



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

FACOLTÀ DI FARMACIA

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOFARMACEUTICA-FARMACOCINETICA

PREPARAZIONE DI DISPERSIONI SOLIDE PER IL MIGLIORAMENTO DELLE CARATTERISTICHE BIOFARMACEUTICHE DI FARMACI MEDIANTE L'IMPIEGO DI FLUIDI SUPERCRITICI

Tutore:

Chiar.mo Prof. Ruggero Bettini

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Paolo Colombo

Dottoranda:

Letizia Pezzini

XXIV CICLO 2009-2011

Indice

1. Introduzione	1
1.1. Benzodiazepine	9
1.2. Polietilenglicoli (PEG)	13
1.3. Fluidi supercritici	16
1.3.1. Tecniche basate sull'utilizzo dei fluidi supercritici	20
1.3.1.1. Processi che usano i fluidi supercritici come solvente	20
RESS	20
RESOLV	22
1.3.1.2. Processi che usano i fluidi supercritici come antisolvente	22
GAS	24
PCA	24
SAS	24
ASES	25
SEDS	25
1.3.1.3. Precipitazione da soluzioni sature di gas	25
PGSS	25
DELOS	28
CPCSP	29
1.3.1.4. Spray-drying CO ₂ -assistito	29
CAN-BD	29
SAA	29
2. Scopo	30
3. Materiali e Metodi	32
3.1. Materiali	32
3.2. Metodi	32
3.2.1. View cell ad alta pressione	32
3.2.2. Preparazione delle miscele binarie contenenti diazepam e lorazepam	33
3.2.3. Solubilità di lorazepam e diazepam nei PEGs	33
3.2.4. Preparazione delle dispersioni preparate con metodo della fusione contenenti diazepam alla saturazione	33
3.2.5. Preparazione delle dispersioni preparate con metodo della fusione contenenti diazepam al 80 % e 60 % della saturazione	34
3.2.6. Stabilità delle dispersioni binarie al di sotto e alla saturazione	34
3.2.7. Preparazione delle miscele fisiche di diazepam e lorazepam	35
3.2.8. Preparazione delle dispersioni solide con la tecnica PGSS	35
3.2.9. Analisi HPLC	36

3.2.10. Determinazione quantitativa del principio attivo	37
3.2.11. Analisi termica	37
3.2.12. Microscopia su piastra riscaldante	38
3.2.13. Diffrazione di Raggi X su polvere (XRPD)	39
3.2.14. Spettroscopia ad Infrarossi	40
3.2.15. Studi di dissoluzione	41
3.2.16. Spettrofotometria UV-Visibile	41
3.2.17. Quench cooling	42
3.2.18. Mulino a palle	42
4. Risultati e Discussione	43
4.1. Caratterizzazione dello stato solido dei PEGs	43
4.2. Caratterizzazione dello stato solido delle benzodiazepine	47
4.3. Convalida dei metodi analitici	53
4.3.1. Convalida del metodo HPLC	53
4.3.2. Convalida del metodo di spettrofotometria UV	57
4.4. Diminuzione dei punti di fusione dei PEGs in CO ₂ supercritica	61
4.5. Costruzione dei diagrammi di fase benzodiazepine-PEGs	63
4.5.1. Diagrammi di fase diazepam e PEGs	64
4.5.2. Diagrammi di fase lorazepam e PEGs	81
4.6. Caratterizzazione delle dispersioni preparate con il metodo della fusione contenenti diazepam alla saturazione	89
4.6.1. Stabilità delle dispersioni di diazepam nei PEGs alla saturazione	96
4.7. Caratterizzazione delle dispersioni binarie al di sotto della saturazione	100
4.7.1. Stabilità delle dispersioni binarie al di sotto della saturazione	102
4.8. Caratterizzazione delle miscele fisiche	109
4.8.1. Caratterizzazione delle miscele fisiche contenenti diazepam	109
4.8.2. Caratterizzazione delle miscele fisiche contenenti lorazepam	117
4.9. Caratterizzazione delle dispersioni solide preparate con la tecnica PGSS	122
4.9.1. Caratterizzazione delle dispersioni contenenti diazepam	122
4.9.1.1. Determinazione del contenuto in principio attivo	122
4.9.1.2. Caratterizzazione dello stato solido delle dispersioni	123
4.9.1.3. Studi di dissoluzione	136
4.9.2. Caratterizzazione delle dispersioni contenenti lorazepam	141
4.9.2.1. Determinazione del contenuto in principio attivo	141
4.9.2.2. Caratterizzazione dello stato solido delle dispersioni	142
4.9.2.3. Studi di dissoluzione	154

5. Conclusioni

157

Bibliografia

159

1. Introduzione

Nel trattamento delle malattie acute, come possono essere gli attacchi di panico, è fondamentale avere un'insorgenza d'azione molto rapida. Questa può essere ovviamente ottenuta attraverso una somministrazione parenterale ma è una via questa che non è ben accettata dal paziente, mentre le tradizionali e ben accette forme farmaceutiche somministrate per via orale non sono in grado di dare un'insorgenza d'azione sufficientemente veloce. Suscita quindi molto interesse l'utilizzo di una via di somministrazione, non parenterale, in cui il farmaco viene immediatamente assorbito nel circolo sistemico [2].

La somministrazione oromucosale sfruttando come siti d'assorbimento la mucosa buccale e sublinguale risulta essere una via promettente per promuovere un rapido assorbimento e un'alta biodisponibilità, con un'insorgenza quasi immediata dell'effetto farmacologico. Questo è conseguenza dell'alta vascolarizzazione della mucosa orale attraverso cui il farmaco entra direttamente nella circolazione sistemica evitando il tratto gastrointestinale e l'effetto di primo passaggio epatico [3].

La dissoluzione di un farmaco è però un prerequisito fondamentale per l'assorbimento e quindi la risposta farmacologica per quasi tutti i composti somministrati per via buccale [2], come è di fondamentale importanza anche nel caso di somministrazioni attraverso la più convenzionale via orale [4].

Lo sviluppo della chimica combinatoriale negli ultimi anni ha portato alla scoperta di farmaci da una parte molto potenti, si è infatti in grado di ottimizzare il legame al recettore di riferimento andando a modificare i gruppi funzionali, dall'altra parte questo ha portato alla scoperta di farmaci con una solubilità acquosa molto bassa [5]. La formulazione di composti poco solubili per migliorarne la velocità di dissoluzione è quindi diventata una delle maggiori sfide per l'industria farmaceutica [4].

Nel 1995 Amidon et al. [6] hanno posto le basi teoriche per correlare la dissoluzione *in vitro* di un farmaco con la sua biodisponibilità *in vivo*. Il Sistema di Classificazione Biofarmaceutico (BCS) dei farmaci si basa sulla prima legge di Fick:

$$J_w = P_w C_w \quad (1)$$

dove J_w è il flusso di farmaco attraverso la parete intestinale ad ogni posizione e tempo, P_w è la permeabilità della membrana intestinale e C_w la concentrazione del

farmaco sulla superficie di questa membrana [7]. La velocità di assorbimento massima si avrà quindi quando la concentrazione del farmaco è alla sua saturazione. Secondo questa classificazione è possibile suddividere i farmaci in quattro classi a seconda della loro solubilità e permeabilità.

La *Classe I* raggruppa farmaci altamente solubili e permeabili, in questo caso la correlazione *in vitro-in vivo* (IVIV) è buona se la velocità di dissoluzione è minore della velocità di svuotamento gastrico altrimenti la correlazione risulta essere limitata. Alla *Classe II* appartengono farmaci con buona permeabilità ma scarsa solubilità, in questo caso la correlazione IVIV è buona se la dissoluzione *in vitro* è simile alla dissoluzione *in vivo* a meno che la dose non sia troppo alta.

Nella *Classe III* troviamo farmaci con buona solubilità ma scarsa permeabilità, essendo l'assorbimento lo step limitante è chiaro che non si ha alcuna correlazione con la velocità di dissoluzione *in vitro*.

Infine la *Classe IV* rappresenta farmaci con scarsa solubilità e permeabilità, anche in questo caso la correlazione IVIV è molto limitata.

I farmaci utilizzati in questo lavoro di tesi sono due benzodiazepine, in particolare diazepam e lorazepam. Questi farmaci appartengono alla classe II del Sistema di Classificazione Biofarmaceutico, presentano quindi alta permeabilità ma scarsa solubilità acquosa [8, 9].

In linea di principio è possibile quindi migliorare le proprietà biofarmaceutiche di questi farmaci andando ad aumentare la loro velocità di dissoluzione.

Se prendiamo in considerazione l'equazione di Noyes-Whitney [10, 11] modificata questa ci indica come può essere aumentata la velocità di dissoluzione di composti anche molto poco solubili:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{AD(C_s - C)}{h} \quad (2)$$

dove dM/dt è la velocità di dissoluzione, A l'area superficiale a contatto con il mezzo di dissoluzione, D il coefficiente di dissoluzione del composto, C_s la solubilità del composto nel mezzo di dissoluzione, C la concentrazione del farmaco nel mezzo, t e h sono rispettivamente il tempo e lo spessore dello strato diffusivo.

Le principali possibilità per aumentare la dissoluzione sono di incrementare l'area superficiale a contatto con il mezzo diminuendo le dimensioni particellari del

composto e/o migliorandone la bagnabilità. Oppure, diminuire lo spessore dello strato diffusionale o ancora aumentare la solubilità apparente del composto.

Tra le modificazioni fisiche che possono essere apportate ad un composto farmaceutico con l'intento di aumentarne la dissoluzione la più semplice è sicuramente la diminuzione delle dimensioni particellari attraverso la sua micronizzazione [4]. Le tecniche sfruttate per raggiungere questo obiettivo implicano però lo sviluppo di alte energie che possono portare a cambiamenti di fase del composto, come amorfizzazione e polimorfismo, che spesso implicano instabilità fisica del prodotto finale [12].

Si può anche pensare di modificare il reticolo cristallino del composto oppure utilizzare i suoi polimorfi o pseudopolimorfi come i solvati in modo da sfruttare la maggiore solubilità delle forme metastabili [4]. Rimane anche in questo caso un problema che coinvolge la stabilità fisica in quanto queste forme metastabili tenderanno a trasformarsi nella forma termodinamicamente più stabile in un lasso di tempo rilevante per il prodotto farmaceutico [12].

Un altro modo per aumentare la dissoluzione di un composto è la sua complessazione ad esempio con tensioattivi o ciclodestrine [4]. Nel primo caso può risultare un problema la compatibilità tra il farmaco e l'eccipiente mentre nel secondo caso rimane una tecnica limitata a poche molecole che presentano compatibilità chimica e dimensionale con le ciclodestrine [13].

La formazione di dispersioni solide offre un'alternativa valida alle tecniche sopra descritte per incrementare la dissoluzione di composti scarsamente solubili [14].

Queste, infatti, sono in grado di combinare i benefici di un incremento locale di solubilità con la massimizzazione dell'area superficiale del farmaco che entra in contatto col mezzo di dissoluzione quando il carrier dissolve [4].

La dispersione solida è stata definita come la dispersione di uno o più principi attivi in una matrice di carrier inerte allo stato solido, preparata mediante fusione, metodi che utilizzano solventi od una combinazione di entrambi [15]. Queste dispersioni vengono generalmente classificate in tre categorie: miscele eutetticali, soluzioni solide o dispersioni solide [14].

La miscela eutetticale consiste di due composti completamente miscibili in fase liquida ma solo in minima parte allo stato solido [4].

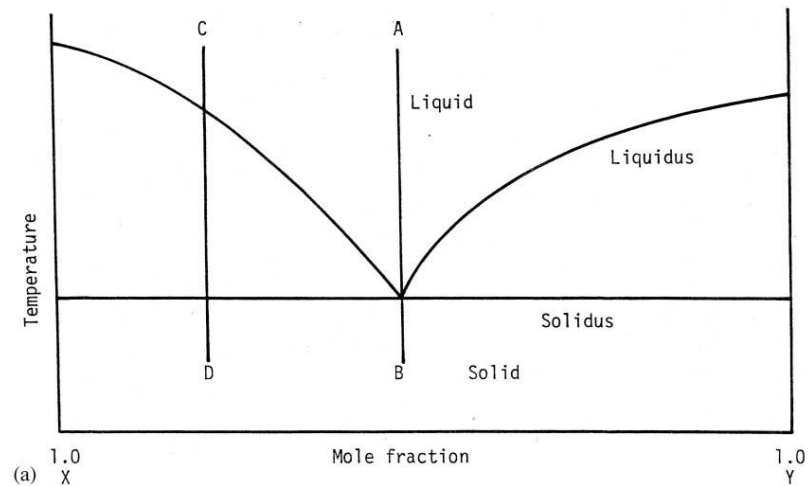


Figura 1. Diagramma di fase di una miscela eutetticale [16].

Miscela eutetticale solida sono preparate attraverso un rapido raffreddamento dei due composti fusi miscelati tra loro in modo da ottenere una miscela fisica di microcristalli dei due componenti. Quando questa miscela, composta da un principio attivo scarsamente solubile in acqua e un carrier inerte e solubile in acqua, è posta a contatto con un mezzo acquoso, il carrier dissolve rapidamente, rilasciando i nanocristalli di farmaco [17, 18]. L'area superficiale elevata della sospensione che ne deriva porta ad un aumento della velocità di dissoluzione e della biodisponibilità [4].

Le soluzioni solide consistono, come le soluzioni liquide, di un'unica fase. Soluzioni solide di un farmaco scarsamente solubile disciolto in un carrier con una buona solubilità acquosa sono anch'esse di particolare interesse come mezzo per aumentare la biodisponibilità orale e transmucosale in genere [19].

Le soluzioni solide sono di due tipi: soluzioni solide continue e discontinue. Nel primo caso i componenti sono miscibili in tutte le proporzioni, questo vuol dire che la forza di legame tra i due componenti è più alta della forza di legame tra le molecole dello stesso componente [4]. Nel secondo caso invece, la solubilità di un componente nell'altro è limitata. In particolare, al di sotto di una certa temperatura le solubilità dei due componenti iniziano a diminuire [19].

Le dispersioni solide sono infine forme farmaceutiche dove il principio attivo in forma cristallina è disperso non molecularmente in una matrice biologicamente inerte. Si tratta di sistemi in cui il rilascio in vitro del principio attivo è incrementato rispetto a quello delle forme farmaceutiche convenzionali.

Tradizionalmente i carrier usati erano polimeri solubili o miscibili in acqua come polietilenglicoli (PEG) o polivinilpirrolidone (PVP) oppure molecole a basso peso molecolare come gli zuccheri. In questo lavoro di tesi sono stati scelti come carrier i polietilenglicoli.

Normalmente nella preparazione delle dispersioni solide sono utilizzati pesi molecolari (PM) da 1500 a 20000, anche se all'aumentare del PM aumenta la viscosità di questi polimeri e diminuisce la loro solubilità acquosa [4]. Un altro aspetto interessante di questi polimeri è la loro capacità di solubilizzare alcuni composti [20] e aumentarne la bagnabilità.

I pesi molecolari più utilizzati, e scelti anche in questo lavoro insieme al PEG 1500, sono il PEG 4000 e 6000. In questo caso infatti la solubilità acquosa è ancora alta mentre l'igroscopicità, caratteristica dei PEGs a più basso peso molecolare, non è problematica e il punto di fusione supera i 50 °C [21].

Alcuni studi [22] hanno rilevato che all'aumentare del PM del PEG utilizzato per preparare la dispersione solida diminuiva il rilascio del farmaco, altri studi hanno invece riportato il comportamento opposto [20], in altri casi infine il PM non sembra influenzare il rilascio del farmaco dalla dispersione solida [23].

Una delle possibili spiegazioni per il maggior rilascio dal PEG a più alto peso molecolare può risiedere in una migliore dissoluzione del composto nel suddetto polimero rispetto al PEG con PM inferiore [4].

Anche il rapporto tra farmaco e PEG può influenzare il rendimento della dispersione solida, se la percentuale di farmaco è troppo alta questo può avere difficoltà a rimanere molecularmente disperso e quindi si possono formare piccoli cristalli di farmaco, dall'altra parte se è la percentuale del carrier ad essere molto alta si può avere l'assenza di cristallinità da parte del farmaco e questo porta ad un enorme incremento della velocità di dissoluzione del farmaco stesso [4].

I problemi maggiori nell'utilizzo di dispersioni solide riguardano proprio la struttura dello stato solido, infatti nella maggior parte dei casi diventa difficile capire come il farmaco sia disperso nella matrice e se sia in forma amorfa o cristallina. In aggiunta a questo risulta anche importante studiare quale sia la natura delle interazioni tra farmaco e carrier in questi sistemi [24, 25].

Oltre a questo esiste anche un problema riguardante la stabilità, dispersioni che contengono un farmaco amorfo si trovano infatti in una condizione termodinamica sfavorevole che può portare ad una devettrificazione. In particolare, alcuni studi hanno evidenziato cambiamenti nella velocità di dissoluzione durante la conservazione di queste formulazioni [16, 26].

Altre difficoltà da affrontare sono una più completa comprensione del meccanismo con il quale viene aumentata la dissoluzione e delle correlazioni *in vitro/in vivo*.

Come detto tra i possibili meccanismi che portano ad un aumento della dissoluzione si ha un aumento dell'area superficiale esposta del principio attivo. La riduzione delle dimensioni particellari è normalmente attribuita alla formazione della miscela eutetticale o della soluzione solida. Inoltre, molti dei carrier utilizzati nella formazione delle dispersioni solide presentano proprietà bagnanti, ed è quindi ragionevole pensare che questo aumento di bagnabilità porti ad una riduzione dell'agglomerazione e ad un aumento dell'area superficiale [16].

Per quanto riguarda i processi coinvolti nella dissoluzione di dispersioni solide esistono due possibilità (Figura4), nel primo caso il processo di dissoluzione è dominato dalla dissoluzione del carrier nel secondo caso è invece controllato dal farmaco [16].

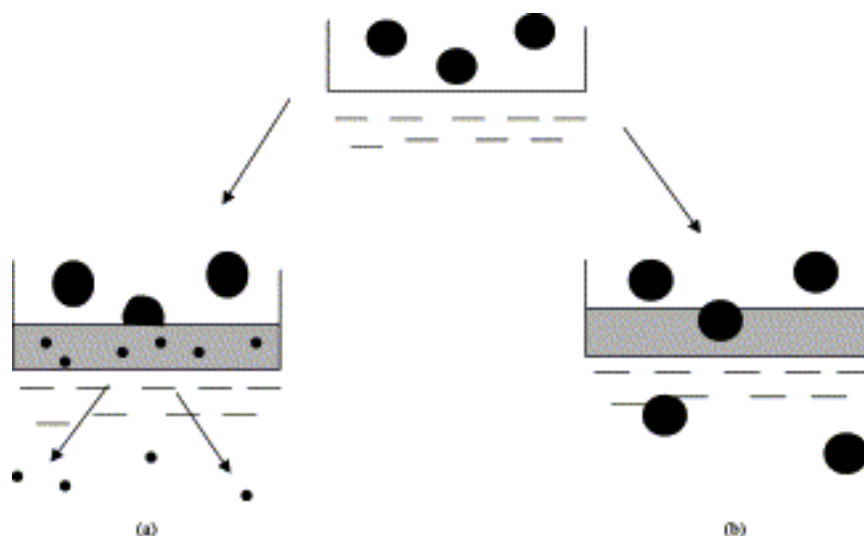


Figura 4. Dissoluzione carrier controllata (a) e dissoluzione farmaco mediata (b) [16].

Nel primo caso le particelle di farmaco dissolvono rapidamente in uno strato diffusivo ricco in polimero, la viscosità di questo strato fa sì che la diffusione del farmaco sia

piuttosto lenta e di conseguenza lo step limitante la velocità diventa la dissoluzione del polimero. Nel secondo caso la dissoluzione del farmaco nello strato di polimero è lenta e le particelle di farmaco vengono rilasciate come particelle solide. Di conseguenza la dissoluzione dipenderà dalle proprietà del farmaco stesso piuttosto che da quelle del carrier. Questo può portare comunque ad un aumento della dissoluzione del farmaco in quanto l'area superficiale e la bagnabilità sono nettamente migliorate. Conoscere il meccanismo con cui avviene la dissoluzione di una dispersione solida è ovviamente di fondamentale importanza in quanto se si ha una dissoluzione carrier-mediata le proprietà fisiche del farmaco risultano irrilevanti, quindi avranno una importanza minore sia le dimensioni particellari di partenza che la forma fisica del farmaco mentre cruciali saranno le caratteristiche del carrier. Al contrario se il processo di dissoluzione risulta essere farmaco-mediato le proprietà fisiche del farmaco risulteranno basilari [16].

I metodi tradizionalmente usati nella preparazione sia di dispersioni solide che di miscele eutetticali sono basati sulla fusione dei componenti oppure sull'utilizzo di solventi o ancora una combinazione di entrambi [15]. I primi ad utilizzare un metodo che consisteva nella fusione dei componenti seguito da un raffreddamento rapido in ghiaccio e quindi la macinazione in mortaio della massa solidificata furono Sekiguchi e Obi [17]. Successivamente Tachibani e Nakamura [27] disciolsero sia farmaco che carrier in un solvente che fu evaporato sotto vuoto per produrre la dispersione solida. Entrambi i metodi presentano però alcuni svantaggi, il primo ad esempio non può essere utilizzato con farmaci termolabili nel secondo caso si può avere solvente residuo nella dispersione solida.

Un altro approccio che sembra molto promettente per ottenere dispersioni solide è rappresentato dall'impiego dei fluidi supercritici (FSC), sono state infatti sviluppate diverse tecniche che utilizzano i fluidi supercritici per produrre particelle composte da farmaco e carrier [28].

Le dispersioni solide possono essere ottenute per esempio con la rapid expansion of supercritical solutions (RESS), in questo caso il fluido supercritico viene saturato con una miscela di farmaco ed eccipiente e quindi fatto espandere in una camera a più bassa pressione. In questo modo si ha una rapida nucleazione della miscela che porta alla formazione di microcapsule e microsfeere di carrier con all'interno il principio attivo [29].

Con la supercritical anti-solvent (SAS) si possono invece ottenere delle micro- o nano- sfere caricate di principio attivo. In questo caso il fluido supercritico funge da

antisolvente ed espande il solvente nel quale è disciolto il carrier e il farmaco. Questo produce una supersaturazione che porta alla precipitazione di microparticelle [29].

Infine è possibile produrre particelle anche con la particles from gas-saturated solutions (PGSS), questo processo consiste nella solubilizzazione del fluido supercritico in una miscela fusa che viene poi fatto espandere attraverso un ugello provocando la formazione delle particelle [29].

In quest'ultimo caso è possibile eliminare i due principali svantaggi dei metodi tradizionali, è infatti possibile lavorare a temperature inferiori e in assenza di solventi. L'interazione tra CO₂ e i polimeri è in grado di ridurre i legami intra-catena del polimero stesso provocando un aumento della mobilità delle catene polimeriche che si traduce in una riduzione della temperatura di transizione vetrosa o del punto di fusione. Il grado di tale riduzione dipende dalla quantità di CO₂ disciolta nel polimero [30-32].

Nello stato gommoso o liquido il polimero può incorporare farmaci dando vita ad una dispersione molecolare che può portare alla formazione di particelle solide contenenti il farmaco.

1.1 Benzodiazepine

Le benzodiazepine, di cui fanno parte diazepam e lorazepam, sono una classe di farmaci con proprietà sedative, ipnotiche, ansiolitiche, anticonvulsivanti, anestetiche e miorilassanti. Questi farmaci sono anche utilizzati per curare gli attacchi di panico e gli stati di insonnia grave e debilitante.

La sedazione si verifica alle dosi più basse, e corrisponde ad una diminuzione della capacità di risposta ad un livello costante di stimolazione inoltre a questi dosaggi si possono avere effetti disinibitori sul comportamento, quali euforia, diminuzione della capacità di giudizio e perdita di autocontrollo. Le benzodiazepine, a dosi ansiolitiche, possono provocare anche amnesia anterograda. A dosaggi sufficientemente elevati questi farmaci inducono il sonno, in particolare sono in grado di diminuire il tempo di latenza prima dell'inizio del sonno, aumentano la durata dello stadio 2 di sonno NREM, diminuiscono la durata del sonno REM e del sonno ad onde lente. L'interruzione del sonno REM provoca però ansietà ed irritabilità seguita da un 'effetto rimbalzo' al termine della somministrazione del farmaco.

Dosi elevate di sedativo-ipnotici inducono una depressione del sistema nervoso centrale che può essere sfruttata nella pratica anestetica, tuttavia nessuna benzodiazepina si è dimostrata capace, da sola, di indurre e mantenere anestesia chirurgica. Inoltre le benzodiazepine a causa della loro lunga emivita e della formazione di metaboliti attivi possono causare una persistente depressione respiratoria post-anestetica.

Molte benzodiazepine, come lorazepam e diazepam, hanno un'azione selettiva clinicamente utile negli stati convulsivi in quanto sono in grado di inibire lo sviluppo e la diffusione di attività epilettiforme senza una marcata depressione del sistema nervoso centrale. Questi farmaci possono dare effetto miorilassante in quanto in grado di deprimere la trasmissione a livello della giunzione neuromuscolare scheletrica. Infine anche a dosi terapeutiche i farmaci sedativo-ipnotici possono provocare una depressione respiratoria in pazienti con malattie polmonari, la cui gravità è proporzionale alla dose. In caso di malattie che riducono la funzionalità cardiovascolare, anche le dosi normali possono provocare depressione cardiovascolare, a livelli tossici si può arrivare al collasso cardiocircolatorio.

La tolleranza, ossia una diminuita capacità di risposta ad un farmaco in seguito a somministrazione continua è un aspetto comune ai sedativo-ipnotici che si può esprimere nella necessità di aumentare le dosi. Nel caso delle benzodiazepine, lo sviluppo di tolleranza è associato ad una down-regulation dei recettori localizzati nel cervello. L'abuso di queste sostanze può avere delle conseguenze sia a livello psicologico (comportamento nevrotico) che fisico (sindrome di astinenza che può sfociare in convulsioni). Gli effetti collaterali più comuni osservati a dosi relativamente basse portano a confusione, diminuzione dell'attività motoria e talvolta modificano le relazioni interpersonali e la capacità lavorativa.

Le benzodiazepine per esplicare la loro azione si legano al recettore per il GABA A, un canale di membrana per il cloro localizzato sulle membrane neuronali del SNC. Il loro meccanismo d'azione consiste nel potenziare la neurotrasmissione dell'acido gamma-aminobutirrico (GABA), il maggiore neurotrasmettitore inibitorio del sistema nervoso centrale (SNC). Il legame del GABA a questo recettore provoca l'apertura del canale per il cloro con conseguente ingresso dello ione nelle cellule nervose, questo determina una iperpolarizzazione e quindi una riduzione dell'eccitabilità delle cellule stesse. Le benzodiazepine sono definiti farmaci GABAergici in quanto non si legano al sito recettoriale del GABA ma in un sito diverso e necessitano del GABA stesso per poter esplicare la loro azione. In particolare, sono in grado di aumentare

l'affinità del recettore per il GABA e di conseguenza aumentare la frequenza di apertura del canale. Questo porta ad un flusso maggiore di ioni cloro in entrata, una maggiore iperpolarizzazione della membrana neuronale e un ritardo dell'insorgenza del nuovo potenziale d'azione.

Questi farmaci, chimicamente, sono 1,4-benzodiazepine e contengono un gruppo carbossiamidico nella struttura eterociclica. Per ottenere l'attività sedativo-ipnotica è necessario avere in posizione 7 un sostituente, nel caso di lorazepam e diazepam è rappresentato da un alogeno, in particolare il cloro.

Quando queste molecole sono usate nel trattamento dell'ansia o dell'insonnia in genere vengono somministrate per via orale, la loro velocità di assorbimento dipende da molti fattori come la liposolubilità. Nel caso dei nostri farmaci, il lorazepam risulta avere un assorbimento orale più lento rispetto a quello del diazepam. Se somministrate per via intramuscolare la biodisponibilità di molte benzodiazepine è invece risultata essere non costante.

Anche per quanto riguarda la distribuzione di questi farmaci sedativo-ipnotici nell'organismo molto dipende dalla loro liposolubilità, questa infatti determina la velocità con la quale entrano nel sistema nervoso centrale. Abbiamo quindi che nel caso del diazepam gli effetti sul sistema nervoso centrale compaiono più rapidamente rispetto al lorazepam in quanto ha una liposolubilità maggiore e quindi maggiore è la velocità con la quale entra nel SNC. Nel caso di questi farmaci inoltre la velocità di trasformazione metabolica e di eliminazione è molto lenta nell'uomo rispetto alla durata degli effetti farmacologici, questo sta ad indicare un'elevata ridistribuzione delle benzodiazepine dal cervello ai tessuti altamente perfusi, come la muscolatura scheletrica, poi al tessuto adiposo. Le benzodiazepine attraversano la barriera placentale durante la gravidanza, possono quindi contribuire alla depressione delle funzioni vitali del neonato, e si ritrovano nel latte materno. Questi farmaci sono anche in grado di legarsi alle proteine plasmatiche.

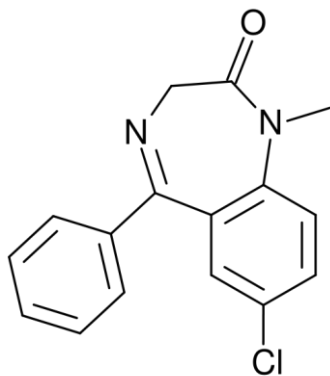
Responsabile della clearance di tutte le benzodiazepine è il metabolismo epatico, in particolare molte benzodiazepine subiscono l'ossidazione microsomiale e i metaboliti vengono successivamente coniugati mediante glucuroniltrasferasi per formare glucuronidi che vengono escreti con le urine. Molti metaboliti delle benzodiazepine sono composti ancora attivi con emivite più lunghe dei composti di partenza. Ad esempio il diazepam viene trasformato in desmetildiazepam che a sua volta viene trasformato in oxazepam, composti entrambi dotati di attività farmacologica. Queste benzodiazepine possono dar luogo ad accumulo con trattamenti prolungati con

maggiore probabilità rispetto a benzodiazepine, come il lorazepam, che hanno emivite più brevi e sono direttamente metabolizzati a glucuronidi inattivi. Questi metaboliti sono escreti principalmente per via renale, ma l'alterazione della funzionalità renale non ha effetti rilevanti nella eliminazione del farmaco di partenza. La funzionalità epatica compromessa a seguito di malattie, età o induzione enzimatica può invece influenzare la trasformazione metabolica ma molto meno la glucuronoconiugazione.

L'uso prolungato di benzodiazepine sembra indurre meno variazioni nell'attività enzimatica microsomiale farmaco-metabolizzante rispetto ad altri farmaci come i barbiturici, questo spiega le minori interazioni con altri farmaci [33].

Le dosi utilizzate per somministrazione orale nei disturbi dell'ansia sono da 1 a 6 mg giornalieri di lorazepam e 2 mg 3 volte al giorno fino ad un massimo di 30 mg giornalieri per quanto riguarda il diazepam [1].

La struttura chimica del diazepam e i dati chimico-fisici sono riportati in Figura 5.



Struttura chimica: $C_{16}H_{13}ClN_2O$

Peso molecolare: 284.7 g/mol

Stato fisico: polvere cristallina bianca o quasi bianca

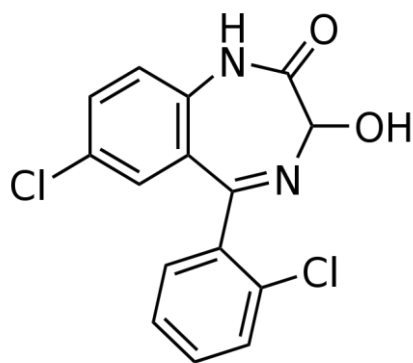
Punto di fusione: 131.5 to 134.5 °C

Solubilità: poco solubile in acqua, solubile in alcol, e solubile in cloroformio

pKa: 3.4 [1]

Figura 5. Struttura chimica del diazepam. Nome Sistemico (IUPAC): 7-chloro-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-one

La struttura chimica del lorazepam e i suoi dati chimico-fisici sono invece riportati nella Figura 6.



Struttura chimica: $C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$

Peso molecolare: 321.2 g/mol

Stato fisico: polvere cristallina bianca o quasi bianca

Punto di fusione: 166 to 168 °C

Solubilità: praticamente insolubile in acqua, poco solubile in alcol e cloruro di metilene

pK_1 : 1.3

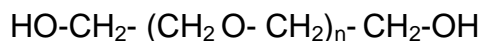
pK_2 : 11.5 [1]

Figura 6. Struttura chimica del lorazepam. Nome Sistemático (IUPAC): 7-chloro-5-(2-chlorophenyl)-1,3-dihydro-3-hydroxy-2H-1,4-benzodiazepin-2-one.

In letteratura sono stati descritti 6 polimorfi e 7 pseudopolimorfi del lorazepam ottenuti dopo ricristallizzazione in vari solventi in condizioni di temperatura e pressione controllata. I polimorfi presentano i seguenti punti di fusione: I (p.f. = 183 °C), II (p.f. = 173 °C), III (p.f. = 170 °C), IV (p.f. = 163 °C), V (p.f. = 158 °C), VI (p.f. = 153 °C). Il lorazepam inoltre va incontro ad una fusione seguita da decomposizione che non permette di sottoporlo a cicli di riscaldamento/ raffreddamento [34].

1.2 Polietilenglioli (PEG)

I polietilenglicoli sono polimeri sintetizzati per reazione di ossido etilenico e acqua, sotto pressione e in presenza di catalizzatore. I PEG hanno la seguente struttura:



Al crescere del grado di polimerizzazione n cresce la lunghezza della catena polimerica e quindi aumenta il peso molecolare. Sinonimi per PEG sono: Carbovax, Macrogol, Breox PEG, Hodag PEG, e Lutrol E. Ogni PEG è identificato con un numero che indica il peso molecolare medio del polimero (Tabella 1).

Tabella 1. Nome, grado di polimerizzazione e intervallo di peso molecolare di alcuni PEG.

Nome	n	Intervallo di peso molecolare
PEG 200	4,2	190-210
PEG 300	6,4	285-315
PEG 400	8,7	380-420
PEG 600	13,2	500-600
PEG 900	15,3	570-613
PEG 1000	22,3	855-900
PEG 1450	32,5	950-1050
PEG 1540	28,0-36,0	1300-1600
PEG 2000	40,0-50,0	1800-2200
PEG 3000	60,0-75,0	2700-3300
PEG 3350	75,7	3000-3700
PEG 4000	69,0-84,0	3000-4800
PEG 4600	104,1	4400-4800
PEG 8000	181,4	7000-9000

A seconda del peso molecolare si possono distinguere PEG in forma liquida (200-600) e in forma solida (>1000) a temperatura ambiente.

I PEG a più basso peso molecolare sono liquidi viscosi, trasparenti o leggermente gialli. Hanno un lieve ma caratteristico odore e un sapore amaro.

I PEG solidi si presentano come fiocchi bianchi di consistenza collosa-cerosa, con un lieve odore dolciastro. I PEG con PM uguale o superiore a 6000 sono disponibili in polveri scorrevoli.

I PEG sono chimicamente stabili e non permettono crescita microbica, mentre sono sostanze molto igroscopiche sebbene l'igroscopicità diminuisca all'aumentare del peso molecolare.

Tutti i gradi di PEG sono solubili in acqua e miscibili in tutte le proporzioni con gli altri polietilenglicoli. Le soluzioni acquose concentrate dei PEG a peso molecolare più alto possono formare gel. I PEG liquidi sono solubili in acetone, alcoli, benzene, glicerina, glicole propilenico. Le forme solide sono solubili in acetone, diclorometano,

etanolo e metanolo; sono leggermente solubili in idrocarburi alifatici ed etere, insolubili in grassi e oli [35].

La reattività chimica dei PEG riguarda essenzialmente i due gruppi idrossilici terminali, che possono essere esterificati o eterificati. Possono mostrare attività ossidante dovuta a gruppi perossidici presenti come impurezze o a prodotti secondari formatisi per autossidazione. I PEG possono ridurre l'attività antibatterica di alcuni antibiotici (ad esempio penicillina) e deteriorare l'efficacia dei parabeni [35].

Il PEG viene assorbito dal tratto gastrointestinale con una frazione assorbita che dipende dal suo peso molecolare. Dopo esposizione orale i PEGs sono praticamente atossici, si è riscontrato un effetto lassativo solo dopo ingestione di grandi quantità.

Data la loro biocompatibilità [36] sono spesso utilizzate nelle formulazioni cosmetiche e farmaceutiche, incluse le preparazioni parenterali, topiche, oftalmiche, orali e rettali.

I PEGs non sono irritanti per la pelle, quelli solidi sono in genere usati per unguenti topici e la consistenza della base viene aggiustata addizionando PEGs liquidi.

Miscele di PEGs vengono anche utilizzate come base per supposte in quanto presentano dei vantaggi rispetto ai grassi: viene aumentato il punto di fusione delle supposte che possono, in questo modo, resistere a temperature più alte; il rilascio del farmaco non dipende dal punto di fusione; migliora la stabilità durante lo stoccaggio; le supposte sono miscibili con i fluidi rettali. Gli svantaggi riguardano il fatto che sono più reattivi dei grassi, la velocità di rilascio di farmaci idrosolubili diminuisce con l'aumentare del peso molecolare e i PEGs tendono a essere più irritanti verso le mucose rispetto ai grassi.

Soluzioni acquose di PEG possono essere utilizzate sia come agenti sospendenti che per aggiustare la viscosità e la consistenza di altri veicoli sospendenti.

PEG liquidi sono usati come solventi per il contenuto di capsule di gelatina. In concentrazioni vicine al 30% v/v PEG 300 e 400 sono usati come veicoli in forme farmaceutiche parenterali.

I PEGs con alto peso molecolare possono essere utilizzati per incrementare l'efficacia dei leganti per compresse e per impartire plasticità ai granuli.

Questi polimeri possono anche essere usati per aumentare la dissoluzione in acqua di composti poco solubili producendo dispersioni solide [35].

Un altro uso dei PEGs è nel rivestimento con film. Al momento, il PEG è il materiale più usato per modificare la superficie di nanoparticelle biodegradabili per ridurre il

legame alle proteine plasmatiche ed evitare, in questo modo, il riconoscimento da parte del sistema reticoloendoteliale [37, 38].

Il PEG 6000 può, infine, essere utilizzato come lubrificante.

I polietilenglicoli sono riportati come monografie in numerose farmacopee, ed indicati con nomi diversi: nella farmacopea italiana così come in quella giapponese, inglese e europea vengono indicati come Macrogol, mentre nella farmacopea americana sono descritti con il nome di Polyethylene glycol.

Inoltre la USP ha una singola monografia che descrive tutti i pesi molecolari; altre farmacopee hanno invece monografie individuali.

In questa tesi di dottorato sono stati utilizzati tre polietilenglicoli a diverso peso molecolare, in particolare il PEG 1500, PEG 4000 e PEG 6000.

Il PEG 1500 è definito nella Farmacopea Europea 7.0 “solido bianco o quasi bianco con aspetto ceroso o paraffino-simile. È molto solubile in acqua, cloruro di metilene, solubile in alcol, in oli grassi e minerali”

Il PEG 4000 e 6000 sono definiti nella Farmacopea Europea 7.0 come “solido bianco o quasi bianco con aspetto ceroso o paraffino-simile. È molto solubile in acqua, cloruro di metilene, praticamente insolubile in alcol, in oli grassi e minerali”.

1.3 Fluidi supercritici

Un fluido raggiunge lo stato supercritico quando si trova in condizioni di temperatura e pressione superiore ai suoi valori critici (Figura 7) e può essere definito come un fluido denso non condensabile [30].

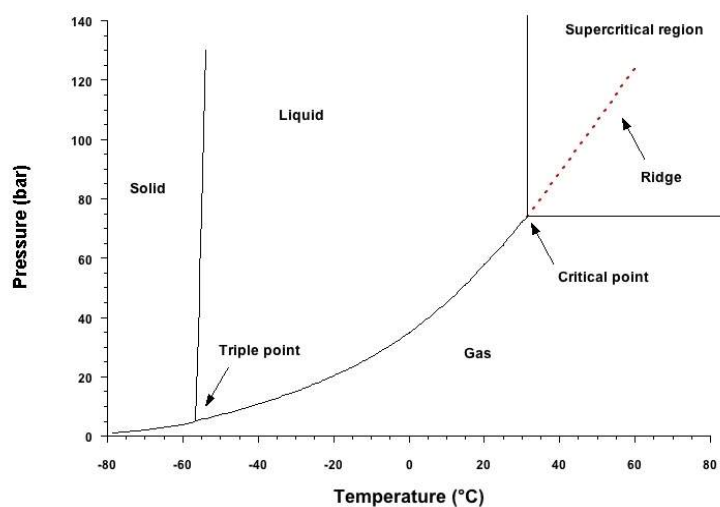


Figura 7. Diagramma di stato dell'anidride carbonica

Nel diagramma di fase della CO₂ riportato in Figura 7 sono distinguibili tre curve che rappresentano l'equilibrio di bifasicità (solido-liquido, liquido-vapore, solido-vapore) e che delimitano regioni in cui il sistema è monofasico. Le tre curve si incontrano nel punto triplo dove i tre stati della materia coesistono.

La curva di equilibrio liquido-vapore si presenta ascendente con un estremo superiore detto punto critico al di sopra del quale è presente la regione supercritica.

Se si osserva la transizione della CO₂ a fluido supercritico attraverso una cella ad alta pressione fenestrata (Figura 8) si può notare la netta separazione di fase tra liquido e vapore al di sotto del punto critico (fotogramma iniziale), in seguito per aumento della pressione e temperatura il menisco di separazione tra le due fasi si attenua fino a scomparire al punto critico dove le due fasi (liquido e gas) non sono più distinguibili poiché hanno la stessa densità.

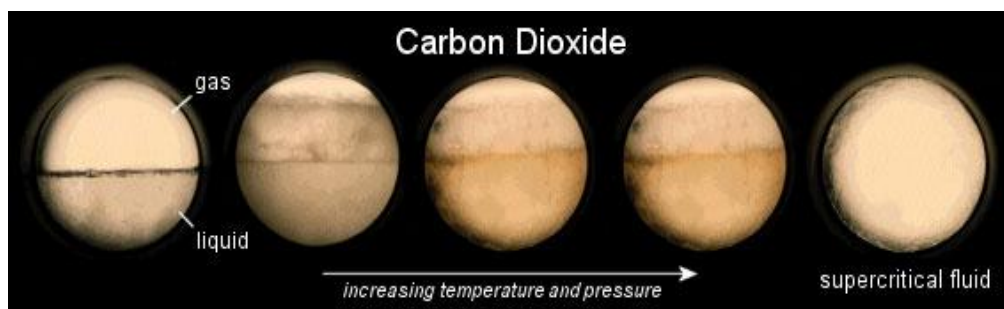


Figura 8. Fotogrammi che illustrano la sequenza della transizione del biossido di carbonio a fluido supercritico (http://www.galenotech.org/tecniche_est.htm)

In Tabella 2 sono riportate le condizioni di pressione e temperatura critiche di alcuni gas.

Tabella 2. Pressione e temperatura critici di alcuni gas

<i>GAS</i>	<i>T_c (°C)</i>	<i>P_c (bar)</i>
Azoto	-147,0	33,9
Metano	-82,5	46,4
Etilene	9,2	50,3
Anidride Carbonica	31,2	72,8
Etano	32,2	48,8
Protossido d'azoto	36,4	72,5
Esafluoruro di Zolfo	45,6	37,6
Propilene	91,6	46,1
Propano	96,8	42,5
Ammoniaca	132,4	112,9
Solfuro d'idrogeno	157,5	79,8

Un fluido supercritico (FSC) non rappresenta un quarto stato della materia, ma è dotato di proprietà fisiche intermedie tra un liquido ed un gas; infatti, rispetto alla fase gassosa ha maggiore densità e minore comprimibilità, rispetto alla fase liquida presenta migliore diffusività ed una più bassa viscosità (Tabella 3) [39].

Tabella 3. Confronto tra proprietà chimico-fisiche di gas, FSC e liquido

<i>Stato fisico</i>	<i>Densità (g / ml)</i>	<i>Viscosità (g/cm·s)</i>	<i>Diffusività (cm² / s)</i>
Gas*	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻¹
Liquid	1	10 ⁻²	10 ⁻⁶
SCF**	0,2 –0,8	10 ⁻⁴	10 ⁻³

*in condizioni standard

**al punto critico

Tra le proprietà fisiche sopra riportate la più sfruttata è probabilmente l'elevata densità dei fluidi supercritici in confronto a quella dei gas; infatti, è stato osservato che in prossimità del punto critico l'aumento di densità, direttamente proporzionale all'aumento della pressione (Figura 9), esalta le capacità solventi dei fluidi soprattutto nei confronti di soluti con minor peso molecolare e più volatili. Inoltre vicino al punto critico piccole variazioni di pressione e temperatura causano grandi variazioni di volume o densità [39].

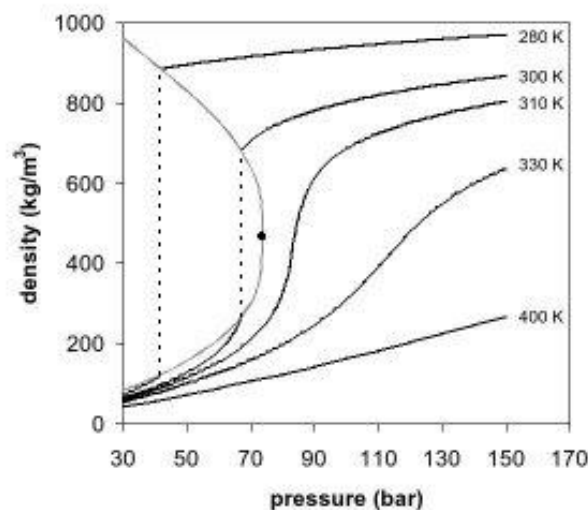


Figura 9. Densità della CO₂ in funzione della pressione in prossimità del punto critico a diverse temperature.

La densità è inversamente correlata all'aumento della temperatura. Ciò significa che, al contrario di quanto accade per i solventi tradizionali, la capacità solvente dei fluidi supercritici è, in genere, migliore a basse temperature. Questo rappresenta un grande vantaggio per il trattamento di sostanze termolabili.

Le proprietà dei fluidi supercritici sono note da tempo; infatti i primi dati bibliografici sul comportamento di liquidi e gas in condizioni di alta pressione e temperatura risalgono al 1822 quando il barone Cagniard de la Tour descrisse ciò che noi oggi conosciamo come il punto critico [40]. Nonostante questo, le prime applicazioni in processi industriali risalgono solo agli anni '70 del secolo scorso.

Le tecnologie basate sull'utilizzo di fluidi supercritici sono già impiegate nell'industria alimentare, nell'industria petrolchimica, in chimica analitica come sostituti di solventi organici, ma solo negli ultimi venti anni l'interesse per i fluidi supercritici è significativamente aumentato anche in campo farmaceutico [41, 42].

Il fluido supercritico più largamente utilizzato è l'anidride carbonica, che ha valori critici (Figura 7) tecnologicamente facili da raggiungere ($T_c=31,1^\circ\text{C}$, $P_c=73,8$ bar), è economica, e non è infiammabile. Poiché la temperatura critica è vicina a quella ambiente, è possibile condurre il processo a temperature compatibili con la stabilità di numerosi composti d'interesse farmaceutico.

I fluidi supercritici sono utilizzati anche in processi di sublimazione, micronizzazione e cristallizzazione da solventi.

Inoltre, grazie alla versatilità delle condizioni operative è possibile ottenere il controllo della morfologia delle particelle e delle loro dimensioni nell'intervallo dei micron o dei nanometri .

1.3.1 Tecniche basate sull'utilizzo dei fluidi supercritici

I processi che utilizzano i fluidi supercritici sono raggruppabili in quattro categorie [30]:

- processi che usano i fluidi supercritici come solvente (RESS, RESOLV) [43-46].
- processi che usano i fluidi supercritici come antisolvente (GAS, PCA, ASES, SEDS) [47-51].
- precipitazione da soluzioni sature di gas (PGSS) [31, 32, 52-59].
- spray-drying CO_2 -assistita (CAN-BD, SAA) [60, 61].

1.3.1.1 Processi che usano i fluidi supercritici come solvente

RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solution)

Questo è un processo che prevede, come prima operazione, la dissoluzione del soluto nel fluido supercritico all'interno di una cella di solubilizzazione; a questa segue una rapida espansione del fluido supercritico attraverso un ugello micrometrico per ottenere la sovrassaturazione del soluto, una nucleazione omogenea e la formazione di particelle. Il processo si basa su di una repentina riduzione del potere di solubilizzazione del solvente dovuta alla riduzione della sua densità [43].

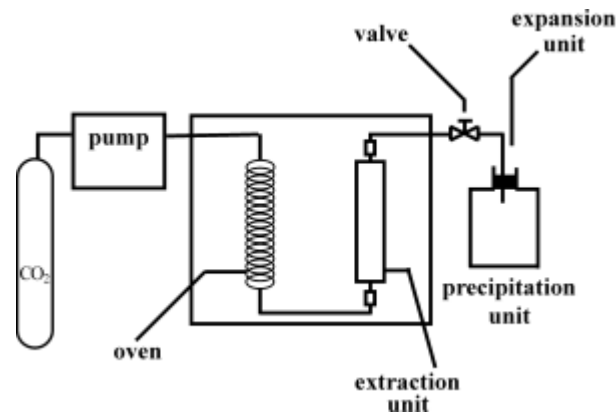


Figura 10. Schema di un apparato per il processo RESS [43].

I fattori che influenzano le proprietà fisiche delle particelle, come forma e dimensioni, sono le condizioni di pre- e post- espansione.

Tra le prime si hanno temperatura e pressione della cella di solubilizzazione.

Questi parametri operativi infatti influenzano la cinetica del processo di cristallizzazione cambiando la densità del FSC e di conseguenza la concentrazione della soluzione di pre-espansione.

Quest' ultima dipende anche dal FSC, dalla natura del soluto (cristallino, amorfo, composto o puro), ed aggiunta di un cosolvente. Tanto più alta è la concentrazione di pre-espansione tanto più ampia sarà la distribuzione dimensionale delle particelle [45].

