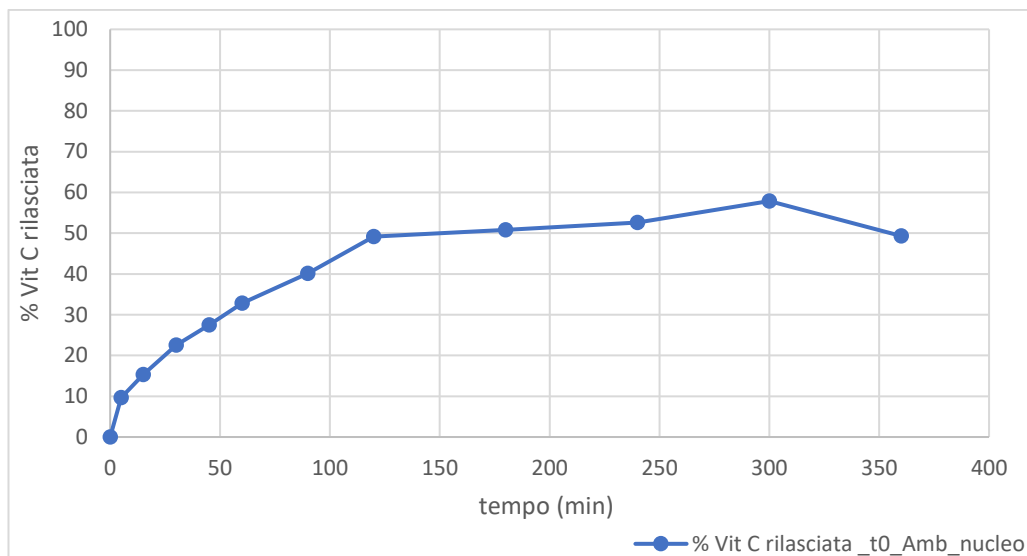


Figura 34. RILASCIO della VITAMINA C nel NUCLEO dell'INTEGRATORE 3: Profilo di rilascio ottenuto dal nucleo (privo di rivestimento) di una compressa dell'INTEGRATORE 3 appena prodotta. Non sono presenti barre di errore in quanto il profilo di dissoluzione è stato costruito con i risultati della prova eseguita su una singola compressa.

Il profilo di dissoluzione della compressa costituita dal solo nucleo è risultato in linea con quello ottenuto dalla compressa tal quale (con il rivestimento) appena prodotta a temperatura ambiente. Di conseguenza si deduce che non è il rivestimento a determinare un rilascio non ottimale del principio attivo.

b. DISSOLUZIONE eseguita sulla POLVERE dell'INTEGRATORE 3 macinato

La dissoluzione è stata eseguita anche su una compressa tal quale (con il rivestimento), macinata e resa polvere, per verificare che la vitamina C presente nella compressa riuscisse a passare totalmente in soluzione nel mezzo di dissoluzione.

La prova di dissoluzione è stata eseguita in ambiente acido (HCl 0,03 M, pH 2±0,05) per sei ore.

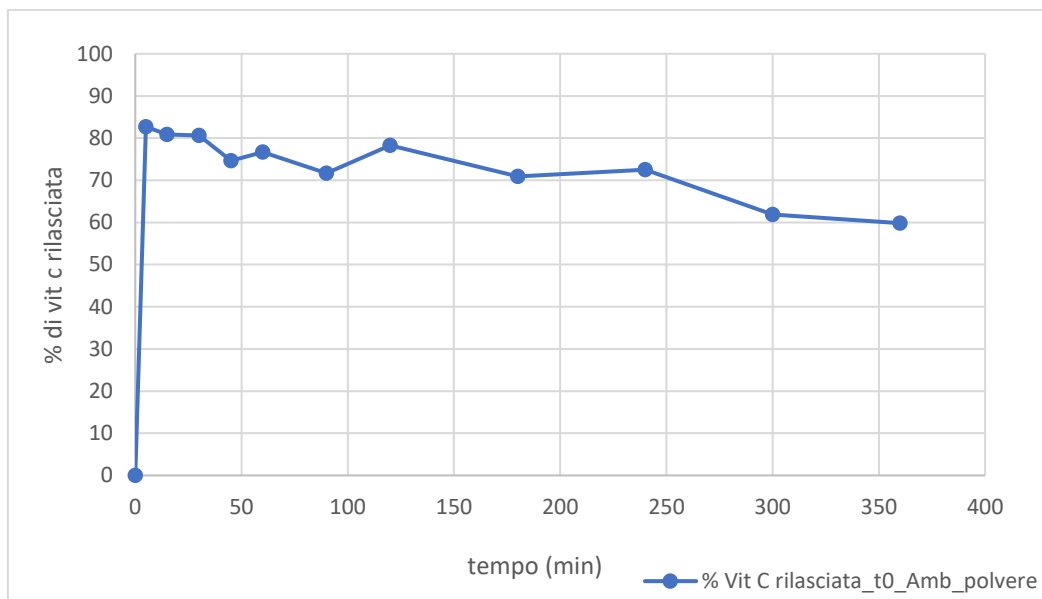


Figura 35. RILASCIO della VITAMINA C nell'INTEGRATORE 3 macinato: Profilo di rilascio ottenuto dalla polvere di una compressa tal quale (con rivestimento) dell'INTEGRATORE 3 appena prodotta e macinata. Nel grafico non sono presenti barre di errore in quanto il profilo di dissoluzione è stato costruito con i risultati di una prova eseguita su una singola compressa.