Tra le condizioni di post-espansione che influenzano le caratteristiche fisiche delle particelle si ritrovano la temperatura dell'ugello, la sua geometria, grandezza, distanza ed angolo di impatto del flusso [44].

L'ugello della valvola micrometrica può essere mantenuto ad una appropriata temperatura per prevenire la prematura precipitazione del soluto.

La RESS è un processo di facile applicazione; l'uso minimo o nullo di solvente organico e la possibilità di riutilizzare il FSC in continuo, lo rendono un processo di basso impatto ambientale.

Tuttavia la misura, la morfologia e la grandezza delle particelle ottenute sono poco prevedibili ed inoltre la solubilità di molti dei composti farmaceutici in CO₂ supercritica è bassa.

Il biossido di carbonio non è una molecola polare, ha basso peso molecolare ed è scarsamente capace di dissolvere i farmaci che tipicamente sono basi deboli o acidi che comunque mostrano caratteristiche di polarità più o meno marcate.

Per ovviare a tale inconveniente si può utilizzare un cosolvente che modifichi la polarità del solvente in favore del soluto [44].

RESOLV (Rapid Expansion of a Supercritical Solution into a Liquid Solvent)

La soluzione del farmaco in CO₂ liquida è preparata all'interno di una cella di solubilizzazione ad alta pressione. La soluzione viene messa in una unità riscaldata, si attende il raggiungimento della temperatura desiderata prima dell'espansione attraverso l'ugello micrometrico; la rapida espansione avviene in un mezzo acquoso a pressione ambiente. Vari polimeri solubili in acqua possono essere aggiunti al mezzo acquoso per stabilizzare la sospensione delle particelle ottenute [46].

1.3.1.2 Processi che usano i fluidi supercritici come antisolvente

Gallagher e collaboratori [47] sono stati i primi a studiare un processo alternativo alla RESS per superare il limite della scarsa solubilità della maggior parte dei composti organici in CO₂ supercritica.

La tecnica alternativa è basata sulla capacità del solvente di solubilizzare una quantità altissima di CO₂ gassosa. L'antisolvente deve mostrare una bassa affinità per il soluto ma una miscibilità buona con la fase organica. La nucleazione ed il conseguente ingrandimento dei cristalli ottenuti dal sistema soluto/solvente/antisolvente organico, sono governati dalla diffusione dell'antisolvente nella fase organica e dall'evaporazione del solvente organico nella fase antisolvente.

L'espansione volumetrica causata dalla diffusione dell'antisolvente nel solvente organico abbassa la solubilità del soluto; d'altra parte l'evaporazione del solvente nella fase gassosa aumenta la concentrazione del soluto. I due fenomeni combinati portano ad una sovrassaturazione, alla nucleazione ed alla formazione di particelle [48].

Lo studio della termodinamica, della dinamica dei fluidi e della cinetica di precipitazione consente di descrivere la formazione di particelle con antisolvente. Il coefficiente di trasferimento di massa governa il trasporto di FSC nel solvente organico e viceversa. In questo contesto può essere applicata la teoria della diffusione [10]. La formula che descrive il trasporto di sostanza i è rappresentata da una semplice soluzione della legge di Fick, e consente di calcolare il flusso N_i

$$N_i = K_{L,SC} a (C_E - C_t) \quad (3)$$

Dove a è l'area attraverso la quale avviene il trasferimento di massa, C_E è la concentrazione di saturazione, C_t è la concentrazione di bulk al tempo t e $K_{L,SC}$ è il coefficiente di trasferimento di massa nella fase liquida (L) o nella fase supercritica (SC) rispettivamente [62].

La nebulizzazione del fluido supercritico nella soluzione e viceversa rappresenta un modo per aumentare l'area attraverso la quale avviene il trasferimento di massa e quindi il flusso dei composti i . La distribuzione delle gocce deve essere la più omogenea possibile. Il numero di Weber (N_{we}) che è il rapporto tra le componenti distruttive, fluido dinamiche e le forze interfacciali che invece mantengono le forme delle gocce, determina la grandezza delle gocce stesse:

$$N_{we} = \frac{(\rho_A v_A^2 D)}{\sigma} \quad (4)$$

dove ρ_A è la densità dell'antisolvente, v_A è la velocità relativa, D è il diametro dell'ugello e σ è la tensione interfacciale [63], N_{we} è inversamente proporzionale alla grandezza delle gocce. Un fattore importante da considerare in un processo di antisolvenza è l'efficacia del mescolamento tra SCF e la soluzione che può essere descritta dal numero di Reynolds (N_{Re}).

$$N_{Re} = \frac{(\rho v_s L)}{\eta} \quad (5)$$

dove ρ è la densità del fluido, v_s è la velocità del fluido, L la lunghezza del capillare che costituisce l'ugello, η è la viscosità del fluido. È possibile ottenere un completo mescolamento ad alti numeri di Reynolds (>10.000) vale a dire che condizioni di flusso turbolento portano alla formazione di particelle con basso grado di agglomerazione. A bassi numeri di Reynolds prevalgono le forze viscosi ed il flusso è caratterizzato da un movimento lineare del fluido detto "flusso laminare" [64]. La geometria dell'ugello, la natura del solvente e del FSC possono essere considerati i fattori principali che influenzano i parametri descritti.

Dal momento che la forza principale di cristallizzazione è la supersaturazione altri parametri operativi come la concentrazione del soluto, il rapporto tra solvente e FSC influenzano le caratteristiche del prodotto [65].

Il processo di antisolvenza è discontinuo, il suo principale svantaggio è la difficoltà di ottenere una completa rimozione del solvente residuo (USP 28, 2005); per questa ragione un ultimo lavaggio delle particelle precipitate con CO₂ supercritica, può essere richiesto per rimuovere tracce residue del solvente organico e prevenire una condensazione durante la depressurizzazione.

Le tecniche che impiegano il fluido supercritico come antisolvente possono essere classificate in base ai diversi metodi di mescolamento tra soluzione e FSC.

GAS (Gaseous Anti Solvent)

È una tecnica in cui si ha la graduale introduzione di CO₂ SC dal basso nella cella di precipitazione che contiene la soluzione del soluto. Il principale vantaggio di questa tecnica è che introducendo SCF dal basso della cella di solubilizzazione si ottiene un buon mescolamento tra solvente ed antisolvente (Figura11).

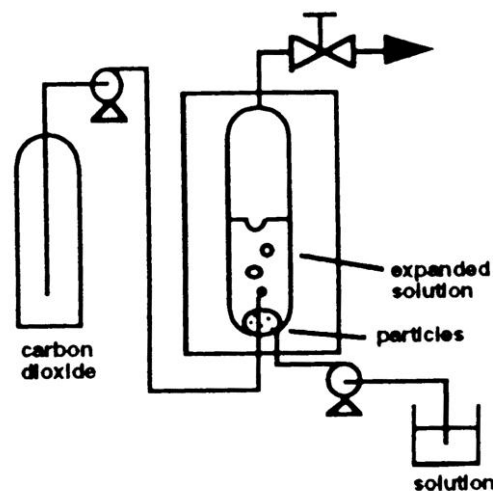


Figura 11. Schema di un apparato per il processo GAS.

PCA (Precipitation by Compressed Antisolvent)

SAS (Supercritical Antisolvent)

In questi due metodi la CO₂ (supercritica per SAS o subcritica per PCA) è da prima pompata ad alta pressione all'interno della cella fino alle condizioni di pressione e temperatura volute, quindi la soluzione organica è inserita tramite pompa, attraverso una valvola, all'interno della cella contenente il FSC. Le

particelle che si formano vengono raccolte su di un filtro posizionato all'uscita della cella [30].

ASES (Aerosol Solvent Extraction System)

Questa è una modifica che implica il simultaneo inserimento all'interno della cella della soluzione e dell'antisolvente [30].

SEDS (Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids)

In questo processo la soluzione di farmaco ed il fluido supercritico vengono introdotti contemporaneamente nella cella in cui si formeranno le particelle attraverso il mescolamento di un ugello coassiale [51]. La geometria di questo ugello permette di lavorare ad alti numeri di Reynolds il che determina quindi un buon mescolamento ed alta velocità del fluido; ciò comporta un aumento del trasferimento di massa che determina una veloce nucleazione e produzione di piccole particelle con bassa agglomerazione [50].

1.3.1.3 Precipitazione da soluzioni sature di gas

Questi processi utilizzano i fluidi supercritici per ottenere materiali liquefatti o miscele ternarie soluto-solvente-gas compresso che vengono depressurizzati alla pressione atmosferica in una camera di espansione. La PGSS è il metodo che meglio esemplifica questo gruppo.

PGSS (Precipitation from Gas Saturated Solution)

In questo processo, il gas compresso (super- o sub-critico) è disciolto nella soluzione di soluto o nel materiale liquefatto. La soluzione satura di gas presenta una bassa viscosità dovuta ad un aumento del volume libero. In più la tensione interfacciale tra il gas e la fase liquida è diminuita poichè la tensione superficiale del gas nello stato supercritico è vicina a zero. La soluzione è poi espansa attraverso un ugello dallo stato supercritico alla pressione ambiente. Questo causa una supersaturazione del gas e una intensa espansione delle bolle di gas che porta all'esplosione del materiale liquefatto in particelle fini [52] (Figura 12).

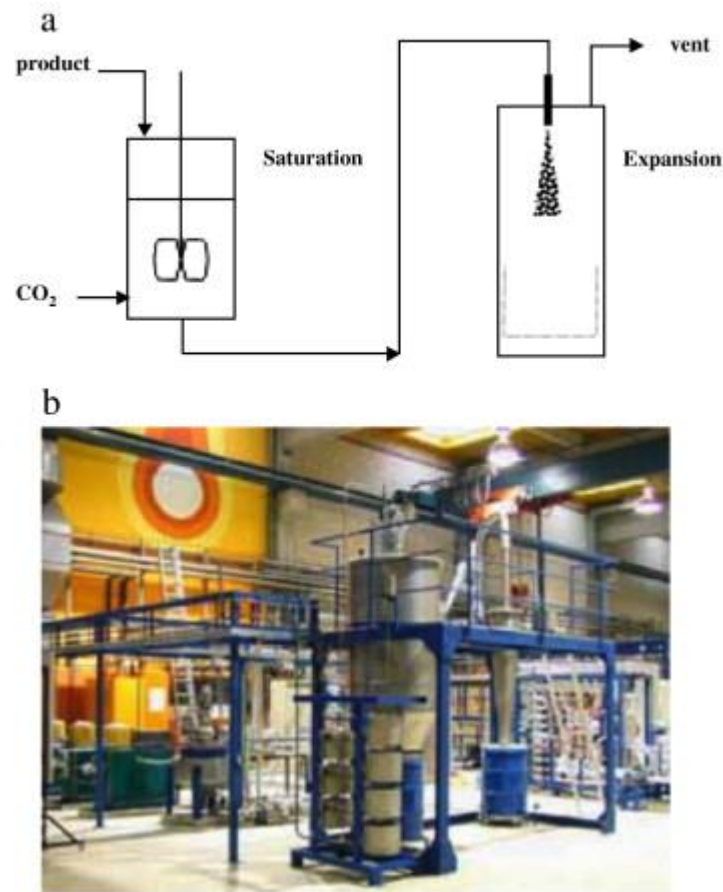


Figura 12. (a) Rappresentazione schematica della PGSS, (b) PGSS impianto pilota presso NATEX, Austria

I vantaggi di questa tecnica sono numerosi. La pressione usata è inferiore alla pressione usata con la RESS, la quantità di gas richiesta è inferiore, non è necessaria l'aggiunta di solventi, in questo modo non si avranno tracce di solventi nel prodotto finale, si può lavorare in modo continuo, mentre la tecnica dell'antisolvente richiede uno step di lavaggio per rimuovere le tracce di solvente. Inoltre, a causa dell'alta solubilità del gas compresso nella soluzione da spruzzare può essere ottenuta una buona resa. L'applicazione farmaceutica più interessante è rappresentata dall'uso della PGSS nella lavorazione dei polimeri. E' noto che la CO_2 compressa può agire da plasticizzante e può diminuire il punto di fusione e/o la transizione vetrosa di certi polimeri [31, 32, 53], in questi casi è possibile caricare principi attivi in polimeri fusi che formeranno microparticelle dopo decompressione. Per avere una buona resa e un buon caricamento del farmaco nelle particelle polimeriche, sia le sostanze che il polimero non devono essere solubili nella CO_2 . I maggiori svantaggi di questa tecnica sono lo scarso controllo che si ha sulle dimensioni delle particelle che può, in alcuni casi, portare a una distribuzione dimensionale allargata. Il bilancio tra vantaggi e svantaggi rimane

comunque positivo e la tecnica risulta quindi promettente; infatti diversi impianti PGSS lavorano con una capacità di qualche centinaia di kilogrammi all'ora (Figura13).

In letteratura, solo pochi lavori riguardano la formazione di microparticelle di PEG tramite PGSS [54, 55]. Tra questi, Hao e collaboratori hanno prodotto microparticelle di PEG 5000 e studiato la loro morfologia, dimensioni e porosità in funzione delle condizioni operative di temperatura, pressione e diametro dell'ugello utilizzato [56]. In particolare, la diminuzione della pressione, così come un aumento di temperatura, favoriscono la produzione di particelle regolari e sferiche. Questo è spiegato dal fatto che la morfologia delle particelle dipende, in primo luogo, dalla nucleazione e secondariamente dal tempo di solidificazione del polimero. Particelle sferiche sono ottenute quando la nucleazione del polimero fuso precede il processo di solidificazione. In queste condizioni le gocce nebulizzate di polimero hanno il tempo di assestare la loro morfologia, e questo favorisce la formazione di particelle sferiche. La velocità di nucleazione è determinata dalla velocità del flusso attraverso l'ugello, mentre la velocità di solidificazione può essere regolata cambiando le condizioni operative di temperatura e pressione. Anche il diametro dell'ugello sembra condizionare la morfologia delle particelle, in particolare, più il diametro è piccolo maggiore è la percentuale di particelle sferiche prodotte. Probabilmente perché le gocce nebulizzate attraverso un ugello più piccolo solidificano più lentamente e questo porta ad una morfologia sferica. Per quanto riguarda le dimensioni particellari è stato visto come l'aumento di temperatura porta ad un aumento delle dimensioni delle particelle poiché la maggior parte delle particelle nebulizzate tendono a fondersi. Tuttavia, l'aumento di pressione può evitare questa fusione. Il diametro dell'ugello non sembra avere, invece, particolare influenza sulle dimensioni, contrariamente a ciò che ci si aspetterebbe. Inoltre alcune particelle ottenute mostravano una struttura cava, questo si pensa sia dovuto all'espansione della CO₂ all'interno delle particelle, che gioca anche un ruolo fondamentale nel determinare le dimensioni finali delle particelle stesse. Le gocce di PEG prodotte con un ugello più piccolo permettono alla CO₂ di espandersi all'interno delle particelle più lentamente e questo porta ad un aumento delle dimensioni a cui, però, si contrappone l'effetto del diametro del foro dell'ugello [56].

Mooney et al. hanno sviluppato un metodo, che prevede la formazione di scaffolds porosi di poli(acido D,L-lattico-co-glicolico) senza l'utilizzo di solventi organici. La

base del processo, così come nel caso della PGSS è legata alla solubilità della CO₂ nel polimero. In accordo con altri autori hanno evidenziato che la porosità e la struttura del poro dipendono dalla quantità di gas disciolto nel polimero, dalla velocità di flusso e dal tipo di gas utilizzato, così come dalla velocità di diffusione delle molecole di gas attraverso il polimero [66-68]. La quantità di gas può essere controllata variando la pressione del gas e la temperatura alla quale il polimero è equilibrato e saturato col gas. Il tipo di nucleazione (omo- o eterogenea) e la velocità di diffusione del gas disciolto possono essere regolate modificando la temperatura di lavoro e la velocità alla quale la pressione del gas è variata [66, 68]. Precedenti esperimenti hanno evidenziato che polimeri amorfi esibiscono una notevole porosità in seguito al contatto con la CO₂, mentre polimeri cristallini mostrano un' inferiore formazione di strutture porose. Questo comportamento è spiegato dal fatto che in un polimero amorfo dissolve, in genere, una maggiore quantità di gas rispetto al polimero cristallino [66, 69].

La nucleazione può avvenire in maniera omogenea o eterogenea [66, 68]. Spesso si verificano entrambe, e il loro contributo dipende dalla grandezza della forza motrice e dalla barriera di energia di attivazione che porta alla formazione dei vuoti. Nella nucleazione omogenea, le molecole di gas si riuniscono e l'energia di attivazione associata a questo è l'energia richiesta per formare una nuova superficie stabile e questo genera un cambiamento di volume. Ogni residuo di solvente agirà da plasticizzante riducendo l'energia superficiale del polimero, come anche la barriera di energia libera della nucleazione. Tutto questo porta ad un aumento della velocità di nucleazione e del numero di celle e, quindi, diminuisce le dimensioni dei pori. Nella nucleazione eterogenea, le celle nucleano in interfacce discrete all'interno del polimero. L'energia libera di nucleazione all'interfaccia è minore rispetto alla nucleazione omogenea per cui la velocità di nucleazione eterogenea è maggiore. Il numero totale di celle che può formarsi è, quindi, più limitato. Di conseguenza si formeranno meno pori ma di dimensioni maggiori [67].

DELOS (Depressurization of an Expanded Liquid Organic Solution)

La CO₂ in questo caso espande in un autoclave dove è presente una soluzione organica del soluto da micronizzare. Quindi la soluzione ternaria di soluto-solvente-gas compresso è depressurizzata rapidamente alla pressione ambiente. Durante questa depressione il sistema raffredda, ed è proprio la temperatura delle

goccioline che causa la nucleazione e la precipitazione del farmaco [57, 58]. La CO₂ agisce quindi come co-solvente per nebulizzare e raffreddare la soluzione organica.

CPCSP (The Continuous Powder Coating Spraying Process)

Questo processo è stato proposto per il coating di polveri. I componenti principale sono fusi in contenitori separati per evitare interazioni col polimero. Il polimero fuso è quindi miscelato intensivamente con CO₂ compressa, sono poi miscelati in esso i componenti principali e la miscela così ottenuta è espansa attraverso un nozzle [59]

1.3.1.4 Spray-drying CO₂-assistito

In questo caso la CO₂ in fase supercritica è utilizzata per favorire la nebulizzazione della soluzione contenente il composto d'interesse. E' un metodo questo molto simile al classico spray-drying, la sostanza viene infatti disciolta in acqua o etanolo oppure in una miscela di essi, quindi questa soluzione viene miscelata con CO₂ in condizioni supercritiche e l'emulsione che si è così formata viene decompressa [30].

CAN-BD (Carbon dioxide Assisted Nebulization with a Bubble Dryer[®])

In questo caso la CO₂ in fase supercritica e la soluzione sono forzati attraverso un volume molto piccolo per creare l'emulsione che viene poi fatta espandere in una camera d'essiccamento a pressione ambiente per generare un aerosol di goccioline che vengono essiccate da un flusso di azoto caldo [60] .

SAA (Supercritical Fluid-Assisted Atomization)

In questo metodo la CO₂ supercritica e la soluzione sono miscelate in un vessel che assicura una larga superficie di contatto tra la soluzione e il FSC, la miscela è poi spruzzata alla pressione ambiente sotto flusso di azoto caldo [61].

La principale differenza in queste due tecniche è quindi la miscelazione tra FSC e la soluzione che influenza l'entità della solubilizzazione del FSC nella soluzione stessa [30].

2. Scopo

La finalità di questo lavoro di ricerca è stato il miglioramento delle caratteristiche biofarmaceutiche di due farmaci modello, diazepam e lorazepam che appartengono alla classe II del Sistema di Classificazione Biofarmaceutica. Sono pertanto farmaci che presentano scarsa solubilità acquosa ma alta permeabilità.

Questi due farmaci sedativo-ipnotici sono utilizzati anche in casi di emergenza come possono essere gli attacchi di panico in cui è richiesta un'insorgenza d'azione immediata che non è garantita dalla somministrazione orale. Escludendo la via parenterale le vie di somministrazione che possono essere sfruttate in questo senso sono la via sublinguale e buccale. L'assorbimento in questo caso, come per la via orale, dipende dalla dissoluzione del farmaco a livello del sito d'assorbimento ossia la mucosa orale [2].

Si è quindi ricercato un miglioramento delle caratteristiche di dissoluzione attraverso la stabilizzazione cinetica di fasi non cristalline per mezzo della produzione di dispersioni solide con polimeri idrofili, come i polietilenglicoli.

Le dispersioni solide, tradizionalmente, sono preparate riscaldando le miscele di farmaco e carrier fino alla loro fusione seguita da risolidificazione per raffreddamento. Metodi alternativi consistono nel dissolvere entrambi i componenti in un solvente volatile e in seguito causare l'evaporazione del solvente stesso ovvero dissolvere il farmaco in un solvente come il propilen glicole e aggiungerlo successivamente al carrier fuso. Altri approcci includono anche metodi di melt-extrusion [24, 70, 71].

I principali inconvenienti di questi approcci sono la difficoltà di trattare materiali termosensibili e la possibile presenza di solvente residuo nel prodotto finale. Problemi questi che possono essere superati utilizzando la tecnologia dei FSC.

In questa tesi in particolare, l'attenzione è stata rivolta al processo di formazione di particelle da una soluzione saturata con gas in condizioni supercritiche (PGSS).

Nella preparazione di dispersioni solide i FSC sono stati sfruttati grazie alla loro capacità di ridurre la temperatura di transizione vetrosa e il punto di fusione dei PEGs [30, 53, 72].

Le condizioni operative e le variabili in grado di influenzare la struttura cristallina, la morfologia o la stabilità del prodotto sono state determinate dallo studio dei

sistemi a due componenti farmaco-eccipiente, eccipiente- SC-CO₂ e a tre componenti farmaco-eccipiente- SC-CO₂.

Le formulazioni ottenute sono state caratterizzate per quanto riguarda stato solido e velocità di dissoluzione.

In particolare, sono state effettuate misure di analisi termica e diffrazioni di raggi X per valutare in che forma i farmaci si disperdevano all'interno dei polietilenglicoli.

In seguito, attraverso analisi spettroscopiche è stata valutata la presenza e la natura delle interazioni tra farmaco ed eccipienti.

Infine, è stata studiata la velocità di dissoluzione delle dispersioni solide preparate in tampone fosfato pH 6.5 per valutare il potenziale miglioramento della dissoluzione del farmaco nell'ottica di un possibile impiego di queste formulazioni per la somministrazione buccale.

3. Materiali e Metodi

3.1 Materiali

Il PEG 1500 è stato fornito da A.C.E.F. (Italia); il PEG 4000 è stato fornito da Merck (Germany) e il PEG 6000 da Fluka (Germany); lorazepam e diazepam sono stati forniti da Cambrex (Italia). La CO₂ 4.5 (99.99 %) è stata fornita da Sapio (Italy).

In questo studio sono stati utilizzati anche acqua purificata, sodio fosfato monobasico anidro (A.C.E.F., Italia), sodio idrossido (VWR, International s.r.l., Italia), metanolo e acetonitrile per HPLC (Sigma Aldrich, Germania), acido acetico glaciale (VWR, International s.r.l., Italia), sale sodico dell'acido 1-eptansolfonico (Alfa Aesar, Germania), acetato di sodio (Merk, Germania).

Questi prodotti sono stati utilizzati come ricevuti dal fornitore.

3.2 Metodi

3.2.1 View cell ad alta pressione

Per visualizzare il comportamento dei PEGs in presenza di CO₂ a pressione e temperatura fisse è stata utilizzata una view cell ad alta pressione (SITEC-Sieber Engineering AG, Zurigo, Svizzera) (volume interno 74 mL). La cella presenta due finestre in zaffiro (diametro 18 mm) una di fronte all'altra. La temperatura è data da una camicia riscaldante (SITEC-Sieber Engineering AG, Zurigo, Svizzera) e la pressione da una pompa ad alta pressione (Teledyne ISCO 260D, Nebraska, USA) con un controllo della pressione di $\pm 0,5\%$ (series D pump controller, Teledyne ISCO). Utilizzando questa view cell è stato misurato il punto di fusione dei polimeri in CO₂ supercritica.

Punto di fusione in CO₂ supercritica

La misurazione del punto di fusione dei PEGs sotto pressione è basata su un metodo capillare modificato. Il polimero (circa 1g) è stato introdotto in un cilindro di vetro e posto all'interno della view cell. È stato, quindi, creato il vuoto all'interno della cella (membrane pump KNF, Italia), poi, è stata introdotta la CO₂ pressurizzata e si è riscaldato. La fusione del polimero è stata osservata attraverso le finestre di zaffiro. Per ogni analisi è stata fissata una temperatura mentre la pressione è stata aumentata fino all'inizio della fusione (la comparsa della prima goccia di liquido).

3.2.2 Preparazione delle miscele binarie contenenti diazepam e lorazepam

Le miscele utilizzate per la costruzione dei diagrammi di fase sono state preparate mediante il metodo di fusione; disperdendo i farmaci nei vari PEGs (1500, 4000 e 6000), in diverse percentuali p/p (5%, 10%, 20%, 30% e 50%), ad una temperatura di circa 2°C sopra la temperatura di fusione del polimero con l'ausilio di una piastra riscaldante (AREX, VELP Scientifica, Monza Brianza, Italia) dotata di una sonda (VERTEX VTF, VELP Scientifica, Monza Brianza, Italia) per il controllo della temperatura. Per il PEG 1500 la temperatura utilizzata è stata quindi 52 °C, per il PEG 4000 63 °C e per il PEG 6000 64 °C. Queste miscele sono state fatte raffreddare a temperatura ambiente sotto continua agitazione e quindi macinate in mortaio.

3.2.3 Solubilità di lorazepam e diazepam nei PEGs

Per analizzare la solubilità delle benzodiazepine nei vari PEG sono state preparate delle provette in vetro contenenti da 0,4 g a 0,6 g di miscele costituite da un 50: 50 di farmaco e polimero. Queste provette sono state poste in un becker contenente olio di vaselina ed isolate dall'ambiente esterno con polistirolo, quindi sono state riscaldate con una piastra (AREX, VELP Scientifica, Monza Brianza, Italia), dotata di una sonda (VERTEX VTF, VELP Scientifica, Monza Brianza, Italia) per il controllo della temperatura, a temperature da 60°C a 120°C (da 70 °C per le miscele contenenti PEG 6000). Le miscele sono state lasciate equilibrare per 24 ore e miscelate ad intervalli regolari con un agitatore vortex (FALC Instruments s.r.l., Bergamo, Italia) fino ad ottenere una soluzione satura, si è quindi verificata la presenza di corpo di fondo. Il surnatante è stato prelevato con una pipetta pasteur precedentemente tarata e riscaldata ed è stato poi fatto raffreddare a temperatura ambiente e pesato. Una volta raffreddato il surnatante è stato recuperato quantitativamente con una miscela metanolo:acqua (v/v 60:40) e diluito in un matraccio da 100 ml. Il contenuto in principio attivo è stato analizzato tramite metodo HPLC in grado di evidenziare anche eventuali prodotti di degradazione.

3.2.4 Preparazione delle dispersioni preparate con metodo della fusione contenenti diazepam alla saturazione

Sono stati preparati circa 3 g di dispersioni contenenti diazepam alla saturazione. Le miscele di farmaco e polimero in una proporzione del 50:50 sono state poste in un becker contenente olio di vaselina ed isolato dall'ambiente esterno con polistirolo,

queste miscele sono quindi state riscaldate con una piastra (AREX, VELP Scientifica, Monza Brianza, Italia), dotata di una sonda (VERTEX VTF, VELP Scientifica, Monza Brianza, Italia) per il controllo della temperatura. Le temperature utilizzate nella preparazione di queste dispersioni sono state 60 °C (70 °C nel caso del PEG 6000), 90 °C e 120°C. Le miscele sono state lasciate equilibrare per 24 ore e miscelate ad intervalli regolari con un agitatore vortex (FALC Instruments s.r.l., Bergamo, Italia) fino ad ottenere una soluzione satura. Il surnatante è stato prelevato con una pipetta pasteur ed è stato fatto raffreddare a temperatura ambiente. Il contenuto di principio attivo è stato analizzato tramite metodo HPLC in grado di evidenziare anche eventuali prodotti di degradazione ed è risultato essere intorno al 45%.

3.2.5 Preparazione delle dispersioni preparate con metodo della fusione contenenti diazepam al 80 % e 60 % della saturazione

Sono state preparate dispersioni di PEG 1500, 4000 e 6000 contenenti diazepam ad una concentrazione pari al 60 % e 80 % del valore di saturazione del farmaco nel polimero. Circa 3 g della miscela di farmaco e polimero nelle suddette concentrazioni sono stati posti in una provetta in vetro all'interno di un becker contenente olio di vaselina ed isolato dall'esterno con polistirolo e sono state quindi riscaldate con una piastra (AREX, VELP Scientifica, Monza Brianza, Italia), dotata di una sonda (VERTEX VTF, VELP Scientifica, Monza Brianza, Italia) per il controllo della temperatura. La temperatura nella preparazione di queste dispersioni è stata 120°C. Le miscele sono state lasciate equilibrare per 24 ore e miscelate ad intervalli regolari con un agitatore vortex (FALC Instruments s.r.l., Bergamo, Italia) fino ad ottenere una soluzione limpida senza corpo di fondo. Le dispersioni fuse sono state prelevate con pipette pasteur e fatte raffreddare a temperatura ambiente.

3.2.6 Stabilità delle dispersioni binarie al di sotto e alla saturazione

Le dispersioni binarie preparate sia alla saturazione che al di sotto di essa con tutti e tre i PEGs sono state poste, all'interno di un contenitore sigillato, in stabilità fino ad un anno in camera termostata (S.T.A. BRANCA IDEALAIR s.a.s., Varese, Italia) a 25 °C e 60 % di umidità. Le dispersioni preparate con PEG 4000 e 6000 sono state anche poste in camera termostata (Memmert, Schwabach, Germania) a 40 °C. Le dispersioni alla saturazione sono state analizzate ad intervalli di 1, 2, 3, 6 mesi e 1 anno. Le dispersioni al di sotto della saturazione sono invece state analizzate dopo 1, 6 mesi e 1 anno.

3.2.7 Preparazione delle miscele fisiche di diazepam e lorazepam

Le miscele fisiche sono state preparate al 5 % e 10 % p/p di contenuto in farmaco sia con PEG 4000 che 6000. In un mulino a palle Retsch MM 301 sono stati posti 0,5 g di miscele di diazepam e lorazepam con entrambi i PEGs ed entrambe le concentrazioni. Per la concentrazione più bassa sono quindi stati pesati 0,025 g di farmaco e 0,475 g di polimero, mentre per la concentrazione maggiore sono stati pesati 0,050 g di farmaco e 0,450 g di polimero. Farmaco e polimero sono stati posti all'interno del mulino, senza l'ausilio delle palle, e sono stati fatti mescolare per 5 min ad una frequenza di 30 s^{-1} .

3.2.8 Preparazione delle dispersioni solide con la tecnica PGSS

Il diagramma schematico dell'apparato supercritico utilizzato per la produzione di particelle di PEG contenenti il farmaco è riportato in Figura 14:

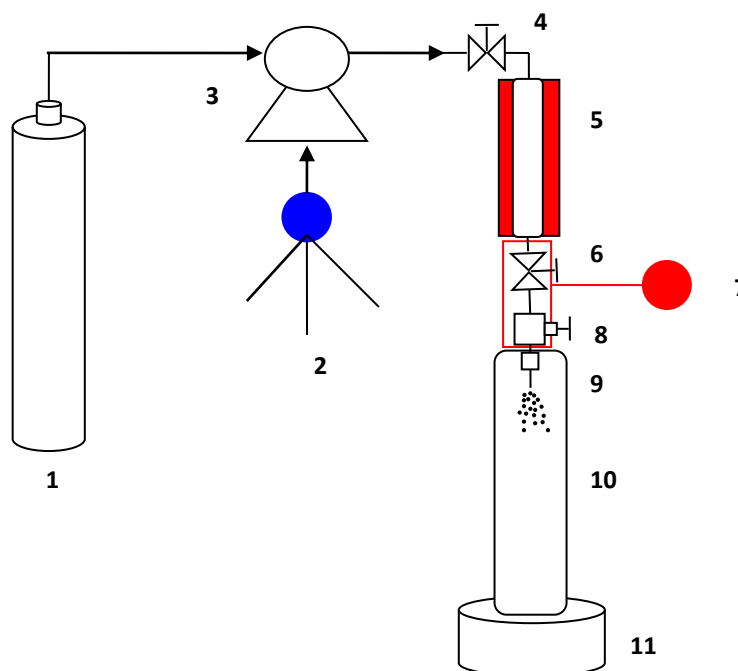


Figura 13. Schema dello strumento per la produzione di microparticelle: 1 cilindro di CO₂; 2 criostato; 3 pompa; 4 valvola d'entrata; 5 camera termostata; 6 valvola d'uscita; 7 termostato; 8 valvola micrometrica; 9 ugello, 10 camera di precipitazione, 11 camera di raccolta.

Lo strumento consta di due unità principali: una camera termostata (5) avvolta da camicia riscaldante dove avviene la miscelazione tra il polimero e il farmaco e la camera di precipitazione dotata di un ugello di diametro 0,4 mm.

Nella camera termostata è stata caricata una quantità di polimero e farmaco accuratamente pesata; in seguito è stato creato il vuoto all'interno della colonna per allontanare l'aria ed eventuale umidità. La colonna così preparata è stata connessa al circuito tramite le valvole 4 e 6. La CO₂ contenuta all'interno di una bombola (1) e, mantenuta liquida dal criostato (2), è stata, per mezzo di una pompa a pistone (Teledyne 260D, Isco, USA), mandata alla cella di mescolamento caricata con la miscela di polimero e farmaco (5% e 10% p/p). In seguito all'entrata della CO₂, il diazepam o il lorazepam si è solubilizzato nel polimero fuso. Dopo 4 ore di equilibratura (scelte in base alle analisi di solubilità della CO₂ nel polimero condotte in lavori precedenti [73]) la miscela CO₂-PEG-farmaco è stata nebulizzata attraverso l'ugello (9) all'interno della camera di precipitazione. Le particelle sono state preparate con PEG 4000 e 6000, alla temperatura di 55 °C e ad una pressione di 100 e 200 bar.

3.2.9 Analisi HPLC

La determinazione quantitativa di diazepam e lorazepam è stata effettuata mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography). È stato utilizzato un cromatografo Shimadzu (LC-10 Atvp; Software Cromatoplus) munito di un rivelatore a fotodiodi (SPD-10 VP Shimadzu).

La fase stazionaria era una colonna di silice ottil derivatizzata termostata a 50 °C, con un volume d'iniezione pari a 10 µl e ad un flusso di 1 ml/min. L'eluizione del diazepam e del lorazepam è stata osservata ad una lunghezza d'onda di 254 nm. Il tempo di ritenzione del diazepam era pari a 5,19 minuti mentre il lorazepam eluiva a 4,18 minuti. La fase mobile consisteva di una soluzione 0,5 M di acetato di sodio triidrato, contenente 5 mM di sale sodico monoidrato dell'acido 1-eptansolfonico e metanolo (30:70 v/v) aggiustata ad un pH 6.0 con acido acetico glaciale.

Il metodo HPLC utilizzato è stato convalidato per linearità, precisione, limite di rilevazione e limite di quantificazione.

La linearità è determinata calcolando la retta di regressione di un grafico in cui l'area di una soluzione di farmaco è posta in funzione della sua concentrazione.

La precisione è espressa come deviazione standard relativa (%RSD), ossia come percentuale del rapporto tra la deviazione standard e il valore medio dei risultati. Risulta essere accettabile una %RSD inferiore a 2 [74].

Il limite di rilevazione di un metodo è la concentrazione più bassa che lo strumento può rilevare ed è la concentrazione per la quale il LOD è uguale a 3:

$$\text{LOD} = \frac{\text{altezza picco}}{\text{oscillazione della linea di base}} \quad (6)$$

Il limite di quantificazione LOQ è la concentrazione minima che lo strumento può quantificare ed è la concentrazione per la quale il rapporto tra l'altezza del picco e il rumore di fondo è uguale a 10 [74].

E' stato calcolato anche il numero di piatti teorici (HETP) che è una misura dell'efficienza della colonna:

$$\text{HETP} = 5.54 \left(\frac{t}{W_h} \right)^2 \quad (7)$$

dove t è il tempo di ritenzione e W_h la larghezza del picco a metà della sua altezza [75].

Infine è stato misurato il fattore di scodamento (T), un indice di simmetria del picco dato dal rapporto tra la larghezza del picco a 1/20 della sua altezza (W) e due volte la distanza tra la perpendicolare tracciata al massimo del picco e il punto di inizio del picco stesso a 1/20 della sua altezza (f) [75]:

$$T = \frac{W}{2f} \quad (8)$$

$T = 1$ indica simmetria perfetta.

3.2.10 Determinazione quantitativa del principio attivo

Per valutare l'uniformità di contenuto, le dispersioni solide prodotte sono state sottoposte a 3 campionamenti e titolazione del contenuto di farmaco tramite analisi HPLC. I campioni sono stati preparati dissolvendo circa 30 mg esattamente pesati di particelle in una miscela acqua/metanolo 40:60 e quindi analizzati. Sono state calcolate la media e la deviazione standard del titolo % per ogni miscela analizzata.

3.2.11 Analisi termica

La DSC è una tecnica termoanalitica che misura la quantità di energia (calore) che viene assorbita o rilasciata dal campione quando è riscaldato, raffreddato o mantenuto ad una temperatura costante.

In un tipico esperimento sia il campione che il riferimento sono posti all'interno del forno termostato e sottoposti allo stesso programma di riscaldamento. La DSC rileva la differenza di calore tra il campione e il riferimento, dovuta a processi endo- o esotermici che possono verificarsi nel campione durante la scansione di temperatura.

Una tipica applicazione include la determinazione del punto di fusione, il calore di fusione, la temperatura di transizione vetrosa, studi di cristallizzazione, e identificazione delle trasformazioni di fase.

I campioni di farmaco e PEGs preparati con il metodo della fusione sono stati analizzati con un calorimetro differenziale a scansione DSC 821e STARe METTLER TOLEDO; i crogioli dove è stata posta la polvere sono in alluminio della capacità di 40 μ l, chiusi e sigillati con coperchi (sempre in alluminio) forati. I campioni delle dispersioni solide sono stati pesati esattamente (15-35 mg), posti nei crogioli e sottoposti ad un programma di riscaldamento che va da 0 a 180 °C ad una velocità di scansione di 1K al minuto in una atmosfera di azoto secco ad un flusso di 100 mL/min. Con questo strumento sono stati analizzati anche i materiali puri, i PEGs sono stati sottoposti ad un programma di riscaldamento da 0 °C a 80 °C, mentre il diazepam da 0 °C a 220 °C e il lorazepam da 0 °C a 200 °C ad una velocità di 5 K/min.

Le dispersioni solide preparate con il metodo PGSS sono state analizzate con un calorimetro differenziale a scansione DSC Q100 Alphatec TA Instruments equipaggiato con un sistema di raffreddamento TA Instruments; i crogioli sono in alluminio chiusi e sigillati con coperchi (sempre in alluminio). I campioni delle dispersioni solide sono stati pesati esattamente (3-6 mg), posti nei crogioli e sottoposti ad un programma di riscaldamento che va da 0 a 160 °C nel caso delle dispersioni contenenti diazepam, mentre da 0 a 220 °C in quelle contenenti lorazepam; entrambe ad una velocità di scansione di 5K al minuto in una atmosfera di azoto secco.

La calibrazione di temperatura e dei valori di entalpia è stata fatta con Indio in entrambi i casi.

3.2.12 Microscopia su piastra riscaldante

Nel caso delle miscele binarie è stata utilizzata una piastra riscaldante HSF 91 (Linkam Scientific Instruments, U.K.) accoppiata ad un microscopio a luce polarizzata (Labophot II Nikon, Tokio, Japan) con un ingrandimento 10x. Una fotocamera Nikon

(Japan) coolpix 4500, 4.0 megapixels equipaggiata con coolpix MDC lens (Nikon) è stata utilizzata per prendere immagini del campione in esame durante il riscaldamento a 1K/min da temperatura ambiente fino a completa scomparsa dei cristalli di farmaco e del successivo raffreddamento fino a temperatura ambiente.

Le dispersioni solide preparate con la tecnica PGSS, le miscele fisiche e i polimeri corrispondenti sono stati analizzati su una piastra riscaldante FP82HT (Mettler Toledo) accoppiata ad un microscopio a luce polarizzata (Motic, B9300) con un ingrandimento 4x. Le immagini del campione in esame durante il riscaldamento a 1K/min da temperatura ambiente fino a completa scomparsa del farmaco sono state acquisite con il programma Motic Images Plus 2.0 ML.

3.2.13 Diffrazione di Raggi X su polvere (XRPD)

La diffrazione di raggi X su polvere è una tecnica che utilizza radiazioni elettromagnetiche di lunghezza d'onda intorno a 1 Å (10^{-10} m) per caratterizzare la struttura dei materiali.

I raggi X sono generati all'interno di un tubo sigillato che si trova sotto vuoto. E' applicata una corrente che riscalda un filamento all'interno del tubo; questo genera l'emissione di elettroni. L'alto voltaggio della corrente applicata entro il tubo accelera gli elettroni che, poi, colpiscono un bersaglio (in genere Cu). Quando questi elettroni colpiscono il target vengono generati i raggi X. I raggi X sono collimati e diretti su un campione appiattito, e diffratti agli angoli in modo da soddisfare l'equazione di Bragg:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (9)$$

dove n è l'ordine di diffrazione, d è lo spazio interplanare del reticolo cristallino del campione, θ è l'angolo di incidenza del raggio X (angolo di Bragg) e λ è la lunghezza d'onda caratteristica dei raggi X.

I dati di diffrazione della polvere sono, in genere, presentati su un diffrattogramma dove l'intensità della radiazione diffratta I è posta in funzione dell'angolo che diffonde 2θ .

Gli spettri di diffrazione su polvere delle miscele binarie, delle dispersioni alla saturazione e al di sotto di essa, delle dispersioni solide al tempo zero preparate con la tecnica PGSS e delle miscele fisiche sono stati registrati mediante un diffrattometro Rigaku MiniFlex (Tokyo, J) con una radiazione $\text{CuK}\alpha$ (30 kV, 15mA,

$\lambda=1.5418 \text{ \AA}$), in un range di scansione (2θ) compreso tra 2 e 35° e una velocità di scansione di $0.5^\circ/\text{min}$.

I diffrattogrammi delle dispersioni dopo 4 mesi sono stati raccolti con un diffrattometro X'Pert PRO MPD (PANalytical B.V., Alemolo, The Netherlands) con una radiazione $\text{CuK}\alpha$ (40 kV , 30mA , $\lambda=1.541 \text{ \AA}$) ad una velocità di scansione di $0.119^\circ/\text{min}$ e in un range di scansione da 5° a 35° .

3.2.14 Spettroscopia ad Infrarossi

La radiazione infrarossa è una tecnica molto utilizzata per identificare composti sconosciuti poiché gli spettri IR sono specifici per ogni molecola in quanto sono caratteristici dei gruppi di atomi presenti all'interno del composto e delle sue vibrazioni molecolari.

La spettrometria infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR) è ampiamente utilizzata e prevede la suddivisione della radiazione IR in due raggi che percorrono differenti distanze prima di colpire il campione. Queste differenze portano ad ottenere un interferogramma che è convertito dalla trasformata di Fourier in un grafico di assorbanza in funzione della frequenza.

Gli spettri IR delle dispersioni binarie di diazepam alla saturazione preparate a 120°C sono stati registrati mediante lo strumento FT/IR – 300E Jasco equipaggiato con accessorio per riflettanza orizzontale attenuata (HATR Trough, PIKE Technologies, Madison, Wisconsin, USA) dotato di un cristallo di ZnSe, in un range di lunghezza d'onda compreso tra 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} . I campioni sono stati analizzati come semisolidi.

Gli spettri IR delle dispersioni solide preparate con la tecnica PGSS, delle corrispondenti miscele fisiche e delle materie prime sia cristalline che amorfe sono stati raccolti utilizzando uno spettrometro Varian 3100 FT-IR Excalibur Series equipaggiato con un accessorio per riflettanza totale attenuata (ATR, GladiATR, PikeTech, WI, USA) costituito da un diamante monolitico. La risoluzione utilizzata è stata 4 cm^{-1} , gli spettri sono stati ottenuti con 64 scansioni e registrati in un range di lunghezze d'onda tra $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$. L'utilizzo dell'accessorio ATR ha permesso di analizzare i campioni direttamente come polveri.

3.2.15 Studi di dissoluzione

La velocità di dissoluzione dei farmaci nelle dispersioni solide e nelle miscele fisiche sono state misurate con il metodo dei basket ad una velocità di 100 rpm utilizzando un dissolutore D800 (Logan Instruments Corp.) equipaggiato con un sistema riscaldante (Logan Instruments Corp.). Le dispersioni solide e le miscele fisiche sono state precedentemente setacciate ed è stato selezionato per questi studi un range dimensionale tra 0 e 355 μm . Gli esperimenti di dissoluzione sono stati eseguiti a 37 °C con un mezzo di dissoluzione costituito da tampone fosfato 0.1 M a pH 6.5. Il volume di dissoluzione utilizzato è stato di 500 mL. La concentrazione di diazepam e lorazepam è stata quantificata mediante spettrofotometria UV-Visibile ad intervalli regolari (5', 10', 15', 30', 45', 60', 90' e 120') .

3.2.16 Spettrofotometria UV-Visibile

La spettrofotometria UV-Visibile è un'analisi che si basa sui fenomeni di assorbimento delle radiazioni nelle regioni tra 100 nm e 800 nm che corrispondono alle regioni del visibile e dell'ultravioletto. Le analisi più comuni in realtà utilizzano la regione del visibile (350-800 nm) e del vicino ultravioletto (200-350 nm). L'assorbimento di queste radiazioni, nel caso delle molecole organiche, avviene ad opera di gruppi cromofori i quali contengono elettroni di valenza caratterizzati da una bassa energia di eccitazione, in particolare elettroni di tipo π . Questi gruppi assorbono nella maggior parte dei casi tra 200 e 800 nm.

Questo metodo permette di condurre sia analisi quantitative, misurando l'assorbanza a singole lunghezze d'onda, ma anche qualitative, misurando lo spettro di assorbimento completo che è tipico di ogni sostanza [76].

In questo lavoro è stata condotta un'analisi quantitativa convalidata per linearità e precisione. La linearità è determinata calcolando la retta di regressione di un grafico in cui l'assorbanza è posta in funzione della concentrazione del campione. La precisione è una misura della riproducibilità del metodo analitico ed è espressa come deviazione standard relativa (RSD).

Dalla pendenza della retta di taratura è stato ricavato il valore del coefficiente di estinzione molare che permette di calcolare la concentrazione della soluzione partendo dalla sua assorbanza secondo la legge di Lambert – Beer:

$$A = \epsilon cl \quad (10)$$

in cui A è l'assorbanza del campione analizzato, ϵ è il coefficiente di estinzione molare, c è la concentrazione del campione analizzato e l è la lunghezza del cammino ottico tipico della cella contenente il campione.

La concentrazione di lorazepam e diazepam è stata quantificata mediante spettrofotometro UV-Visibile (Cary 1, Varian) ad una lunghezza d'onda di 229 nm e 231 nm rispettivamente.

3.2.17 Quench cooling

Il diazepam amorfo è stato ottenuto con un ciclo di riscaldamento/ raffreddamento: il diazepam cristallino è stato fuso ad una temperatura di 150 °C in un forno Heraeus e quindi raffreddato con azoto liquido.

Sono state anche preparate dispersioni solide contenenti diazepam con il metodo della fusione e successivo rapido raffreddamento: le miscele fisiche di farmaco e polimeri al 5 % e 10 % p/p di diazepam sono state fuse a 80 °C nel forno Heraeus e quindi raffreddate con azoto liquido.

3.2.18 Mulino a palle

Il lorazepam è stato sottoposto ad un ciclo in mulino a palle per raggiungere la sua amorfizzazione. Circa 0,5 g di lorazepam sono stati posti all'interno di un mulino Retsch MM301 insieme a 3 palle, il mulino è stato quindi attivato ad una frequenza di 30 s⁻¹ per 99 minuti.

4. Risultati e Discussione

4.1 Caratterizzazione dello stato solido dei PEGs

I polietilenglicoli utilizzati in questo lavoro di tesi sono stati caratterizzati mediante analisi termica, come calorimetria differenziale a scansione e microscopia su piastra riscaldante, e analisi cristallografica, come la diffrazione di raggi X su polveri.

I campioni sono stati innanzitutto sottoposti ad un programma di riscaldamento da 0 °C a 80 °C ad una velocità di 5 K/min all'interno di un calorimetro differenziale a scansione.

In Figura 14, 15 e 16 sono riportati i tracciati DSC del PEG 1500, 4000 e 6000.

In tutti i tracciati si osserva la presenza di un fenomeno endotermico riconducibile ad una transizione di fase solido-liquido. I PEG 1500, 4000 e 6000 sono risultati essere dei polimeri solidi semicristallini con un punto di fusione, rispettivamente di 49,6 °C, 60,6 °C e 61,5 °C.

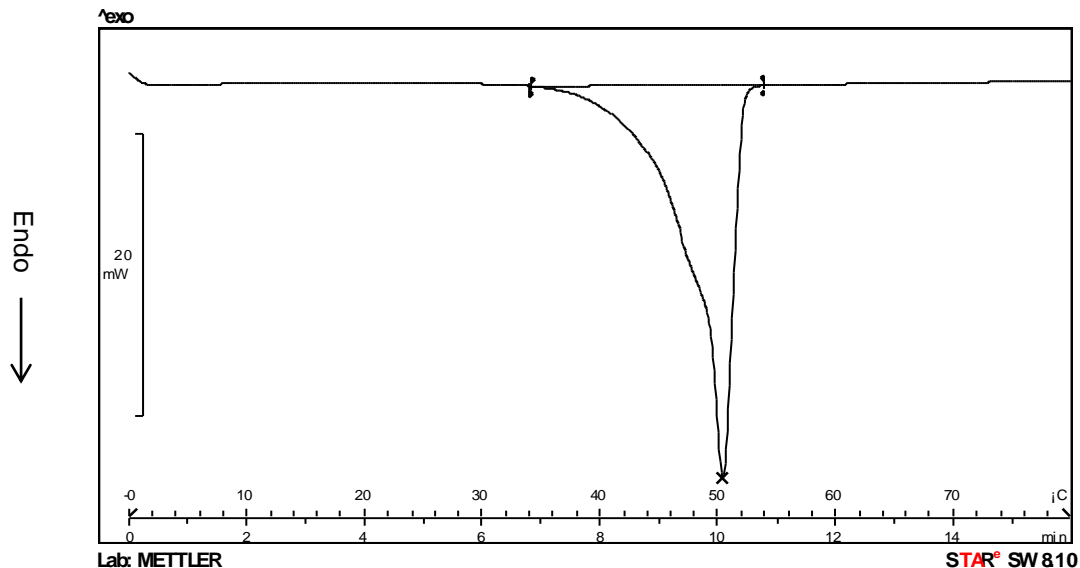


Figura 14. Tracciato DSC del PEG 1500

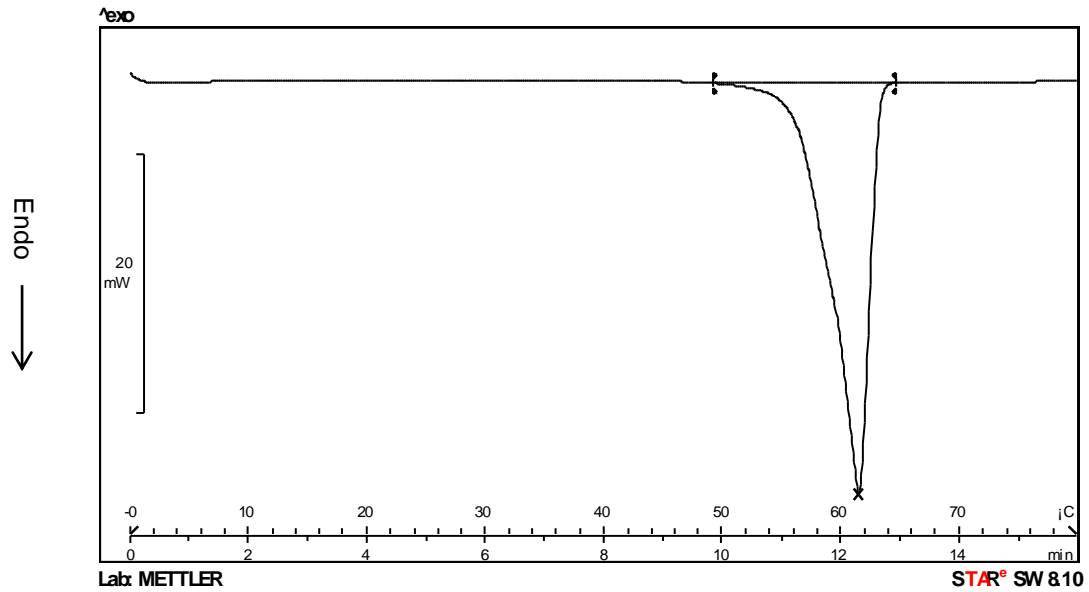


Figura 15. Tracciato DSC del PEG 4000

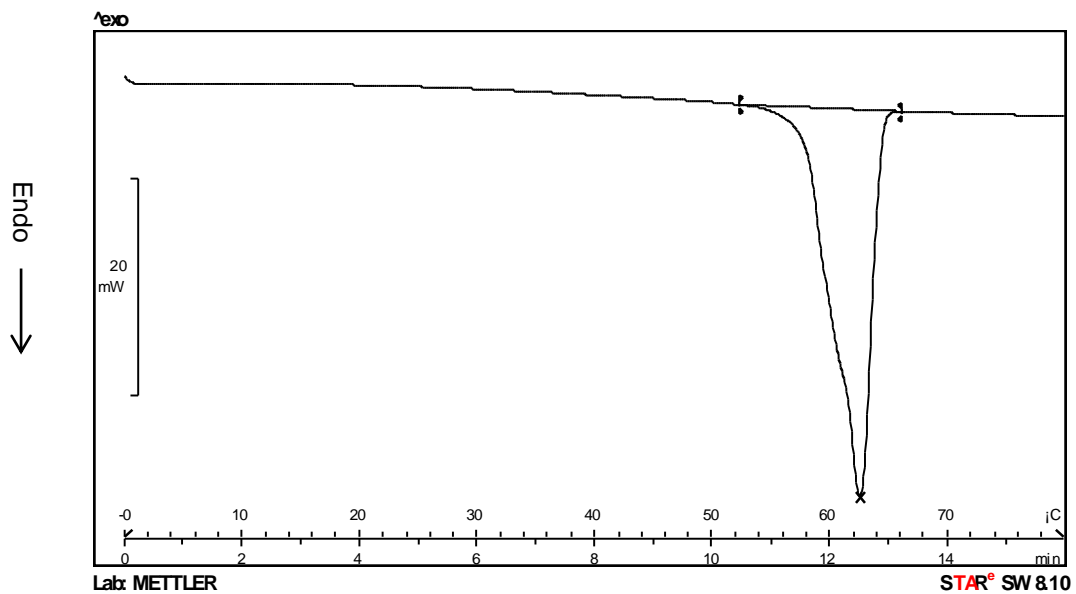


Figura 16. Tracciato DSC del PEG 6000

L'evento endotermico messo in evidenza dalla calorimetria differenziale a scansione è stato seguito per quanto riguarda PEG 4000 e 6000 anche con l'ausilio di un microscopio a luce polarizzata ed una piastra riscaldante. Le immagini ottenute sono riportate in Figura 17 e 18.

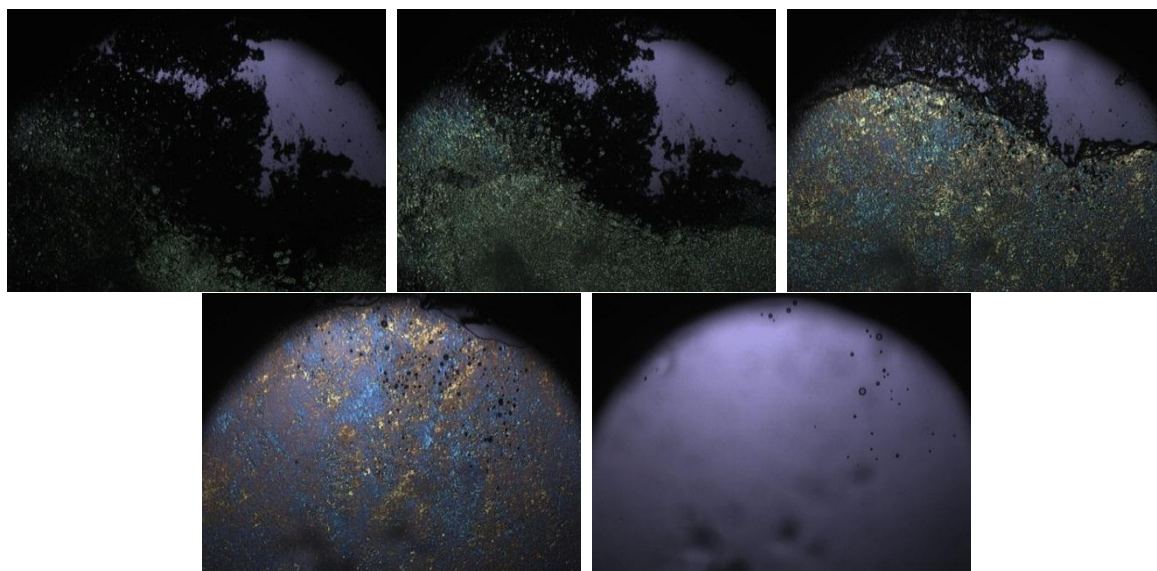


Figura 17. Immagini al microscopio polarizzato (ingrandimento 4x) dotato di piastra riscaldante del PEG 4000 durante un riscaldamento con una velocità di 1K/min da 30 °C a completa fusione del polimero (70 °C).

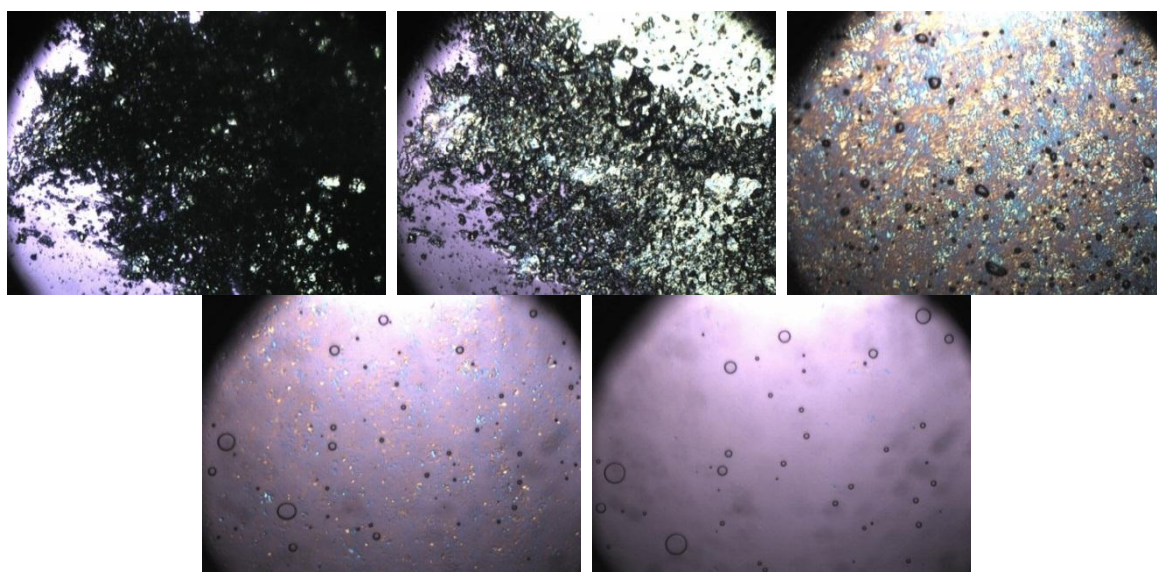


Figura 18. Immagini al microscopio polarizzato (ingrandimento 4x) dotato di piastra riscaldante del PEG 6000 durante un riscaldamento con una velocità di 1K/min da 30 °C a completa fusione del polimero (70 °C).

Da queste immagini si può notare una birifrangenza iniziale, indice della cristallinità del prodotto di partenza, seguita da un rammollimento e quindi una fusione a temperature in linea con quelle ottenute in DSC.

I polimeri sono stati quindi sottoposti a diffrazione di raggi X su polvere. In Figura 19, 20 e 21 sono mostrati i diffrattogrammi di raggi X dei tre PEG studiati.

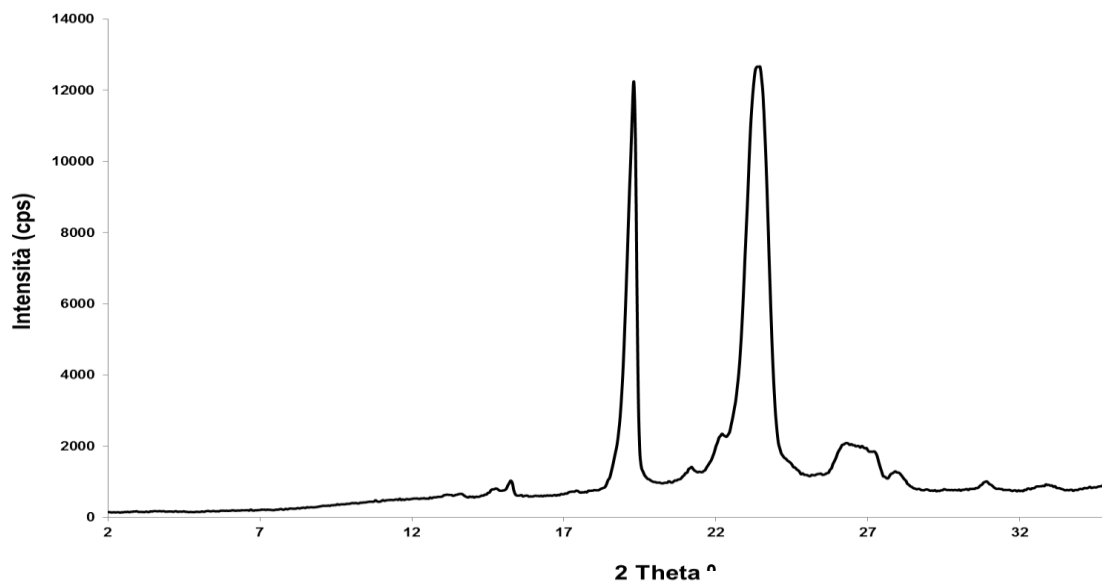


Figura 19. Diffrattogramma di raggi-X del PEG 1500

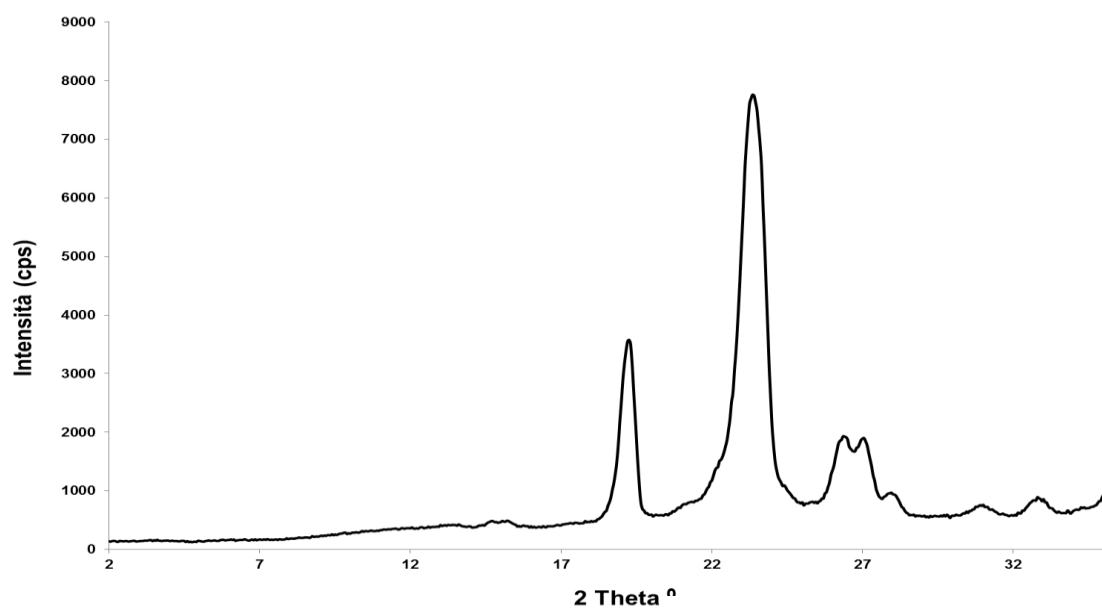


Figura 20. Diffrattogramma di raggi-X del PEG 4000

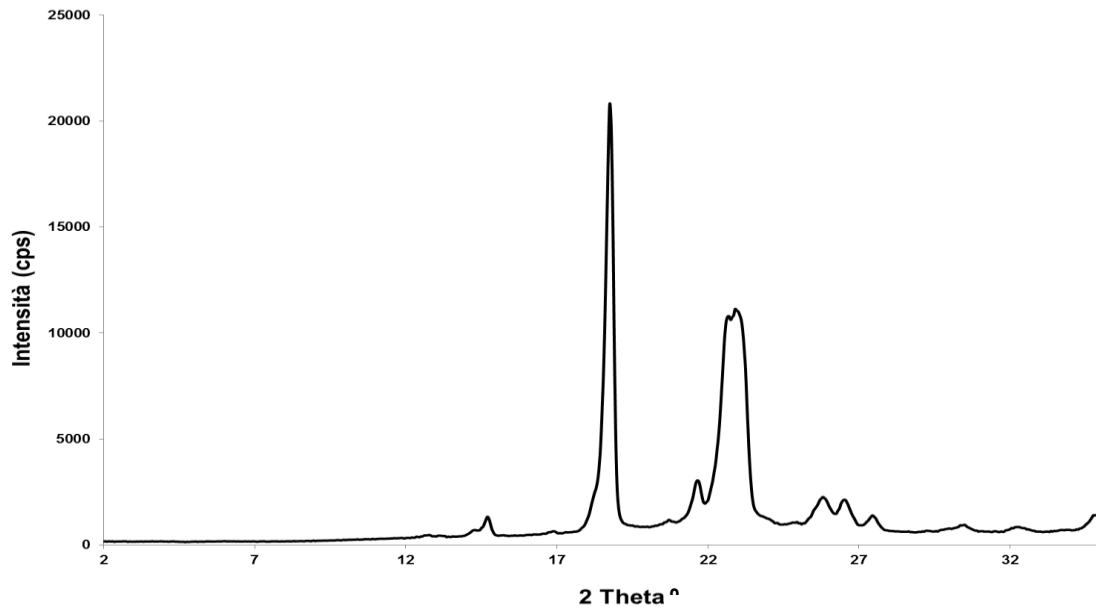


Figura 21. Diffrattogramma di raggi-X del PEG 6000

Da questi diffrattogrammi si osserva la presenza di alcuni picchi caratteristici di elevata intensità che denotano un certo grado di cristallinità per tutti e tre i materiali analizzati.

4.2 Caratterizzazione dello stato solido delle benzodiazepine

Le benzodiazepine sono state anch'esse caratterizzate tramite analisi termica e cristallografica.

Il diffrattogramma del diazepam (Figura 22) mostra una serie di picchi ben definiti e di elevata intensità caratteristici di sostanze di natura cristallina. Il tracciato DSC (Figura 23) mostra un unico evento di natura endotermica che rappresenta la fusione del farmaco la quale avviene intorno a 132 °C, dato che trova conferma in letteratura [1]

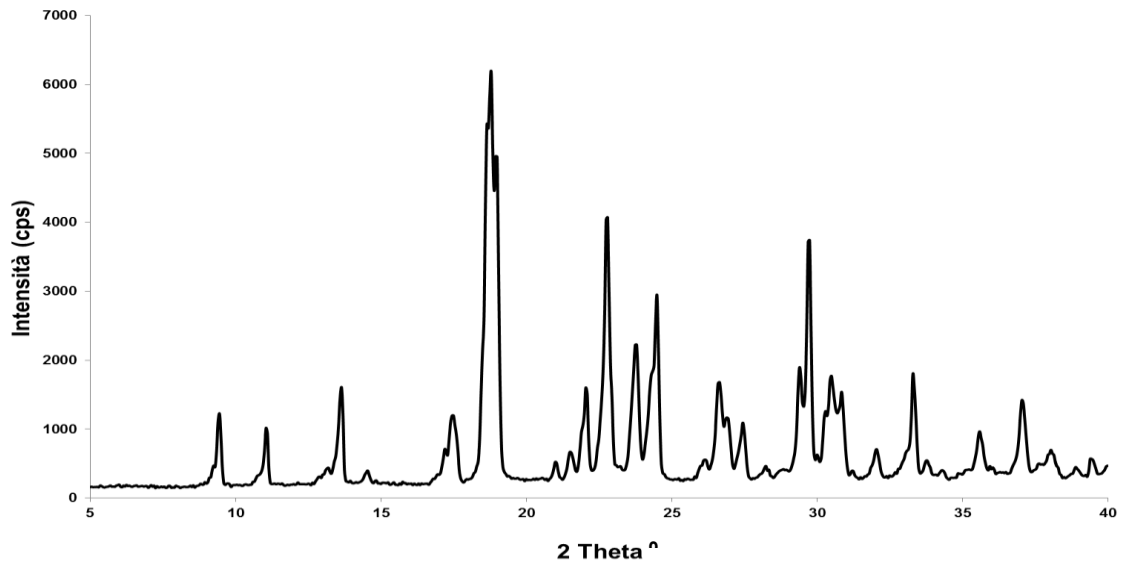


Figura 22. Diffrattogramma di raggi X della polvere di diazepam

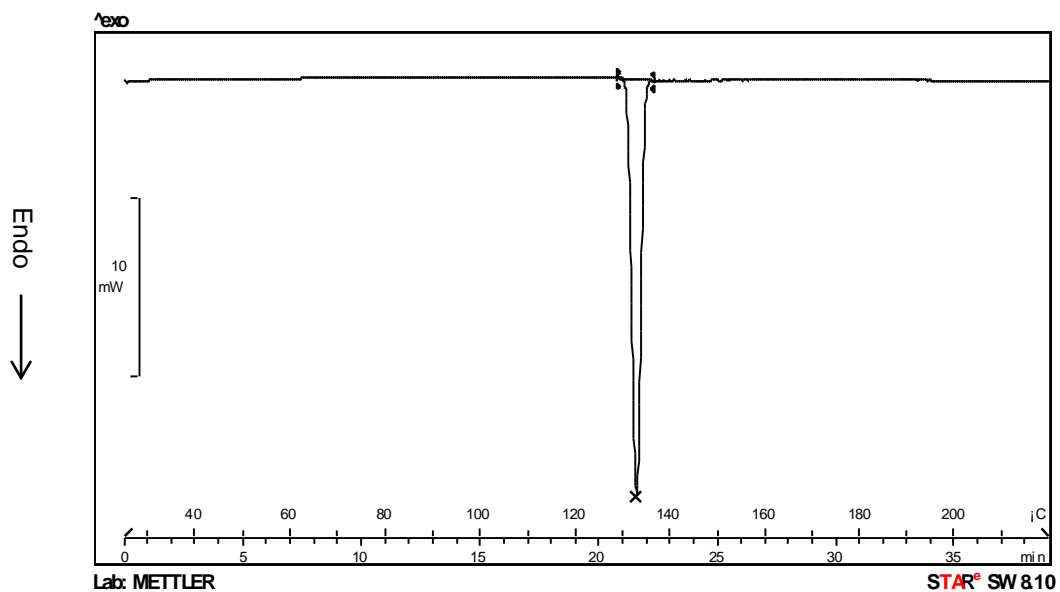


Figura 23. Tracciato DSC del diazepam

Il diazepam è stato sottoposto ad un ciclo di riscaldamento/raffreddamento in un calorimetro differenziale a scansione. Inizialmente il diazepam è stato riscaldato oltre il suo punto di fusione fino ad una temperatura di 150 °C quindi raffreddato ad una velocità di 50 K/min fino a 0 °C. Successivamente il diazepam è stato nuovamente riscaldato fino a 160 °C. Come si può vedere dalla Figura 24 è stato possibile ottenere la sua forma amorfa, è possibile infatti notare un evento endotermico, durante la prima fase di riscaldamento, che corrisponde al picco di fusione del

farmaco cristallino. Dopo il raffreddamento il secondo ciclo di riscaldamento mostra invece un evento endotermico che inizia a 44 °C riconducibile alla transizione vetrosa del farmaco amorfo. La T_g (temperatura di transizione vetrosa) è risultata essere 47 °C.

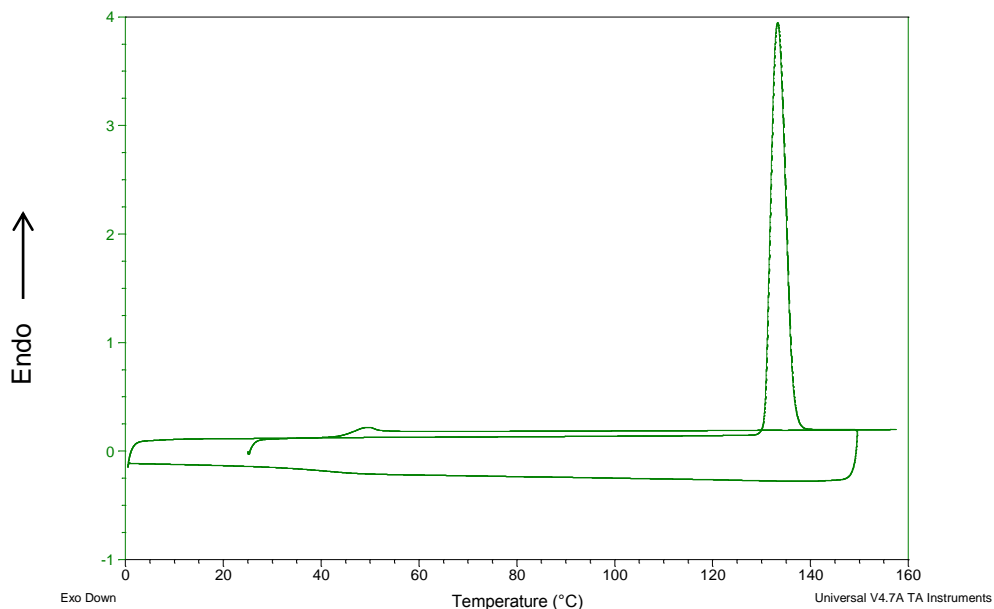


Figura 24. Tracciato DSC del diazepam dopo ciclo di riscaldamento/ raffreddamento

Il diazepam è stato anche sottoposto a quench cooling al di fuori del forno della DSC, è stato quindi riscaldato oltre il suo punto di fusione, in particolare fino a 150 °C, e raffreddato rapidamente in azoto liquido.

Il diazepam in fase amorfa così ottenuto è stato conservato a - 20 °C in presenza di P₂O₅. Alcuni studi hanno infatti dimostrato che a temperature inferiori di almeno 50 gradi alla T_g di un campione amorfo la sua mobilità molecolare è trascurabile e questo dovrebbe impedirne la ricristallizzazione [26].

Le immagini riportate in Figura 25, ottenute con microscopio a luce polarizzata, hanno confermato ciò che si è visto dai tracciati DSC. Il diazepam grezzo ha infatti mostrato birifrangenza (a), indice questo di una sostanza cristallina.

La birifrangenza scompare nel diazepam dopo quench cooling (b), questo indica la scomparsa di cristallinità nel composto e quindi la sua amorfizzazione .

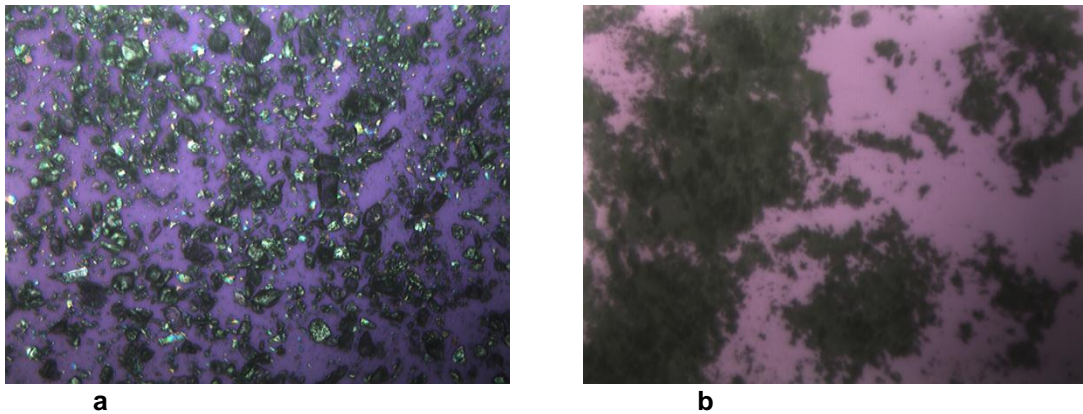


Figura 25. Immagini da microscopio polarizzato con ingrandimento 4x (a. diazepam grezzo, b. diazepam dopo quench cooling).

Nello studio del diazepam in miscela con tutti e tre i polietilenglicoli si è verificato un problema di orientamento preferenziale dei cristalli di farmaco e polimero che ha portato ad avere nei diffrattogrammi uno shift dei picchi relativi ai due componenti e la mancanza di una risposta lineare e precisa alle variazioni di concentrazione del diazepam all'interno delle miscele.

Questi problemi si possono evidenziare in Figura 26 dove è riportato un confronto tra i diffrattogrammi del diazepam, del PEG 6000 e di una miscela al 50:50 di diazepam e polimero.

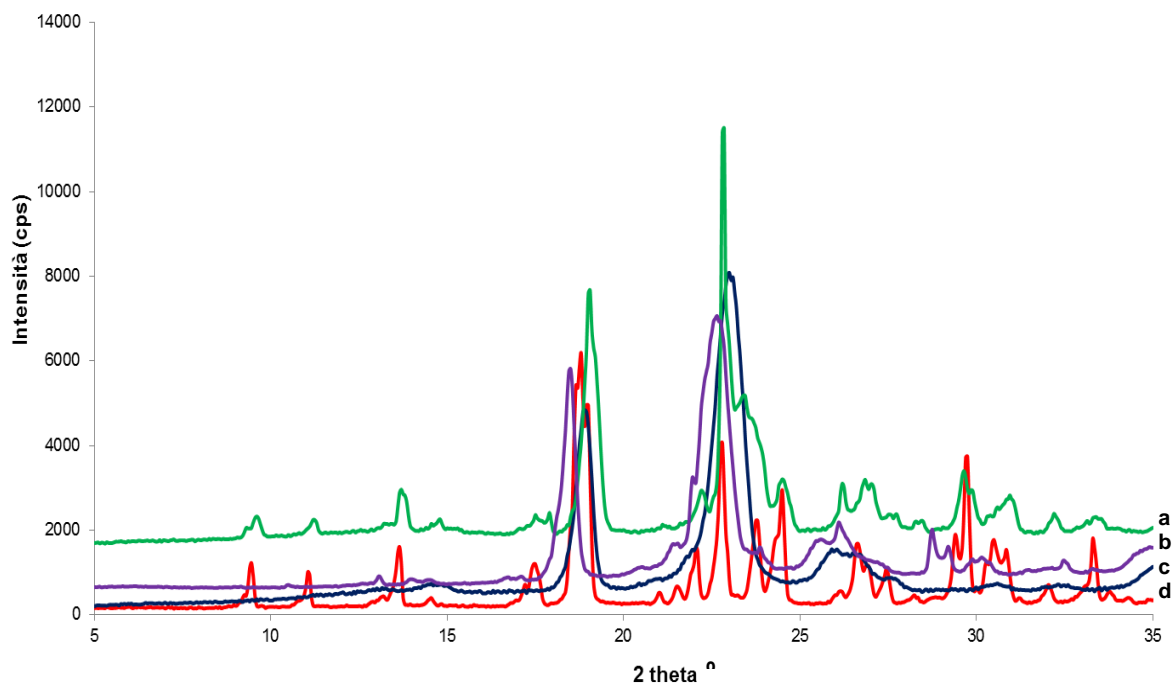


Figura 26. Diffrattogramma di raggi X della polvere di diazepam (d), PEG 6000 (b), miscela fisica di diazepam e PEG 6000 al 50% (c) e 16% (a) p/p in farmaco.

Sono stati riportati ad esempio solo i diffrattogrammi relativi al PEG 6000 e alle sue miscele col diazepam in quanto i problemi mostrati in questi diffrattogrammi sono gli stessi mostrati dalle miscele di diazepam anche con PEG 1500 e 4000.

Passando alla seconda benzodiazepina, il lorazepam, in Figura 27 è rappresentato il diffrattogramma di raggi-X su polvere. Anche in questo caso, come in quello del diazepam, si osservano una serie di picchi ben definiti ed intensi che denotano un elevato grado di cristallinità del farmaco.

Per quanto concerne, invece, la determinazione del punto di fusione, il tracciato DSC, riportato in Figura 28 presenta alcune interessanti caratteristiche. Anzitutto si osserva un progressivo innalzamento della linea di base, che può, in prima istanza, essere interpretato come dovuto ad una parziale decomposizione conseguente al riscaldamento. E' presente un'endoterma di fusione con onset attorno a 181,1 °C e un picco a 182,6°C. Questa endoterma si presenta allargata nella parte finale, verosimilmente a causa di un fenomeno di rapida degradazione.

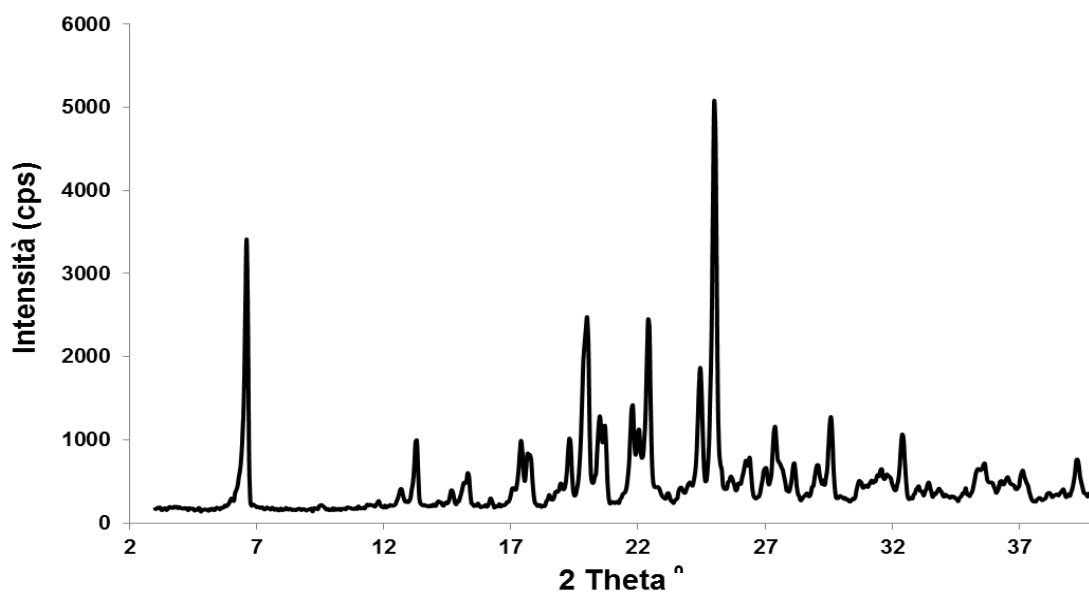


Figura 27. Diffrattogramma di raggi X della polvere di lorazepam

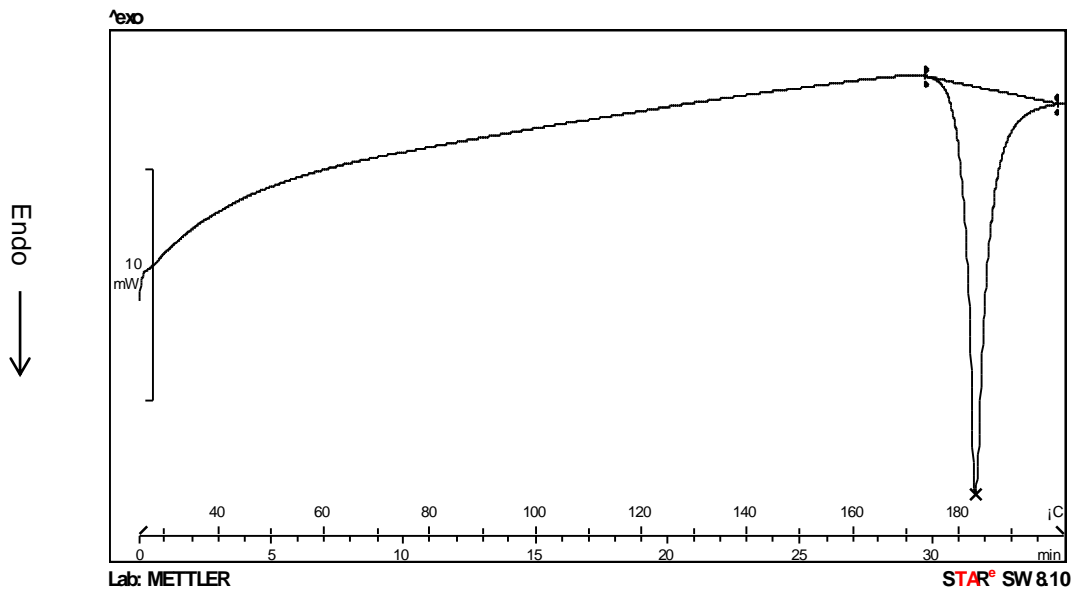


Figura 28. Tracciato DSC del lorazepam

Anche nel caso del lorazepam si è valutata la possibilità di ottenere il farmaco in uno stato amorfo. L'instabilità termica del lorazepam durante la fusione non permette però di sottoporlo a cicli di riscaldamento/ raffreddamento [34] e quindi di sfruttare la tecnica di quench cooling per ottenere il composto amorfo.

Un altro metodo che permette di convertire un farmaco cristallino in amorfo è rappresentato dall'attivazione meccanica del composto che porta ad una conversione solido-solido. Viene quindi sfruttata la macinazione [77] e in particolare, in questo caso si è pensato di sottoporlo ad un ciclo in mulino a palle, altra tecnica che può essere sfruttata per raggiungere l'amorfizzazione di composti farmaceutici.

Nel tracciato DSC riportato in Figura 29 relativo al lorazepam dopo un ciclo in mulino a palle di 99 minuti è possibile evidenziare un picco endotermico che non è preceduto da alcun fenomeno esotermico di cristallizzazione, essendo questo picco a 140 °C e quindi almeno 40 gradi sotto il punto di fusione del lorazepam grezzo che stiamo utilizzando (Figura 28) e non corrispondendo a nessuno dei polimorfi riportati in letteratura [34] possiamo concludere che durante il processo di macinazione nel mulino a palle si è formato un prodotto di degradazione. Questa ipotesi è supportata anche dal colore nero della polvere ottenuta dopo tale processo.

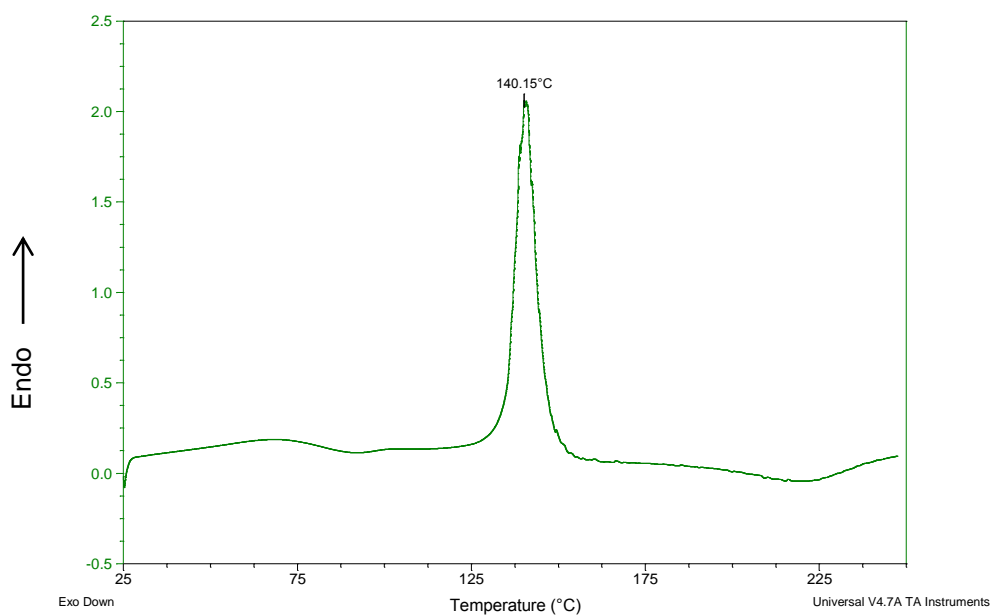


Figura 29. Tracciato DSC dopo ball milling

4.3 Convalida dei metodi analitici

4.3.1 Convalida del metodo HPLC

La convalida del metodo HPLC è stata eseguita per entrambi i farmaci riportando i valori dell'area del picco cromatografico ottenuto con la concentrazione di uno standard di farmaco disciolto in una miscela di metanolo:H₂O (60:40 v/v).

Per quanto riguarda il diazepam ogni campione è stato iniettato tre volte. In Tabella 4 sono riportati i valori che indicano il grado di precisione del metodo analitico espresso dalle deviazioni standard relativa, RSD.

Tabella 4. Valori di area sottesa al picco cromatografico del diazepam (AUC), deviazione standard (ds) e deviazione standard relativa (RSD %) calcolata per i diversi campioni di diazepam a diverse concentrazioni.

Concentrazione (mg/mL)	AUC media (n =3)	ds	RSD %
0,0103	573224	10466	1,83
0,0275	1723207	7421	0,43
0,0344	2104464	25914	1,23
0,0602	3627897	34841	0,96
0,0688	4121260	68677	1,67
0,0860	5215457	78409	1,5

Dai valori ottenuti di RSD % il metodo è stato considerato sufficientemente preciso e riproducibile in quanto tutti i valori sono risultati essere inferiori al 2 %. E' stata inoltre determinata la capacità del metodo di fornire una risposta lineare alla concentrazione dell'analita in un determinato range. In Figura 30 è rappresentata la relazione tra l'area sottesa dalla curva del picco cromatografico e la concentrazione della soluzione del farmaco.

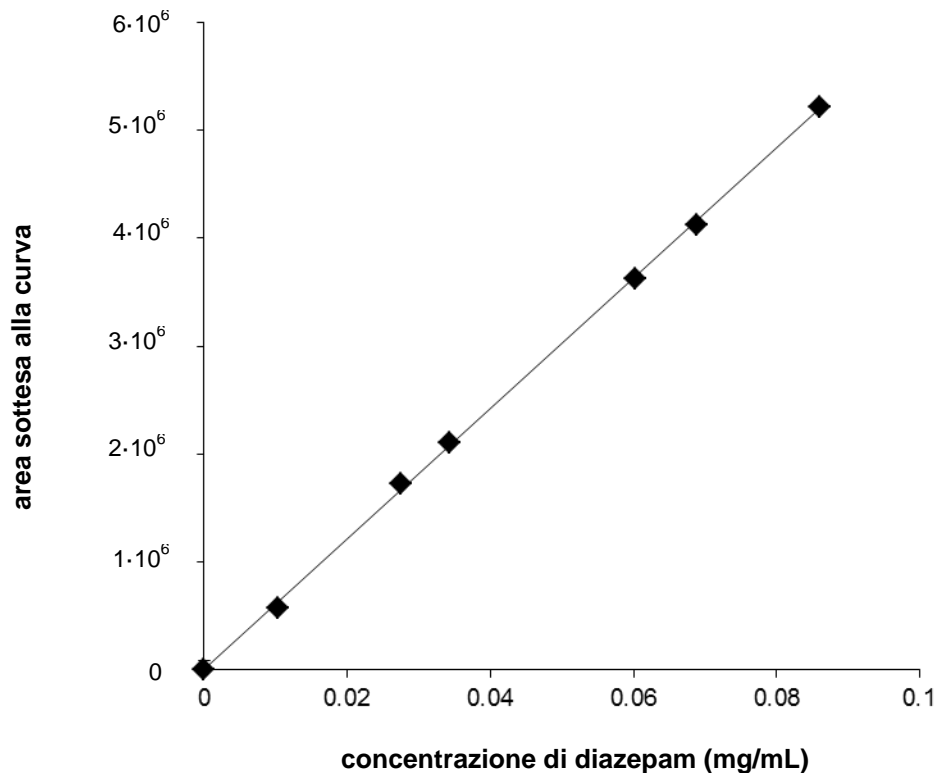


Figura 30: Area del picco in funzione della concentrazione di soluzioni di diazepam. Equazione della retta di regressione $y=6 \cdot 10^7 x + 42,365$ $R^2=0,9996$.

Il coefficiente R^2 è risultato essere molto vicino ad 1, indicando così una buona correlazione tra concentrazione e risposta analitica.

Inoltre, sono stati calcolati i limiti di rilevazione (LOD) e di quantificazione (LOQ).

Il valore di LOD è risultato essere pari a 0,75 $\mu\text{g/ml}$ mentre il valore di LOQ pari 2,87 $\mu\text{g/ml}$. E' stato inoltre calcolato il numero di piatti teorici (HETP) risultato essere uguale a 12247 mentre il fattore di scodamento è risultato pari a 0,94.

Per quanto riguarda il lorazepam ogni campione è stato iniettato due volte. Anche in questo caso gli standard di faramco sono stati preparati utilizzando una miscela di metanolo: acqua (60:40 v/v). In Tabella 5 sono stati riportati i valori che indicano il grado di precisione del metodo analitico espresso dalle deviazioni standard relativa, RSD.

Tabella 5. Valori di area sottesa al picco cromatografico del lorazepam (AUC), deviazione standard (ds) e deviazione standard relativa (RSD %) calcolata per i diversi campioni di lorazepam a diverse concentrazione.

Concentrazione (mg/mL)	AUC media (n =2)	ds	RSD %
0,128	2411902	21994	0,91
0,064	1209670	577	0,05
0,0128	237306	1713	0,72
0,00256	38977	472	1,21
0,000512	9892	295	2,98

Dai valori ottenuti di RSD % il metodo è stato considerato sufficientemente preciso e riproducibile fino ad una concentrazione di 0,00256 mg/ml, in quanto tutti i valori sono risultati essere inferiori al 2 %. E' stata inoltre determinata la capacità del metodo di fornire una risposta lineare alla concentrazione dell'analita. In Figura 31 è rappresentata la relazione tra l'area sottesa della curva del picco cromatografico e la concentrazione della soluzione del farmaco.

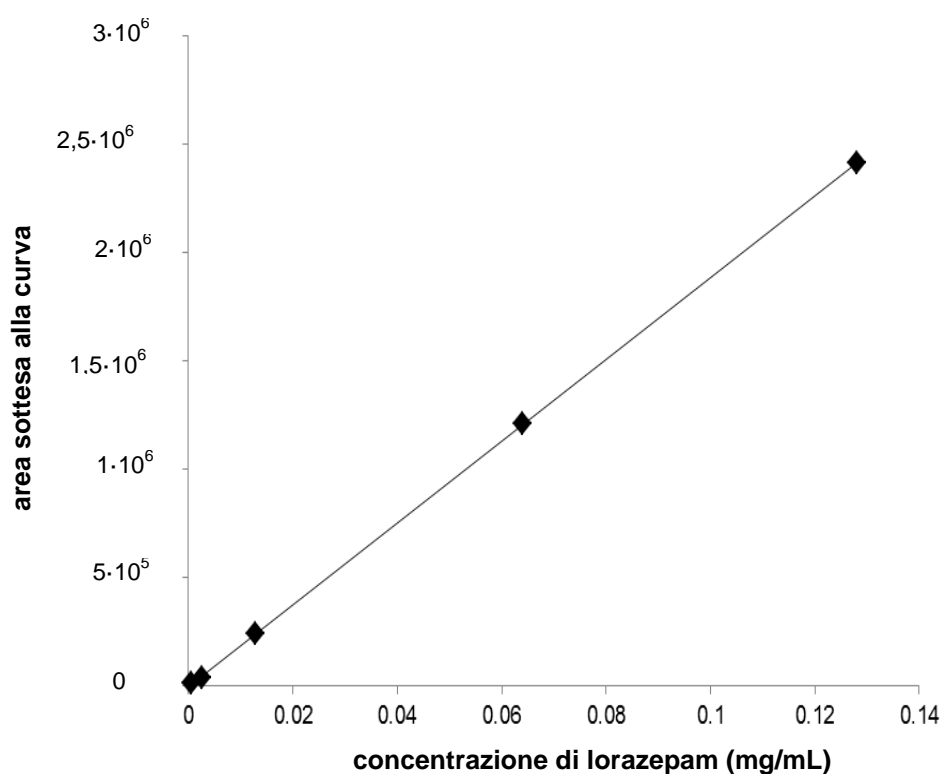


Figura 31: Area del picco in funzione della concentrazione di soluzioni di lorazepam. Equazione della retta di regressione $y=2 \cdot 10^7 x - 3727,7$ $R^2=1$.

Il coefficiente R^2 è risultato essere pari ad 1, indicando anche in questo caso un'ottima correlazione tra concentrazione e risposta analitica.

Sono stati inoltre calcolati i limiti di rilevazione (LOD) e di quantificazione (LOQ).

Il valore di LOD è risultato essere pari a 0.002 mg/ml mentre il valore di LOQ pari 0.006 mg/ml. E' stato infine calcolato il numero di piatti teorici (HETP) risultato essere uguale a 10243 mentre il fattore di scodamento è risultato pari a 1.05.

4.3.2 Convalida del metodo di spettrofotometria UV

La convalida del metodo di spettrofotometria UV è stata eseguita per entrambi i farmaci riportando i valori di assorbanza ottenuti con la concentrazione di uno standard di farmaco disciolto in una miscela metanolo:H₂O (60:40 v/v).

Per quanto riguarda il diazepam ogni campione è stato analizzato tre volte ad una lunghezza d'onda fissa di 231 nm. In Tabella 6 sono stati riportati i valori che indicano il grado di precisione del metodo analitico espresso dalle deviazioni standard relativa, RSD.

Tabella 6. Valori di assorbanza di soluzioni di diazepam a diverse concentrazioni, deviazione standard (ds) e deviazione standard relativa (RSD %) calcolata per i diversi campioni.

Concentrazione (mg/mL)	Abs % (n =3)	ds	RSD %
0,0106	1,2262	0,0020	0,16
0,0053	0,6144	0,0037	0,61
0,0026	0,3022	0,0059	1,97
0,0013	0,1444	0,0018	1,27
0,0007	0,0571	0,0018	3,08
0,0003	0,0527	0,0014	2,66

Dai dati ottenuti il metodo è stato considerato sufficientemente preciso e riproducibile fino a valori di concentrazione di 0,0013 mg/ml in quanto i dati di RSD % sono risultati essere inferiori al 2 %. E' stata inoltre determinata la capacità del metodo di fornire una risposta lineare alla concentrazione dell'analita. In Figura 32 è rappresentata la relazione tra l'assorbanza del campione e la concentrazione della soluzione del farmaco.