Il profilo di dissoluzione in questo caso mostra un rilascio immediato del principio attivo, già superiore all'80% al primo prelievo effettuato dopo 5 minuti. Ai successivi prelievi si rileva un andamento piuttosto instabile che mostra una leggera diminuzione del titolo, sceso al 60% di rilascio, al termine delle sei ore (Fig.35).

Tenendo conto dell'incertezza analitica legata soprattutto alla fase di macinazione della compressa e successivo trasferimento nella provetta del dissolutore, la vitamina C presente nella compressa è riuscita a passare in soluzione quasi interamente.

Dalle analisi preliminari eseguite, il rilascio non ottimale rilevato nella compressa appena prodotta dell'INTEGRATORE 3 (Rif. par. 5.3.4) è sembrato dipendere dalla forma farmaceutica (ovvero compressa) che si è mantenuta molto compatta, ostacolando il rilascio del principio attivo.

Più elementi potrebbero aver contribuito a questo risultato. Come discusso in merito ai risultati delle prove di disaggregazione, la rapidità con cui una compressa si disintegra, permettendo il passaggio in soluzione del principio attivo, può dipendere da diversi aspetti, tra cui la sua composizione (Rif. par. 5.1.1). Analizzando gli ingredienti che compongono l'INTEGRATORE 3, si nota che presenta diversi estratti vegetali: il principale ingrediente è la Centella e.s. (per l'apporto di terpeni) che rappresenta il 13% della compressa e risulta insolubile in acqua; in quantitativi minori sono presenti anche Vite e.s., Ortosifon e.s. e Ginko biloba e.s. È evidente quindi, che la presenza di queste materie prime vada a determinare la formazione di una matrice complessa e poco solubile, che può contribuire a rallentare il processo di disaggregazione e, conseguentemente, il

passaggio in soluzione del principio attivo. Inoltre, è da tener presente che in questo integratore il quantitativo di vitamina C presente è molto basso (20 mg, pari al 1,7% della compressa): si può ipotizzare che la molecola rimanga quindi in parte trattenuta dalla massa della compressa che non si disaggrega completamente nel corso della dissoluzione. A questo, va aggiunto anche il fattore di incertezza analitica che aumenta considerando il basso dosaggio del principio attivo rispetto al volume del mezzo di dissoluzione e al numero dei prelievi che vengono eseguiti.

5.5 Risultati della prova di confronto tra disaggregazione e dissoluzione

Come ulteriore passo, per gli integratori di riferimento che hanno mostrato un rilascio non completo del principio attivo (INTEGRATORI 3, 6, 24), è stata valutata una possibile relazione presente tra il saggio di disaggregazione e il saggio di dissoluzione, per indagare se la simulazione dei movimenti peristaltici, realizzata dal disaggregatore, potesse essere in grado di modificare il profilo di rilascio del principio attivo dalle compresse (Nickerson B. et al., 2018).

È stato quindi costruito il profilo di rilascio della vitamina C durante la disaggregazione, usando come mezzo di disaggregazione il medesimo fluido gastrico simulato (HCl 0,03 M, pH $2\pm 0,05$) usato per la dissoluzione.

La prova è stata eseguita sui seguenti integratori di riferimento:

- integratore a beneficio drenante, rivestito (INTEGRATORE 3)
- integratore immunostimolante, rivestito (INTEGRATORE 6)
- integratore energizzante a rilascio modificato (INTEGRATORE 24)

Tutti i casi analizzati hanno dimostrato il completo rilascio del principio attivo al termine della disaggregazione e un profilo di rilascio molto più rapido rispetto a quello ottenuto mediante la dissoluzione.

5.5.1 L'INTEGRATORE 3 (compresse drenanti rivestite) mostra un rilascio ottimale durante il saggio di disaggregazione

Nel caso dell'INTEGRATORE 3 (compresse drenanti rivestite), che non aveva mostrato un profilo di dissoluzione ottimale (Rif. par. 5.3.4), è stata svolta la prova di disaggregazione per un'ora, durante la quale sono stati eseguiti 5 prelievi dal mezzo di disaggregazione, rispettivamente a 5, 15, 30, 45, 60 minuti. La prova è stata eseguita su compresse fresche, appena prodotte.

Sono state analizzate parallelamente due compresse ed è stato considerato il profilo di rilascio del principio attivo ottenuto dalla media dei dati. L'errore assoluto rappresentato nel seguente grafico (Fig.36) dalle barre di errore, è stato calcolato determinando la semidispersione massima.