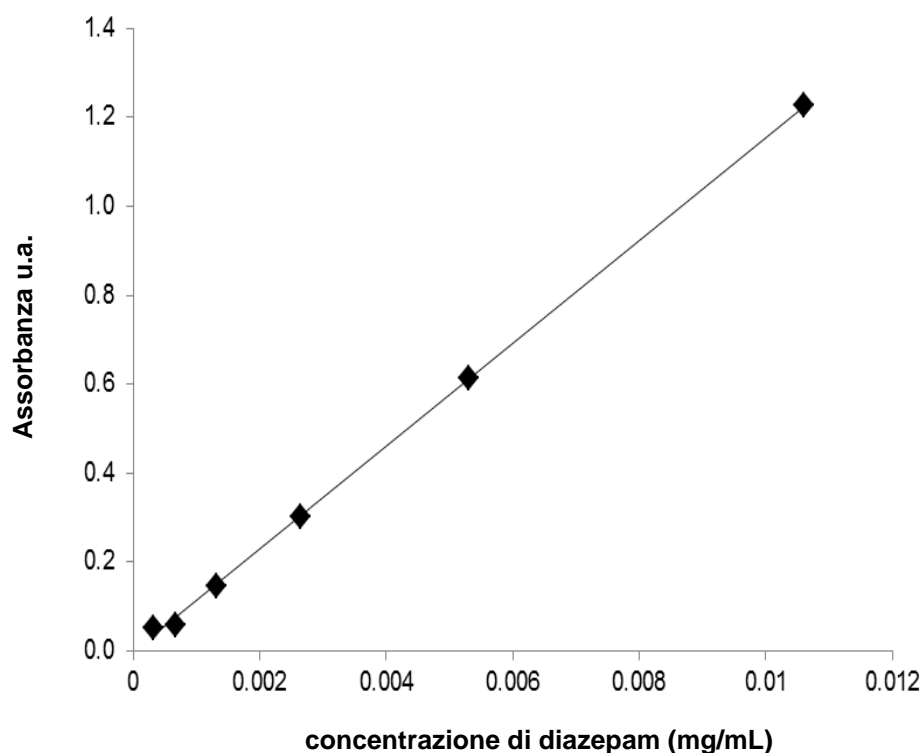


Figura 32: Assorbanza in funzione della concentrazione di soluzioni di diazepam. Equazione della retta di regressione $y=115.51x$ $R^2=0,9993$.

Anche in questo caso il coefficiente R^2 è risultato essere molto vicino ad 1, indicando così una buona correlazione tra concentrazione e risposta analitica.

Anche per quanto riguarda il lorazepam ogni campione è stato analizzato tre volte, la lunghezza d'onda utilizzata è stata di 229 nm. In Tabella 7 sono stati riportati i valori che indicano il grado di precisione del metodo analitico espresso dalle deviazioni standard relativa, RSD.

Tabella 7. Valori di assorbanza di soluzioni di lorazepam a diverse concentrazioni, deviazione standard (ds) e deviazione standard relativa (RSD %) calcolata per i diversi campioni.

Concentrazione (mg/mL)	Abs % (n =3)	ds	RSD %
0,0102	1,5698	0,0056	0,36
0,0051	0,8143	0,0068	0,83
0,0025	0,4062	0,0041	1,00
0,0013	0,2141	0,0021	0,97
0,0006	0,1078	0,0040	3,70
0,0003	0,0526	0,0011	2,10

Il metodo è quindi risultato sufficientemente preciso e riproducibile, anche nel caso del lorazepam, fino a valori di concentrazione di 0,0013 mg/ml in quanto i dati di RSD % sono risultati essere inferiori al 2 %. Come si può vedere in Figura 33, in cui è rappresentata la relazione tra l'assorbanza del campione e la concentrazione della soluzione di farmaco, il metodo è anche risultato in grado di fornire una risposta lineare alla concentrazione dell'analita.

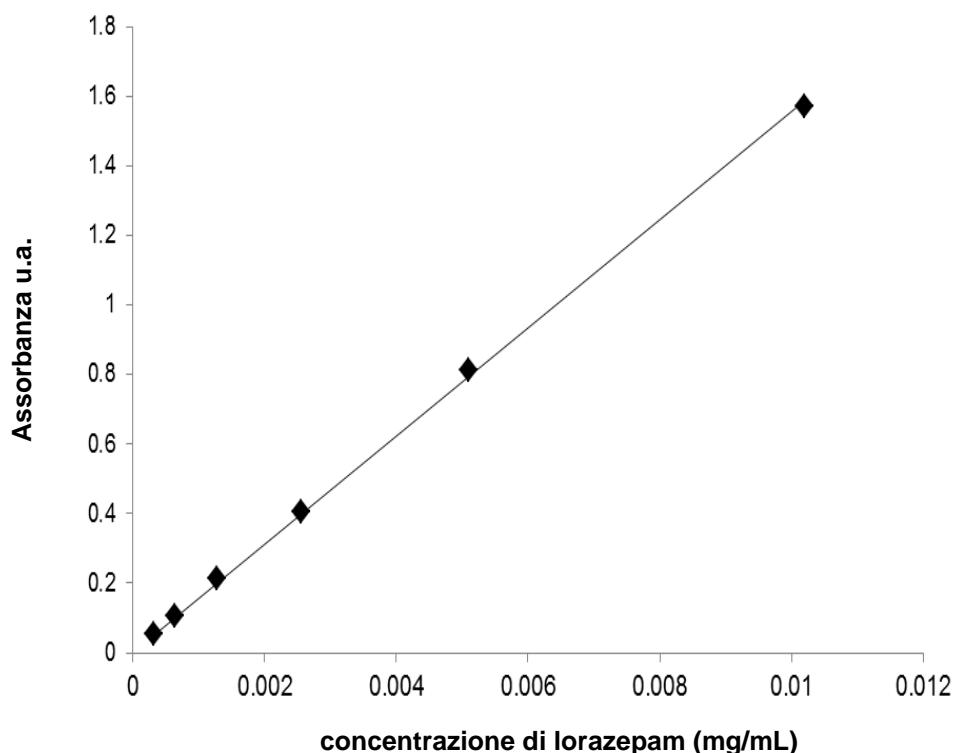


Figura 33: Assorbanza in funzione della concentrazione di soluzioni di lorazepam. Equazione della retta di regressione $y=155.45x$ $R^2=0,9993$.

Anche in questo caso il coefficiente R^2 è risultato essere molto vicino ad 1, indicando così una buona correlazione tra concentrazione e risposta analitica.

Il metodo HPLC è stato quindi utilizzato per la determinazione della solubilità dei due farmaci nei polimeri oltre che per la determinazione del contenuto in principio attivo delle dispersioni solide preparate con la tecnica PGSS. La spettrofotometria UV è stata invece sfruttata per la determinazione della percentuale di farmaco disciolto nel mezzo durante gli studi di dissoluzione.

4.4 Diminuzione dei punti di fusione dei PEGs in CO₂ supercritica

La misurazione del punto di fusione dei polimeri posti a contatto con CO₂ in fase supercritica è stata effettuata con una cella ottica ad alta pressione.

Per ogni analisi è stata fissata una temperatura mentre la pressione è stata aumentata fino all'inizio della fusione, ossia la comparsa della prima goccia di liquido.

I dati ottenuti sono mostrati in Figura 34, dove i punti di fusione del PEG 1500, del PEG 4000 e del PEG 6000 sono riportati in funzione della pressione di CO₂ applicata.

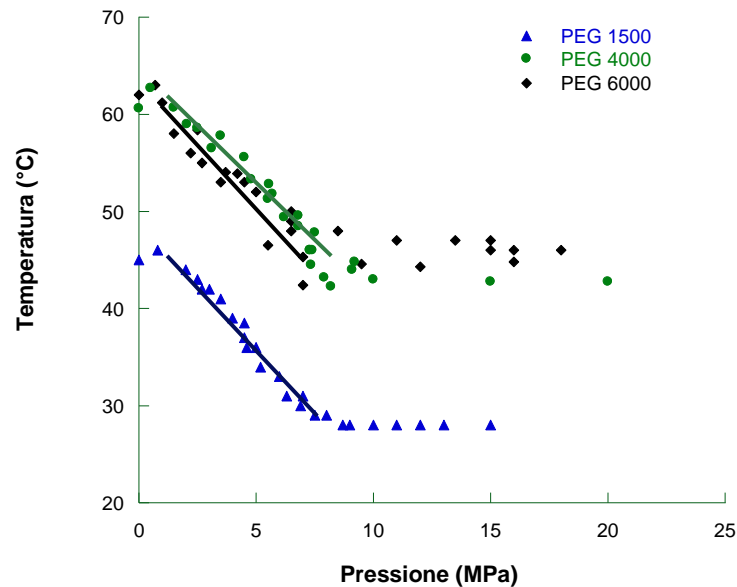


Figura 34. Punti di fusione del PEG 1500 [53], PEG 4000 e 6000 in presenza di CO₂ a differenti pressioni .

Dopo un iniziale leggero aumento della temperatura di fusione per tutti e tre i PEGs si può notare una diminuzione lineare del punto fusione fino a 0,7 Mpa (70 bar), oltre il quale la temperatura rimane costante (48 °C per il PEG 6000, 45 °C per il PEG 4000 e 28 °C per il PEG 1500).

Questo fenomeno di leggero aumento della temperatura di fusione a pressioni molto basse (intorno a 0,5-0,7 MPa) sembra essere dovuto ad un aumento dello spessore dei cristalli del polimero durante l'incorporazione di CO₂ [78].

Per quanto riguarda PEG 1500 e 4000 i dati riportati sono in accordo con quelli di letteratura [79], e con il modello proposto da Lian et al. [80].

Questi autori hanno analizzato la forma caratteristica della curva di diminuzione del punto di fusione di diversi polimeri in seguito all'azione della CO₂. Utilizzando numerosi dati (anche dalla letteratura) hanno sviluppato un metodo sfruttando l'equazione di Clapeyron applicata ad un sistema a due componenti, e a tre fasi per predire l'abbassamento della temperatura di fusione.

Questi autori hanno dimostrato che, a basse pressioni, la forma semplificata dell'equazione di Clapeyron indica una diminuzione lineare della temperatura di fusione con la pressione. Quindi è stata applicata la regressione lineare ai dati sperimentali a bassa pressione (regione lineare) per determinare la pendenza, dT_m/dP .

La variazione del punto di fusione del PEG 4000, in particolare la pendenza della porzione a basse pressioni teorica [80], della letteratura [79] e di questo lavoro sono 2,1, 2,03 e 2,18, rispettivamente.

Per quanto riguarda la variazione del punto di fusione del PEG 1500, la pendenza della porzione lineare teorica [80], della letteratura [79] e di questo lavoro sono 2,62, 2,41 e 2,76, rispettivamente.

Questo dimostra un sostanziale accordo tra i dati da noi raccolti sperimentalmente con i dati già presenti in letteratura e con i dati teorici.

In letteratura non sono invece reperibili dati relativi al PEG 6000.

4.5 Costruzione diagrammi di fase benzodiazepine-PEGs

L'equazione di Schröder-Van Laar nella sua forma semplificata è generalmente sfruttata per determinare la diminuzione del punto di fusione di una sostanza quando miscelata con un altro composto. Può essere utilizzata per determinare la presenza di eventuali contaminanti e quindi la purezza di un composto in base alla diminuzione del suo punto di fusione [81]. Allo stesso modo può essere usata per prevedere il comportamento di diazepam e lorazepam in presenza di PEG 1500, 4000 e 6000; in particolare ad ogni frazione molare di farmaco e polimero viene predetta una temperatura di fusione che risulterà essere inferiore alla temperatura del composto puro.

Di seguito è riportata l'equazione:

$$\ln x = \frac{\Delta H_A^f}{R} \left(\frac{1}{T_A^f} - \frac{1}{T^f} \right) \quad (11)$$

Dove x è la frazione molare del componente della miscela che fonde alla temperatura T^f ; ΔH_A^f e T_A^f sono rispettivamente l'entalpia e la temperatura di fusione del puro e R è la costante dei gas ($8.312 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) [81, 82].

Questa equazione risulta importante per la costruzione di grafici che mostrano l'andamento teorico delle miscele di farmaco e polietilenglicoli. I parametri dell'equazione 11 (entalpia e temperatura di fusione dei materiali puri) sono stati ricavati dalle misurazioni calorimetriche a scansione (DSC). Utilizzando questa equazione è stato possibile calcolare i valori di temperatura di fusione per ogni frazione molare del componente in questione. L'andamento teorico è stato quindi confrontato con i dati sperimentali ottenuti dalla calorimetria differenziale a scansione sulle miscele fisiche e con le analisi di solubilità dei farmaci nei PEGs

Per costruire i diagrammi di fase delle due benzodiazepine con tutti e tre i polimeri sono state utilizzate delle miscele binarie preparate disperdendo il farmaco (diazepam o lorazepam) nei vari PEGs (1500, 4000 e 6000), in diverse percentuali p/p (5%, 10%, 20%, 30% e 50%), ad una temperatura di circa 2°C sopra la temperatura di fusione del polimero.

4.5.1 Diagrammi di fase diazepam e PEGs

Il comportamento termico delle miscele binarie ottenute attraverso il metodo della fusione è stato studiato sottoponendo le miscele stesse ad analisi termica con una velocità di scansione di 1k/min da 0 °C a 180 °C.

Di seguito sono riportati i tracciati DSC (Figura 35, 36 e 37) ottenuti e i corrispondenti valori di temperatura di fusione, di farmaco e polimero, per ogni concentrazione considerata (tabelle 8, 9 e 10). In tutti i tracciati riportati il primo fenomeno endotermico è riconducibile alla fusione del PEG. E' stato invece possibile evidenziare il picco endotermico corrispondente alla fusione del farmaco solo alle concentrazioni di diazepam maggiori. In particolare, nelle miscele preparate con PEG 1500 e PEG 6000 la seconda fusione si può evidenziare fino ad una cocentrazione in farmaco del 30 % p/p. Per quanto riguarda le miscele ottenute con il PEG 4000 il secondo picco endotermico è stato evidenziato fino ad una concentrazione di diazepam del 20 % p/p

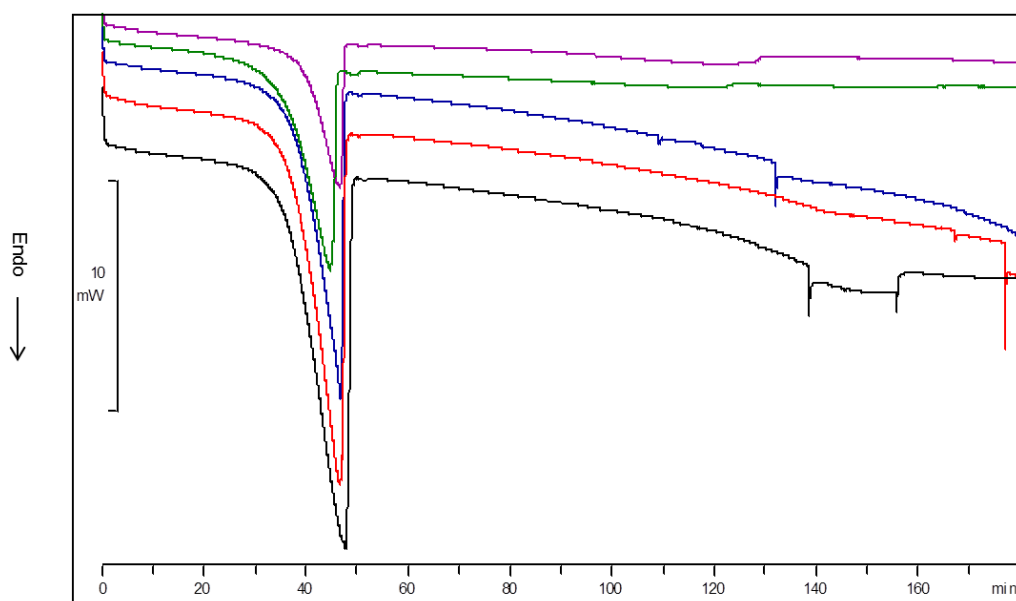


Figura 35. Tracciati DSC delle miscele DZ-PEG 1500, partendo dal basso, al 5,10, 20, 30 e 50 % in farmaco rispettivamente.

Tabella 8. Punti di fusione di PEG 1500 e diazepam all'interno delle miscele binarie al 5, 10, 20, 30 e 50 % in farmaco.

Composizione %	Tf PEG (°C)	Tf Diazepam (°C)
50	46.27	122.43
30	44.20	117.79
20	46.20	/
10	45.94	/
5	47.22	/

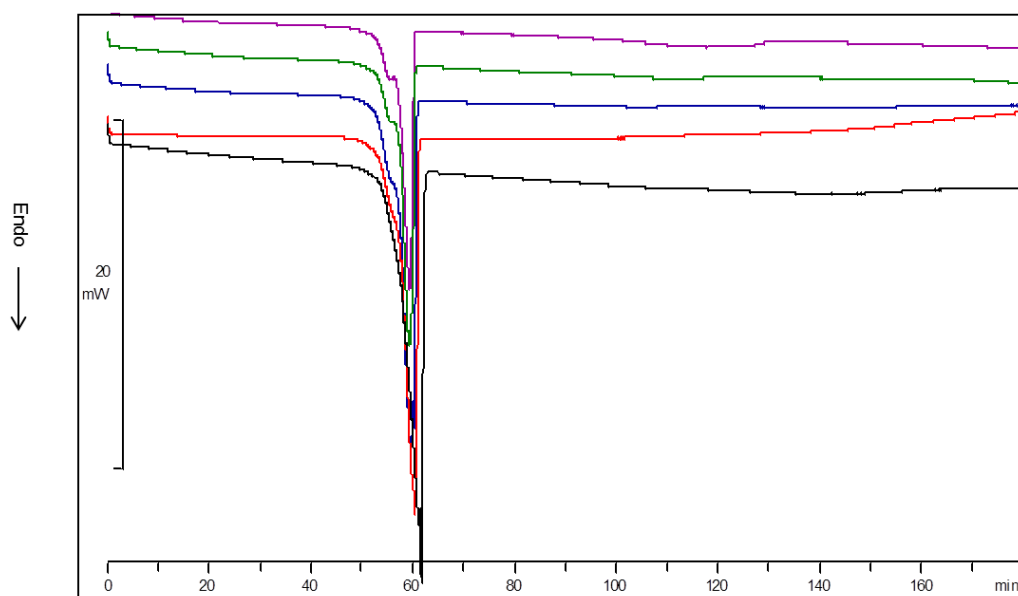


Figura 36. Tracciati DSC delle miscele DZ-PEG 4000, partendo dal basso, al 5,10, 20, 30 e 50 % in farmaco rispettivamente.

Tabella 9. Punti di fusione di PEG 4000 e diazepam all'interno delle miscele binarie al 5, 10, 20, 30 e 50 % in farmaco.

Composizione %	Tf PEG (°C)	Tf Diazepam (°C)
50	58.87	116.67
30	58.89	113.23
20	62.06	104.61
10	59.74	/
5	60.89	/

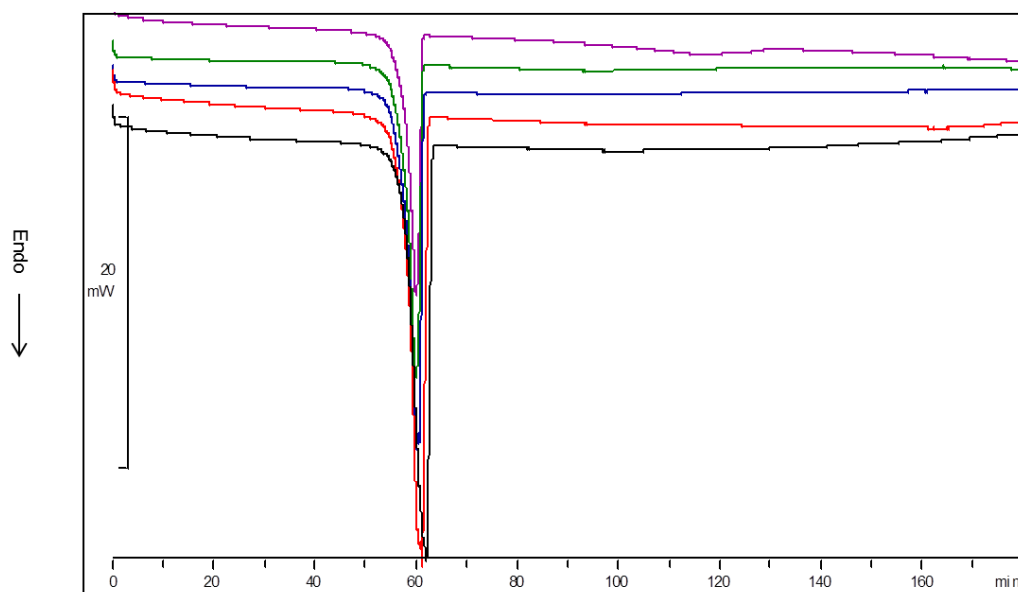


Figura 37. Tracciati DSC delle miscele DZ-PEG 6000, partendo dal basso, al 5,10, 20, 30 e 50 % in farmaco rispettivamente.

Tabella10. Punti di fusione di PEG 6000 e diazepam all'interno delle miscele binarie al 5, 10, 20, 30 e 50 % in farmaco.

Composizione %	Tf PEG (°C)	Tf Diazepam (°C)
50	59.49	116.66
30	59.38	95.63
20	59.28	/
10	60.19	/
5	61.08	/

I risultati ottenuti da quest'analisi termica sono stati posti a confronto con i valori di temperatura di fusione teorici delle miscele binarie ottenuti dalla risoluzione dell'equazione di Schröder-Van Laar, entrambi sono stati riportati in grafico (Figura 38, 39 e 40) in funzione della frazione molare delle miscele stesse.

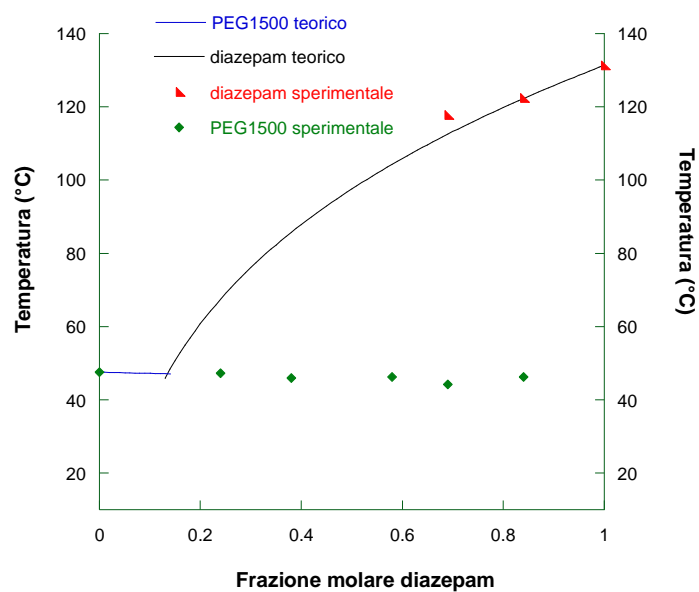


Figura 38. Diagramma di fase diazepam/PEG 1500, modello teorico e dati sperimentali messi a confronto

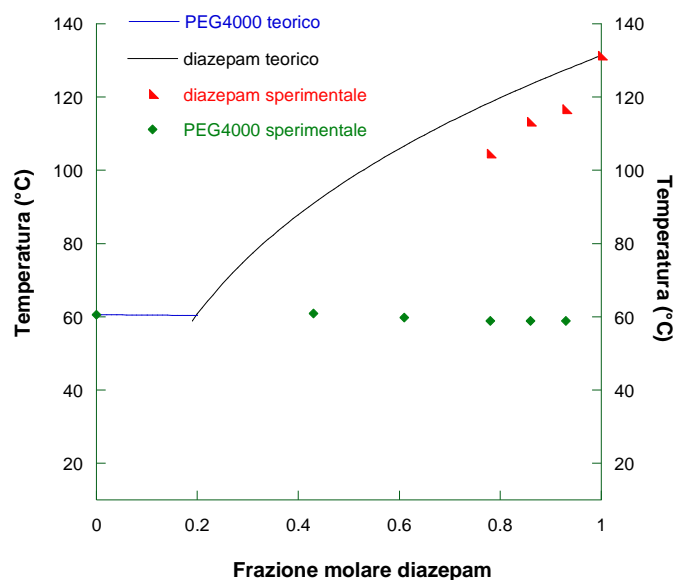


Figura 39. Diagramma di fase diazepam/PEG 4000, modello teorico e dati sperimentali messi a confronto.

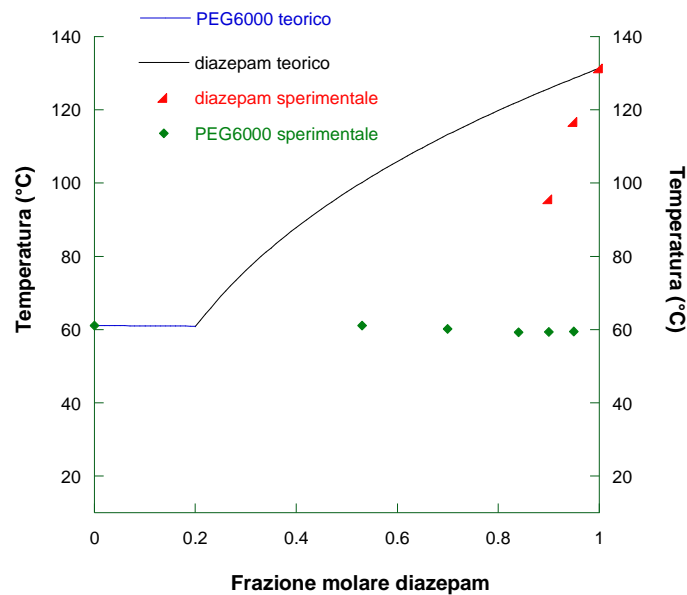


Figura 40. Diagramma di fase diazepam/PEG 6000, modello teorico e dati sperimentali messi a confronto.

Osservando i tre grafici si può notare come la teoria preveda la formazione di un eutettico con composizioni, in termini di frazione molare, di diazepam di 0,12; 0,17 e 0,18 rispettivamente con PEG 1500, 4000 e 6000. Le temperature di fusione eutetticali predette dall'equazione sono 49,2; 60,3 e 61,2 rispettivamente.

Per quanto concerne invece i dati sperimentali si può osservare che nel caso del polimero il dato sperimentale coincide con buona approssimazione con quello teorico, si può infatti notare una diminuzione del suo punto di fusione all'aumentare della concentrazione di diazepam. Nel caso del diazepam invece i valori sperimentali si discostano da quelli del modello teorico in maniera sempre più evidente con l'aumentare del peso molecolare del PEG utilizzato. Solo le miscele preparate con il PEG 1500 sembrano infatti seguire l'andamento teorico. Il disaccordo tra i dati sperimentali e i dati teorici porta a pensare alla presenza di un'interazione tra farmaco e polimero che non viene considerata nell'equazione.

Come detto è possibile evidenziare la mancanza dei punti di fusione del diazepam nelle miscele in cui è presente a basse concentrazioni. Si è ipotizzato che questa deficienza potesse essere dovuta alla scarsa sensibilità dello strumento oppure alla dissoluzione del farmaco nel PEG fuso durante l'analisi termica.

Per quanto riguarda le dispersioni preparate con PEG 1500, che sono quelle che più sembrano seguire l'andamento teorico, si è cercato di completare il grafico

effettuando un'analisi di microscopia con piastra riscaldante, per ovviare ad eventuali problemi di sensibilità del calorimetro differenziale a scansione, su miscele contenenti basse concentrazioni di farmaco, in particolare meno del 20 % di diazepam p/p (Figura 41, 42, 43, 44, 45 e 46):

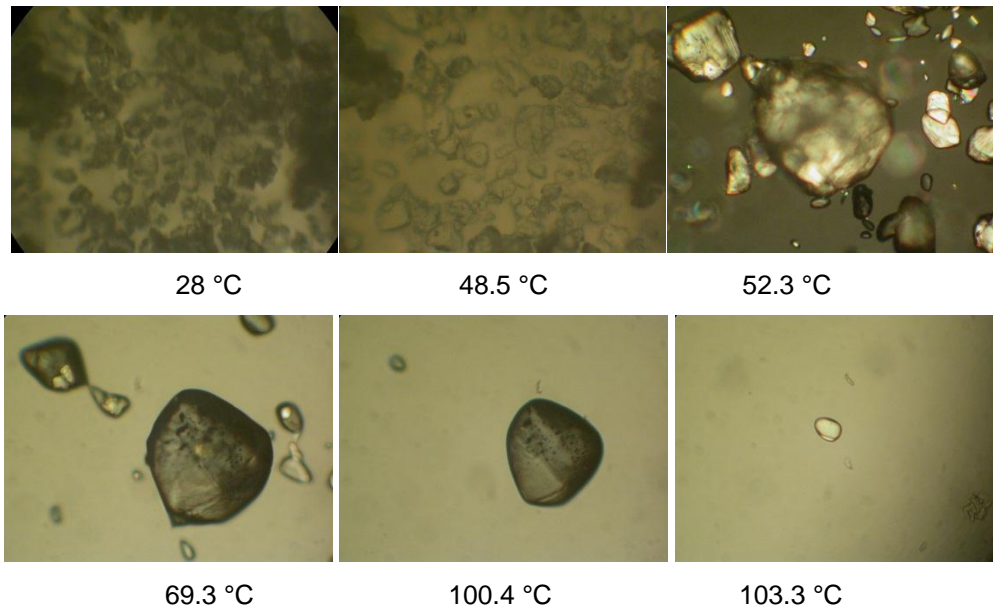


Figura 41. Immagini da microscopio a luce polarizzata equipaggiato con piastra riscaldante (ingrandimento 10x) della miscela diazepam-PEG 1500 20%.

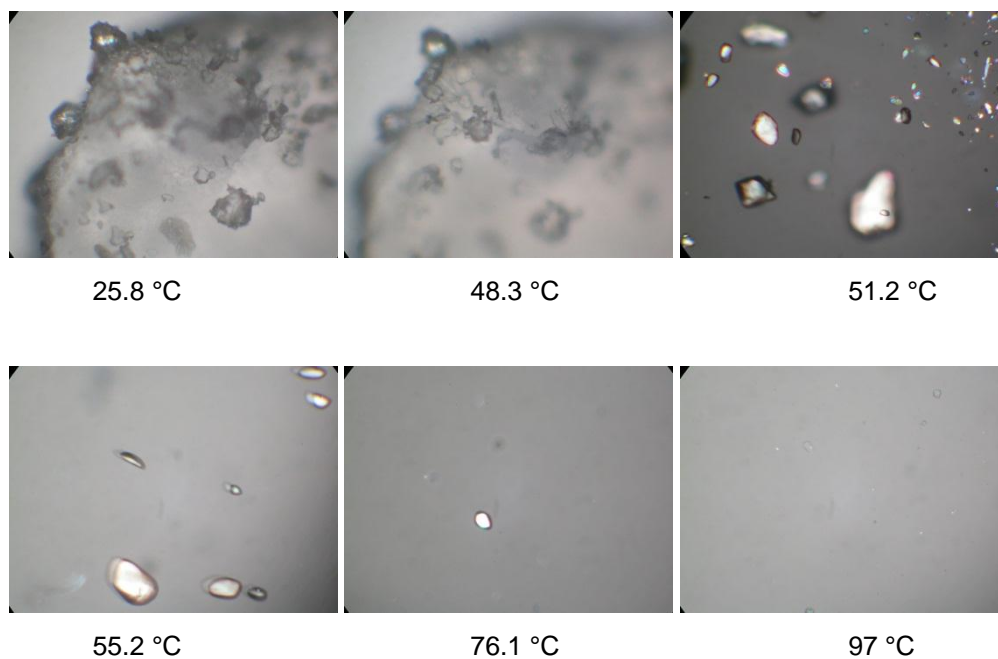


Figura 42. Immagini da microscopio a luce polarizzata equipaggiato con piastra riscaldante (ingrandimento 10x) della miscela diazepam-PEG 1500 10%.

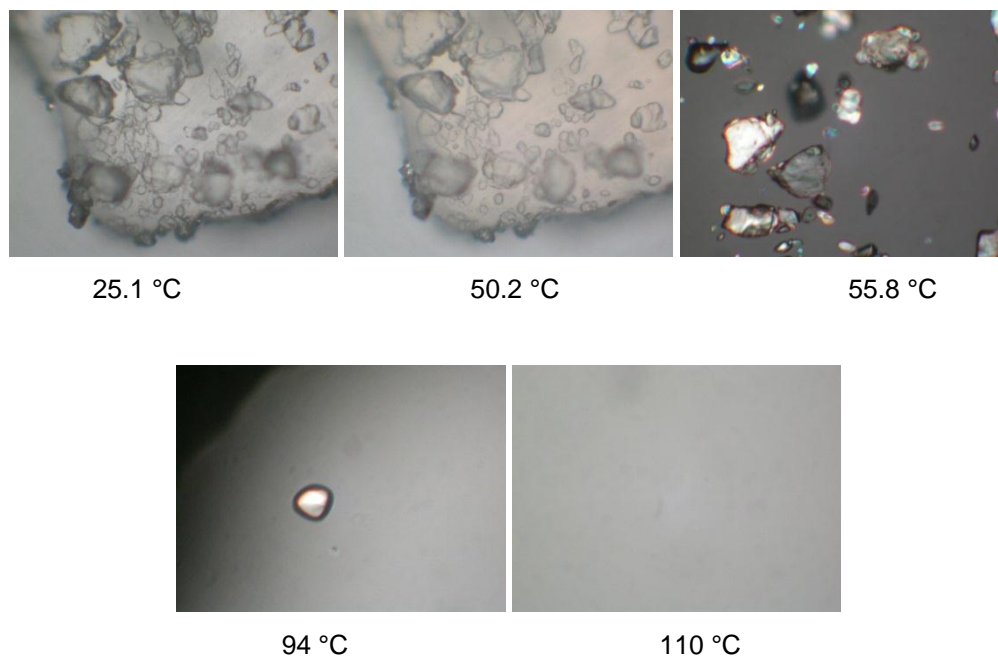


Figura 43. Immagini da microscopio a luce polarizzata equipaggiato con piastra riscaldante (ingrandimento 10x) della miscela diazepam-PEG 1500 5%.

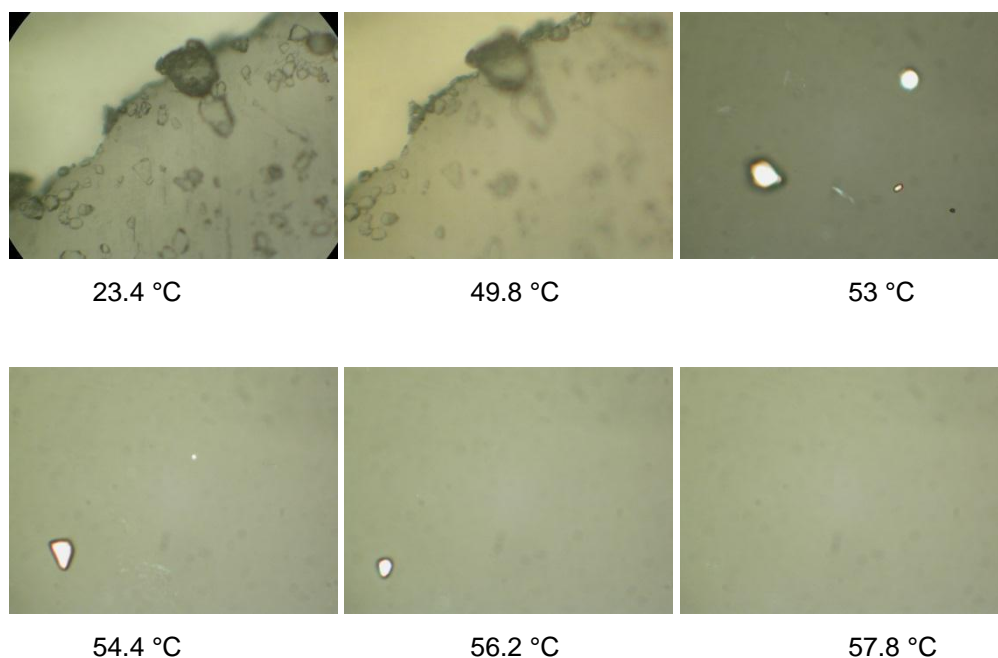


Figura 44. Immagini da microscopio a luce polarizzata equipaggiato con piastra riscaldante (ingrandimento 10x) della miscela diazepam-PEG 1500 2.5%.

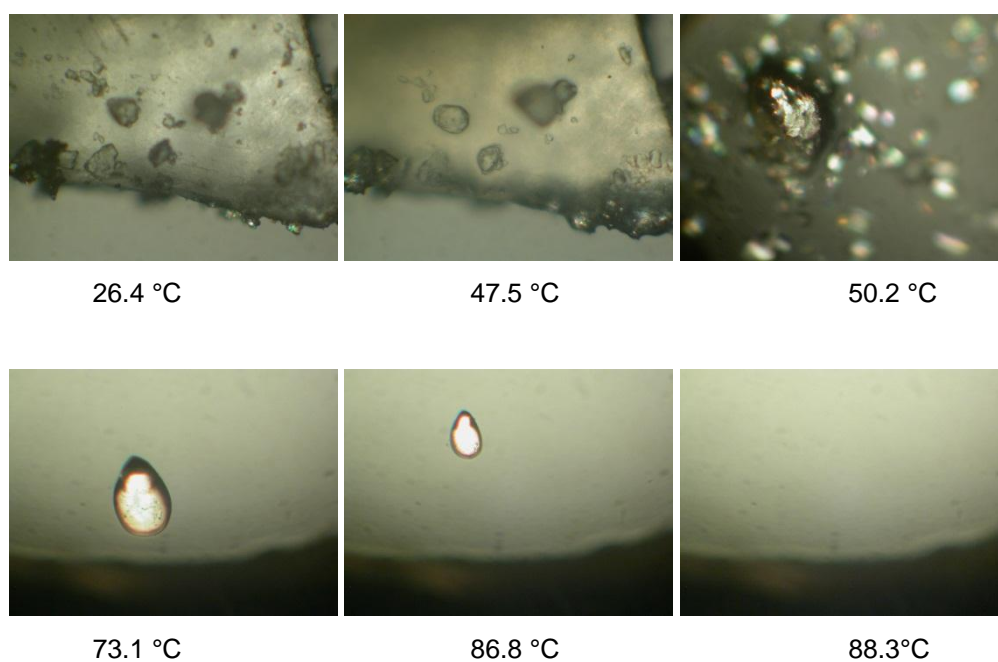


Figura 45. Immagini da microscopio a luce polarizzata equipaggiato con piastra riscaldante (ingrandimento 10x) della miscela diazepam-PEG 1500 2%.

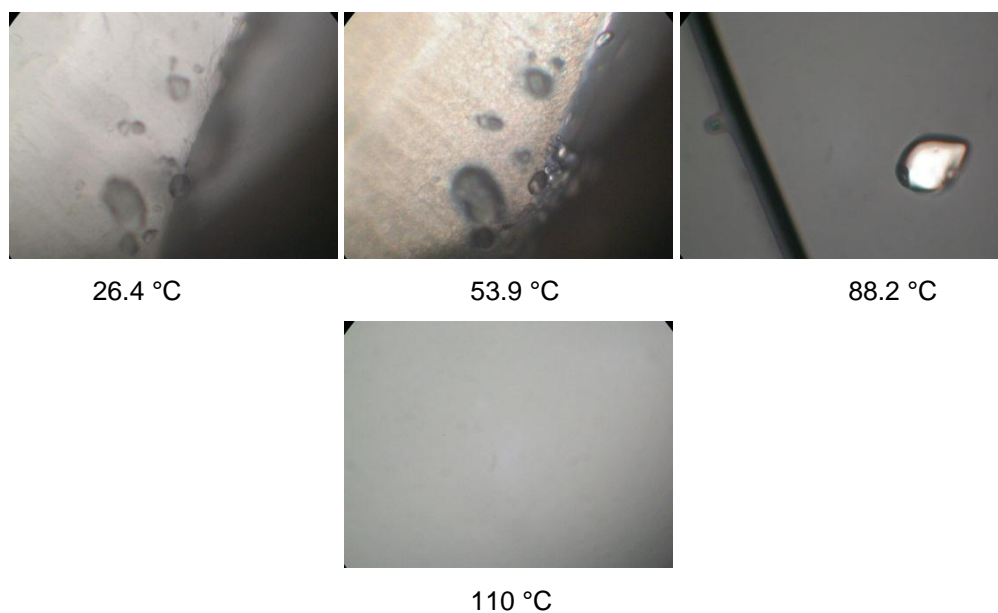


Figura 46. Immagini da microscopio a luce polarizzata equipaggiato con piastra riscaldante (ingrandimento 10x) della miscela diazepam-PEG 1500 1%.

In queste immagini è possibile vedere a temperatura ambiente le scaglie di PEG 1500 alle quali sono rimasti adesi i cristalli di farmaco, in seguito alla fusione del polimero intorno a 50 °C si evidenziano ancora i cristalli di farmaco che tendono a scomparire nella massa di polimero fuso all'aumentare della temperatura. Questo fenomeno è stato evidenziato a tutte le concentrazioni prese in considerazione, e quindi a concentrazioni in diazepam del 20, 10, 5, 2,5, 2 e 1 %.

Neppure con questa tecnica quindi è stato possibile ricavare il punto di fusione del diazepam ma è stato possibile mettere in evidenza un fenomeno di dissoluzione del diazepam susseguente alla fusione del polietilenglicole per tutte le concentrazioni studiate. In nessun caso è stato possibile mettere in evidenza una doppia fusione riconducibile alla fusione del componente in eccesso e di un eutettico.

Con questo tipo di microscopia è stato seguito anche il raffreddamento delle miscele nel tentativo di mettere in evidenza l'eventuale fenomeno di cristallizzazione del farmaco. Come si può notare dalle immagini in Figura 47, seguendo il raffreddamento di una miscela con una concentrazione in diazepam del 10 % p/p preparata con PEG 1500 il primo fenomeno evidenziato è stata la comparsa di cristalli ad una temperatura di 44 °C. Questi cristalli tendono ad aumentare sia in numero che in dimensioni al diminuire della temperatura fino ad ottenere una completa ricristallizzazione a temperatura ambiente. Data la vicinanza di questa temperatura di cristallizzazione con la temperatura di fusione del polimero questo fenomeno è stato identificato come la ricristallizzazione del PEG 1500 nella miscela. Non essendo stato evidenziato alcun fenomeno prima della suddetta temperatura questo ci porta a pensare che la cristallizzazione del farmaco possa essere impedita o quantomeno ritardata dalla presenza del polimero.

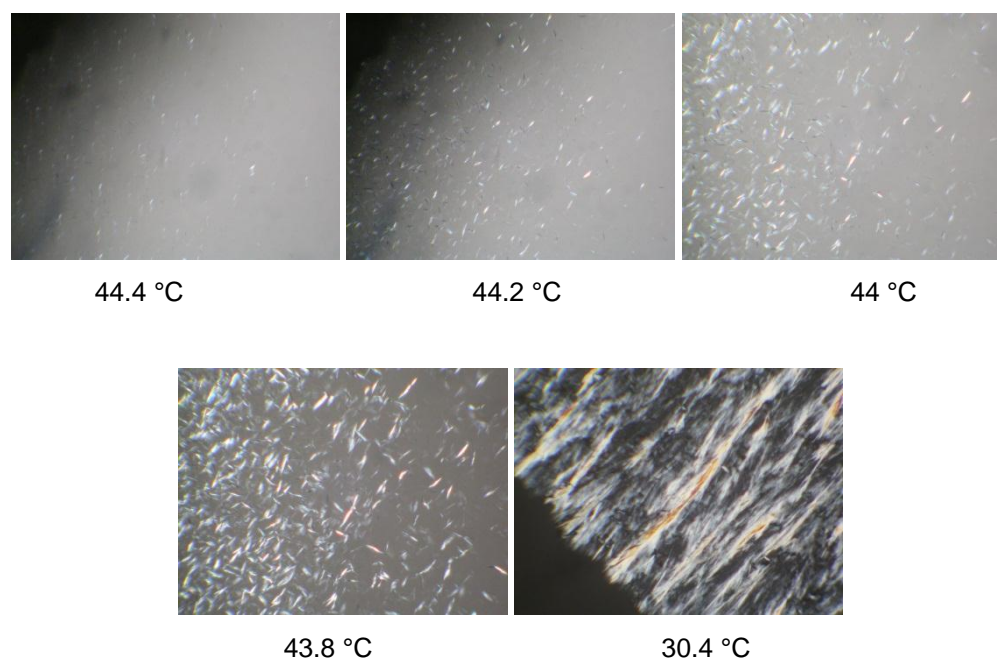


Figura 47. Immagini da microscopio a luce polarizzata equipaggiato con piastra riscaldante (ingrandimento 10x) della miscela diazepam-PEG 1500 10%.

La possibilità che il diazepam si sciogla nel polimero rappresenta tuttavia un punto fondamentale nell'ambito dello studio delle possibili interazioni tra farmaco e polimero. In effetti, i diagrammi di fase sin qui riportati possono essere considerati come diagrammi di solubilità del farmaco nel polimero e viceversa, la curva di transizione solido-liquido (nella rappresentazione grafica dell'equazione di Schroeder-Van Laar) rappresenta la solubilità all'equilibrio dei cristalli di farmaco nel polimero e viceversa a diverse temperature e l'area sopra tale curva rappresenta una regione di completa miscibilità tra i componenti [83].

Per analizzare la solubilità delle benzodiazepine nei vari PEGs sono state preparate miscele costituite da un eccesso di farmaco e da polimero, che sono state riscaldate a temperature diverse (da 60°C a 120°C, nel caso del PEG 6000 da 70 °C per permettere al polimero di fondere completamente) e lasciate equilibrare per circa 24 ore fino ad ottenere una soluzione satura. Dopo separazione della fase solida è stato prelevato il surnatante, il cui contenuto di principio attivo è stato analizzato tramite metodo HPLC in grado di evidenziare anche eventuali prodotti di degradazione.

In Figura 48 sono riportate le curve di solubilità del diazepam nei tre polietilenglicoli.

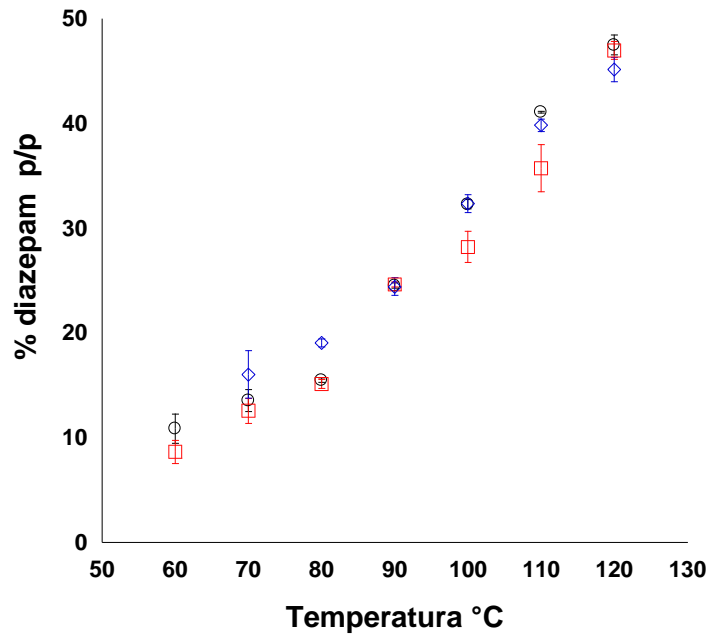


Figura 48. Curve di solubilità di diazepam in PEG 1500 (cerchio), 4000 (quadrato), 6000 (rombo) in funzione della temperatura.

Dal confronto delle tre curve si può osservare che la solubilità del diazepam aumenta quasi linearmente con la temperatura e in modo indipendente dal peso molecolare del PEG considerato.

I valori sperimentali di solubilità sono stati, quindi, confrontati con le curve risultanti dall'equazione di Schroeder-Van Laar. I grafici così ottenuti sono riportati in Figura 49, 50 e 51. Si osserva come il dato sperimentale (in termini di concentrazione) sia sempre significativamente più alto rispetto a quello del modello teorico e che questa differenza sia tanto maggiore quanto più è alto il peso molecolare del polimero.

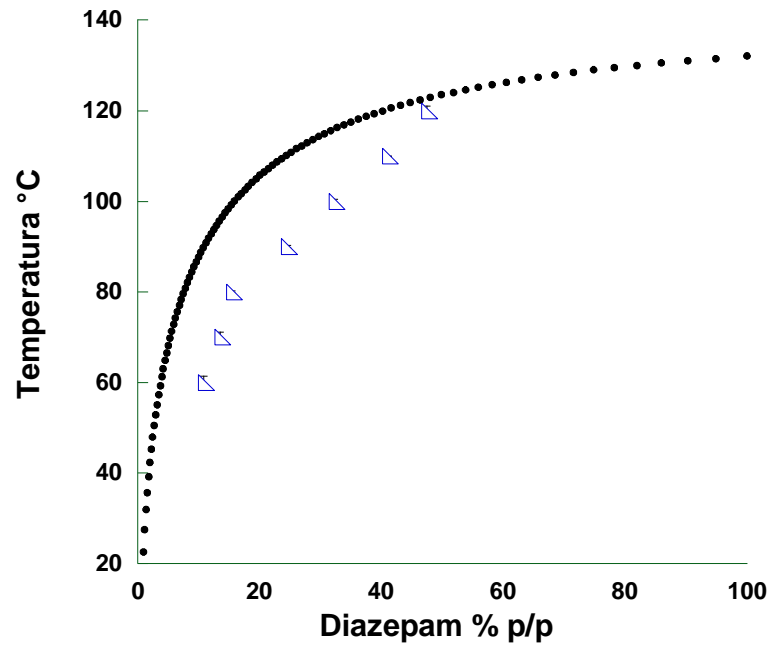


Figura 49. Confronto tra solubilità determinata sperimentalmente (**triangoli blu**) e liquidus curve (**in nero**) di miscele di diazepam e PEG 1500

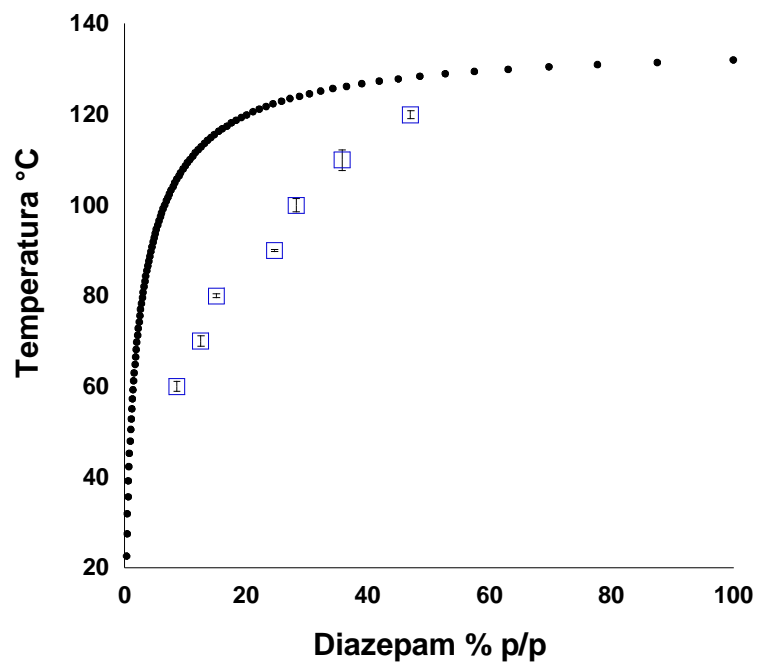


Figura 50. Confronto tra solubilità determinata sperimentalmente (**quadrati blu**) e liquidus curve (**in nero**) di miscele di diazepam e PEG 4000.

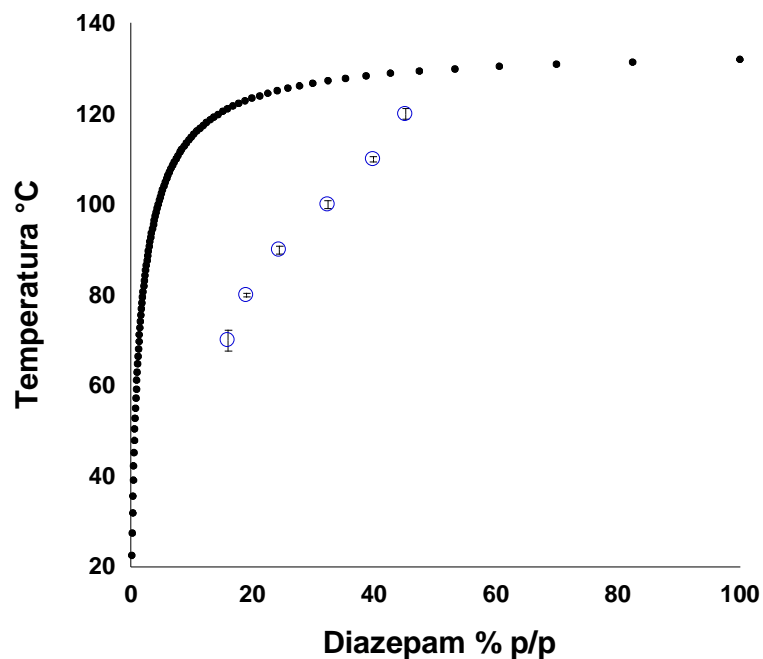


Figura 51. Confronto tra solubilità determinata sperimentalmente (cerchi blu) e liquidus curve (in nero) di miscele di diazepam e PEG 6000.

Infine i valori di solubilità, ottenuti sperimentalmente, sono stati confrontati anche con i dati di transizione solido-liquido risultanti dalle analisi mediante DSC (Figura 52, 53 e 54).

Dall'osservazione di questi grafici si nota un accordo crescente con l'aumentare del peso molecolare tra i set di dati sperimentalmente ottenuti con tecniche differenti, ossia dalle analisi di solubilità e dalla calorimetria differenziale a scansione. Come già visto invece l'accordo con l'andamento teorico aumenta al diminuire del peso molecolare. Questo fa pensare ad un aumento delle interazione tra il diazepam e i polimeri all'aumentare del peso molecolare di quest'ultimi.

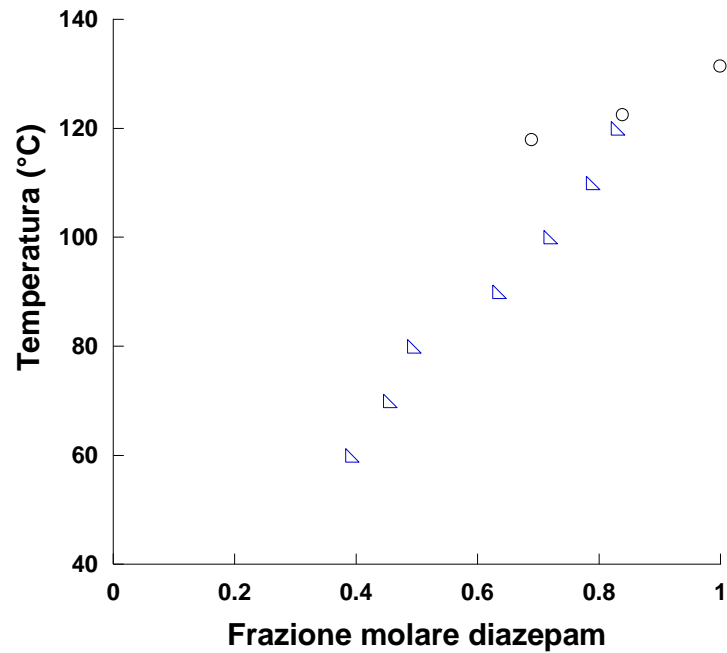


Figura 52. Confronto tra dati di solubilità ottenuti sperimentalmente (**triangoli blu**) e i valori di transizione solido-liquido ottenuti tramite DSC (**cerchi neri**) delle miscele di diazepam e PEG 1500

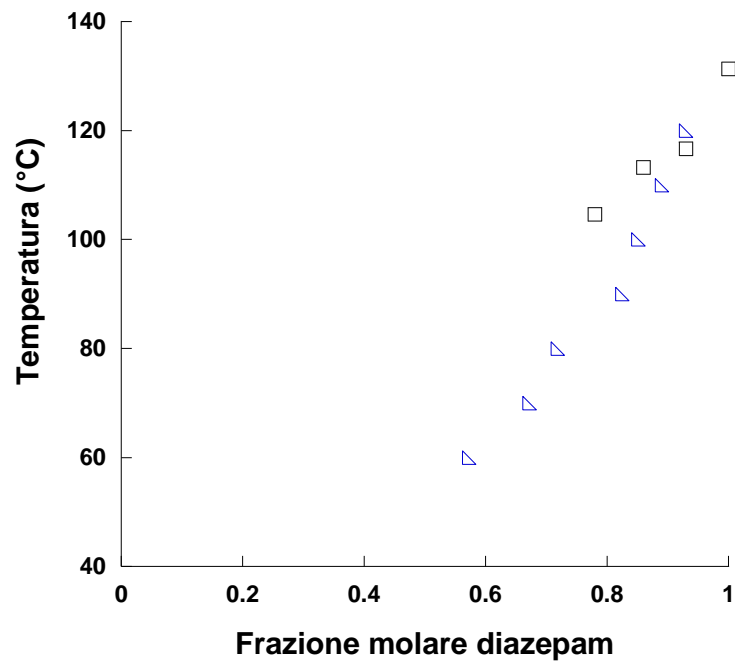


Figura 53. Confronto tra dati di solubilità ottenuti sperimentalmente (**triangoli blu**) e i valori di transizione solido-liquido ottenuti tramite DSC (**quadrati neri**) delle miscele di diazepam e PEG 4000.

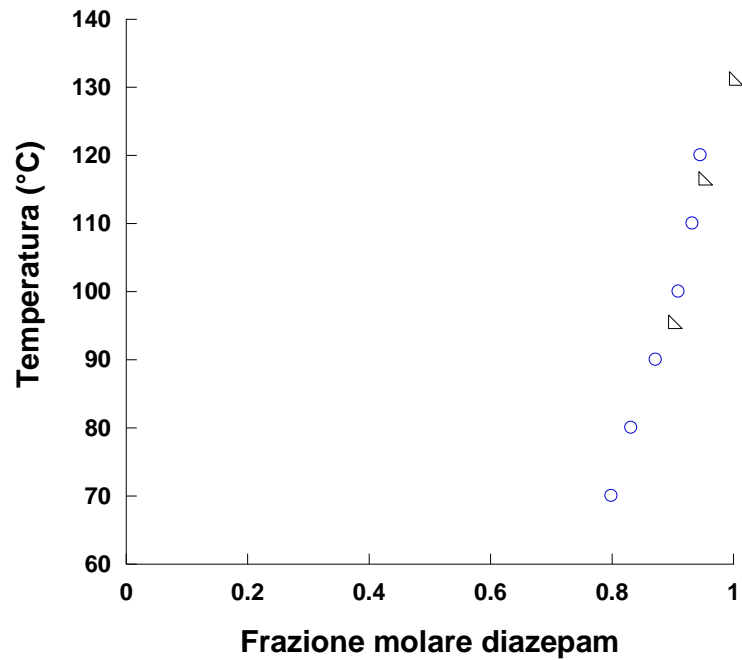


Figura 54. Confronto tra dati di solubilità ottenuti sperimentalmente (cerchi blu) e i valori di transizione solido-liquido ottenuti tramite DSC (triangoli neri) delle miscele di diazepam e PEG 6000.

Infine è stata studiata l'eventuale variazione di entalpia di fusione del polimero miscelato col farmaco in confronto al polimero tal quale (Tabella 11). Secondo Law et al. [84] infatti la formazione di una soluzione solida porterebbe alla formazione di distorsioni considerevoli all'interno del reticolo cristallino del carrier. Queste distorsioni portano alla diminuzione dell'energia interna, dell'entalpia, ed entropia di fusione.

Tabella 11. ΔH di fusione dei polimeri in funzione della composizione in diazepam delle miscele.

PEG 1500	Composizione %	ΔH fusione (Jg⁻¹)
	0	-180.33
	5	-173.72
	10	-177.57
	20	-178.99
	30	-165.20
	50	-181.57
PEG 4000	Composizione %	ΔH fusione (Jg⁻¹)
	0	-190.58
	5	-195.09
	10	-192.86
	20	-196.82
	30	-199.48
	50	-196.58
PEG 6000	Composizione %	ΔH fusione (Jg⁻¹)
	0	-193.51
	5	-199.01
	10	-202.20
	20	-200.20
	30	-198.89
	50	-199.66

Questi dati sembrano però escludere la formazione di una soluzione solida nelle dispersioni binarie preparate a 2 °C sopra la temperatura di fusione del polimero in

quanto l'entalpia di fusione del polimero nelle dispersioni non sembra discostarsi in maniera netta dal ΔH del polimero puro.

4.5.2 Diagrammi di fase lorazepam e PEGs

Come per il diazepam, anche nel caso del lorazepam si è partiti dall'utilizzo dell'equazione di Schröder-Van Laar per prevedere il comportamento di fase di miscele binarie di lorazepam e PEG. I grafici che mostrano il comportamento di fase teorico sono riportati di seguito:

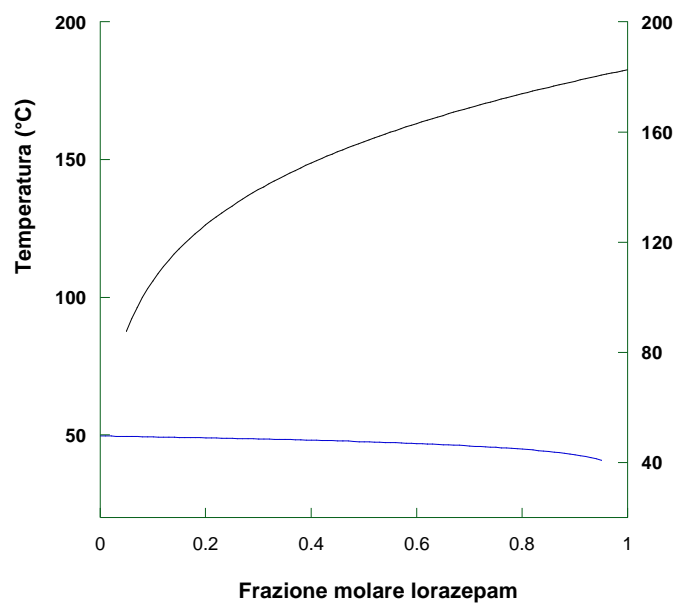


Figura 55. Comportamento di fase teorico delle miscele di lorazepam (in nero) e PEG 1500 (in blu).

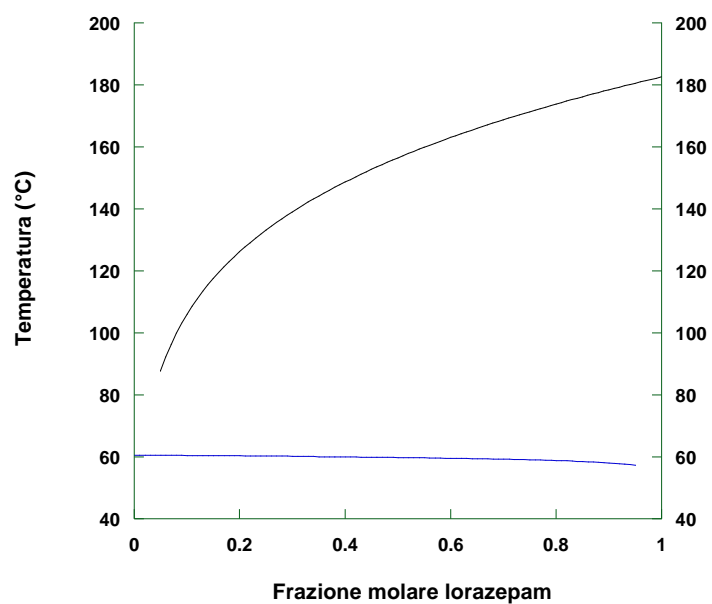


Figura 56. Comportamento di fase teorico delle miscele di lorazepam (in nero) e PEG 4000 (in blu)

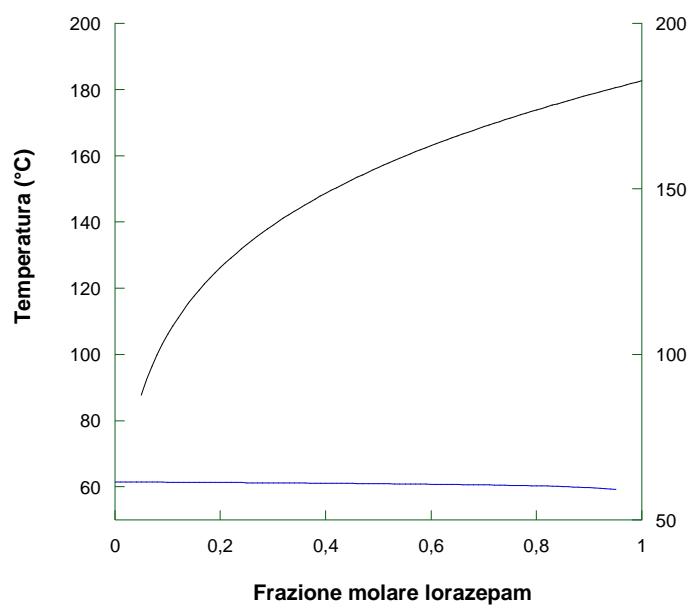


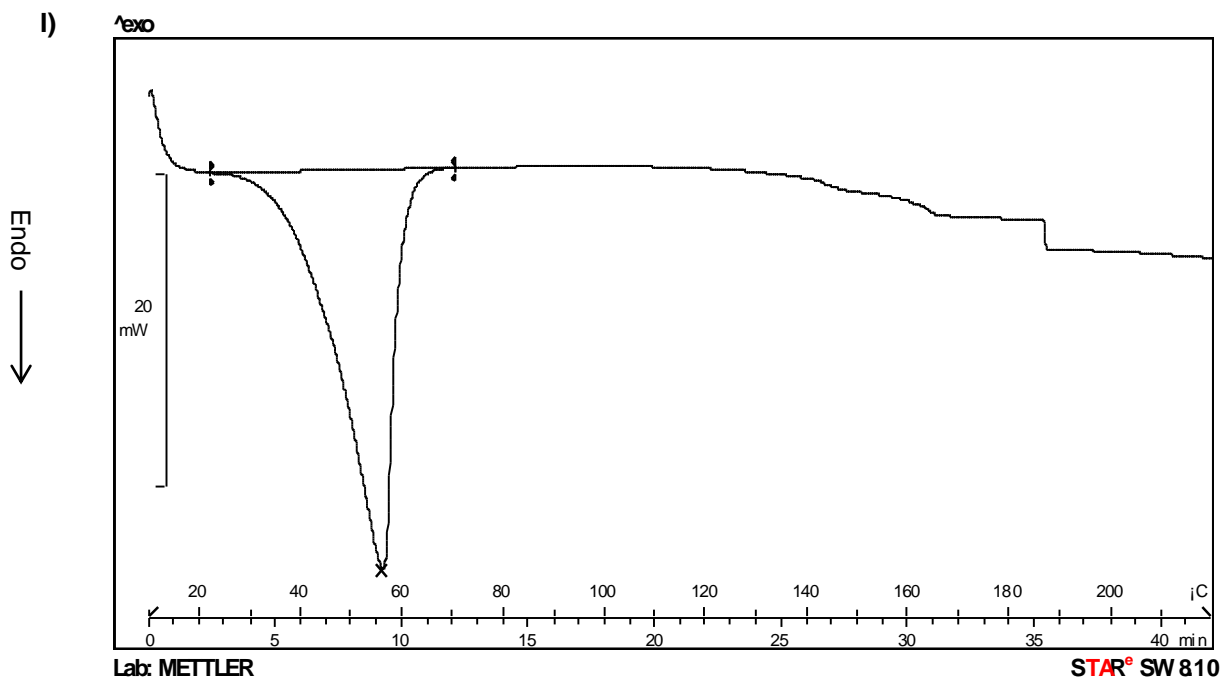
Figura 57. Comportamento di fase teorico delle miscele di lorazepam (in nero) e PEG 6000 (in blu).

Come si può notare da questi grafici, il modello teorico non prevede in nessun caso la formazione di un eutettico, ma solo l'abbassamento della temperatura di fusione

dei due componenti della miscela binaria. Tale abbassamento è più marcato nel caso del farmaco.

Così come è stato fatto per il diazepam, anche in questo caso i dati teorici sono stati confrontati con quelli sperimentali. A tale scopo sono state effettuate analisi mediante DSC delle miscele binarie di lorazepam e PEG 1500, 4000 e 6000 preparate come per il diazepam.

Nei tracciati riportati in Figura 58, 59 e 60 si nota la presenza di un solo picco da attribuire alla fusione del polimero. Nel caso delle dispersioni col lorazepam, il secondo picco non compare nemmeno alle più alte concentrazioni di farmaco, mentre si può osservare un abbassamento della linea di base (tanto più evidente quanto maggiore è la concentrazione del farmaco) che può essere interpretato come dovuto ad un fenomeno di progressiva degradazione del farmaco oppure come una progressiva dissoluzione del lorazepam nel PEG.



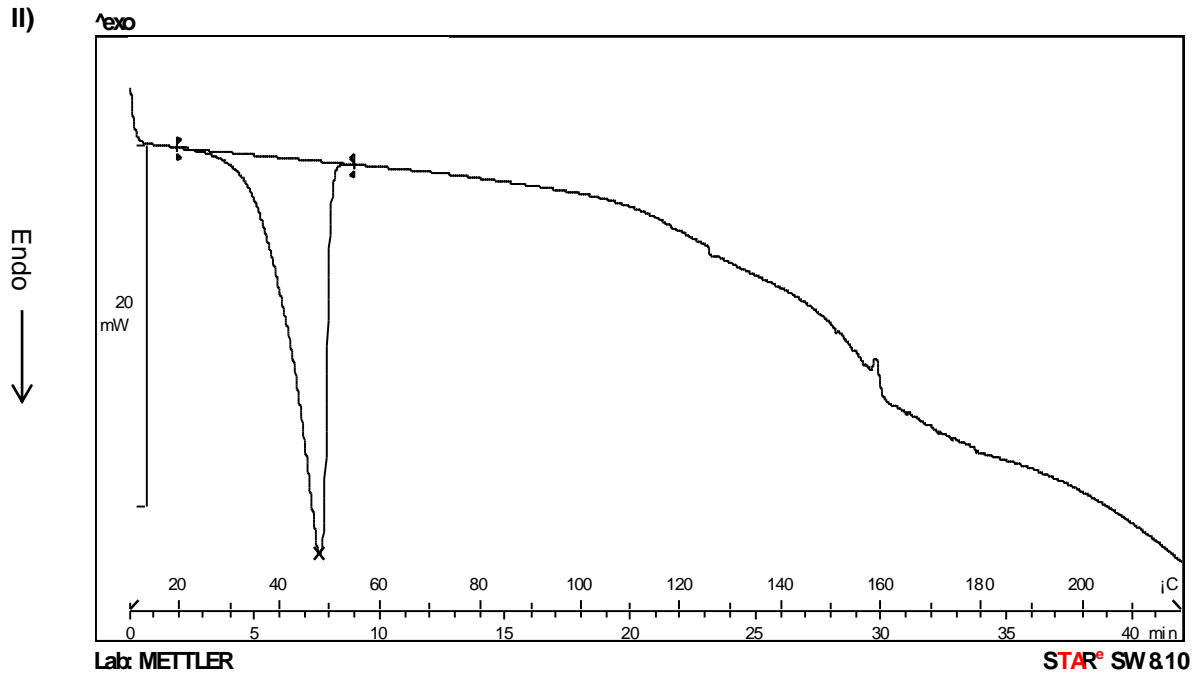
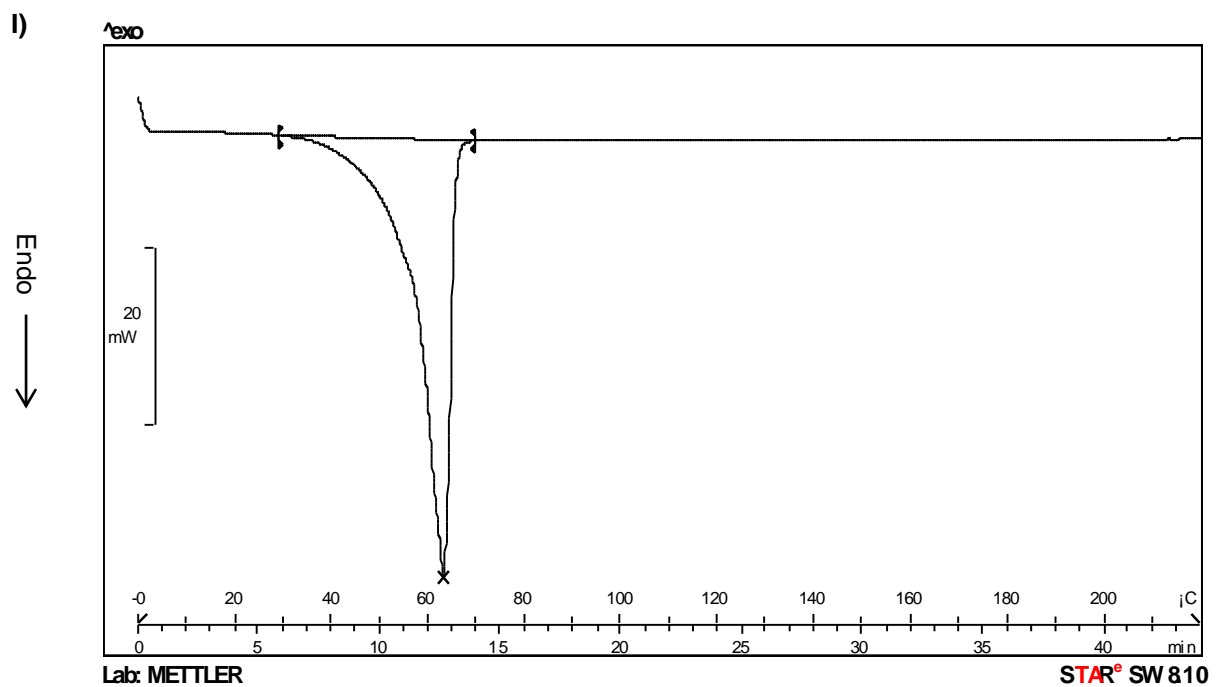


Figura 58. Tracciati DSC della miscela binaria lorazepam-PEG 1500 contenenti una concentrazione di farmaco pari al 5% (I) e al 50% (II) p/p.



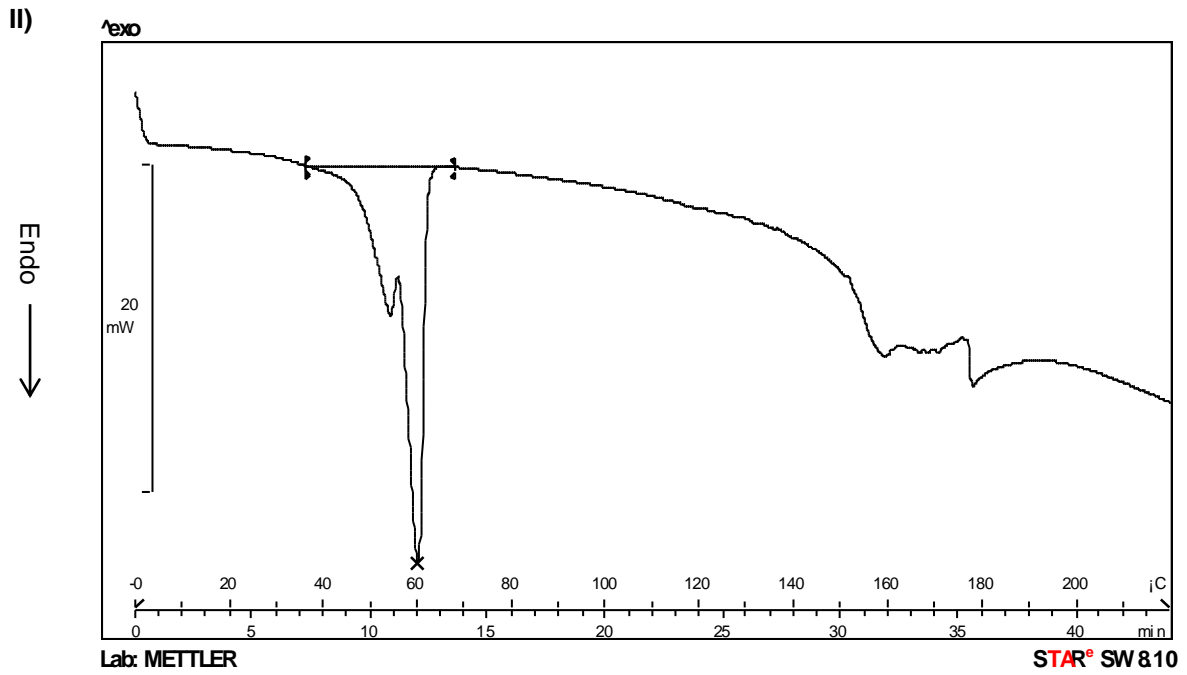
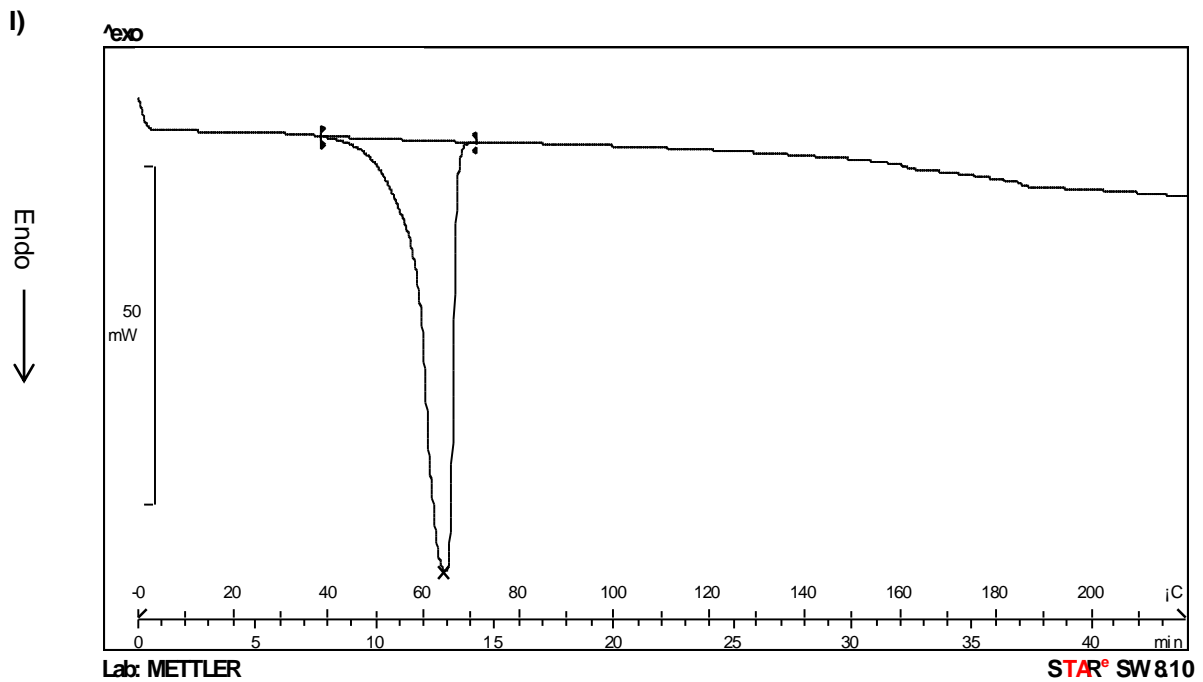


Figura 59. Tracciati DSC delle miscele binarie di lorazepam- PEG 4000 contenenti una concentrazione di farmaco pari al 5% (I) e al 50% (II) p/p.



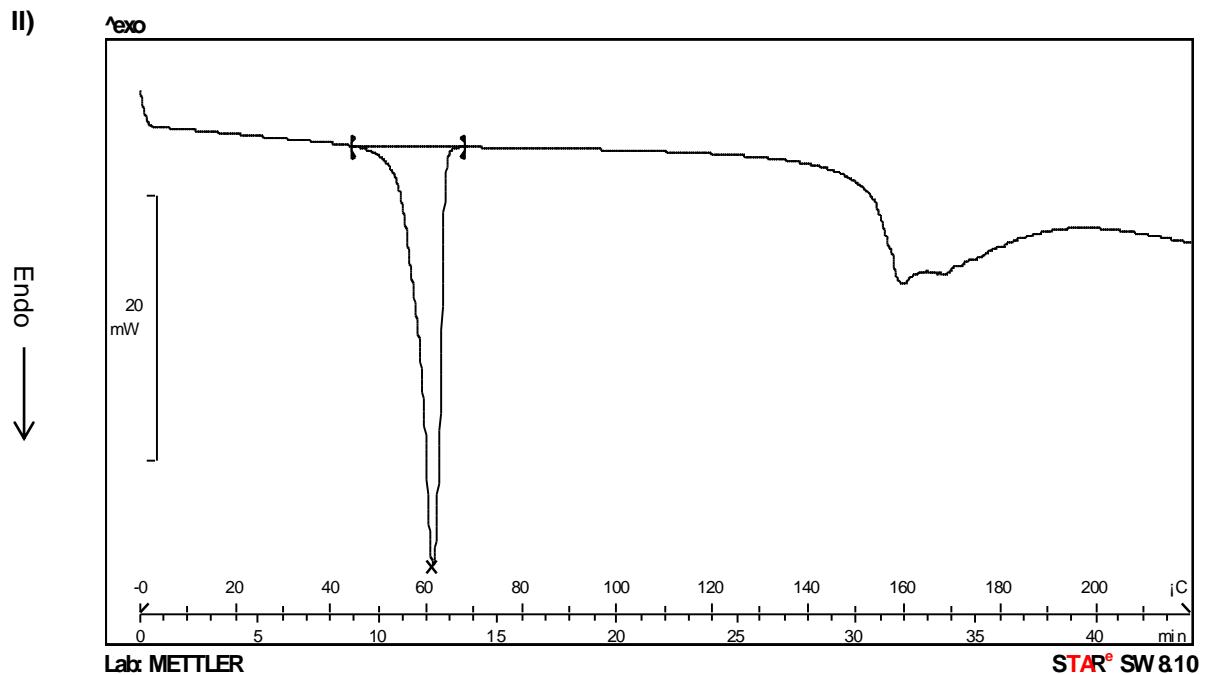
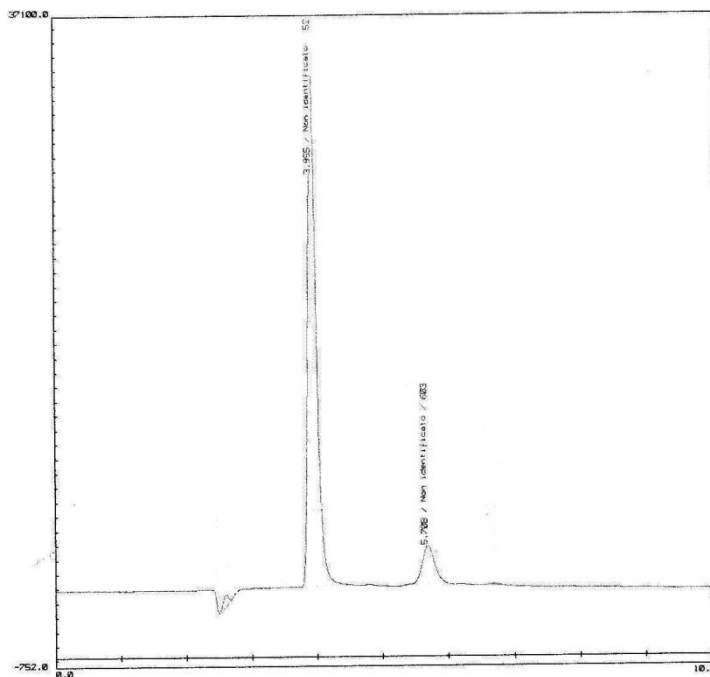


Figura 60. Tracciati DSC delle miscele binarie di lorazepam- PEG 6000 contenenti una concentrazione di farmaco pari al 5% (I) e al 50% (II) p/p.

Le due suddette ipotesi sono state vagliate mediante studi di solubilità a diverse temperature e attraverso microscopia su piastra riscaldante. La solubilità è stata misurata mediante il metodo HPLC utilizzato anche per il diazepam.

L'analisi HPLC utilizzata per quantificare il principio attivo nella soluzione di PEG ha mostrato una degradazione del farmaco che aumenta progressivamente all'aumentare della temperatura, mentre sembra essere indipendente dal peso molecolare del polimero. La Figura 61 mostra un esempio di tracciato HPLC della soluzione di lorazepam nel PEG 1500 a due diverse temperature. Si può notare la presenza di un picco, che compare ad un tempo di ritenzione maggiore rispetto a quello del lorazepam (circa 5,7 minuti, contro i 3,7 del farmaco) e che quindi suggerisce la presenza di prodotti di degradazione. L'intensità di questo picco aumenta progressivamente con la temperatura, mentre il picco del lorazepam, al contrario, diminuisce. Per tale motivo non è stato possibile determinare la solubilità del lorazepam come si era fatto, invece, per il diazepam.

a)



b)

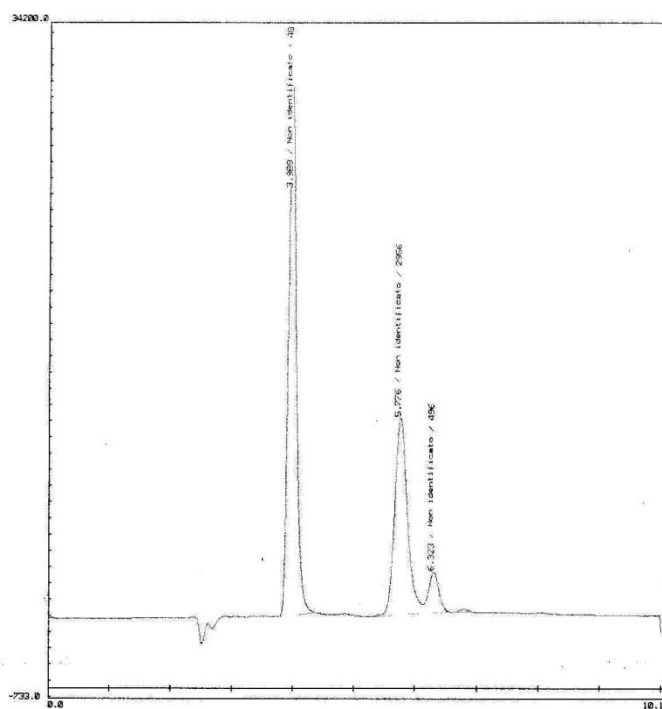


Figura 61. Tracciato HPLC della soluzione ottenuta equilibrando una miscela di lorazepam in eccesso e PEG 1500 a 80°C (a) e 90°C (b).

Queste osservazioni indicano che il lorazepam subisce un fenomeno di degradazione con il riscaldamento, confermando in tal modo l'ipotesi fatta per spiegare i tracciati DSC.

Tuttavia, rimane da chiarire il ruolo giocato dalla possibile solubilizzazione del farmaco nel polimero fuso sulla degradazione. In effetti, la dissoluzione del principio attivo nel fuso potrebbe portare ad una maggiore mobilità molecolare e di conseguenza ad un'accelerazione del processo di degradazione. La potenziale solubilizzazione del farmaco nel PEG è stata studiata mediante microscopia su piastra riscaldante. Grazie a questa tecnica di microscopia si è potuto mimare il riscaldamento che la miscela binaria subisce nel forno DSC osservandone il comportamento al variare della temperatura.

A titolo di esempio, in Figura 62 sono riportati alcuni fotogrammi relativi ad una miscela binaria lorazepam/PEG 4000 a diverse temperature.

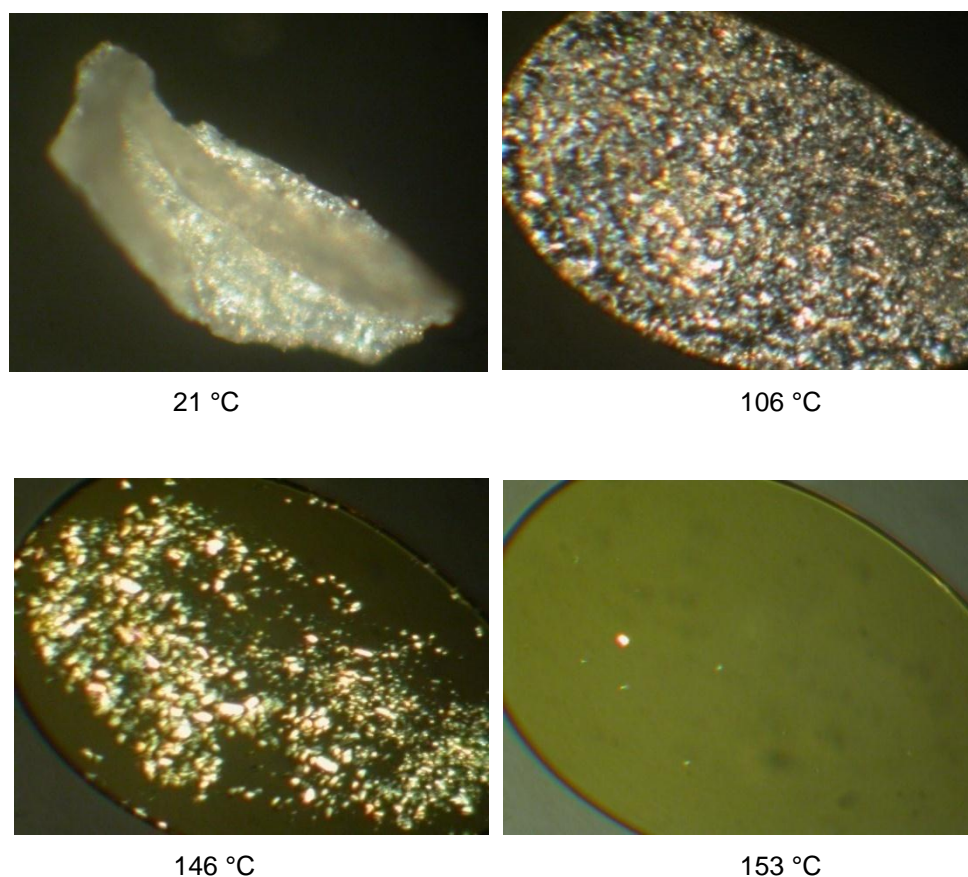


Figura 62. Immagini da microscopio a luce polarizzata equipaggiato con piastra riscaldante (ingrandimento 10x) di una dispersione solida di lorazepam e PEG 4000 prese a diverse temperature.

Si può notare che il lorazepam inizia a dissolversi nel PEG subito dopo la fusione di quest'ultimo. A partire dalla temperatura di 146 °C si è osservata la decomposizione del campione evidenziata dal un cambiamento di colore. Un comportamento simile è stato osservato con tutti e tre i PEG studiati.

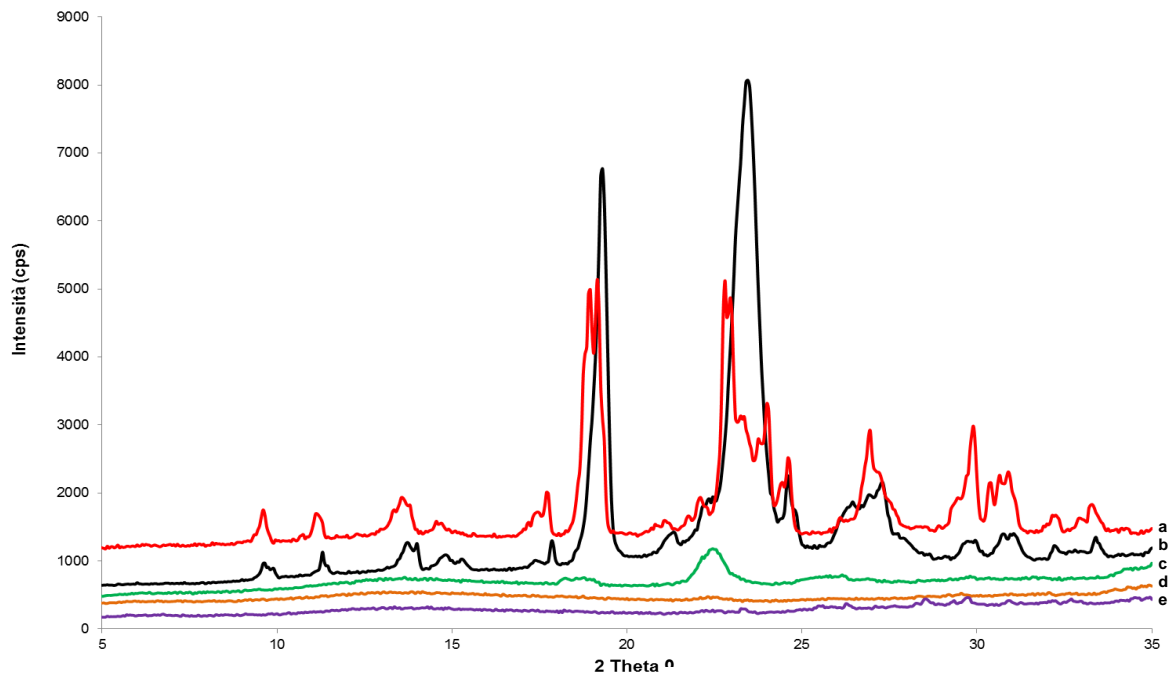
4.6 Caratterizzazione delle dispersioni preparate con il metodo della fusione contenenti diazepam alla saturazione

Il surnatante utilizzato per calcolare la concentrazione del diazepam nel polimero all'aumentare della temperatura è stato fatto solidificare a temperatura ambiente e quindi caratterizzato mediante diffrazione di raggi X. Attraverso l'analisi cristallografica è stata analizzata l'eventuale ricristallizzazione di queste miscele.

In Figura 63.I, 64.I e 65.I sono riportati i diffrattogrammi delle dispersioni solide ottenute a tre differenti temperature, che nel caso del PEG 1500 e del PEG 4000 erano 60 °C, 90 °C e 120°C mentre nel caso del PEG 6000 erano 70 °C, 90 °C e 120 °C. Questi sono stati confrontati con le miscele fisiche corrispondenti alla composizione delle miscele ottenute alla temperatura più bassa (10:90 per il PEG 1500; 9:91 per PEG 4000; 16:84 per il PEG 6000 valori espressi in p/p) e alla temperatura più alta (50:50 per tutti e tre i PEGs).

Sono riportate in Figura 63.II, 64.II e 65.II le regioni da 5 a 12 Theta dei suddetti diffrattogrammi in modo da mettere in evidenza gli eventuali picchi di ricristallizzazione corrispondenti al diazepam in quanto dallo studio delle materie prime questa zona è stata infatti identificata come una regione contenente solo picchi relativi ai farmaci e non ai polimeri.

I)



II)

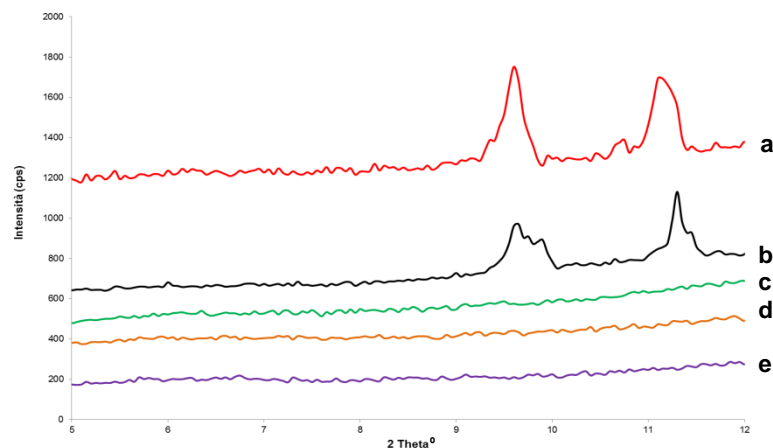
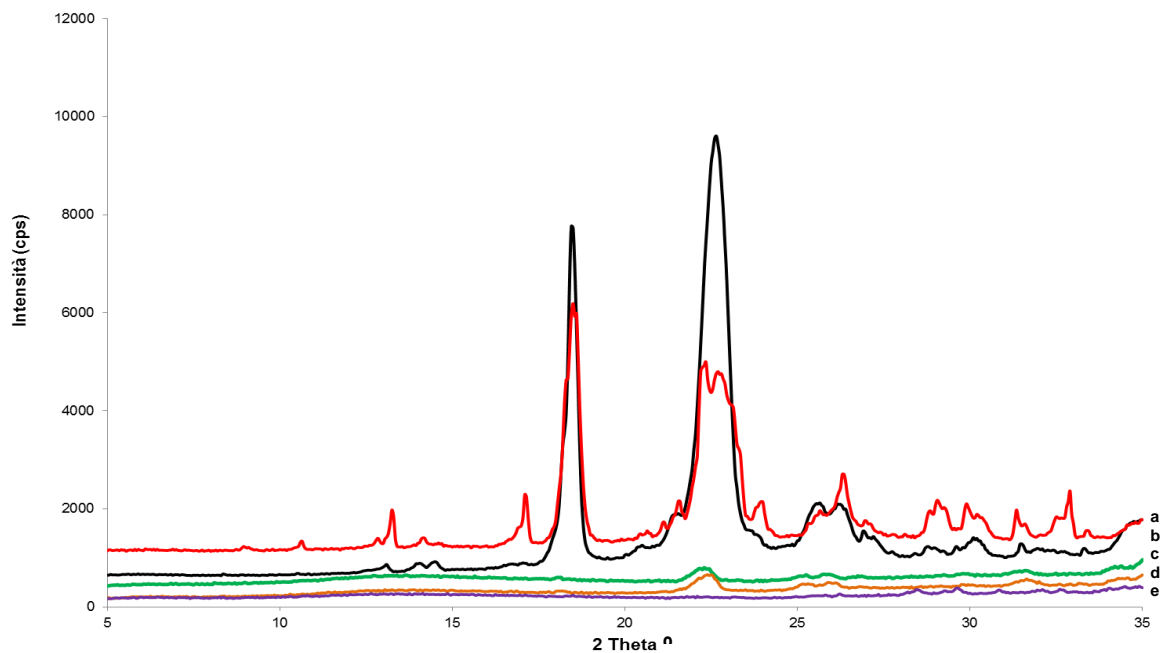


Figura 63. I. Diffratogramma di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 1500 ottenuti per solidificazione dei surnatanti recuperati dalle prove di solubilità effettuate a 60°C (**c**), 90°C (**d**) e 120°C (**e**) in confronto con le due miscele fisiche di diazepam e PEG 1500 al 10 % (**b**) e al 50 % (**a**) p/p di farmaco. **II.** Zoom della regione 5-12 2Theta.

Queste dispersioni, preparate con PEG 1500, presentano un contenuto di diazepam pari alla saturazione del polimero, in particolare 10%, 24% e 47% p/p per le dispersioni preparate a 60 °C, 90 °C e 120 °C rispettivamente. E' possibile notare una parziale ricristallizzazione della miscela preparata a 60 °C (Figura 63.I) probabilmente riconducibile al polimero, ricristallizzazione peraltro già evidenziata nelle precedenti analisi al microscopio a luce polarizzata. Da questi diffratogrammi si

può notare la mancanza dei picchi di ricristallizzazione relativi al diazepam, picchi che sono invece chiaramente evidenziabili nel caso delle miscele fisiche (Figura 63.II). Le miscele alle temperature maggiori denotano invece una natura pressochè amorfa.