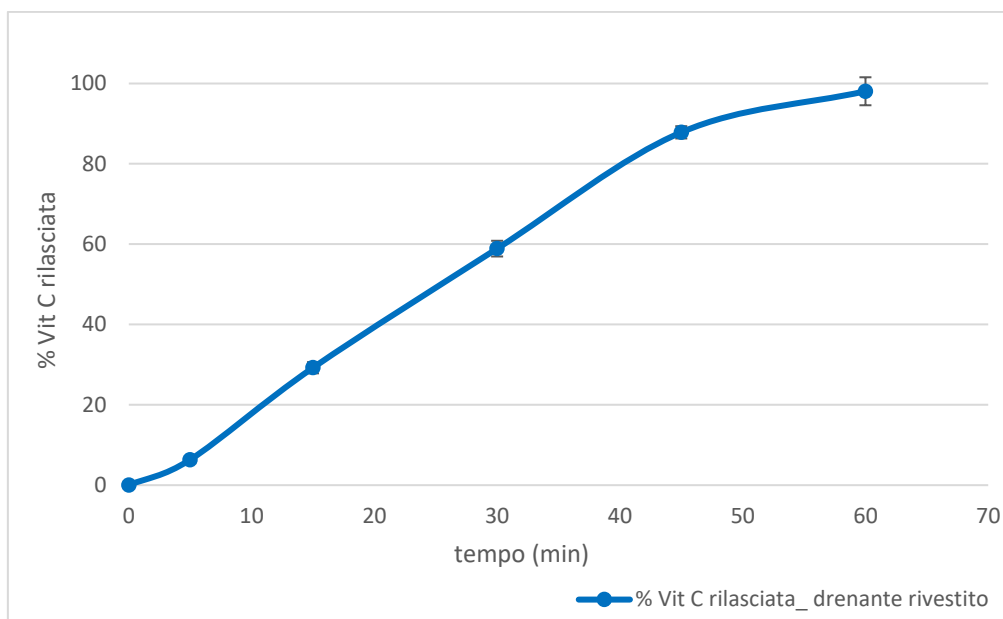


Figura 36. RILASCIO della VITAMINA C nell'integratore DRENANTE (compresse rivestite): Profilo di rilascio della vitamina C in compresse appena prodotte dell'INTEGRATORE 3 durante il saggio di disaggregazione, svolto in ambiente acido per un'ora.

La prova ha dimostrato un rilascio del principio attivo pari al 100% in un'ora. La disaggregazione delle compresse si è verificata tra i 45 e i 60 minuti.

Questo risultato, posto in confronto con il profilo di rilascio ottenuto dalle stesse compresse durante la prova di dissoluzione (Rif. par. 5.3.4), ha fatto emergere due aspetti significativi: da un lato, tutta la vitamina C presente nelle compresse non è ostacolata al passaggio in soluzione a disaggregazione completa; dall'altro, la simulazione dei movimenti peristaltici effettuata dal disaggregatore sembra indispensabile per permettere alla compressa di disaggregarsi e rilasciare efficacemente il principio attivo.

5.5.2 L'INTEGRATORE 6 (compresse immunostimolanti rivestite) mostra un rilascio ottimale durante il saggio di disaggregazione

Nel caso dell'INTEGRATORE 6 (compresse immunostimolanti rivestite), è stata svolta la prova di disaggregazione per un'ora, durante la quale sono stati eseguiti 5 prelievi dal mezzo di disaggregazione rispettivamente a 5, 15, 30, 45, 60 minuti. La prova è stata eseguita su compresse conservate per 3 mesi a temperatura ambiente.

Sono state analizzate parallelamente due compresse ed è stato considerato il profilo di rilascio ottenuto dalla media dei dati. L'errore assoluto rappresentato nel seguente grafico (Fig.37) dalle barre di errore, è stato calcolato determinando la semidisersione massima.