I)



II)

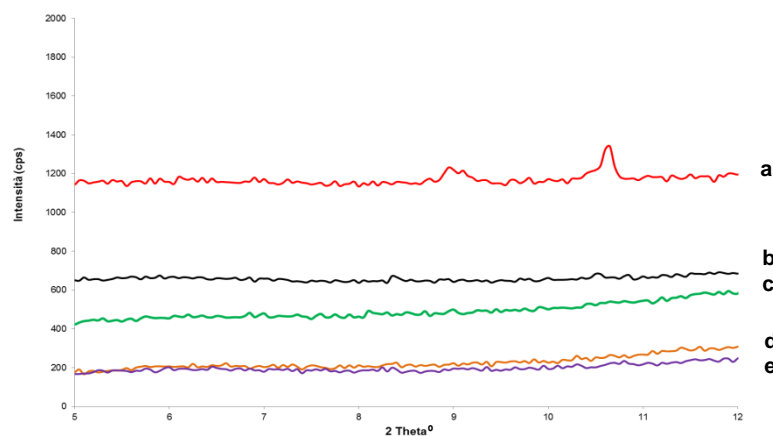
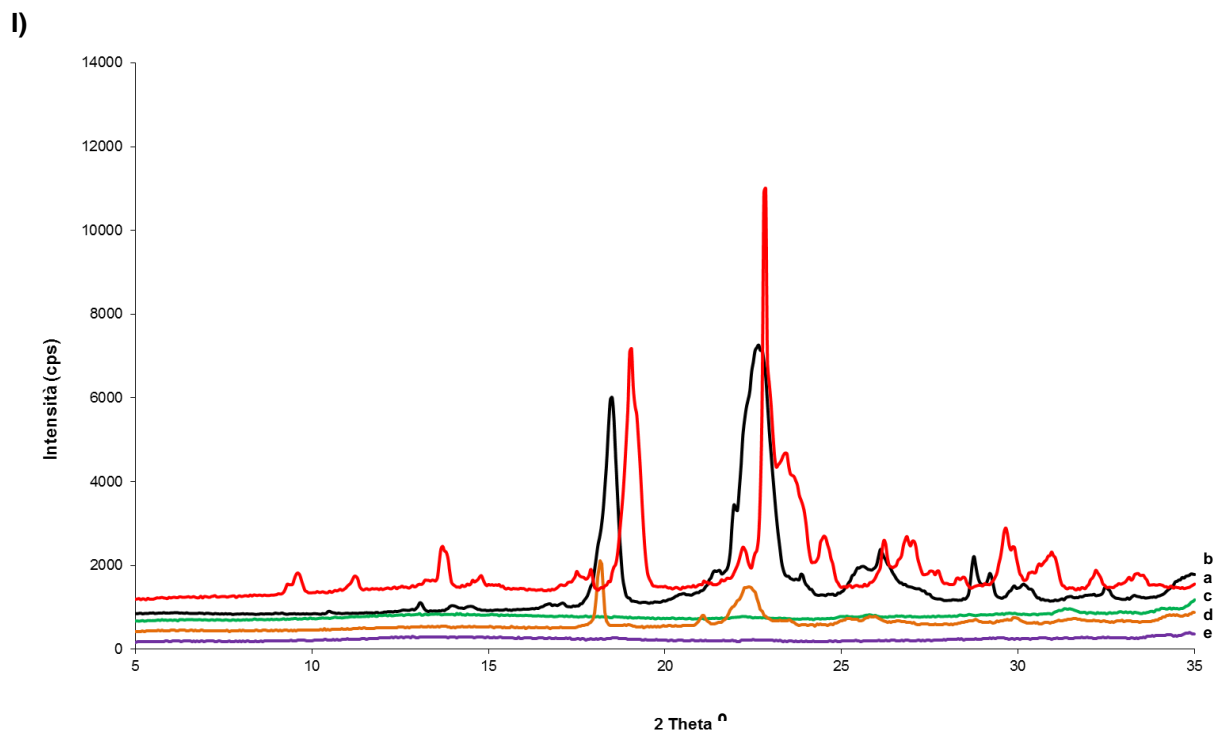


Figura 64. I. Diffratogramma di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 4000 ottenute per solidificazione dei surnatanti recuperati dalle prove di solubilità effettuate a 60°C (**c**), 90°C (**d**) e 120°C (**e**) in confronto con la miscela fisica di diazepam e PEG 4000 al 9 % (**b**) e al 50 % (**a**) p/p di farmaco..

II. Zoom della regione 5-12 2Theta.

Nel caso delle dispersioni preparate con PEG 4000 il contenuto di diazepam pari alla saturazione del polimero era del 8%, 24% e 47% p/p per le dispersioni preparate a 60 °C, 90 °C e 120 °C rispettivamente. Anche in questo caso, come mostrato dalla Figura 65.II, non si evidenziano i picchi di ricristallizzazione del diazepam, tuttavia questi picchi sono poco definiti anche nel caso delle miscele fisiche. Questo induce a pensare che vi sia un problema di sensibilità dello strumento quando si scende al di sotto del 10 % p/p in farmaco. Per quanto riguarda il polimero anche in questo caso si è notato una ricristallizzazione che si evidenzia come per le miscele con PEG 1500 nelle miscele preparate alle temperature più basse (Figura 64.II). Per il PEG 4000 si ha però ricristallizzazione del polimero anche nelle miscele preparate a 90 °C, questa differenza potrebbe essere dovuta al punto di fusione più alto del PEG 4000 rispetto al PEG 1500.



II)

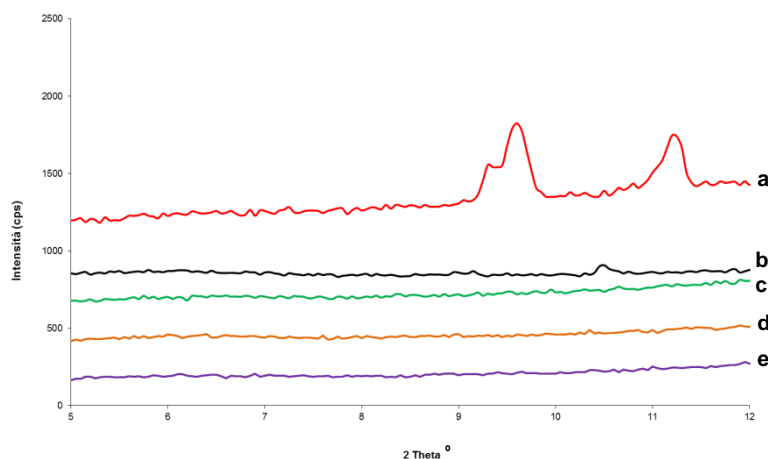


Figura 65. I. Diffrattoграмма di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 6000 ottenute per solidificazione dei surnatanti recuperati dalle prove di solubilità effettuate a 70°C (**c**), 90°C (**d**) e 120°C (**e**) in confronto con la miscela fisica di diazepam e PEG 6000 al 16 % (**b**) e al 50 % (**a**) p/p di farmaco.

II. Zoom della regione 5-12 2Theta.

Le dispersioni ottenute con PEG 6000 presentano infine un contenuto di diazepam pari alla saturazione del polimero, in particolare 16%, 24% e 45% p/p per le dispersioni preparate a 70 °C, 90 °C e 120 °C rispettivamente. Per quanto riguarda la ricristallizzazione del farmaco (Figura 65.I) valgono le stesse considerazioni fatte per le dispersioni con PEG 4000, quindi non si evidenziano picchi riconducibili ad una ricristallizzazione del diazepam. Per quanto riguarda invece il polimero si può notare una ricristallizzazione importante solo per quanto riguarda la dispersione ottenuta a 90 °C (Figura 65.I).

In tutti i casi analizzati è importante sottolineare come vi sia un'importante riduzione della cristallinità rispetto alle materie prime, sia considerando il diazepam che i tre polimeri.

L'attenzione è stata quindi concentrata verso le miscele binarie ottenute a 120 °C in quanto hanno presentato il contenuto in diazepam maggiore intorno al 45 % per tutti e tre i polimeri.

Queste dispersioni sono state caratterizzate anche mediante spettroscopia infrarossa. In particolare, è stato utilizzato il supporto ATR a causa della difficoltà nel preparare le pastiglie di KBr in ragione del basso punto di fusione dei polimeri.

In Figura 66, 67 e 68 sono riportati gli spettri ATR-IR delle miscele binarie preparate con i tre PEGs a 120 °C e a saturazione confrontati con spettro ATR-IR del diazepam e del PEG corrispondente tal quale.

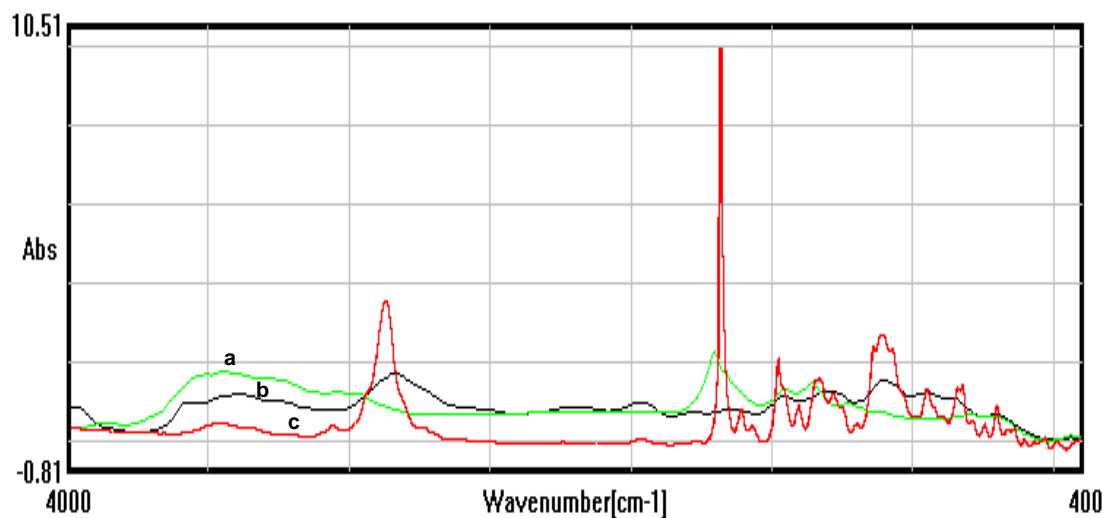


Figura 66. Spettro ATR-IR della miscela binaria di diazepam e PEG 1500 (c) ottenuta a 120°C a saturazione in confronto con lo spettro ATR-IR di diazepam (a) e PEG 1500 (b)

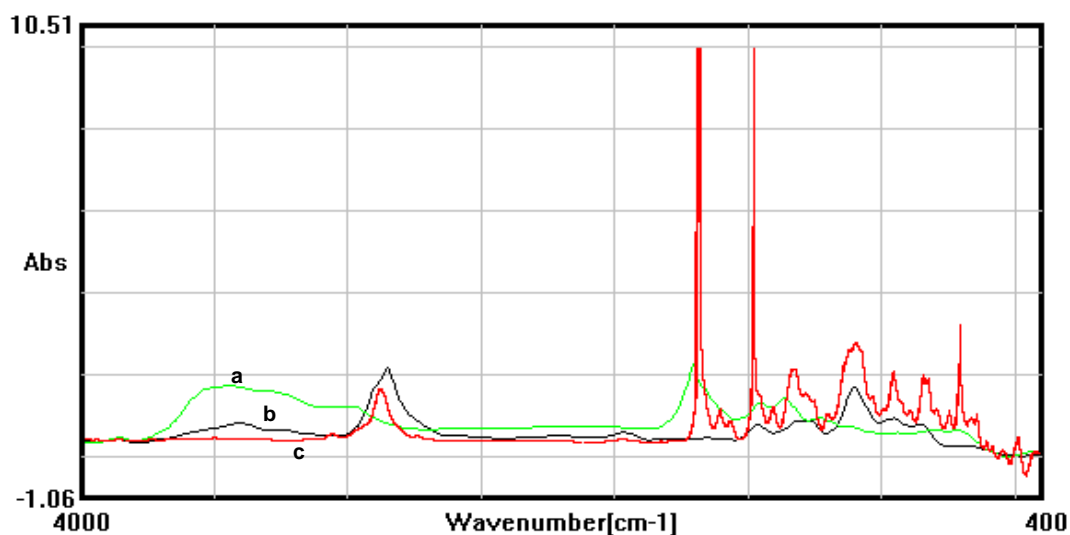


Figura 67. Spettro ATR-IR della miscela binaria di diazepam e PEG 4000 (c) ottenuta a 120°C a saturazione in confronto con lo spettro ATR-IR di diazepam (a) e PEG 4000 (b).

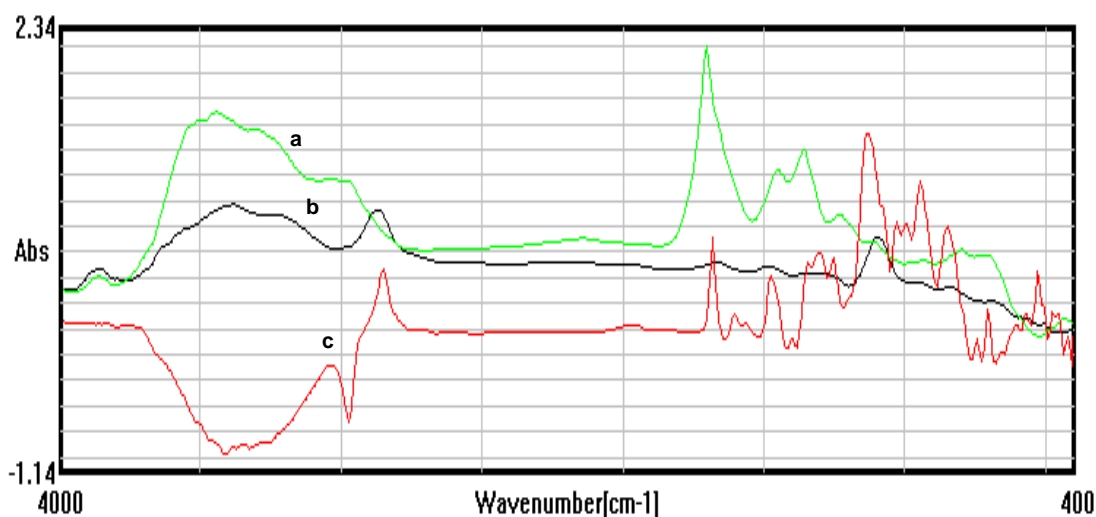


Figura 68. Spettro ATR-IR della miscela binaria di diazepam e PEG 6000 (c) ottenuta a 120°C a saturazione in confronto con lo spettro ATR-IR di diazepam (a) e PEG 6000 (b).

Nello studio di questi spettri sono stati individuati due picchi caratteristici, uno del diazepam e uno del PEG, che è possibile ritrovare nello spettro della miscela binaria. In particolare è stato preso in considerazione il picco dello stretching della ciclo amide del diazepam che presenta un numero d'onda di 1704.76 cm^{-1} e il picco dello stretching del -CH- dei polimeri, quest'ultimo presenta un numero d'onda di 2838.70 cm^{-1} , 2854.13 cm^{-1} e 2869.56 cm^{-1} per PEG 1500, 4000 e 6000 rispettivamente.

Per quanto riguarda il picco dello stretching della ciclo amide nelle miscele binarie è risultato essere spostato verso numeri d'onda minori (1673.91 cm^{-1} , 1675.84 cm^{-1} e 1681.62 cm^{-1} per le miscele preparate con PEG 1500, 4000 e 6000 rispettivamente).

Nel caso del picco del -CH- è risultato essere spostato verso numeri d'onda maggiori nel caso delle miscele ottenute con PEG 1500 e 4000 (2875.34 cm^{-1} e 2883.06 cm^{-1} rispettivamente), mentre nel caso della miscela ottenuta con PEG 6000 è risultato essere spostato verso numeri d'onda minori (2854.13 cm^{-1}).

Gli shift che coinvolgono gruppi funzionali sia del farmaco che dei polimeri confermano l'ipotesi che vi sia un'interazione tra il farmaco stesso e il polimero una volta che questi vengono fusi per ottenere la dispersione binaria.

4.6.1 Stabilità delle dispersioni di diazepam nei PEGs alla saturazione

Per valutare se effettivamente l'interazione tra farmaco e polimero sia in grado di impedire o posticipare la ricristallizzazione del farmaco all'interno delle dispersioni ne è stata seguita la stabilità fino ad un anno.

Le dispersioni sono state quindi conservate all'interno di contenitori sigillati in camera termostata a 25 °C e 40 °C. In Figura 69, 70 e 71 sono mostrati i diffrattogrammi delle dispersioni binarie diazepam/PEGs conservate a 25 °C per 1, 2, 3, 6 mesi e 1 anno confrontati con i diffrattogrammi della miscela fisica e della miscela binaria al tempo zero. L'attenzione è stata rivolta in particolare alla regione tra 5 e 12 Theta del diffrattogramma in modo da mettere in evidenza solo la ricristallizzazione del farmaco.

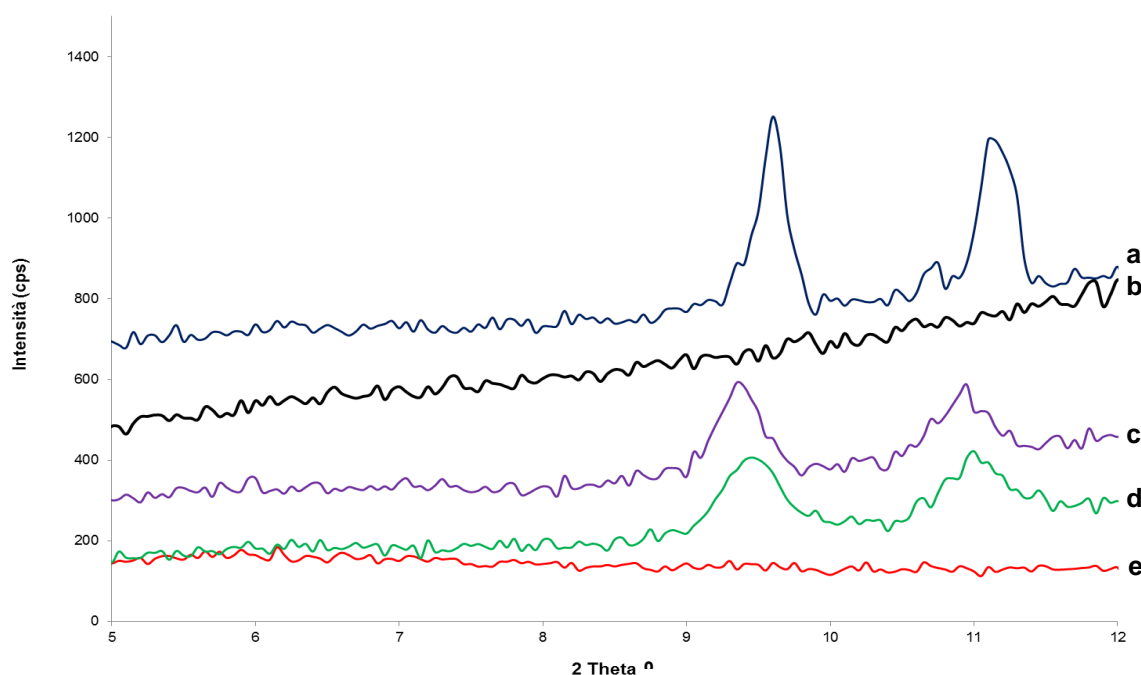


Figura 69. Diffrattogramma di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 1500 ottenute a 120°C a saturazione dopo 1 (d), 2 (c) e 3 (b) mesi a 25 °C in confronto con la miscela fisica (a) e con la miscela binaria al tempo zero (e).

Come si può vedere a dispetto di una natura prettamente amorfa al tempo zero si può evidenziare un principio di ricristallizzazione dopo un mese a 25 °C che sembra però rimanere costante fino a 2 mesi. Dopo il terzo mese le dispersioni contenenti PEG 1500 non sono più state seguite in quanto hanno mostrato segni di rammollimento durante la preparazione del campione per l'analisi cristallografica

dovute alla diminuzione della temperatura di fusione del polimero una volta miscelato col farmaco.

Come si può vedere dai diffrattogrammi in Figura 70 e 71 nel caso delle dispersioni binarie preparate con i due polietilenglicoli a maggiore peso molecolare non si è evidenziato alcun picco di ricristallizzazione fino ad 1 anno a 25 °C. Questo ci porta a concludere che all'interno delle miscele preparate con PEG 4000 e 6000 e contenenti il 47 % di diazepam il farmaco ha una natura pressochè amorfa fino ad un anno o quantomeno la cristallinità residua è inferiore alla sensibilità dello strumento.

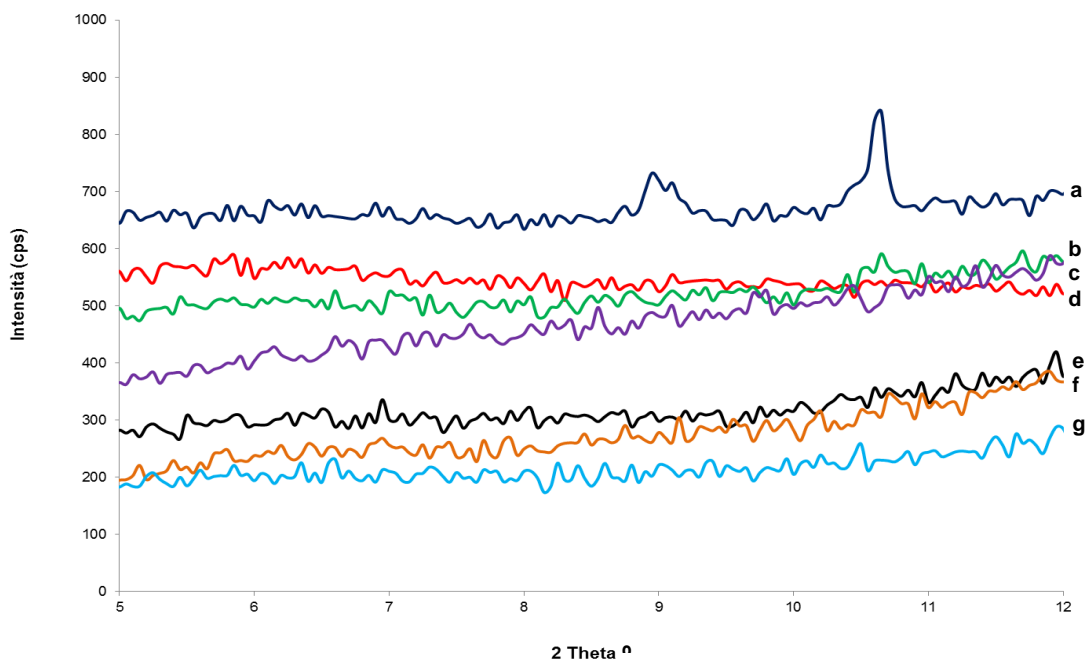


Figura 70. Diffrattogramma di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 4000 ottenute a 120°C a saturazione dopo 1 (b), 2 (c), 3 (e), 6 mesi (f) e 1 anno (g) 25 °C in confronto con la miscela fisica (a) e con la miscela binaria al tempo zero (d).

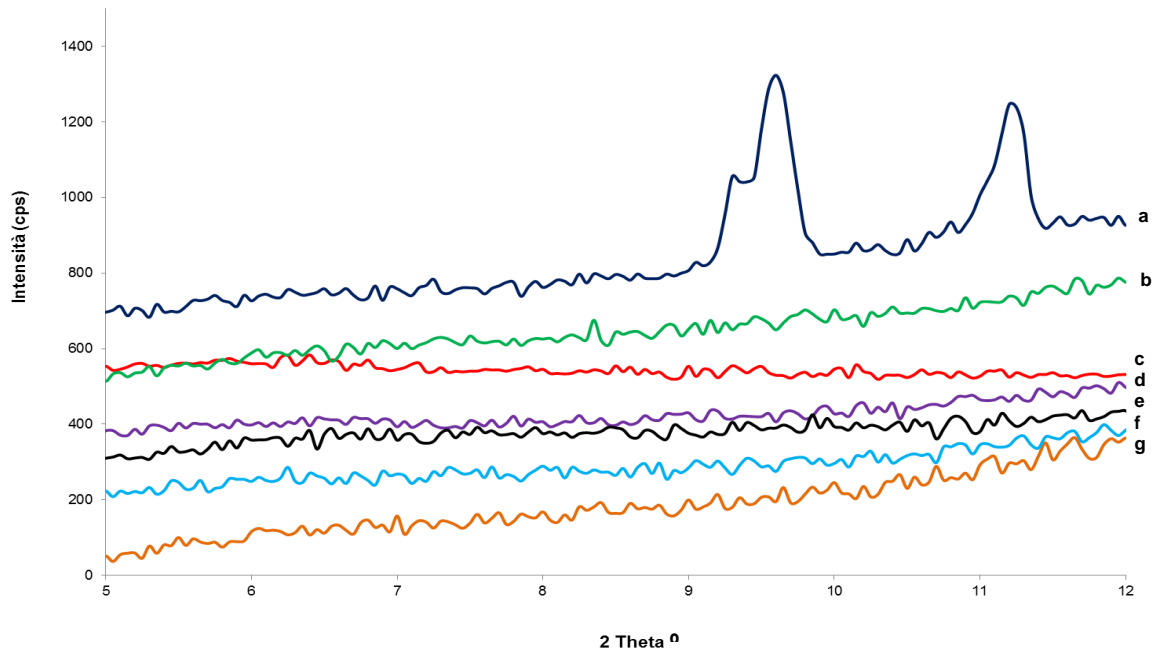


Figura 71. Diffratogramma di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 6000 ottenute a 120°C a saturazione dopo 1 (b), 2 (d), 3 (e), 6 mesi (g) e 1 anno (f) a 25 °C in confronto con la miscela fisica (a) e con la miscela binaria al tempo zero (c).

Le dispersioni solide preparate con PEG 4000 e 6000 sono state poste anche in camera termostata a 40 °C. Nel caso delle dispersioni con PEG 1500 la stabilità a 40 °C non è invece stata valutata in quanto il PEG con questo peso molecolare fonde intorno ai 45 °C, le dispersioni si ritrovano quindi rammollite ed è inutile valutarne la diffrazione di raggi X. In Figura 72 e 73 sono riportati i diffratogrammi di raggi X delle dispersioni diazepam/ PEG 4000 e 6000 conservate per 1, 2, 3, 6 mesi e 1 anno in camera termostata a 40 °C.

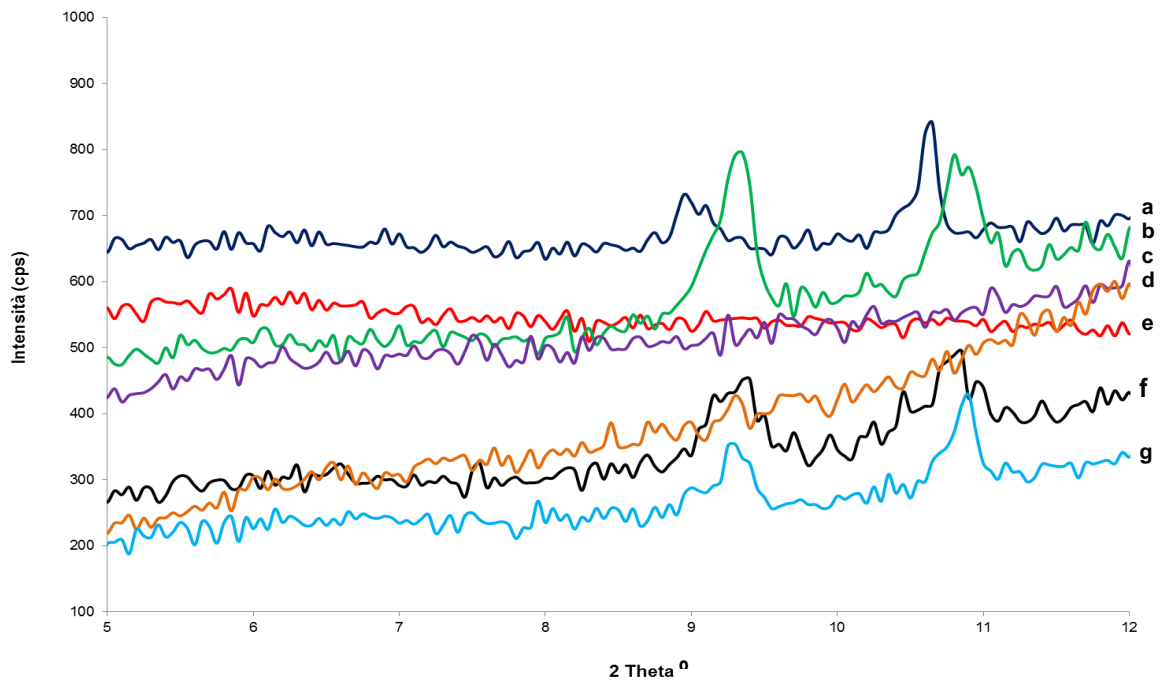


Figura 72. Diffrattoگرامma di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 4000 ottenute a 120°C a saturazione dopo 1 (b), 2 (c), 3 (f), 6 mesi (d) e 1 anno (g) a 40 °C in confronto con la miscela fisica (a) e con la miscela binaria al tempo zero (e).

La Figura 72 mette in evidenza come nel caso delle dispersioni preparate con PEG 4000 ci sia una ricristallizzazione già dopo un mese, anche se alcuni dati (2 e 6 mesi) sembrano contrastanti. Anche in questo caso è confermato un problema di sensibilità e di orientamento preferenziale dei cristalli.

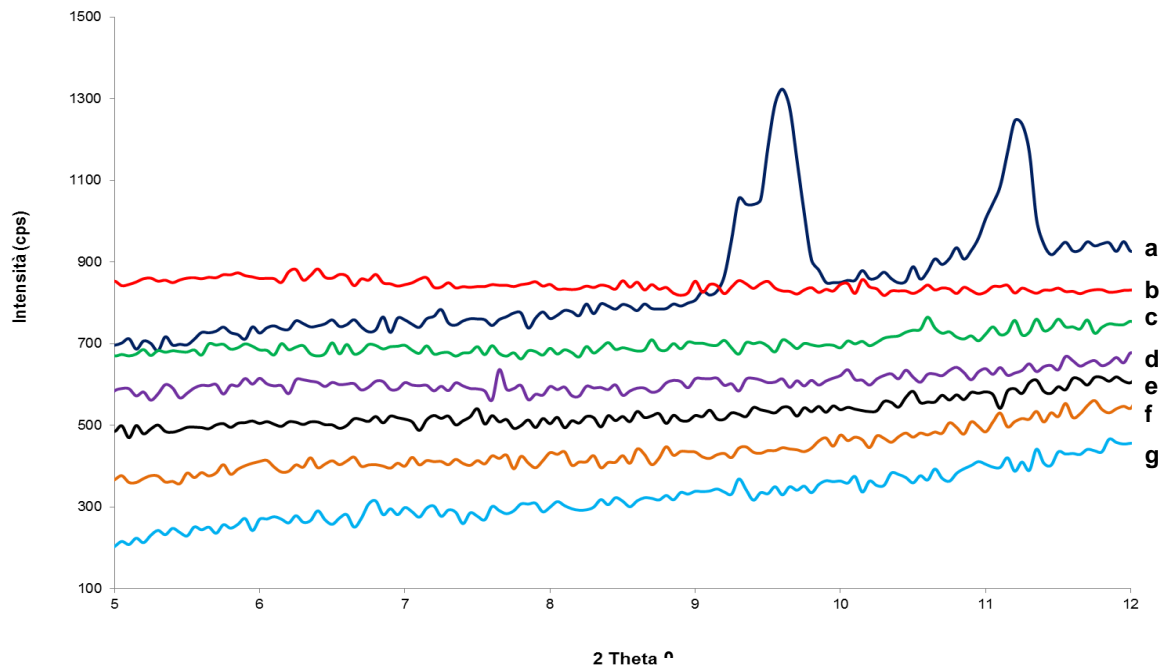


Figura 73. Diffratogramma di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 6000 ottenute a 120°C a saturazione dopo 1 (c), 2 (d), 3 (e), 6 mesi (f) e 1 anno (g) a 40 °C in confronto con la miscela fisica (a) e con la miscela binaria al tempo zero (b).

Per quanto riguarda le miscele preparate con PEG 6000 (Figura 73) non è invece stato evidenziato alcun picco riconducibile alla ricristallizzazione del farmaco fino ad un anno a 40 °C.

4.7 Caratterizzazione delle dispersioni binarie al di sotto della saturazione

Si è deciso di valutare anche il comportamento di dispersioni binarie di diazepam nei tre PEGs preparate sempre a 120 °C ma con una quantità di diazepam inferiore alla saturazione, in particolare ad una concentrazione di diazepam corrispondente al 60 % o a 80 % rispetto alla concentrazione di saturazione.

Il rationale di questa scelta risiede nella considerazione che la riduzione della concentrazione di farmaco nella miscela binaria dovrebbe tradursi in una minore tendenza della stessa a ricristallizzare.

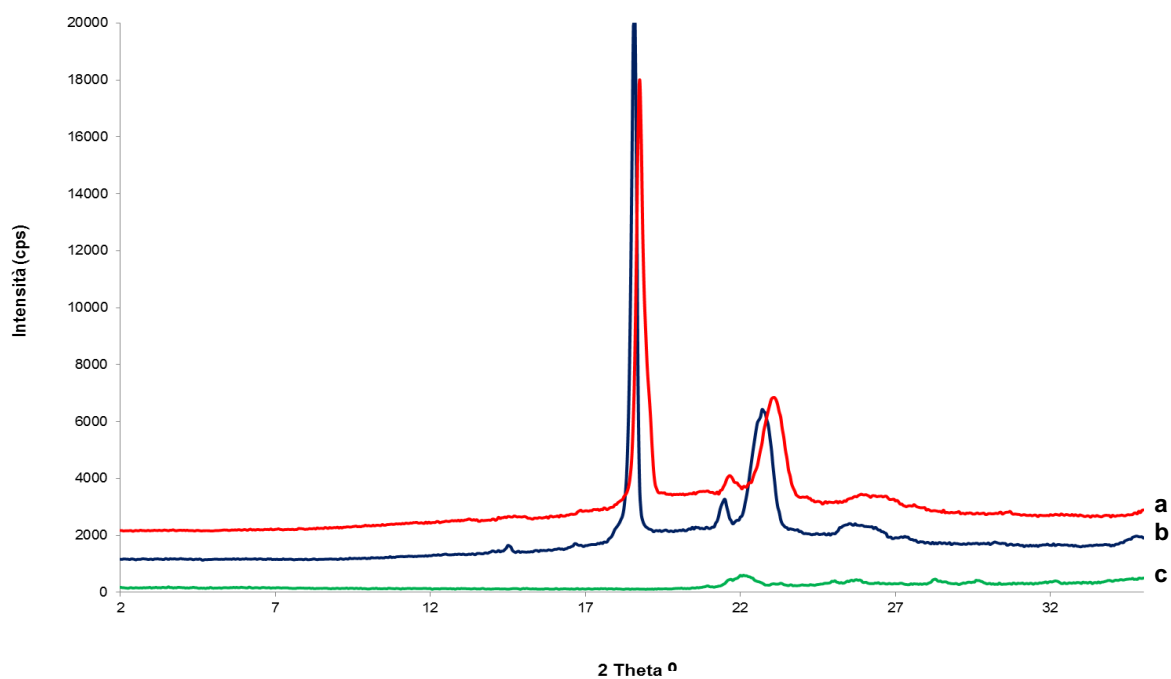


Figura 74. Diffratogramma di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 1500 ottenute a 120°C con concentrazione di diazepam al 60 (b), 80 (a) e 100 % (c) della saturazione.

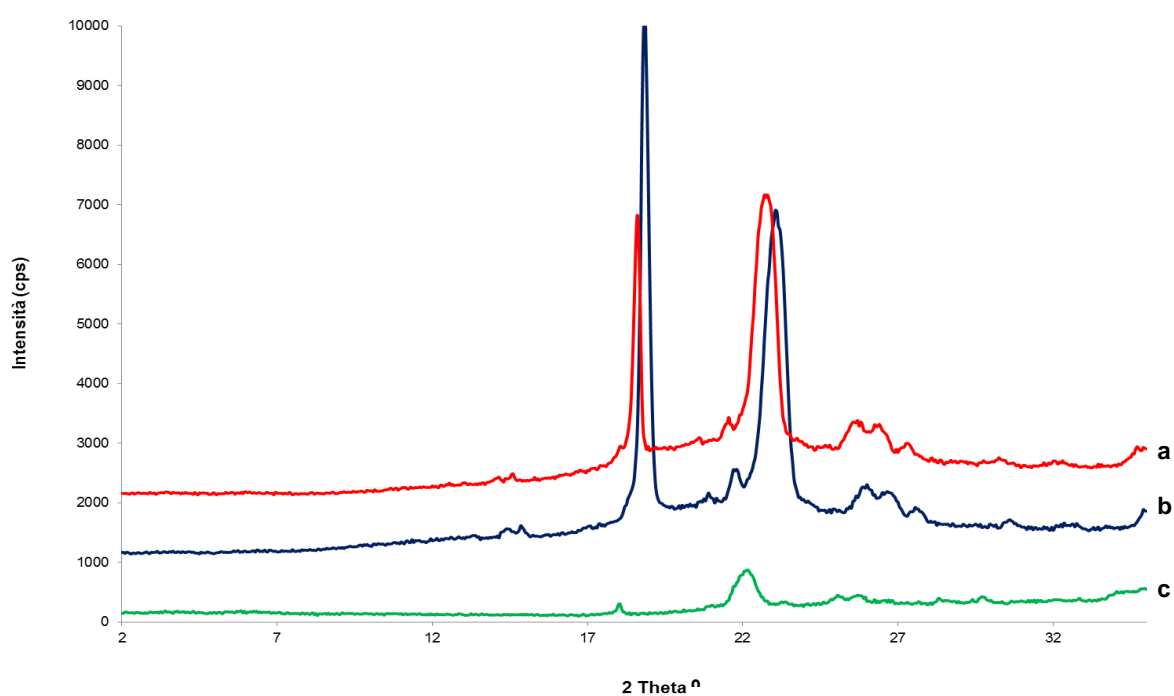


Figura 75. Diffratogramma di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 4000 ottenute a 120°C con concentrazione di diazepam al 60 (b), 80 (a) e 100 % (c) della saturazione.

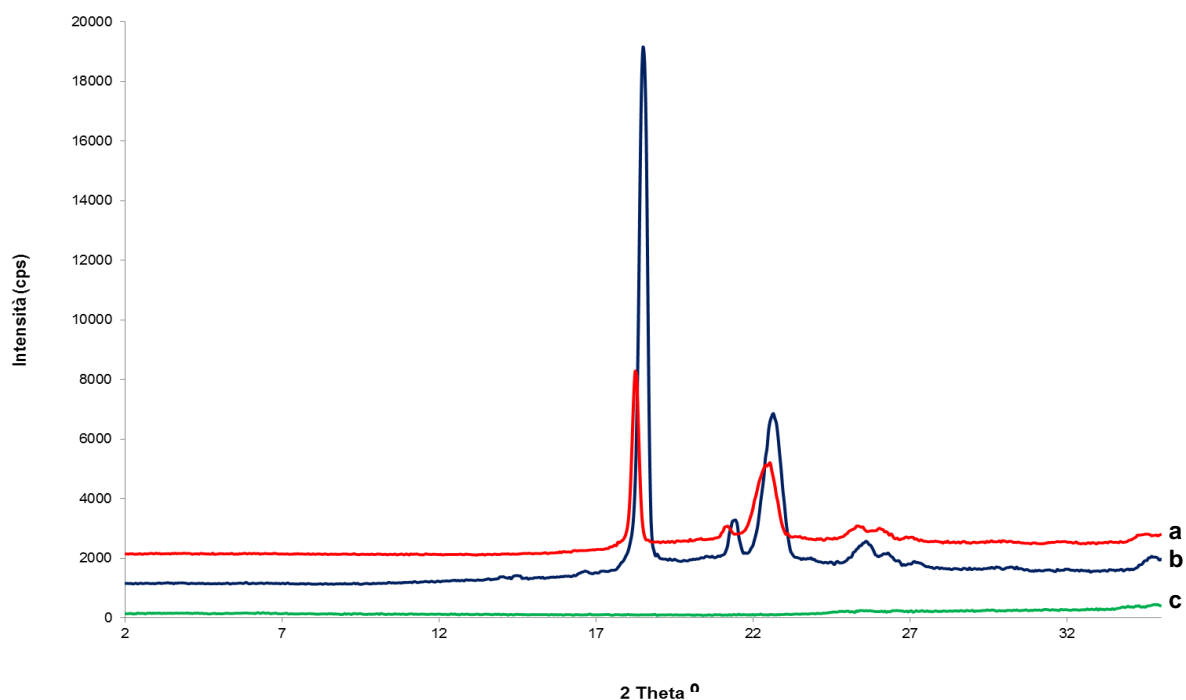


Figura 76. Diffratogramma di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 6000 ottenute a 120°C con concentrazione di diazepam al 60 (b), 80 (a), e 100 % (c) della saturazione.

Questi diffratogrammi mostrano che il numero e l'intensità dei picchi della miscela binaria aumenti all'aumentare della quantità di polimero all'interno della miscela stessa, e questo ci porta a confermare l'ipotesi secondo la quale la cristallinità residua ritrovata nelle miscele preparate a temperature più basse e quindi con un contenuto in farmaco minore sia dovuta al polimero più che al farmaco.

4.7.1 Stabilità delle dispersioni binarie al di sotto della saturazione

E' stata valutata anche la stabilità di queste dispersioni binarie con una concentrazione di diazepam al di sotto della concentrazione di saturazione. Anche queste dispersioni sono state conservate fino ad 1 anno in camera termostata a 25 e 40 °C.

Per quanto riguarda le miscele preparate con PEG 1500 al 60 % e 80 % (Figura 77.I e 77.II) della saturazione si è evidenziata una tendenza alla ricristallizzazione a 25 °C più marcata nel caso delle dispersioni al 60 % della saturazione.

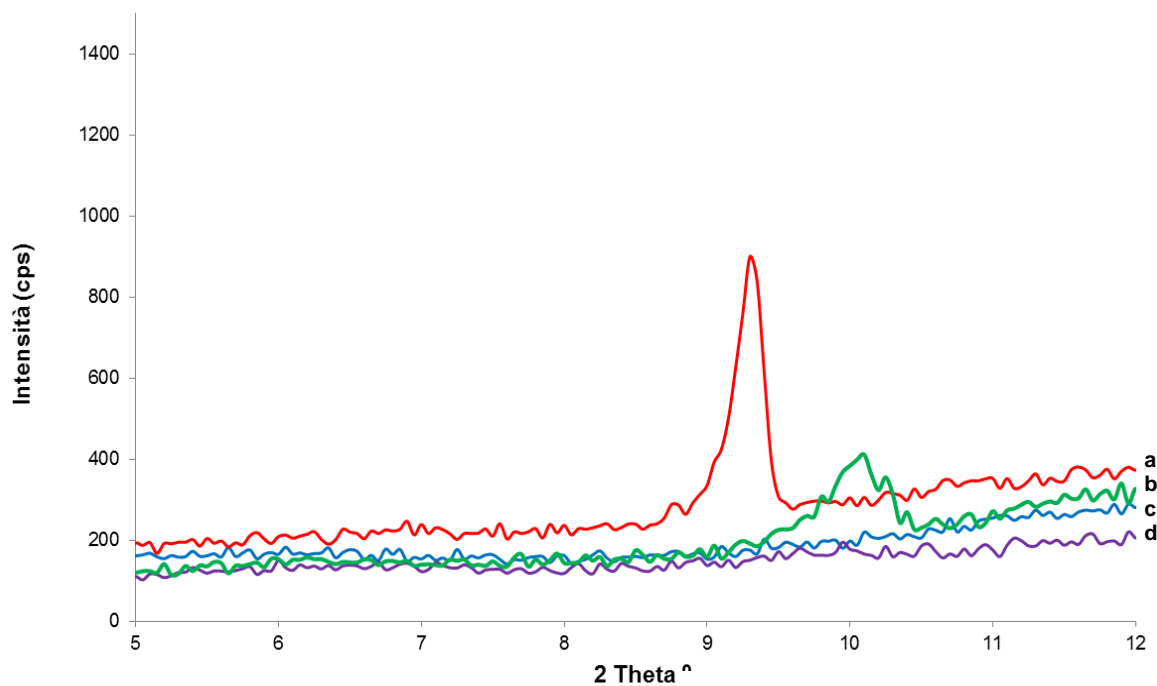


Figura 77.I Diffratogramma di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 1500 ottenute a 120°C con concentrazione di diazepam al 60% della saturazione al tempo zero (c) e conservate in camera termostata a 25 °C per 1 (a), 6 mesi (d) e 1 anno (b).

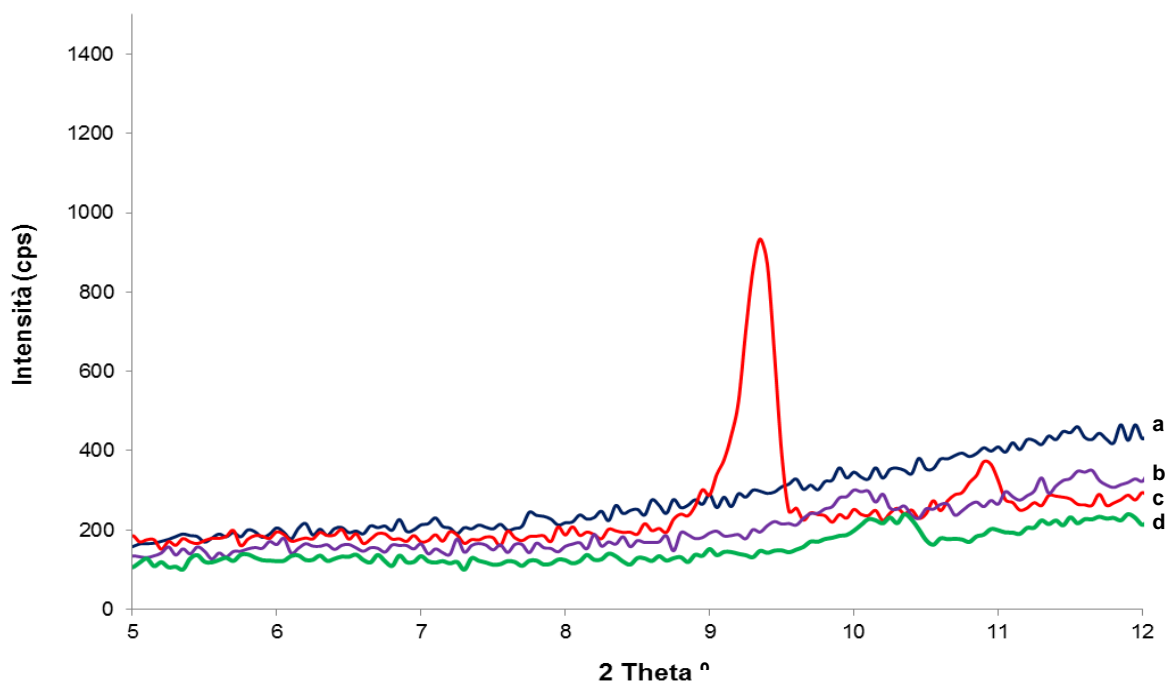


Figura 77.II Diffratogramma di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 1500 ottenute a 120°C con concentrazione di diazepam al 80% della saturazione al tempo zero (a) e conservate in camera termostata a 25 °C per 1 (c), 6 mesi (b) e 1 anno (d) .

Per quanto riguarda le dispersioni ottenute con PEG 4000 (Figura 78, 79, 80 e 81) si può sempre evidenziare una tendenza alla ricristallizzazione per entrambe le concentrazioni di farmaco e per entrambe le condizioni di stabilità considerate.

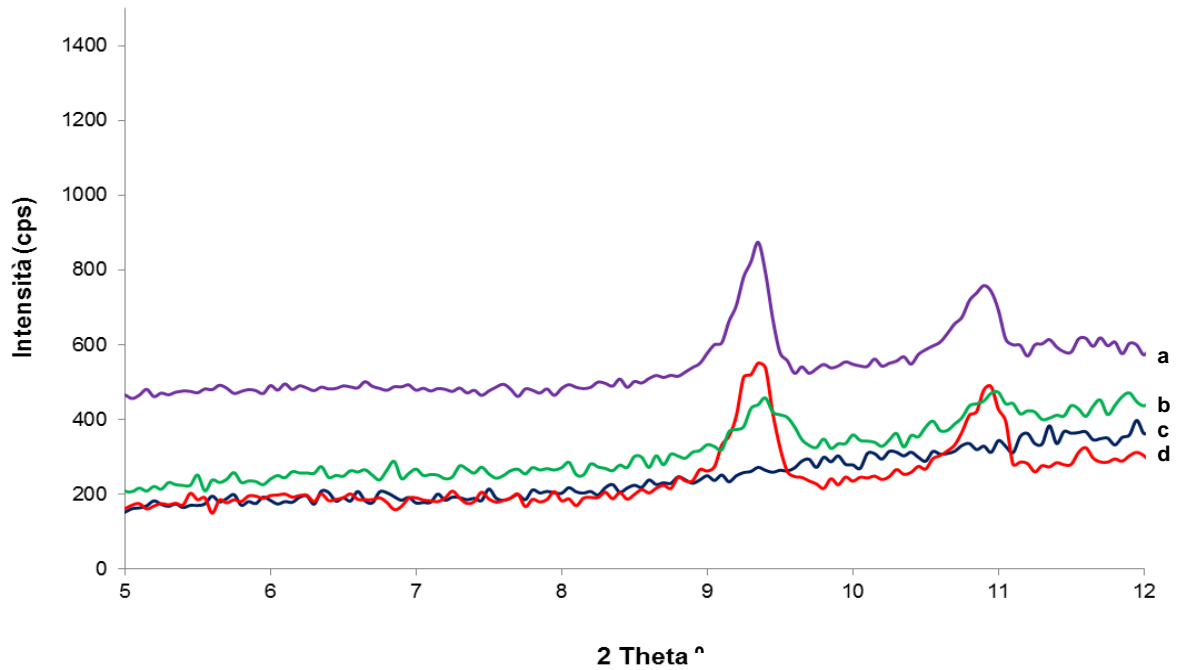


Figura 78. Diffrattoگرامma di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 4000 ottenute a 120°C con concentrazione di diazepam al 60 % della saturazione al tempo zero (**c**) e conservate in camera termostata a 25 °C per 1 (**d**), 6 mesi (**b**) e 1 anno (**a**).