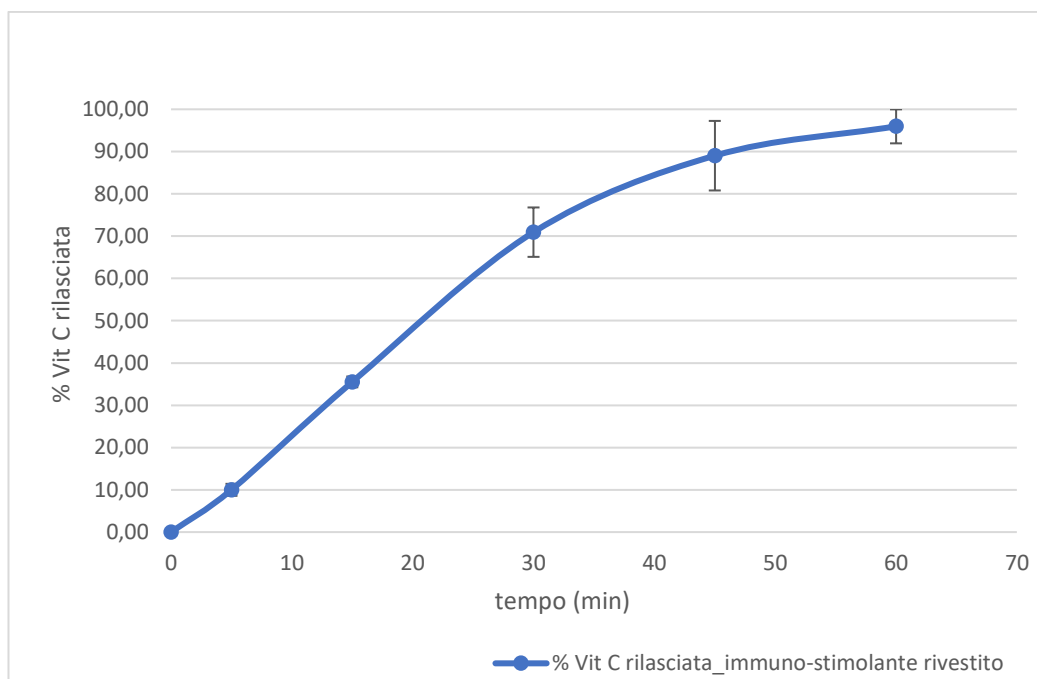


Figura 37. RILASCIO della VITAMINA C nell'integratore IMMUNOSTIMOLANTE (compresse rivestite): Profilo di rilascio della vitamina C in compresse (INTEGRATORE 6) conservate per 3 mesi a temperatura ambiente, durante il saggio di disaggregazione svolto in ambiente acido.

Il profilo di rilascio ottenuto durante la disaggregazione ha mostrato un andamento più rapido rispetto a quello emerso dalla prova di dissoluzione (Rif. par. 5.3.1).

Si può dedurre, anche in questo caso, che la simulazione dei movimenti peristaltici abbia permesso una efficace disaggregazione della compressa, avvenuta tra i 45 e i 60 minuti, con conseguente rapido passaggio in soluzione di tutta la vitamina C presente.

5.5.3 L'INTEGRATORE 24 (compresse energizzanti a rilascio modificato) mostra un rilascio ottimale durante il saggio di disaggregazione

Nel caso dell'INTEGRATORE 24 (compresse energizzanti a rilascio modificato), è stata svolta la prova di disaggregazione per un'ora, durante la quale sono stati eseguiti 5 prelievi dal mezzo di disaggregazione rispettivamente a 5, 15, 30, 45, 60 minuti. La prova è stata eseguita su compresse appena prodotte con l'obiettivo di verificare che tutta la vitamina C presente riuscisse a passare in soluzione.

Sono state analizzate parallelamente due compresse ed è stato considerato il profilo di rilascio ottenuto dalla media dei dati. L'errore assoluto rappresentato nel seguente grafico (Fig.38) dalle barre di errore, è stato calcolato determinando la semidispersione massima.

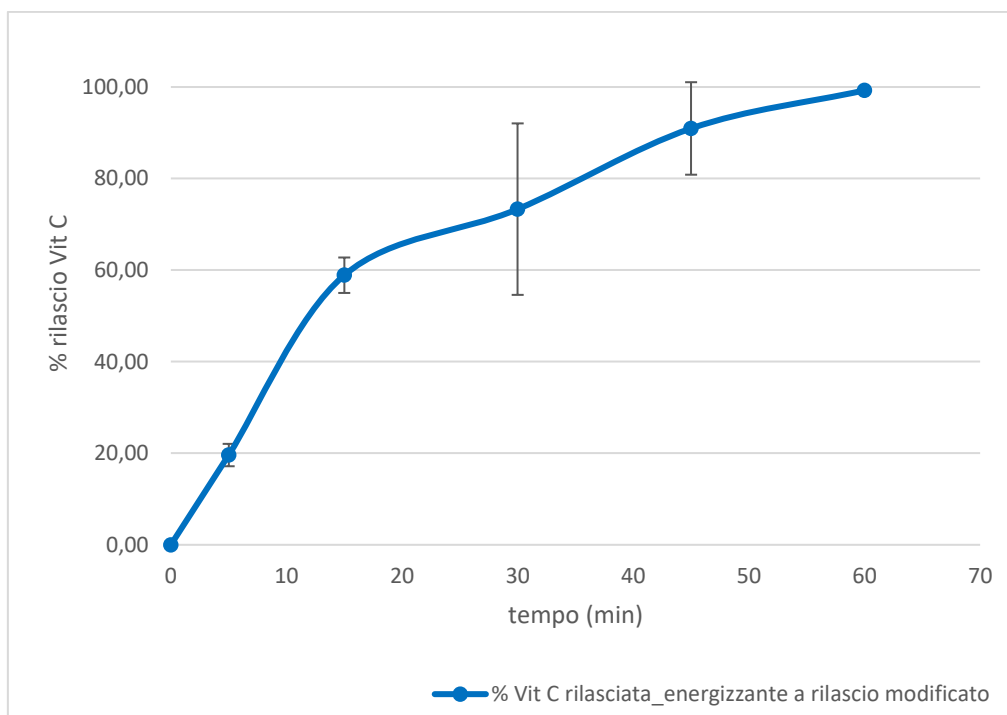


Figura 38. RILASCIO della VITAMINA C nell'integratore ENERGIZZANTE a rilascio modificato: Profilo di rilascio della vitamina C in compresse (INTEGRATORE 24) appena prodotte a temperatura ambiente, durante il saggio di disaggregazione svolto in ambiente acido.