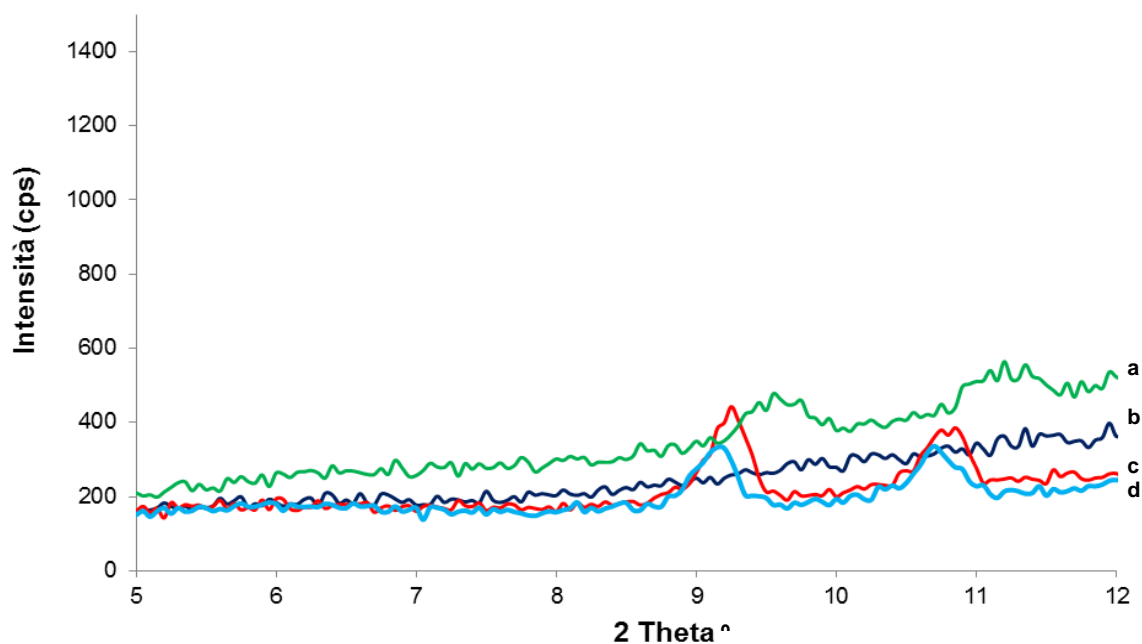


Figura 79. Diffratogramma di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 4000 ottenute a 120°C con concentrazione di diazepam al 60 % della saturazione al tempo zero (**b**) e conservate in camera termostata a 40 °C per 1 (**c**), 6 mesi (**a**) e 1 anno (**d**).

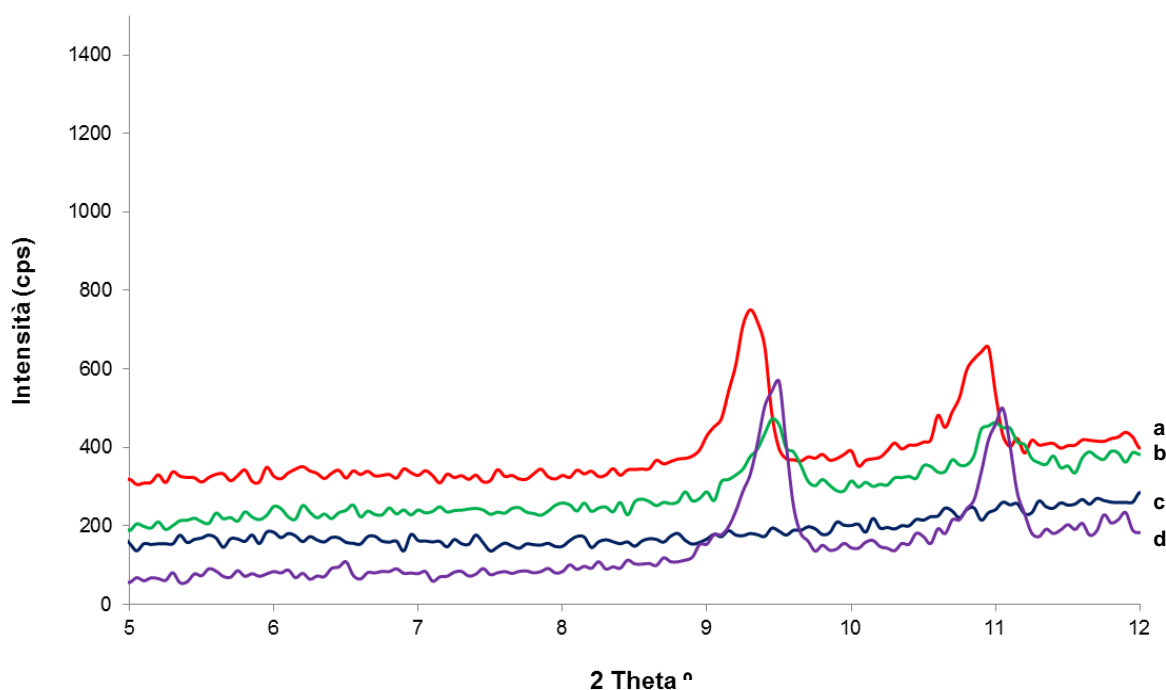


Figura 80. Diffratogramma di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 4000 ottenute a 120°C con concentrazione di diazepam al 80 % della saturazione al tempo zero (**c**) e conservate in camera termostata a 25 °C per 1 (**a**), 6 mesi (**b**) e 1 anno (**d**).

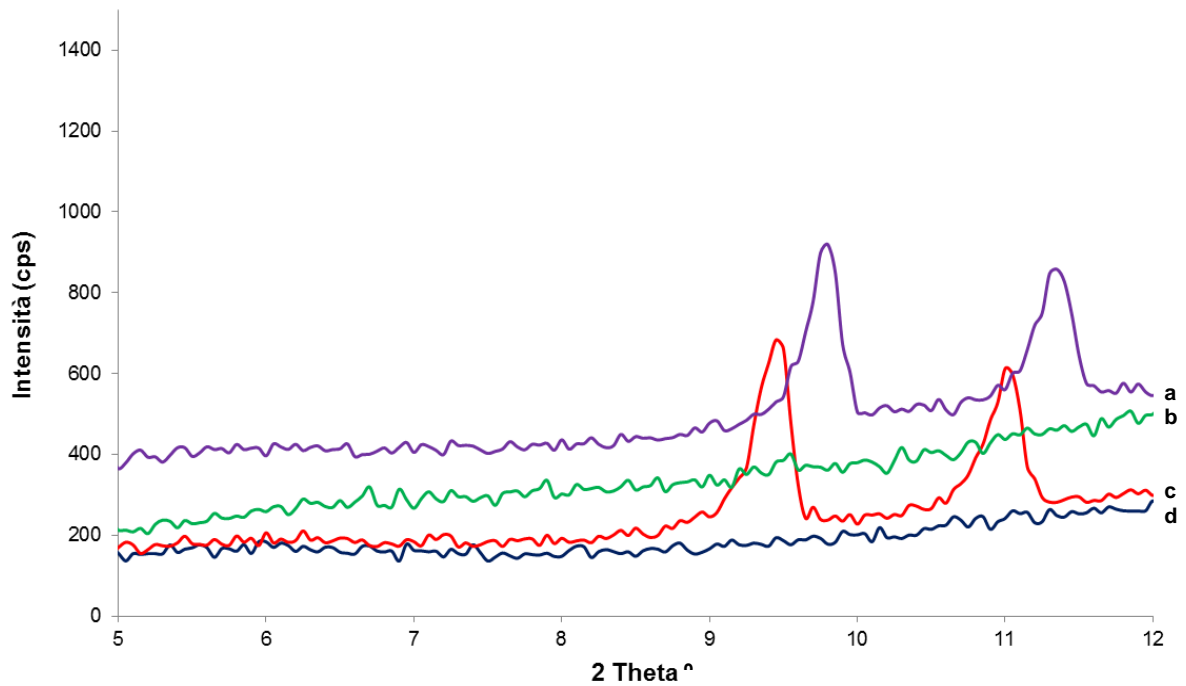


Figura 81. Diffratogramma di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 4000 ottenute a 120°C con concentrazione di diazepam al 80 % della saturazione al tempo zero (**d**) e conservate in camera termostata a 40 °C per 1 (**c**), 6 mesi (**b**) e 1 anno (**a**).

Infine anche per le dispersioni preparate con PEG 6000 (Figura 82, 83, 84 e 85) valgono le stesse considerazioni fatte nel caso delle dispersioni con PEG 4000, vale a dire, si osserva una tendenza alla ricristallizzazione evidenziata per entrambe le concentrazioni di farmaco e per le due diverse condizioni di conservazione.

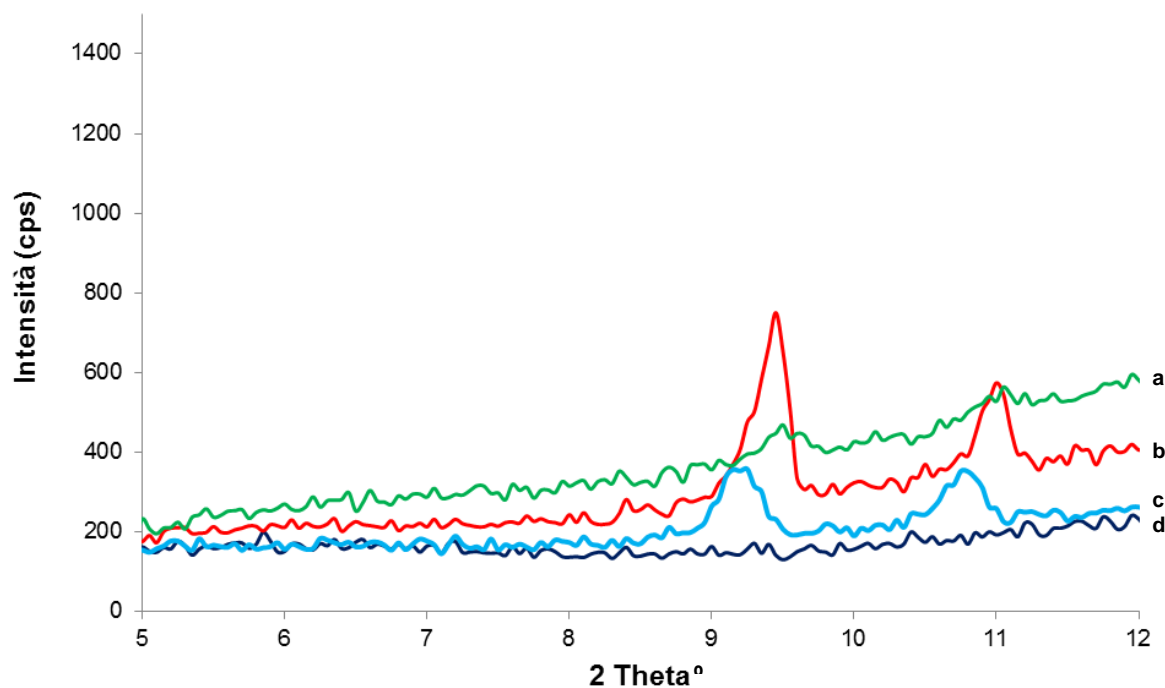


Figura 82. Diffratogramma di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 6000 ottenute a 120°C con concentrazione di diazepam al 60 % della saturazione al tempo zero **(d)** e conservate in camera termostata a 25 °C per 1 **(b)**, 6 mesi **(a)** e 1 anno **(c)**.

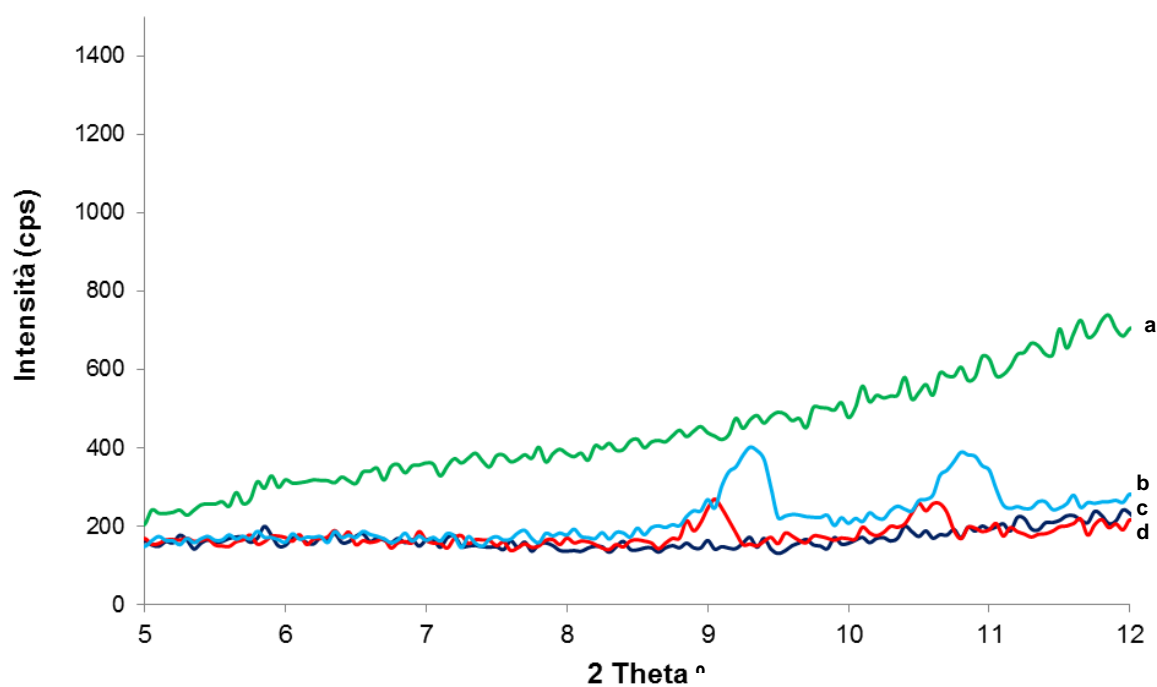


Figura 83. Diffratogramma di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 6000 ottenute a 120°C con concentrazione di diazepam al 60 % della saturazione al tempo zero **(c)** e conservate in camera termostata a 40 °C per 1 **(d)**, 6 mesi **(a)** e 1 anno **(b)**.

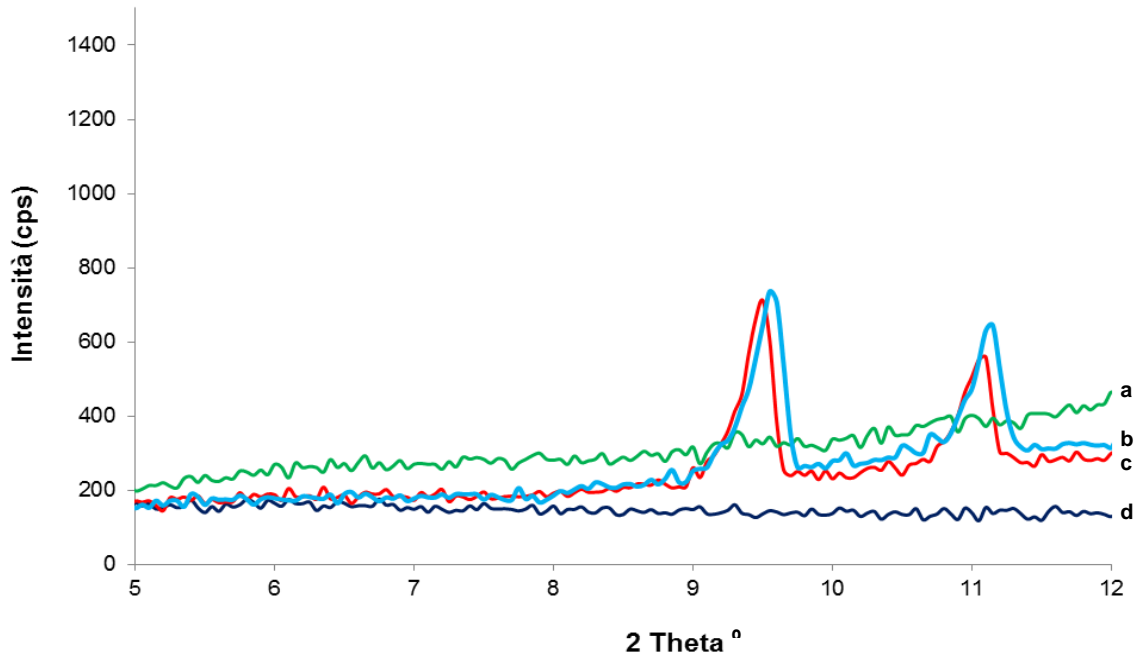


Figura 84. Diffratogramma di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 6000 ottenute a 120°C con concentrazione di diazepam al 80 % della saturazione al tempo zero (**d**) e conservate in camera termostata a 25 °C per 1 (**c**), 6 mesi (**a**) e 1 anno (**b**).

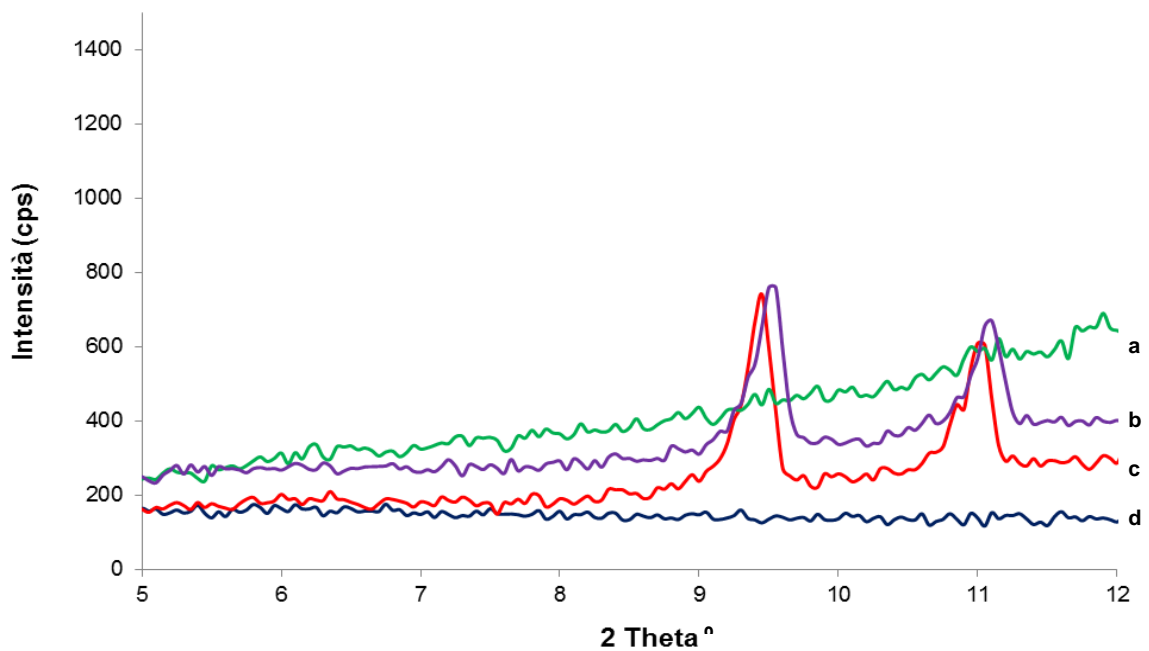


Figura 85. Diffratogramma di raggi X delle miscele binarie di diazepam e PEG 6000 ottenute a 120°C con concentrazione di diazepam al 80 % della saturazione al tempo zero (**d**) e conservate in camera termostata a 40 °C per 1 (**c**), 6 mesi (**a**) e 1 anno (**b**).

Questi dati vanno in realtà nella direzione opposta rispetto all'ipotesi che ha portato alla decisione di diminuire la concentrazione di farmaco nelle miscele, ossia diminuendone la concentrazione se ne diminuisce la ricristallizzazione. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che in queste miscele in cui il diazepam è presente ad una concentrazione inferiore a quella di saturazione parte del polimero non sia coinvolto in interazioni con il farmaco e quindi abbia una maggiore tendenza a ricristallizzare. Questa ricristallizzazione può accelerare la ricristallizzazione anche del polimero che interagisce col farmaco sottraendolo a questa interazione e portando quindi ad un aumento di ricristallizzazione anche del diazepam stesso.

Nello studio della stabilità delle dispersioni è stata valutata la possibilità di convalidare un metodo quantitativo per calcolare la % di cristallinità residua utilizzando sia la calorimetria differenziale a scansione che i raggi X. Entrambi i metodi non sono risultati però adeguati ad un'analisi quantitativa, nel primo caso per la dissoluzione dei cristalli di farmaco nel polimero fuso nel secondo caso per un evidente problema di orientamento dei cristalli stessi e di sensibilità dello strumento che non consente di ottenere una risposta precisa e lineare.

4.8 Caratterizzazione delle miscele fisiche

4.8.1 Caratterizzazione delle miscele fisiche contenenti diazepam

L'attenzione è stata quindi focalizzata solo sui polietilenglicoli a più alto peso molecolare, quindi PEG 4000 e 6000, in quanto hanno dato luogo a dispersioni con minori problemi in particolare, per quanto riguarda la maggiore stabilità alla ricristallizzazione.

E' stato anche deciso di concentrare l'attenzione solo su due concentrazioni di farmaco, in particolare il 5% e 10% in modo da garantire una completa dissoluzione del farmaco nel polimero alle temperature con le quali verranno preparate le dispersioni con la tecnica PGSS.

Le miscele fisiche di PEG 4000 e 6000 contenenti 5% e 10% p/p di diazepam sono state caratterizzate mediante calorimetria differenziale a scansione, microscopia su piastra riscaldante e diffrattometria di raggi X.

Come è stato evidenziato nel paragrafo 4.5.1 l'analisi termica mediante calorimetria differenziale a scansione non è particolarmente utile nel caso di miscele di diazepam

e PEG 4000 e 6000 al di sotto del 30 % in farmaco in quanto i tracciati DSC di queste miscele mostrano un solo fenomeno endotermico relativo alla fusione del polimero (intorno a 60-61 °C) mentre il farmaco si dissolve nella massa di polimero fuso. Questo comportamento è stato confermato per tutte le miscele fisiche prese in considerazione.

Questo viene anche confermato dalle immagini al microscopio a luce polarizzata (Figura 86) in cui si può notare una cristallinità iniziale probabilmente riconducibile al polimero che lascia posto a cristalli più piccoli di farmaco una volta ottenuta la fusione del polimero stesso, che avviene a 56 °C . Questi cristalli tendono poi a dissolversi nel PEG e tale processo di dissoluzione termina a 98 °C.

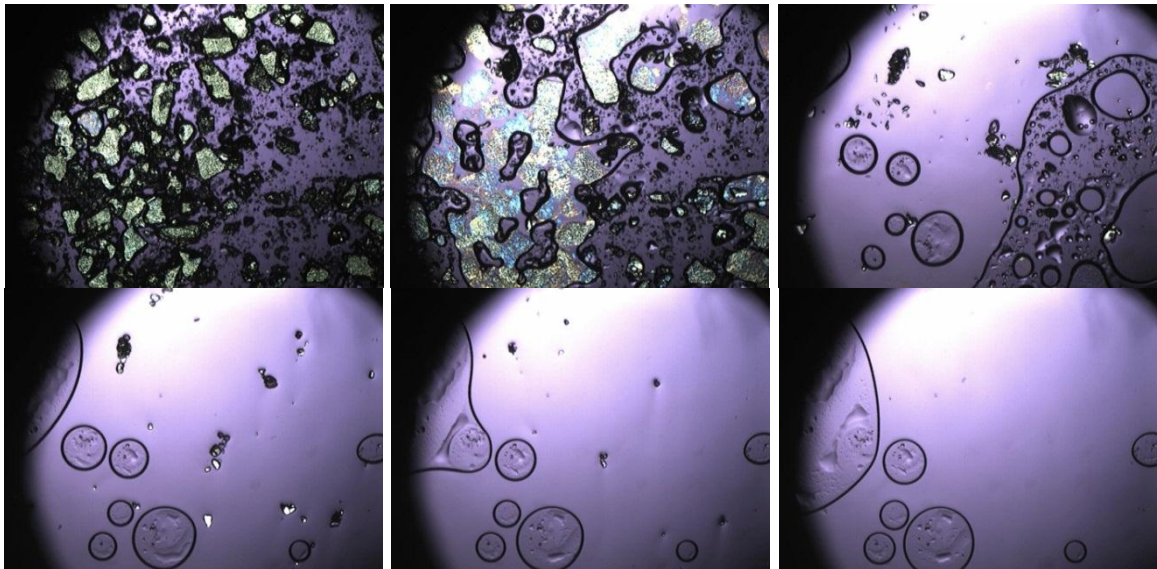


Figura 86. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della miscela fisica diazepam-PEG 4000 5% p/p sottoposta a riscaldamento da 30 °C a 110 °C.

Un comportamento analogo è possibile ritrovarlo anche nel caso della miscela fisica con PEG 4000 e una concentrazione di diazepam pari al 10% p/p (Figura 87), in questo caso la dissoluzione del farmaco nel polimero fuso termina a 113 °C. La maggiore temperatura alla quale il fenomeno di dissoluzione termina è probabilmente dovuta alla quantità maggiore di farmaco che impiega più tempo a disciogliersi nel polimero.

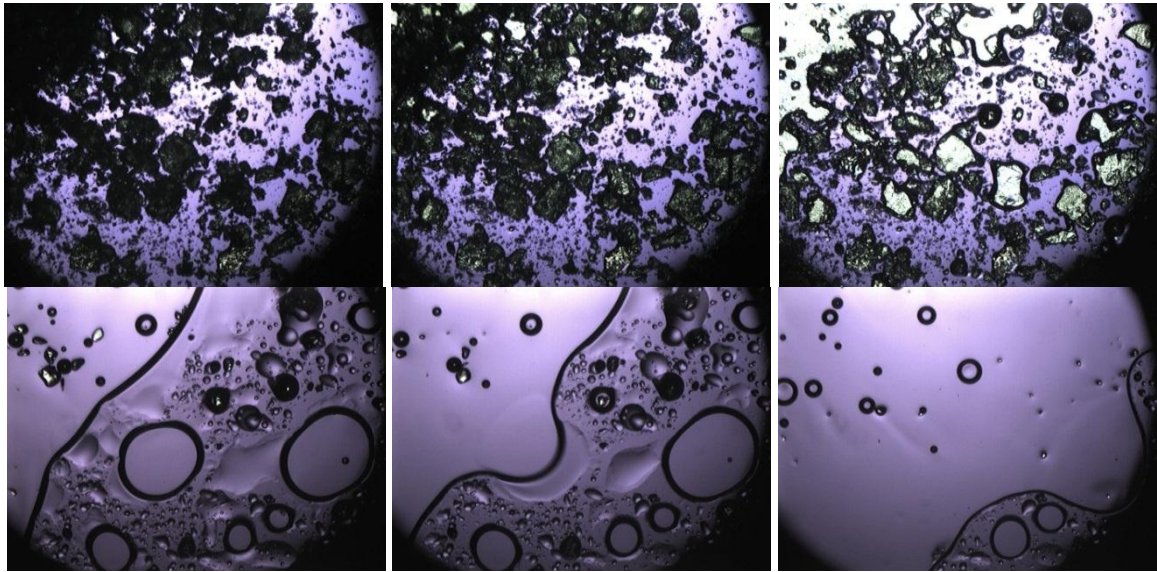


Figura 87. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della miscela fisica diazepam-PEG 4000 10% p/p.

Per quanto riguarda la diffrattometria di raggi X su polvere, anche in questo caso si è scelto di evidenziare solo il range 5-12 2θ in modo da focalizzare l'attenzione solo su picchi riferibili al diazepam e non al polimero. Come si può vedere dalla Figura 88 si possono evidenziare i picchi di cristallinità del farmaco solo nella concentrazione maggiore.

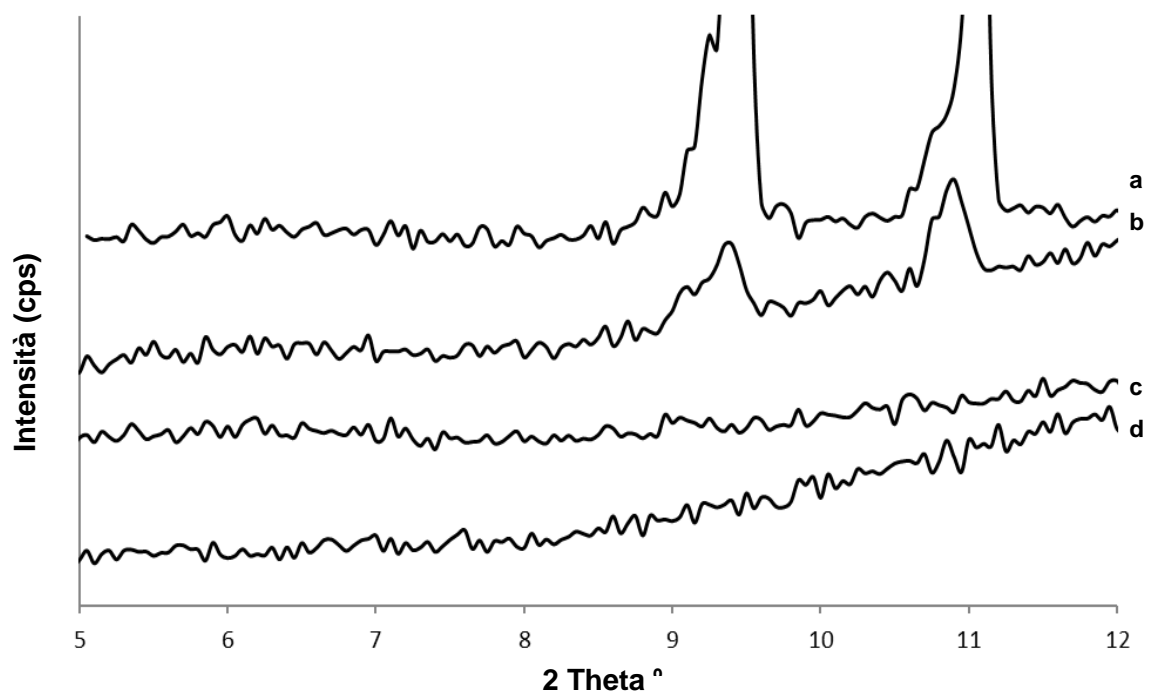


Figura 88. Diffrattogrammi di raggi X su polvere di PEG 4000 (**d**), diazepam (**a**), miscela fisica di PEG4000 con 5% (**c**) e 10% (**b**) di diazepam.

Nelle Figura 89 e 90 sono riportati gli spettri infrarossi del diazepam sia nella forma amorfa che cristallina in confronto con lo spettro del polimero e delle miscele fisiche preparate sia con farmaco amorfo che cristallino. Si può notare come gli spettri delle miscele fisiche risultino molto simili allo spettro del solo polimero con l'eccezione di alcuni picchi caratteristici riconducibili al farmaco. Ad esempio il picco con lunghezza d'onda 1680 cm^{-1} corrispondente allo stretching del carbonile del diazepam, è stato scelto per confrontare miscele fisiche e dispersioni solide e per individuare eventuali interazione tra farmaco e polimero. Da questi spettri si può evidenziare che tale picco diminuisce nelle miscele fisiche, diminuzione probabilmente dovuta alla diminuzione della quantità di diazepam esaminata. Lo shift invece di questo picco nel farmaco amorfo e nelle dispersioni solide verrà discusso in seguito.

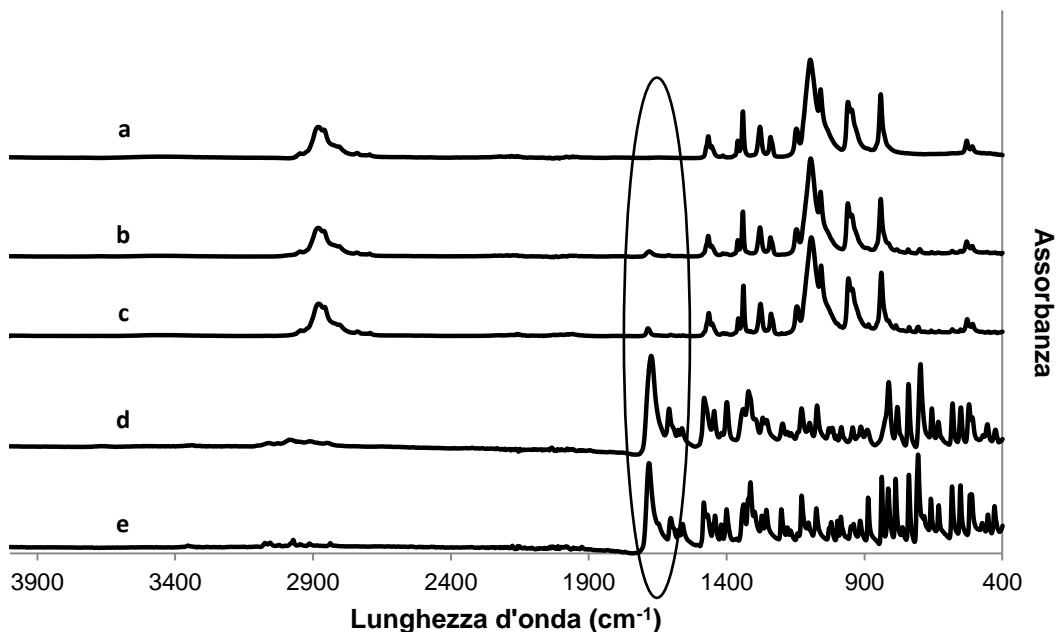


Figura 89. Spettro ATR-IR di PEG 4000 (a), 5% diazepam amorfo-PEG 4000 miscela fisica (b), 5% diazepam cristallino-PEG4000 miscela fisica (c), diazepam amorfo (d), diazepam cristallino (e).

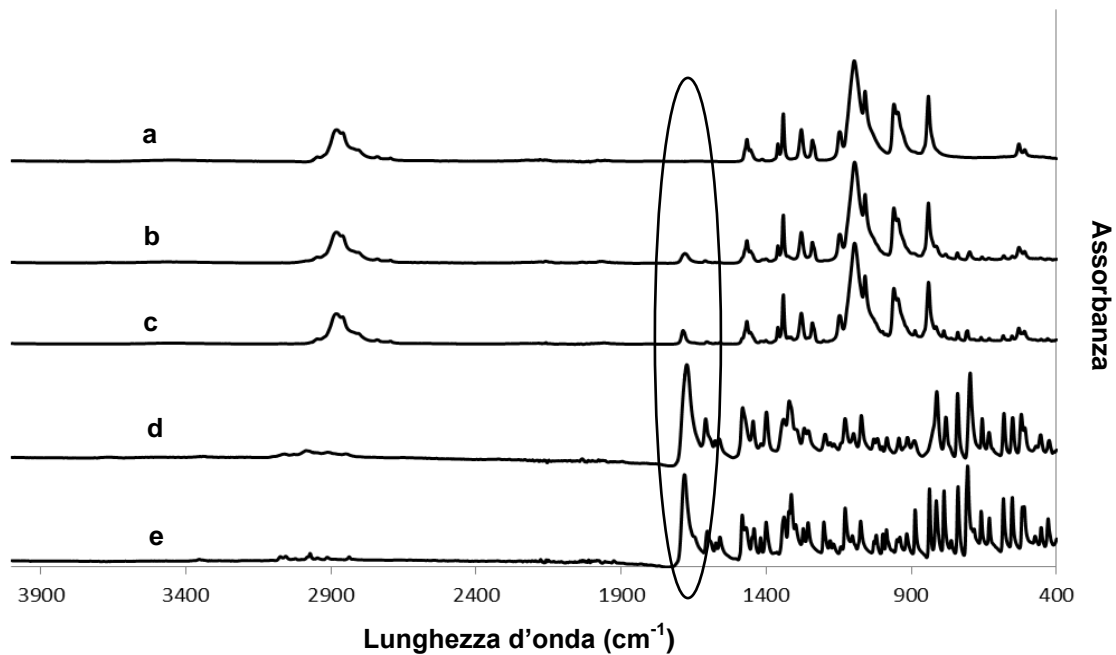


Figura 90. Spettro ATR-IR di PEG 4000 (a), 10% diazepam amorfo-PEG 4000 miscela fisica (b), 10% diazepam cristallino-PEG4000 miscela fisica (c), diazepam amorfo (d), diazepam cristallino (e).

Come detto anche nel caso delle miscele fisiche contenenti entrambe le concentrazioni di diazepam e il PEG 6000 i tracciati DSC evidenziano solo la fusione del polimero intorno a 61 °C. Le immagini al microscopio polarizzato (Figura 91 e 92) mostrano anche in questo caso la presenza di cristalli di farmaco che si disciolgono nella massa di polimero fuso. La fusione del polimero inizia intorno ai 56 °C mentre la dissoluzione del diazepam nel polimero termina a 85 °C e 126 °C rispettivamente per 5% e 10% p/p di diazepam.

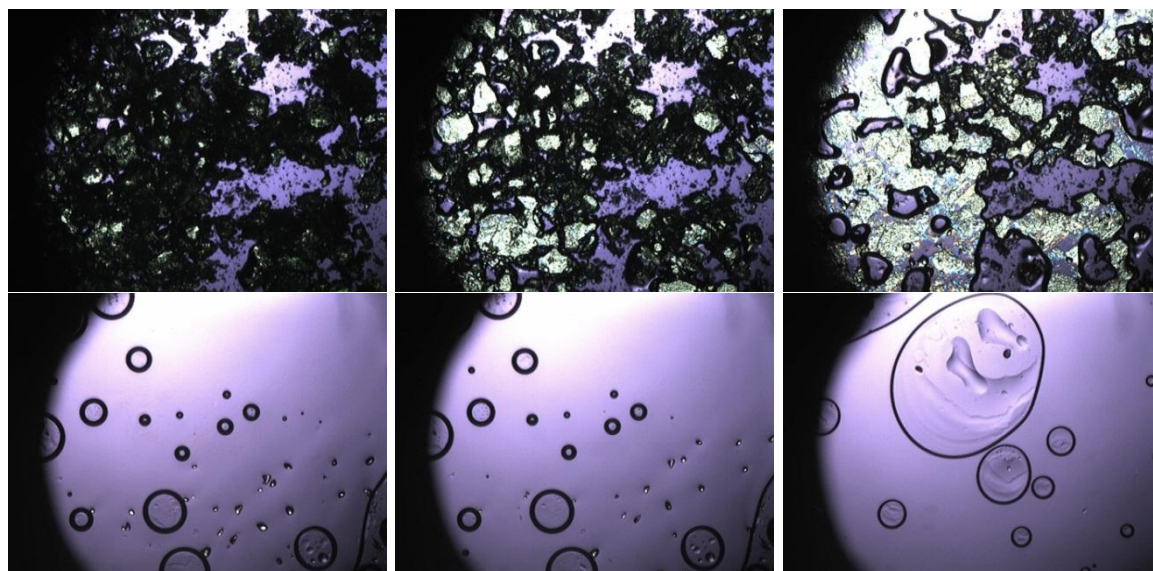


Figura 91. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della miscela fisica diazepam-PEG 6000 5% p/p riscaldata da 30 °C a 100 °C.

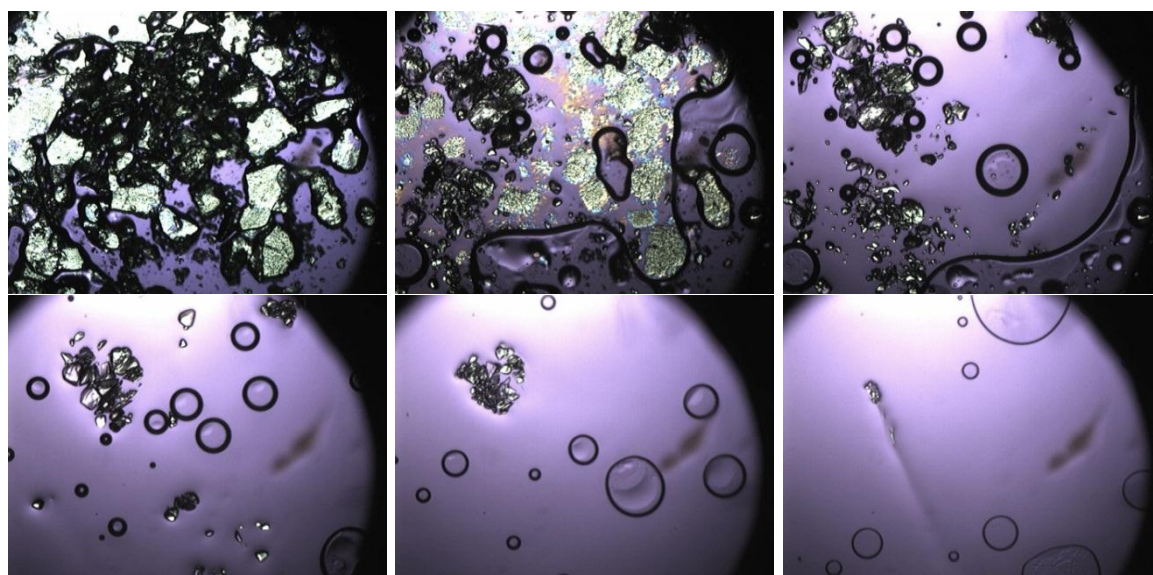


Figura 92. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della miscela fisica diazepam-PEG 6000 10% p/p riscaldata da 30 °C a 140 °C.

Anche in questo caso le immagini del microscopio confermano i dati di calorimetria differenziale a scansione e di solubilità indicando una netta dissoluzione del farmaco nel polimero indicando come in questo caso la curva ottenuta dai dati di DSC, ma anche di solubilità, non sia una curva di transizione solido-liquido di natura termodinamica ma sia di fondamentale importanza anche l'aspetto cinetico. In questo caso infatti non si può evidenziare la fusione del farmaco in quanto la sua dissoluzione nel farmaco è più veloce.

Gli spettri di diffrazione di raggi X mostrano picchi riconducibili al diazepam per entrambe le concentrazioni (Figura 93), la cui intensità non sembra però essere correlata in maniera precisa con la concentrazione di farmaco.

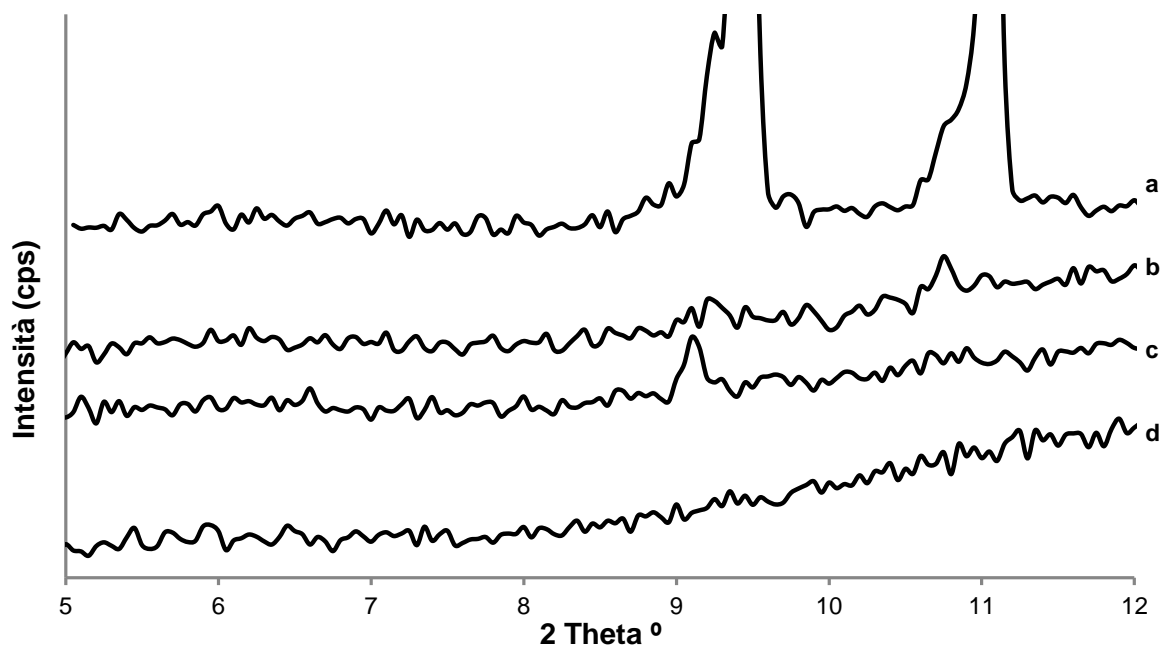


Figura 93. Diffratogrammi di raggi X su polvere di PEG 6000 (**d**), diazepam (**a**), miscela fisica di PEG6000 con 5% (**c**) e 10% (**b**) di diazepam.

Come per le miscele fisiche preparate con PEG 4000 anche le miscele preparate con PEG 6000 sono state analizzate con spettroscopia ad infrarossi (Figura 94 e 95). Ed anche in questo caso il diazepam sia amorfo che cristallino è stato confrontato con il polimero tal quale e con le miscele fisiche contenenti il farmaco in entrambe le forme. Come detto nel caso delle miscele con PEG 4000 anche in questo caso lo spettro delle miscele fisiche corrisponde allo spettro del polimero con l'eccezione di alcuni picchi chiaramente riconducibili al farmaco. Il picco preso in considerazione è sempre quello corrispondente allo stretching del carbonile del diazepam a 1680 cm^{-1} in quanto non è presente a queste lunghezze d'onda alcun picco riconducibile al polimero. Si può mettere in evidenza anche in questo caso una diminuzione della sua intensità nelle miscele fisiche legata alla sua diminuzione in quantità. L'eventuale presenza di shift verrà invece discussa in seguito.

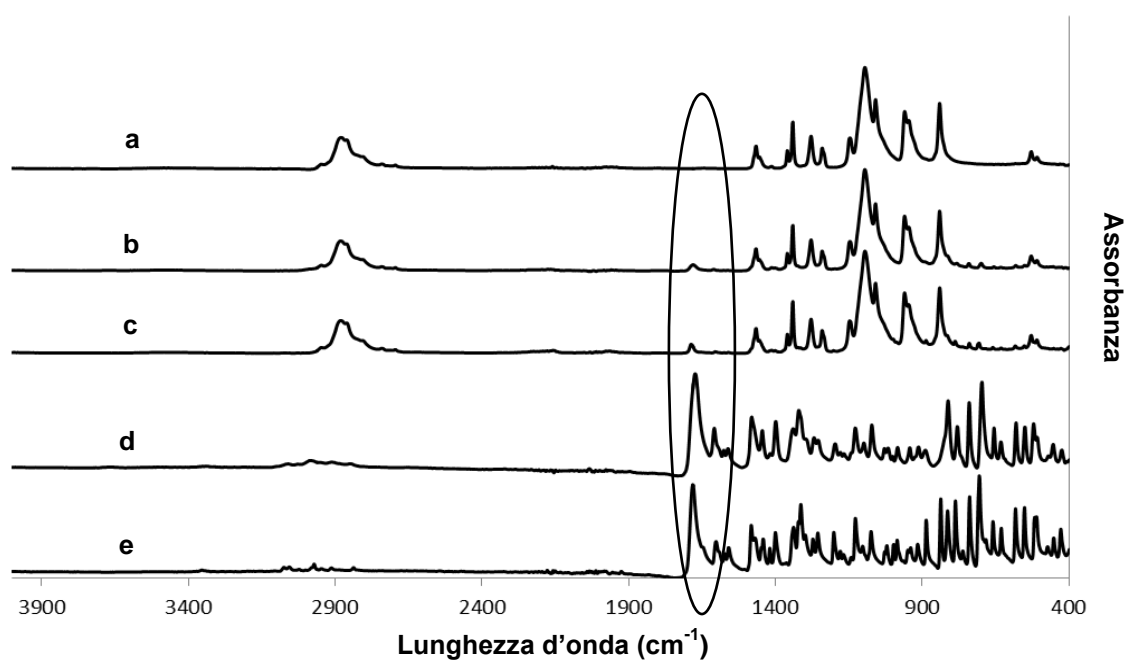


Figura 94. Spettro ATR-IR di PEG 6000 (a), 5% diazepam amorfo-PEG 6000 miscela fisica (b), 5% diazepam cristallino-PEG6000 miscela fisica (c), diazepam amorfo (d), diazepam cristallino (e).

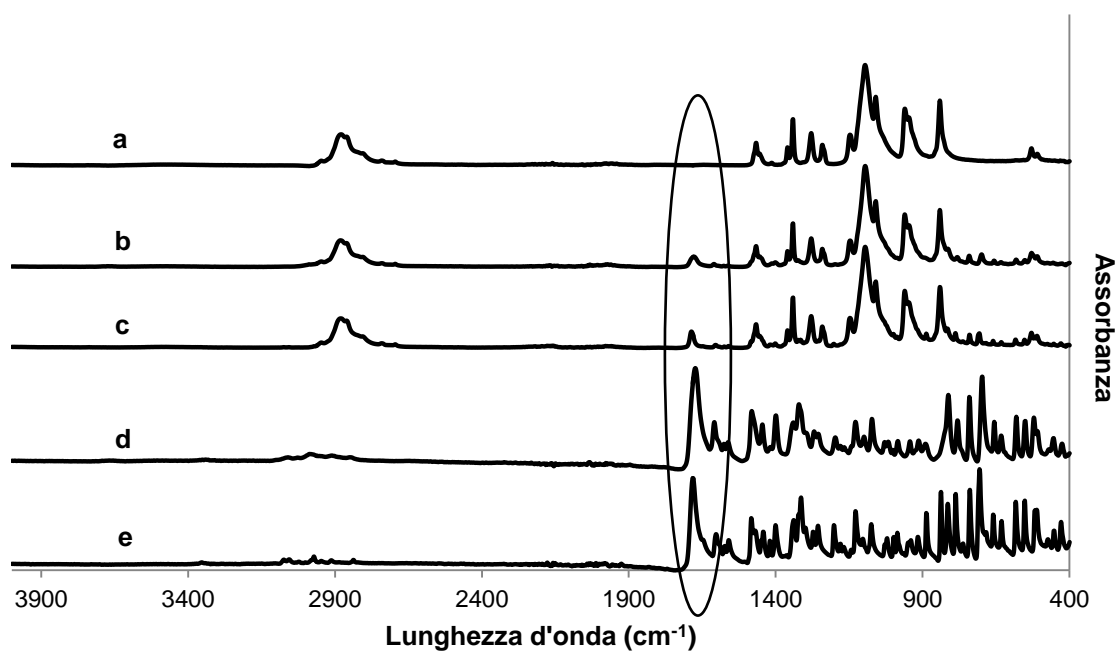


Figura 95. Spettro ATR-IR di PEG 6000 (a), 10% diazepam amorfo-PEG 6000 miscela fisica (b), 10% diazepam cristallino-PEG6000 miscela fisica (c), diazepam amorfo (d), diazepam cristallino (e).