La prova di disaggregazione, a differenza di quanto emerso dal saggio di dissoluzione (Rif. par. 5.3.3), ha dimostrato, al termine di 60 minuti, la completa disaggregazione delle compresse e il completo rilascio della vitamina C presente. L'andamento del profilo, inoltre, è risultato più rapido, confermando anche in questo caso, che la variazione apportata dalla simulazione dei movimenti peristaltici favorisce e accelera il rilascio del principio attivo.

Complessivamente, confrontando i profili di rilascio della vitamina C ottenuti mediante il saggio di dissoluzione e di disaggregazione, emerge che quest'ultimo potrebbe essere più indicato per lo studio del rilascio del principio attivo in alcune tipologie di integratore, in particolare, per le compresse rivestite e per la compressa non rivestita a rilascio modificato.

In questi casi, infatti, le compresse non si sono disintegrate completamente durante il saggio di dissoluzione e, pertanto, si ipotizza che il principio attivo possa risultare in parte ostacolato a passare in soluzione con conseguente sottostima della sua rilevazione. Ecco che, in questi casi la peristalsi che viene simulata mediante il disaggregatore risulta efficace nel disintegrare completamente la compressa con conseguente completo rilascio del principio attivo nel mezzo.

6. Conclusioni

Con il raggiungimento di un pubblico via via sempre maggiore, per gli operatori del settore alimentare si è reso necessario affinare la tipologia di controlli a cui sottoporre gli integratori alimentari, al fine di poter garantire prodotti con elevati standard di qualità e sicurezza.

La tutela del consumatore è, infatti, il punto cardine e la legislazione in tal senso è in continua evoluzione. Nel mese di aprile 2022, ad esempio, è stata pubblicata una circolare ministeriale in cui si invitano gli operatori del settore alimentare a monitorare il parametro di disaggregazione delle compresse prodotte, ovvero la capacità delle stesse a disintegrarsi, permettendo il passaggio in soluzione dei principi attivi contenuti. Nella circolare viene tuttavia sottolineato un limite del saggio di disaggregazione, ovvero l'ambito di applicazione: il test, descritto nel testo della Farmacopea Europea, viene solitamente eseguito sulle formulazioni farmaceutiche che devono sottostare a specifiche ben definite. Tali specifiche, tuttavia, possono fungere solo da linea guida per l'integratore alimentare, che spesso, per la complessità delle materie prime presenti nella formula e la derivazione naturale delle stesse, presenta una matrice molto complessa.

L'azienda UNIFARCO commercializza integratori alimentari sia in Italia che all'estero: la formulazione e la scelta delle materie prime viene effettuata accuratamente da reparti specializzati interni all'azienda mentre la produzione dei lotti di vendita viene affidata ad aziende specializzate del settore alimentare.

L'azienda, da sempre attenta alla qualità ed alla sicurezza dei prodotti, ha deciso di effettuare un'indagine sugli integratori alimentari che commercializza, ripetendo anche internamente le prove di disaggregazione che spesso vengono effettuate dall'azienda terzista che li produce. Inoltre, per gli integratori alimentari in compressa contenenti la vitamina C come principio attivo, ha deciso di accoppiare anche il saggio di dissoluzione, al fine di verificare l'effettiva solubilizzazione del principio attivo ed il corretto rilascio dello stesso.

Con il presente lavoro di Tesi, svolto presso il laboratorio controllo qualità di UNIFARCO, sono stati pertanto indagati i tempi di disaggregazione di tutti gli integratori alimentari in forma di compressa commercializzati dall'azienda. Per tale scopo sono stati analizzati innanzitutto campioni derivanti da lotti di recente produzione (lotti freschi) al fine sia di confermare il dato analitico presentato nel documento di rilascio emesso dall'azienda produttrice, sia di verificare la correttezza della specifica assegnata in fase di definizione del prodotto.

Poiché gli integratori alimentari presentano validità a scaffale anche di diversi anni, al fine di garantire un prodotto di qualità fino al termine della scadenza, in azienda vengono sempre condotti i cosiddetti "studi di stabilità" che, ponendo gli integratori alimentari nel loro packaging di vendita in diverse condizioni di temperatura e umidità, permettono, mediante analisi condotte a tempi di controllo prestabiliti, la verifica di eventuali cambiamenti quali-quantitativi. Lo scopo di tali studi è volto ad avere una conoscenza del prodotto sottoposto ad invecchiamento e, di conseguenza, permette di valutare la necessità di eventuali

ritocchi formulativi, di eventuali modifiche nella tipologia di packaging e permette di assegnare una corretta validità al prodotto.

Con il presente lavoro si è deciso, pertanto, di sottoporre al test di disaggregazione anche campioni di integratore alimentare derivanti da lotti invecchiati negli studi di stabilità sopra esposti al fine di valutare l'andamento del parametro nel tempo. Alla luce dei risultati ottenuti dal saggio di disaggregazione, si può affermare che tutti gli integratori in compressa commercializzati da UNIFARCO hanno superato positivamente la prova di disaggregazione, confermando un tempo di disaggregazione che rispetta le specifiche previste in fase di formulazione e definite dai reparti di competenza sulla base della natura chimica dei principi attivi selezionati, dei quantitativi inseriti, dei processi tecnologici di produzione, della natura del rivestimento e del processo produttivo stesso.

In particolare, tutti i campioni derivanti da lotti industriali di recente produzione hanno mostrato un tempo di disaggregazione conforme alle specifiche attese ed allineato al dato presentato dal produttore e riportato in certificato analitico.

Anche l'analisi delle compresse derivanti da lotti industriali sottoposti allo studio di stabilità ha mostrato la piena conformità alle specifiche: tutte le compresse analizzate hanno mostrato tempi di disaggregazione pressoché stabili anche in condizioni particolarmente stressanti (es. 40°C e 75% RH).

Con il presente lavoro di Tesi si è voluto, inoltre, eseguire un confronto tra i tempi di disaggregazione ottenuti con i tempi di disaggregazione previsti dalla Farmacopea Europea per i farmaci. Tale confronto ha fatto emergere che, in alcuni casi, i tempi di disaggregazione risultano maggiori per gli integratori. Tale disallineamento, tuttavia, viene accettato nell'ambito degli integratori alimentari in quanto, la presenza di diverse materie prime naturali spesso poco solubili in acqua come, ad esempio, l'estratto di Centella e di Curcuma longa o principi attivi insolubili in acqua come il coenzima Q10 e la melatonina, possono creare delle strutture altamente lipofile e difficilmente bagnabili dall'acqua presente nel mezzo di disaggregazione, andando conseguentemente a rallentare il processo di disaggregazione.

Pertanto, come sottolineato anche dalla circolare ministeriale, i dati riportati in Farmacopea Europea per la disaggregazione essendo riferiti ai farmaci, vanno intesi come valido punto di partenza per la definizione dei protocolli analitici di controllo da applicare agli integratori alimentari ma non vanno applicati come specifica cui attenersi in modo ferreo. Il tempo di disaggregazione caratteristico di ogni integratore alimentare, infatti, deve essere stabilito sulla base delle materie prime utilizzate, dei principi attivi apportati, dei quantitativi utilizzati e sulla presenza di particolari agenti di rivestimento introdotti al fine di modificare le modalità di rilascio dei principi attivi presenti nella compressa.

Al fine di valutare la possibilità che parametri fisici relativi alla fase di produzione influenzino il tempo di disaggregazione, con il presente studio è stata anche valutata l'ipotesi di una dipendenza diretta tra la durezza delle compresse degli integratori alimentari ed il tempo di disaggregazione. A tale fine è stata eseguita un'indagine statistica comparando i valori di durezza e il tempo di disaggregazione: dall'elaborazione dei dati non è emersa alcuna correlazione lineare all'interno dei casi analizzati. Tale assenza di correlazione lineare viene confermata anche da una

più approfondita ricerca in letteratura dalla quale è emerso che esistono diversi aspetti, sia durante la scelta della formulazione che nei processi di lavorazione, che rendono le due variabili indipendenti l'una dall'altra.

Parallelamente al saggio di disaggregazione, con il presente lavoro sono stati indagati anche i profili di dissoluzione della vitamina C in cinque integratori alimentari in forma di compressa commercializzati dall'azienda.

Come per il saggio di disaggregazione, anche per il test di dissoluzione esiste una descrizione in Farmacopea Europea e, parallelamente alla disaggregazione, anche tale test viene di norma eseguito sulle preparazioni farmaceutiche al fine di garantire il rilascio ottimale del principio attivo.

Poiché in letteratura non esistono protocolli univoci per l'esecuzione del saggio di dissoluzione, in un primo momento si sono rese necessarie delle prove atte alla messa a punto del metodo.

I cinque prodotti selezionati e sottoposti ad analisi sono da intendersi come rappresentativi delle seguenti categorie: integratore alimentare in compressa rivestita, non rivestita e non rivestita a rilascio controllato. Sono stati analizzati sia campioni derivanti da lotti industriali prodotti recentemente, che campioni derivanti da lotti industriali sottoposti a condizioni stressanti mediante lo studio di stabilità.

Dai dati ottenuti è emerso che il profilo di rilascio della vitamina C per i lotti di compresse prodotti recentemente risulta molto rapido per le compresse di integratore non rivestite, le stesse che avevano mostrato un tempo di disaggregazione inferiore ai 15 minuti; la cinetica di rilascio risulta, invece, più lenta per le compresse di integratore rivestite e per l'integratore a rilascio controllato: entrambi gli integratori di riferimento avevano mostrato un tempo di disaggregazione più lungo, compreso in media tra i 45 e i 60 minuti.

I profili di dissoluzione si sono mantenuti stabili anche per i campioni derivanti dagli studi di stabilità, permettendo dunque di dimostrare che il profilo di rilascio della vitamina C si mantiene conforme all'atteso anche durante l'invecchiamento del prodotto.

Gli integratori in compressa non rivestiti mostrano una percentuale di rilascio della vitamina C pari al 100% dell'atteso dalla formula, mentre gli integratori in compressa rivestiti mostrano una percentuale di rilascio leggermente inferiore.

Nel caso di un integratore (INTEGRATORE 3), al termine della dissoluzione si poteva notare una compressa non del tutto disaggregata. Al fine di capire la causa di tale comportamento sono state eseguite delle ulteriori prove.

Si ipotizzava, infatti, che il problema fosse legato alla tipologia di rivestimento utilizzato o ad un incompleto passaggio in soluzione della vitamina C a causa della composizione dell'integratore e/o a particolari interazioni tra il nucleo e il rivestimento della compressa.

La prova di dissoluzione eseguita solo sul nucleo (privo di rivestimento), ha confermato un profilo di rilascio non ottimale, escludendo quindi la possibilità che fosse il rivestimento ad interferire con il rilascio del principio attivo. Il profilo di dissoluzione della compressa macinata ha invece dimostrato il completo rilascio della vitamina C presente. Sulla base di questo risultato, è stato ipotizzato che il rilascio non ottimale ottenuto dalla compressa tal quale (intera e rivestita) fosse

dovuto al fatto che la compressa si mantenesse compatta nel corso della dissoluzione.

Al fine di verificare se, per le compresse rivestite, durante la prova di disaggregazione si raggiungesse un rilascio ottimale del principio attivo, è stata effettuata una prova di confronto tra il test di disaggregazione e il test di dissoluzione, dove è stato valutato il profilo di rilascio della vitamina C nel corso della disaggregazione. Dal risultato di questa analisi è stato rilevato un passaggio in soluzione della vitamina C pari al 100% dell'atteso.

Sulla base dei risultati ottenuti nell'INTEGRATORE 3, il saggio di disaggregazione, che simula la peristalsi del tratto digerente, sembrerebbe indispensabile per determinare il completo passaggio in soluzione del principio attivo, in quanto solo la completa disaggregazione della compressa permette il rilascio totale del principio attivo.

Poiché si tratta di prove preliminari, dovranno essere condotte ulteriori analisi a supporto di tale tesi.

Anche per l'INTEGRATORE 6 e l'INTEGRATORE 24, che hanno mostrato un profilo di dissoluzione più lento, è stato valutato il rilascio dell'attivo durante la disaggregazione. Anche in questo caso, la simulazione della peristalsi ha permesso un rilascio completo e molto più rapido.

Sulla base dei risultati ottenuti con il test di dissoluzione e con la valutazione del profilo di dissoluzione ottenuto mediante test di disaggregazione, in accordo con quanto suggerito dalle linee guida ICH Q6A, il test di disaggregazione potrebbe risultare più efficace anche per la valutazione del profilo di rilascio del principio attivo per le compresse rivestite (Gupta A. et al., 2009).

In conclusione, grazie al presente lavoro di tesi, è stato possibile colmare una lacuna relativa ai tempi di disaggregazione sugli integratori alimentari in compresse commercializzati da UNIFARCO ed approfondire il comportamento della disaggregazione analizzando compresse invecchiate in laboratorio e sottoposte agli studi di stabilità.

Grazie allo studio di dissoluzione è stato possibile avere informazioni più dettagliate sulla modalità di rilascio del principio attivo vitamina C e valutare l'andamento del profilo di dissoluzione nel tempo.

Tali risultati si mostrano inoltre significativi poiché, uniti ad altri studi interni all'azienda, permettono di affermare che monitorare il comportamento di lotti industriali sottoposti a condizioni stressanti quali, ad esempio, 40°C/75% umidità relativa, risulta predittivo del comportamento che i campioni dello stesso lotto mostrano durante l'invecchiamento in condizioni di conservazione standard, a temperatura ambiente.

I risultati ottenuti in questa Tesi confermano, dunque, la qualità degli integratori in compressa commercializzati da UNIFARCO testati che risultano conformi durante tutto il periodo di validità assegnato e, inoltre, pongono le basi per l'introduzione dei saggi di disaggregazione e dissoluzione nei protocolli aziendali di stabilità, contribuendo quindi ad assicurare ai consumatori prodotti ancora più sicuri e controllati.

7. Bibliografia

7.1 Referenze bibliografiche

- 1) Al-Gousous J, Langguth P. Oral Solid Dosage Form Disintegration Testing - The Forgotten Test. *J Pharm Sci.* 2015 Sep, 104 (9): 2664-75.
- 2) Almukainzi M, Salehi M, Araci Bou-Chacra N, Löbenberg R. Investigation of the performance of the disintegration test for dietary supplements. *AAPS J.* 2010 Dec, 12(4): 602-7.
- 3) Aulton ME, Taylor KMG. *Aulton's Pharmaceutics - The Design and Manufacture of Medicines.* Elsevier. 2018, 5(30): 533-535.
- 4) Azarmi S, Roa W, Löbenberg R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. *Int J Pharm.* 2007 Jan, 328(1): 12-21.
- 5) Carli F, Ceriani D, Frattini C, Gorlato P, Maffione G, Moro L, Neri G, Ciranni Signoretti E. Applicazione del saggio di dissoluzione nel controllo della biodisponibilità delle forme farmaceutiche solide orali. *Amm. Ist. Sup. Sanità.* 1982, 18(3): 551-558.
- 6) Cinotti E. Il Test del mese – Integratori ant colesterolo: stop al Far West. 2022 May: 10-23.
- 7) De Moraes Carvalho D, Pereira K, Robson T, Celso M J, de Moura J, Lopes Torres M C. Production, solubility and antioxidant activity of curcumin nanosuspension. *Food Science and Technology.* 2015, 35 (1): 115-19.
- 8) Graffner C. Regulatory aspects of drug dissolution from a European perspective. *Eur J Pharm Sci.* 2006 Nov, 29 (3-4): 288-93.
- 9) Gray VA. Power of the Dissolution Test in Distinguishing a Change in Dosage Form Critical Quality Attributes. *AAPS PharmSciTech.* 2018 Nov, 19(8): 3328-3332.
- 10) Gupta A, Hunt RL, Shah RB, Sayeed VA, Khan MA. Disintegration of highly soluble immediate release tablets: a surrogate for dissolution. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2009, 10(2): 495-9.
- 11) Limberg J, Potthast H. Regulatory status on the role of in vitro dissolution testing in quality control and biopharmaceutics in Europe. *Biopharm Drug Dispos.* 2013 Jul, 34(5): 247-53.

- 12) Markowiak P, Śliżewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*. 2017 Sep, 9(9): 1021.
- 13) Mayet-Cruz L, Rodríguez JM, Jung-Cook H. Development of a dissolution test for melatonin sublingual tablets using a factorial experimental design. *Farmacia*. 2021, 69(1): 169-173.
- 14) Mizumoto T, Masuda Y, Yamamoto T, Yonemochi E, Terada K. Formulation design of a novel fast-disintegrating tablet. *Int J Pharm*. 2005 Dec 8;306(1-2):83-90.
- 15) Nickerson B, Kong A, Gerst P, Kao S. Correlation of dissolution and disintegration results for an immediate-release tablet. *J Pharm Biomed Anal*. 2018 Feb, 150: 333-340.

7.2 Risorse online

- 1) <https://theory.labster.com/>
- 2) <https://www.thermofisher.com/>

7.3 Normativa

- 1) Decreto Legislativo 21 maggio 2004, n. 169. Attuazione della direttiva 2002/46/CE relativa agli integratori alimentari.
- 2) Decreto ministeriale 10 agosto 2018. "Disciplina dell'impiego negli integratori di sostanze e preparati vegetali".
- 3) Direttiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 10 giugno 2002, per il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative agli integratori alimentari.
- 4) European Pharmacopoeia (*PhEur*) 10th Edition. 2019-2022.
- 5) Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana (F.U.I.) XII^a Edizione. 2008.
- 6) ICH Topic Q 1 A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products. European Medicines Agency. 2003.
- 7) ICH Topic Q 6 A Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances. European Medicines Agency. 2000.

- 8) Informativa in merito alla necessità di garantire la qualità degli integratori alimentari, con riferimento allo svolgimento di test di disaggregazione. Ministero della Salute. 28 aprile 2022.
- 9) Linee guida ministeriali (LGM) sugli integratori alimentari. Data di pubblicazione: 18 febbraio 2009, ultimo aggiornamento 7 luglio 2021.
- 10) Linee Guida Ministeriali su probiotici e prebiotici - revisione marzo 2018.
- 11) Andrea Logreco A. Normativa Medicinali Equivalenti. Biowaiver. Agenzia Italiana del Farmaco. 2022.
- 12) Regolamento (CE) n. 1170/2009 della Commissione, del 30 novembre 2009, che modifica la direttiva 2002/46/CE del Parlamento europeo e del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1925/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda gli elenchi di vitamine e minerali e le loro forme che possono essere aggiunti agli alimenti, compresi gli integratori alimentari.
- 13) Regolamento (CE) n. 1925/2006 — Regole sull'aggiunta di vitamine e minerali e di talune altre sostanze agli alimenti.