4.8.2 Caratterizzazione delle miscele fisiche contenenti lorazepam

Si è scelto di mantenere la stessa composizione anche nel caso del lorazepam pur non avendo effettuato studi preliminari su dispersioni preparate con il metodo della fusione in quanto questo farmaco presenta i suddetti problemi di stabilità termica.

Passando alla caratterizzazione delle miscele fisiche contenenti lorazepam con concentrazione di 5% e 10% p/p e PEG 4000 l'analisi termica con calorimetria differenziale a scansione ha messo in evidenza il solo picco di fusione del polimero intorno a 60 °C mentre, come nel caso del diazepam, il picco di fusione del farmaco non è presente.

Con il microscopio a luce polarizzata si può notare una chiara birifrangenza seguita dalla fusione intorno a 57 °C, questo sta ad indicare la natura cristallina del polimero. Per entrambe le concentrazioni si può anche evidenziare la susseguente dissoluzione del farmaco nel polimero fuso (Figura 96 e 97).

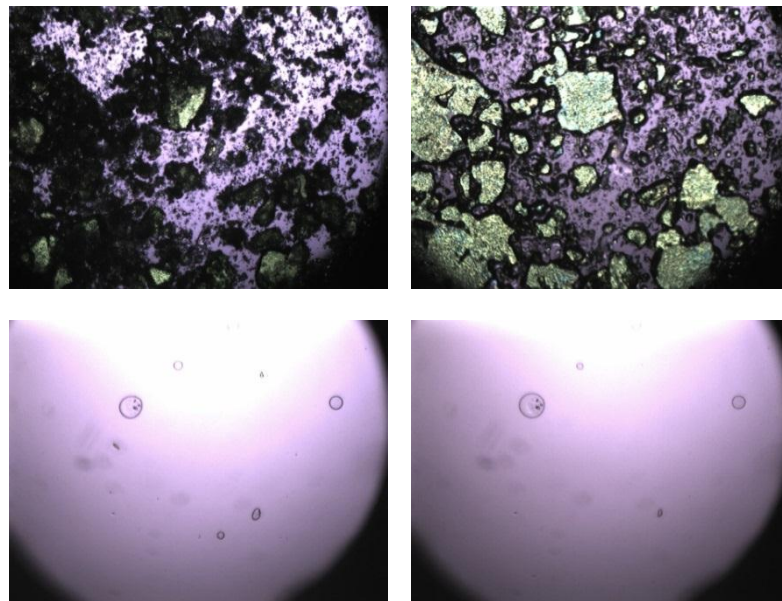


Figura 96. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della miscela fisica lorazepam-PEG 4000 5% p/p riscaldata da 30 °C a 100 °C.

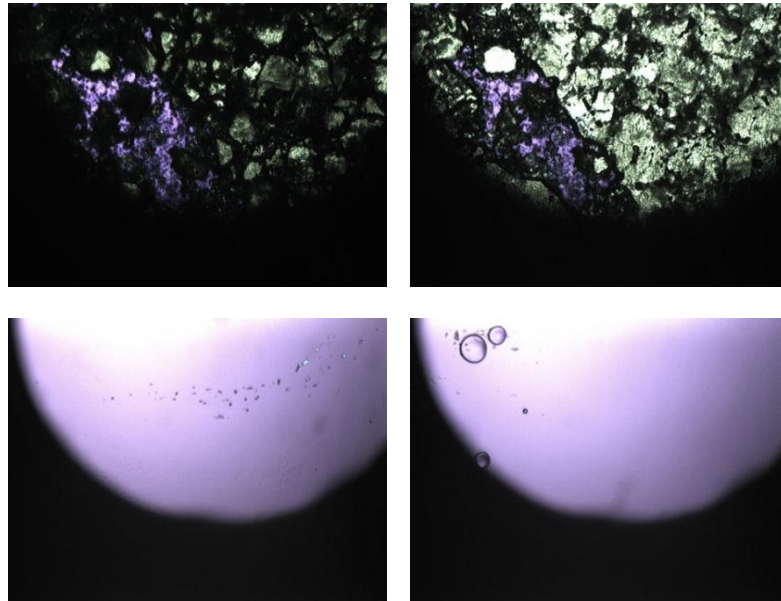


Figura 97. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della miscela fisica lorazepam-PEG 4000 10% p/p riscaldata da 30 °C a 140 °C.

Per quanto riguarda la diffrattometria di raggi X su polvere anche per il lorazepam (Figura 98) si è scelto di focalizzare l'attenzione sul range 5-12 2Theta in modo da avere un picco esclusivamente riconducibile al lorazepam. Entrambe le concentrazioni mostrano il picco indicativo della cristallinità del farmaco.

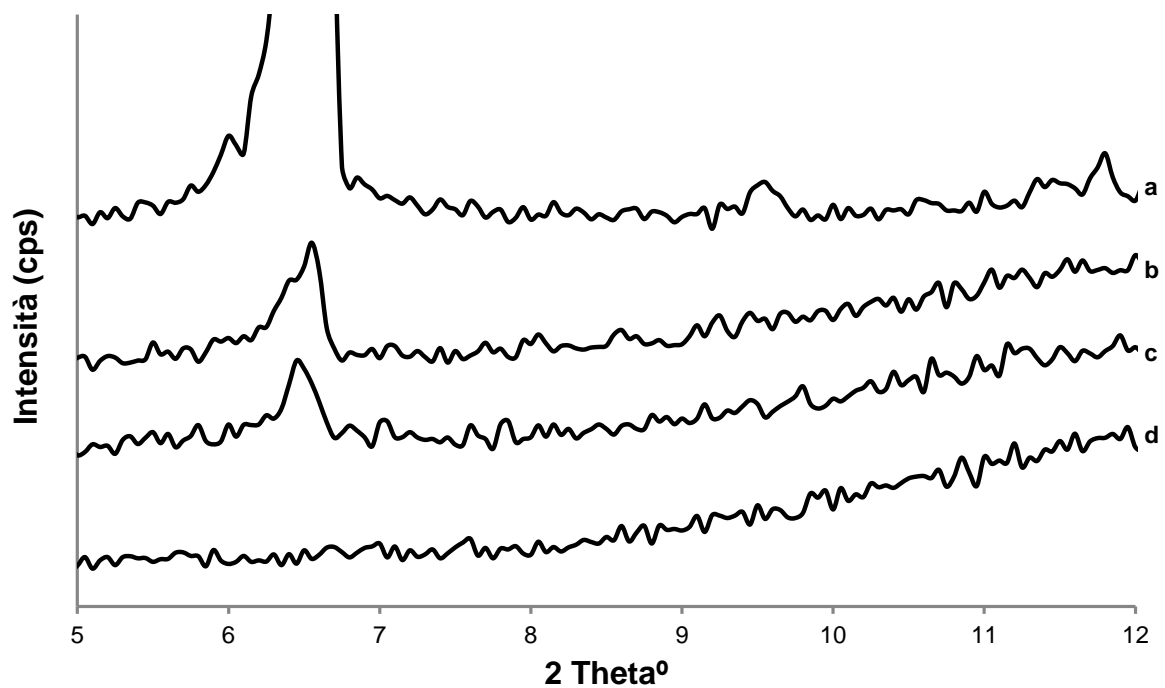


Figura 98. Diffratogrammi di raggi X su polvere di PEG 4000 (d), lorazepam (a), miscela fisica di PEG4000 con 5% (c) e 10% (b) di lorazepam.

In Figura 99 sono confrontati gli spettri IR del lorazepam con quelli del polimero e delle miscele fisiche con entrambe le concentrazioni di farmaco. Come detto per il diazepam lo spettro delle miscele fisiche differisce dallo spettro del polimero solo per la presenza di alcuni picchi riconducibili al farmaco e anche in questo caso sono stati selezionati i picchi nella regione $1750-1650\text{ cm}^{-1}$ per confrontare le miscele fisiche e le dispersioni solide per individuare eventuali shift e quindi interazioni tra lorazepam e polimero. Sono stati scelti questi picchi in quanto non sono presenti nello spettro del polimero e quindi sono chiaramente riconducibili al farmaco. L'intensità di questi picchi diminuisce al diminuire della quantità di farmaco in miscela.

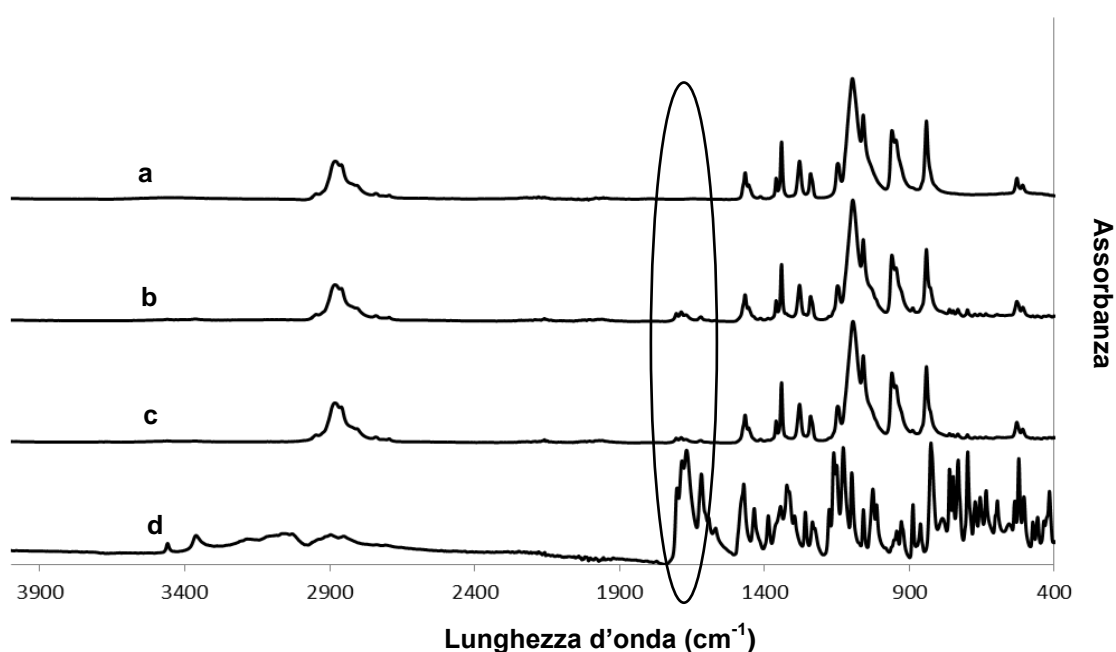


Figura 99. Spettro ATR-IR di PEG 4000 (a), 10% lorazepam-PEG 4000 miscela fisica (b), 5% lorazepam-PEG 4000 miscela fisica (c), lorazepam cristallino (d).

Come per il PEG 4000, e le stesse miscele fisiche preparate con diazepam, dall'analisi termica delle miscele fisiche contenenti PEG 6000 e le due concentrazioni di lorazepam (5% e 10% p/p) si evidenzia solo il picco di fusione del polimero intorno ai $61\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Allo stesso modo la microscopia su piastra riscaldante (Figura 100 e 101) mostra la natura cristallina del polimero e la sua fusione a $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ seguita dalla dissoluzione del farmaco in esso

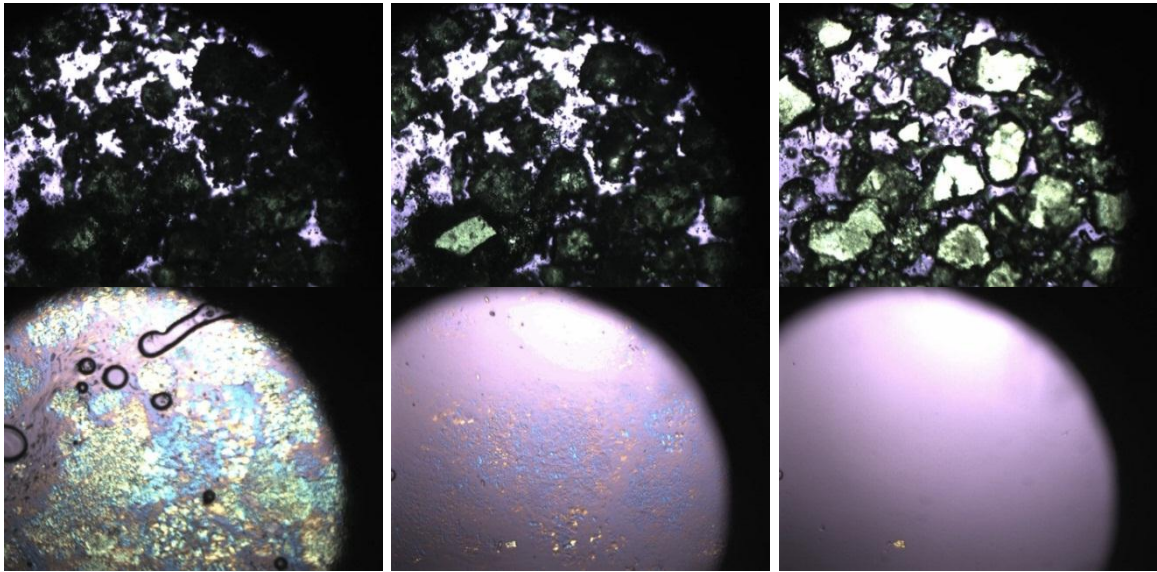


Figura 100. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della miscela fisica lorazepam-PEG 6000 5% p/p riscaldata da 30 °C a 100 °C.

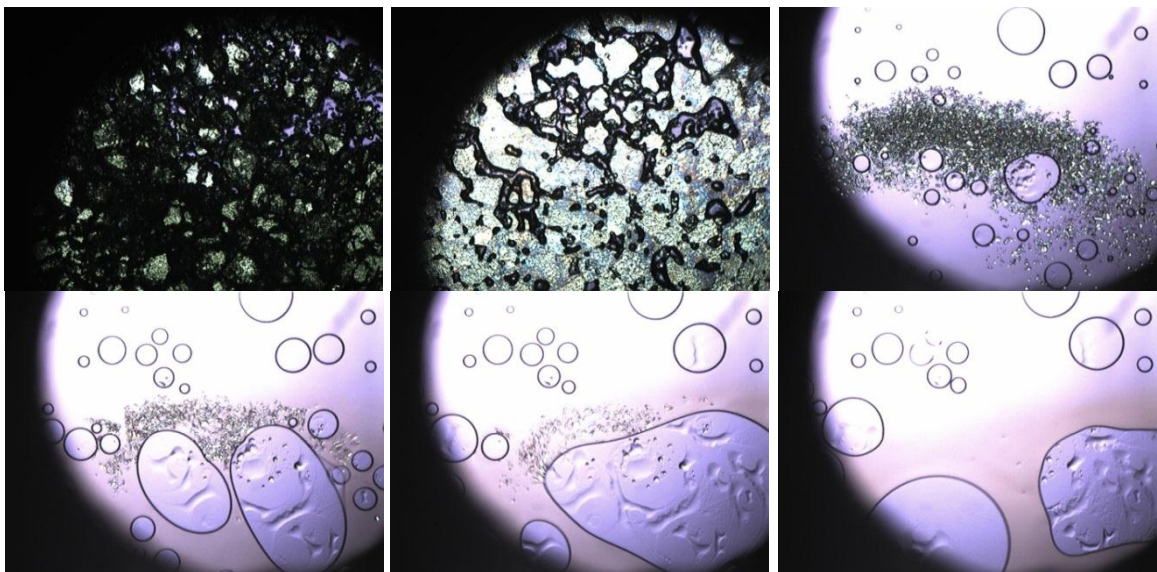


Figura 101. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della miscela fisica lorazepam-PEG 6000 10% p/p riscaldata da 30 °C a 160 °C.

La diffrazione di raggi X su polvere mostra la natura cristallina del lorazepam nelle miscele fisiche con entrambe le concentrazioni di farmaco (Figura 102).

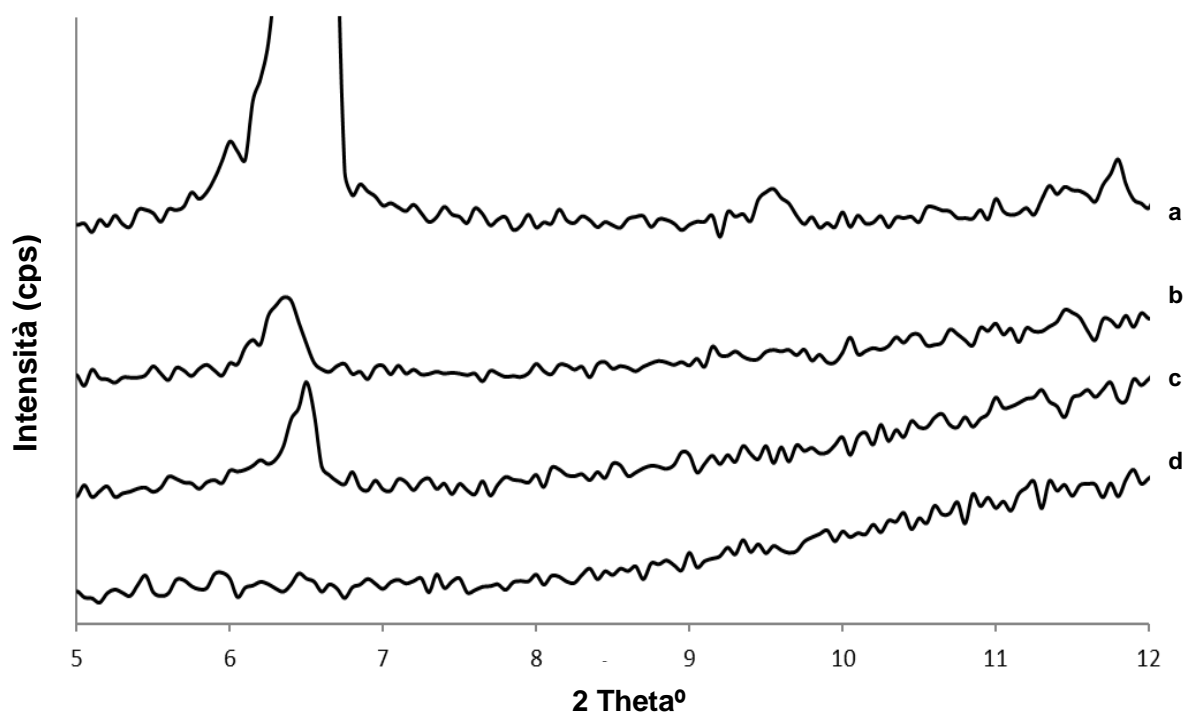


Figura 102. Diffrattogrammi di raggi X su polvere di PEG 6000 (**d**), lorazepam (**a**), miscela fisica di PEG6000 con 5% (**c**) e 10% (**b**) di lorazepam.

Anche per quanto riguarda il PEG 6000 gli spettri IR del lorazepam sono confrontati (Figura 103) con quelli del polimero e delle due miscele fisiche ad entrambe le concentrazioni. Come per tutte le miscele precedentemente analizzate lo spettro IR della miscela fisica è costituito dallo spettro del polimero con l'aggiunta di alcuni picchi sicuramente riconducibili al farmaco. Si focalizza anche in questo caso l'attenzione sul picco corrispondente allo stretching del carbonile del lorazepam (regione $1750-1650\text{ cm}^{-1}$). Si può evidenziare la diminuzione della sua intensità al diminuire della concentrazione di farmaco mentre l'eventuale shift di questo picco verrà discusso successivamente.

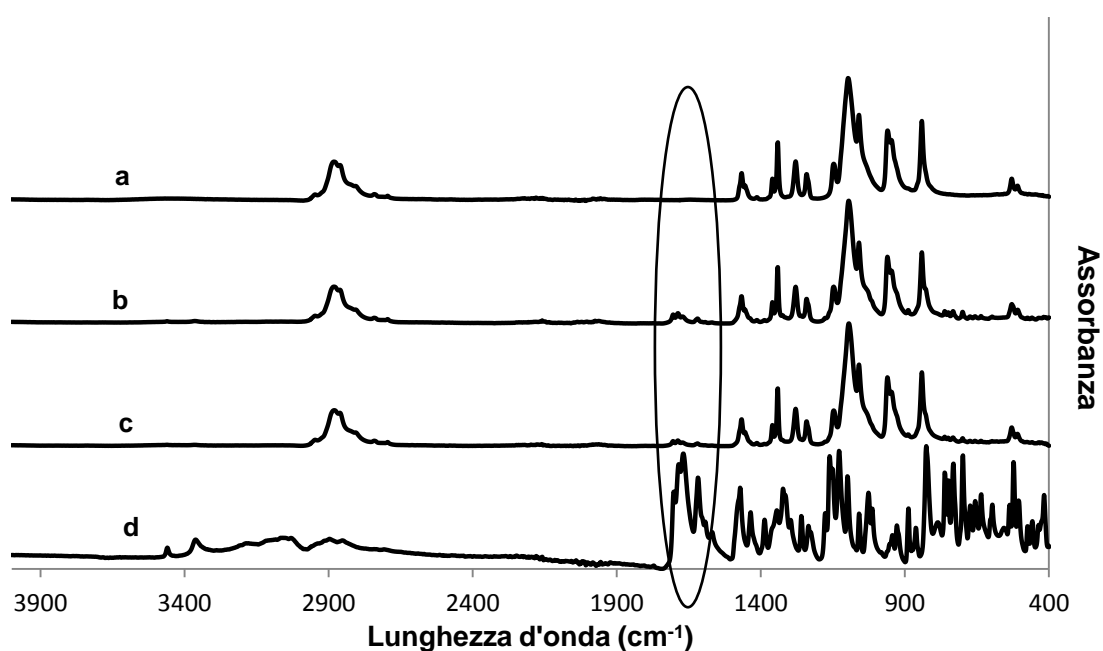


Figura 103. Spettro ATR-IR di PEG 6000 (a), 10% lorazepam-PEG 6000 miscela fisica (b), 5% lorazepam-PEG 6000 miscela fisica (c), lorazepam cristallina (d).

4.9 Caratterizzazione delle dispersioni solide preparate con la tecnica PGSS

4.9.1 Caratterizzazione delle dispersioni contenenti diazepam

4.9.1.1 Determinazione del contenuto in principio attivo

In tabella 12 sono mostrati i titoli delle dispersioni solide preparate ad un contenuto teorico di 5% o 10% p/p di diazepam con PEG 4000 o 6000. La temperatura era in tutti i casi 55 °C mentre sono state utilizzate due diverse pressioni, 100 e 200 bar.

Tabella 12. Titoli delle dispersioni solide ottenute con la tecnica PGSS, deviazione standard in parentesi, n=3.

Dispersione	Titolo %
DZPEG4000 5% 55 °C 100 bar	5,55 (0,09)
DZPEG4000 5% 55 °C 200 bar	5,79 (0,05)
DZPEG4000 10% 55 °C 100 bar	10,65 (0,05)
DZPEG4000 10% 55 °C 200 bar	11,01 (0,17)
DZPEG6000 5% 55 °C 100 bar	5,78 (0,07)
DZPEG6000 5% 55 °C 200 bar	5,38 (0,13)
DZPEG6000 10% 55 °C 100 bar	10,14 (0,45)
DZPEG6000 10% 55 °C 200 bar	10,65 (0,118)

Come si può notare tutti i titoli sono risultati leggermente superiori al valore teorico indicando come non ci sia stata perdita di farmaco durante la precipitazione delle particelle.

4.9.1.2 Caratterizzazione dello stato solido delle dispersioni

Anche le dispersioni solide ottenute con la tecnica PGSS sono state caratterizzate mediante calorimetria a scansione differenziale, microscopia su piastra riscaldante e diffrazione di raggi X.

Anche per quanto riguarda le dispersioni solide preparate con la tecnica PGSS la calorimetria differenziale a scansione mette in evidenza un solo fenomeno endotermico intorno ai 59-60 °C riconducibile alla fusione del polimero.

Nel caso delle dispersioni solide di diazepam al 5% p/p con PEG 4000 preparate sia a 100 che 200 bar la microscopia su piastra riscaldante (Figura 104 e 105) non mostra la presenza di farmaco cristallino ma esclusivamente la fusione del polimero.

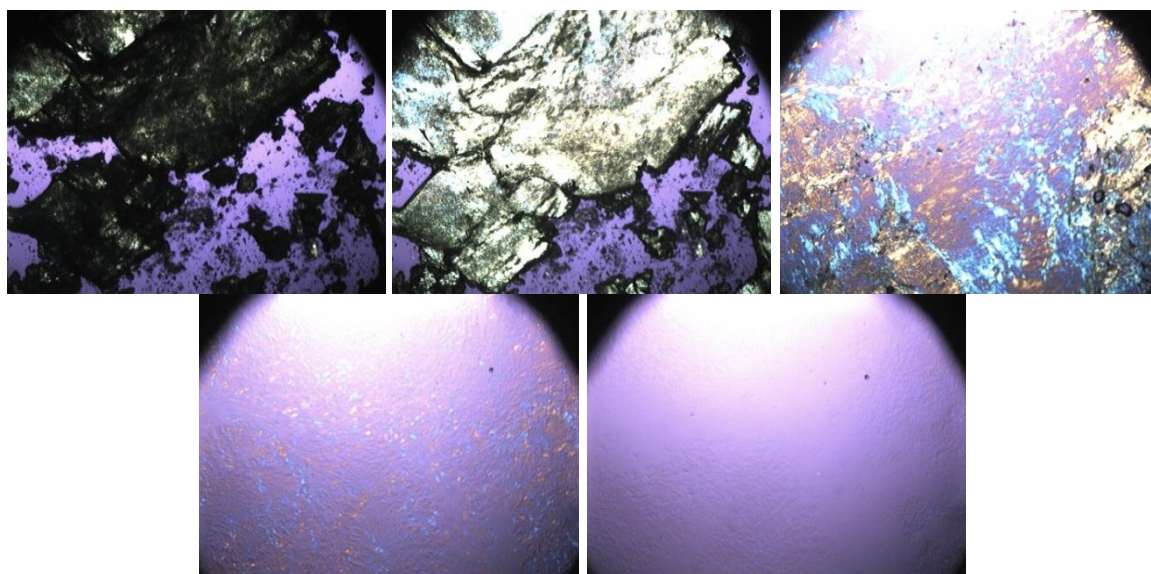


Figura 104. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della dispersione solida diazepam-PEG 4000 5% p/p ottenuta a 55 °C 100 bar e riscaldata da 30 °C a 70 °C.

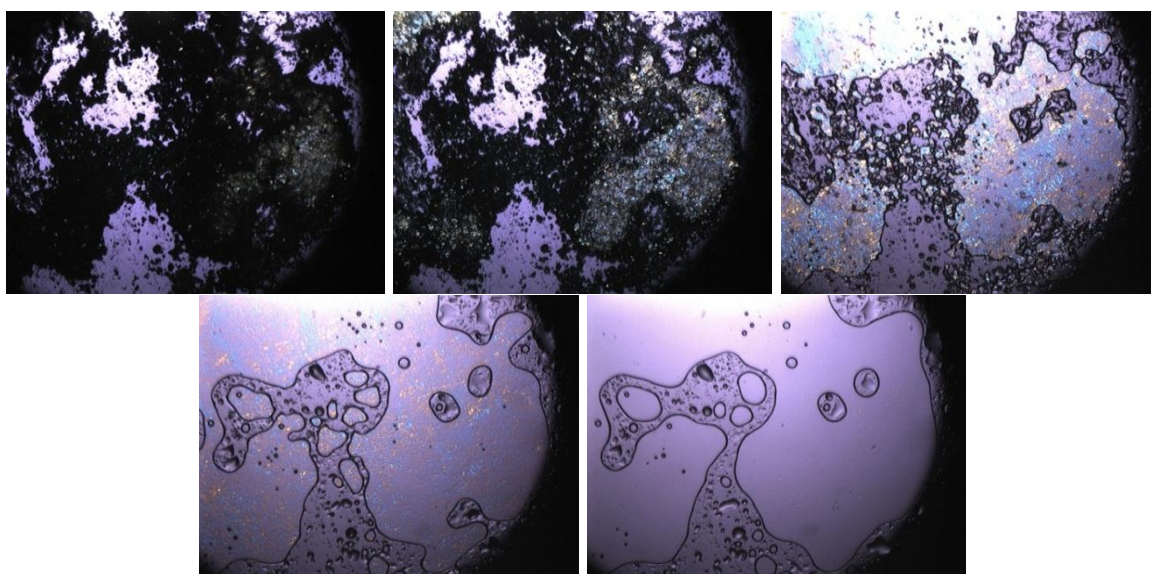


Figura 105. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della dispersione solida diazepam-PEG 4000 5% p/p ottenuta a 55 °C 200 bar e riscaldata da 30 °C a 70 °C.

I risultati di microscopia su piastra riscaldante sono confermati dalla diffrazione di raggi X (Figura 106 e 107) che non mostra picchi di ricristallizzazione del farmaco neppure dopo 4 mesi dalla preparazione e conservazione a 4 °C.

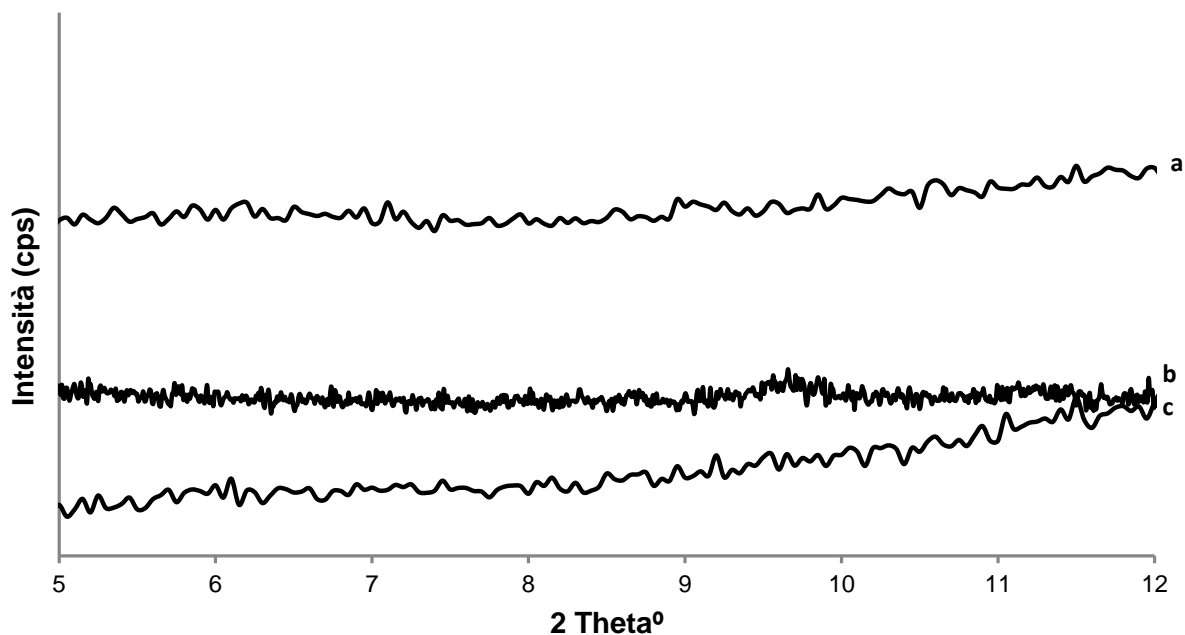


Figura 106. Diffratogrammi di raggi X su polvere della miscela fisica di PEG4000 con 5% di diazepam (a), diazepam-PEG4000 5% 55 °C 100 bar al tempo zero (c) e dopo 4 mesi a 4 °C(b).

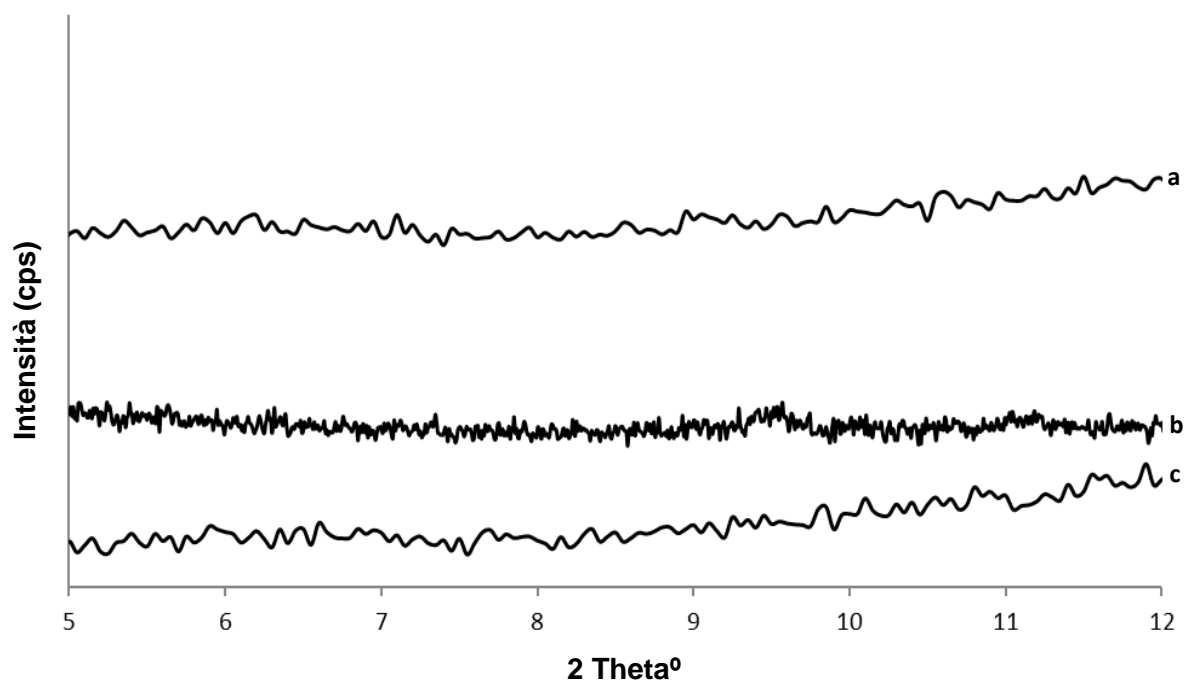


Figura 107. Diffratogrammi di raggi X su polvere della miscela fisica di PEG4000 con 5% di diazepam (a), DZPEG4000 5% 55 °C 200 bar al tempo zero (c) e dopo 4 mesi a 4 °C(b).

La spettroscopia ad infrarossi (Figura 108) mostra uno shift del picco di stretching del carbonile del diazepam sia per quanto riguarda il farmaco amorfo rispetto al farmaco cristallino, che le dispersioni solide preparate con PGSS e il tradizionale metodo della fusione rispetto alle miscele fisiche.

In particolare, tale picco si sposta verso numeri d'onda inferiori nel diazepam amorfo rispetto al diazepam cristallino, passa infatti da 1678 cm^{-1} nel diazepam cristallino a 1672 cm^{-1} nel diazepam amorfo. Lo stesso shift è possibile evidenziarlo nelle miscele fisiche con farmaco amorfo e cristallino. Per quanto riguarda le dispersioni solide preparate con entrambi i metodi si può notare uno shift verso numeri d'onda maggiori, di $2,8\text{ cm}^{-1}$ nel caso delle dispersioni preparate con la tecnica PGSS e di $1,9\text{ cm}^{-1}$ in quelle preparate con il metodo della fusione.

Questo sembrerebbe indicare la presenza di un'interazione tra farmaco e polimero sia nel caso delle dispersioni preparate con la tecnica della fusione, com'era già stato precedentemente descritto nel paragrafo 4.6, ma anche nel caso delle dispersioni preparate con la tecnica PGSS.

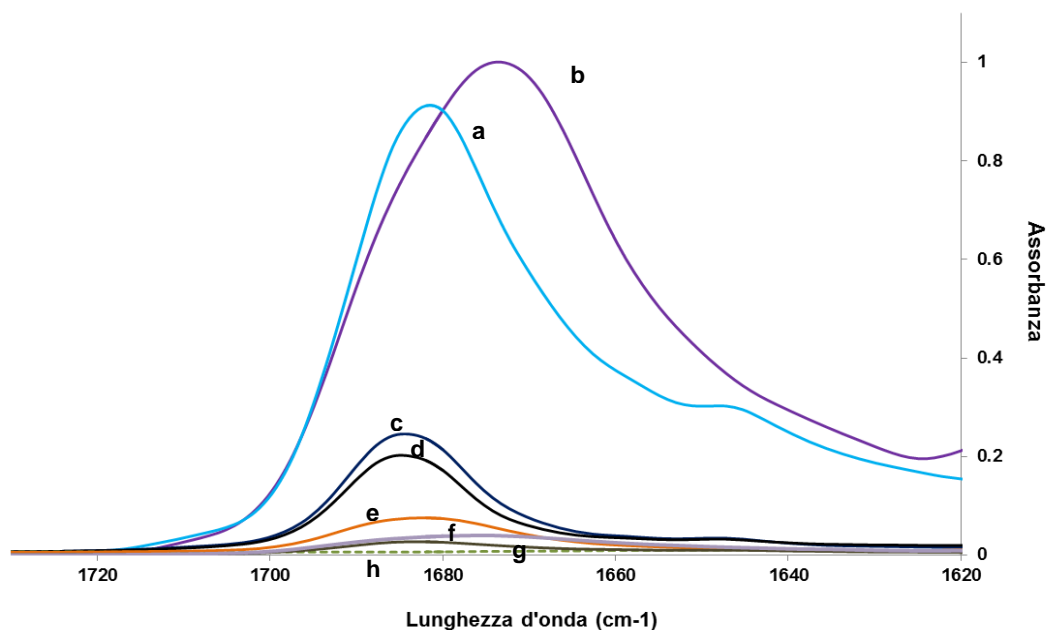


Figura 108. Spettro ATR-IR di PEG 4000 (**h**), 5% diazepam amorfo-PEG 4000 miscela fisica (**f**), 5% diazepam cristallino-PEG4000 miscela fisica (**g**), diazepam amorfo (**b**), diazepam cristallino (**a**), diazepam-PEG4000 5% 55 °C 100 bar (**c**) e 200 bar (**d**) preparate con PGSS, diazepam-PEG4000 5% preparata con metodo della fusione (**e**).

Nel caso delle dispersioni solide contenenti il 10 % p/p di diazepam e PEG 4000 preparati con la PGSS ad entrambe le pressioni, le immagini al microscopio a luce polarizzata (Figura 109 e 110), ottenute dopo 4 mesi dalla preparazione del

campione, evidenziano la presenza di piccoli cristalli di farmaco che si dissolvono nel polimero fuso, e la cui dissoluzione termina a 85 °C.

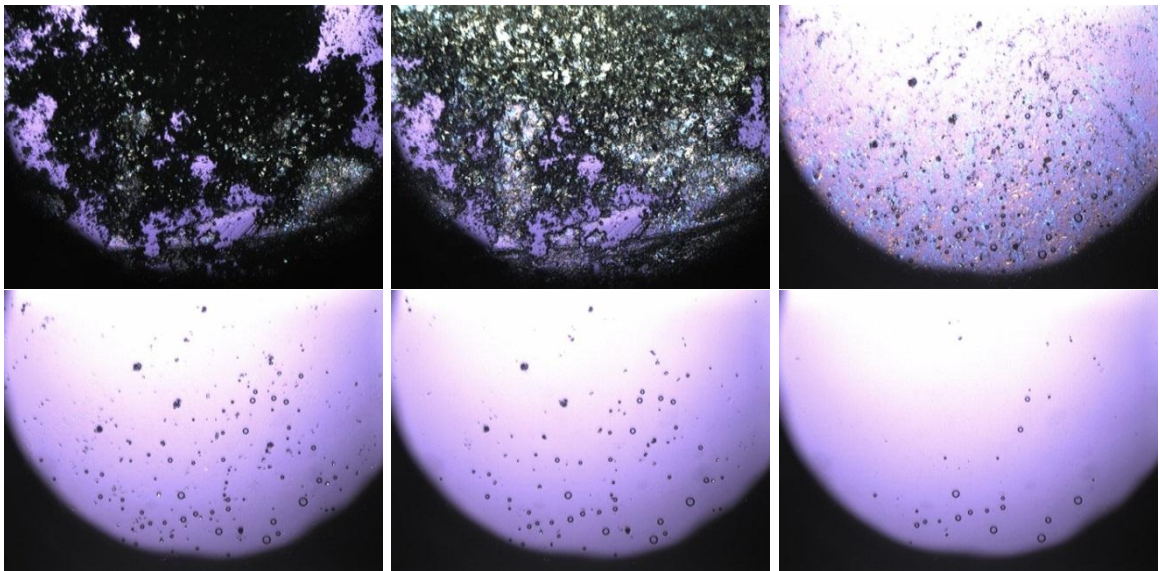


Figura 109. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della dispersione solida diazepam-PEG 4000 10% p/p ottenuto a 55 °C 100 bar e riscaldato da 30 °C a 100 °C.

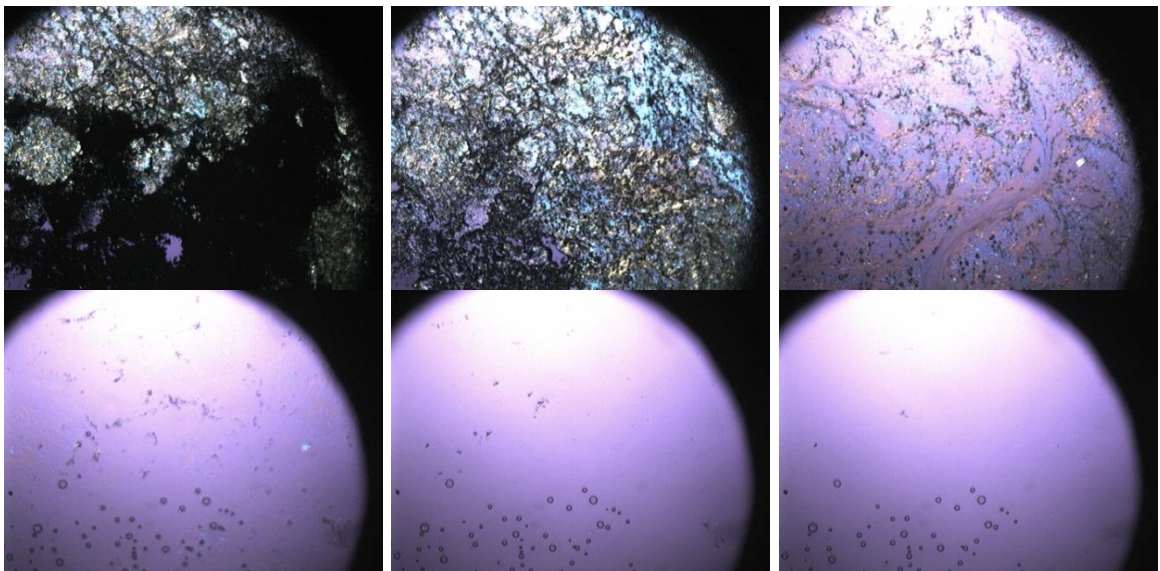


Figura 110. Immagini da microscopio a luce polarizzata equipaggiato (ingrandimento 4x) con piastra riscaldante della dispersione solida diazepam-PEG 4000 10% p/p ottenuta a 55 °C 200 bar e riscaldata da 30 °C a 100 °C.

I diffrattogrammi di raggi X (Figura 111) della dispersione preparata a 100 bar non presentano la cristallinità ritrovata nell'analisi di microscopia su piastra riscaldante.

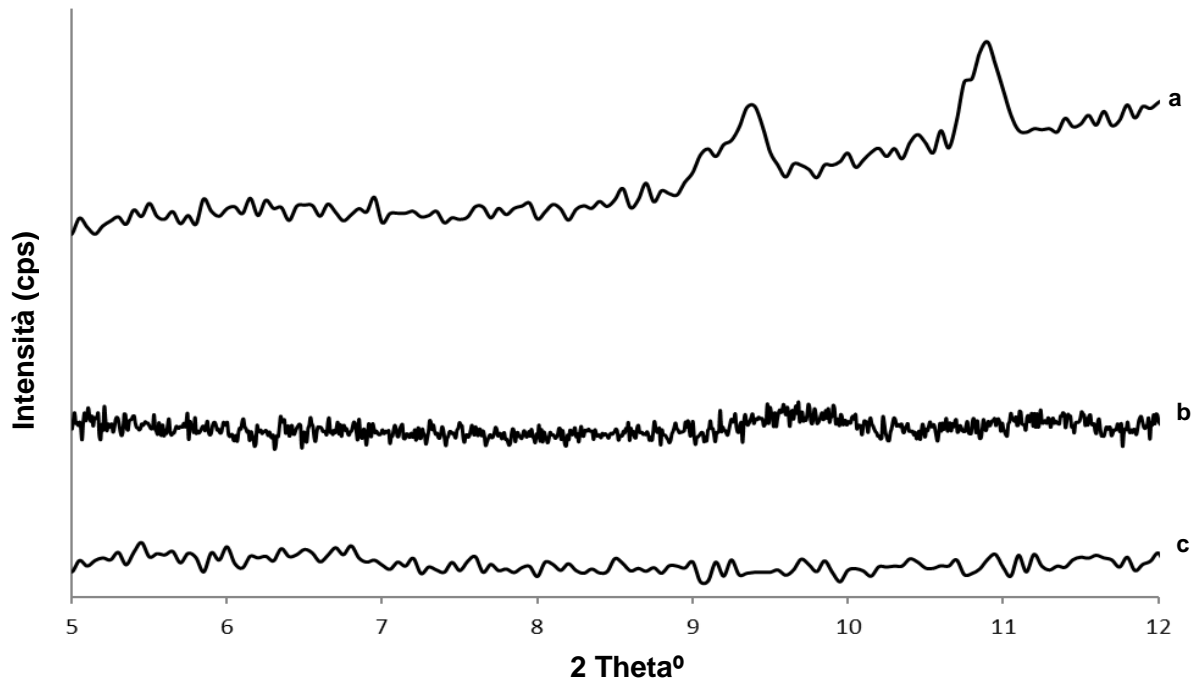


Figura 111. Diffratogrammi di raggi X su polvere della miscela fisica di PEG4000 con 10% di diazepam (a), diazepam-PEG4000 10% 55 °C 100 bar al tempo zero (c) e dopo 4 mesi a 4 °C (b).

Al contrario i diffratogrammi di raggi X su polvere della dispersione solida preparata a 200 bar (Figura112) mostrano una ricristallizzazione del farmaco che conferma l'analisi di microscopia su piastra riscaldante

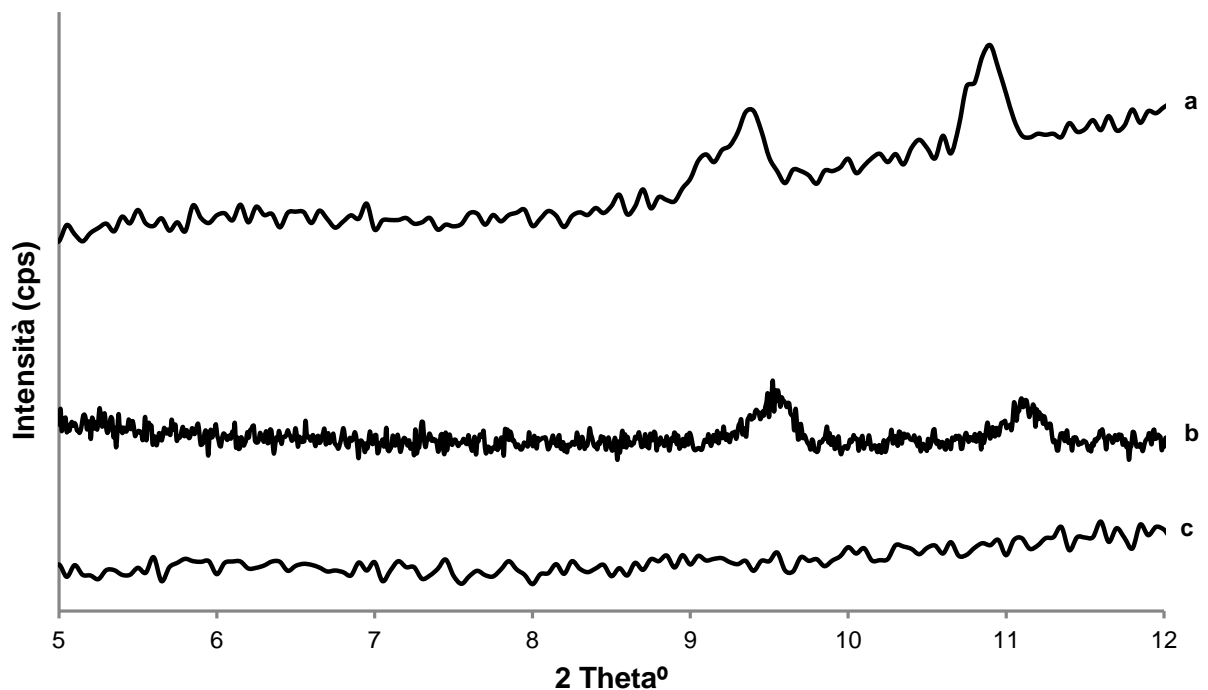


Figura 112. Diffratogrammi di raggi X su polvere della miscela fisica di PEG4000 con 10% di diazepam (a), diazepam-PEG4000 10% 55 °C 200 bar al tempo zero (c) e dopo 4 mesi a 4 °C (b).

Anche alla concentrazione del 10% p/p in farmaco lo spettro IR (Figura 113) della miscela fisica contenente farmaco amorfo mostra uno shift verso numeri d'onda minori rispetto alla miscela fisica contenente farmaco cristallino, shift che ricalca lo spostamento del farmaco nello stato amorfo rispetto alla sua forma cristallina. Le dispersioni solide preparate con la tecnica PGSS mostrano invece uno shift verso numeri d'onda maggiori sia rispetto al farmaco cristallino che amorfo, shift che risulta più marcato nel caso della dispersione preparata a 100 bar ($3,5 \text{ cm}^{-1}$ rispetto allo stato cristallino) rispetto a quella preparata a 200 bar ($2,5 \text{ cm}^{-1}$ rispetto allo stato cristallino). La dispersione preparata con il metodo della fusione infine mostra anch'essa uno shift verso numeri d'onda maggiori rispetto al farmaco cristallino, shift ($1,5 \text{ cm}^{-1}$) però meno marcato rispetto entrambe le dispersioni preparate con la tecnica dei fluidi supercritici.

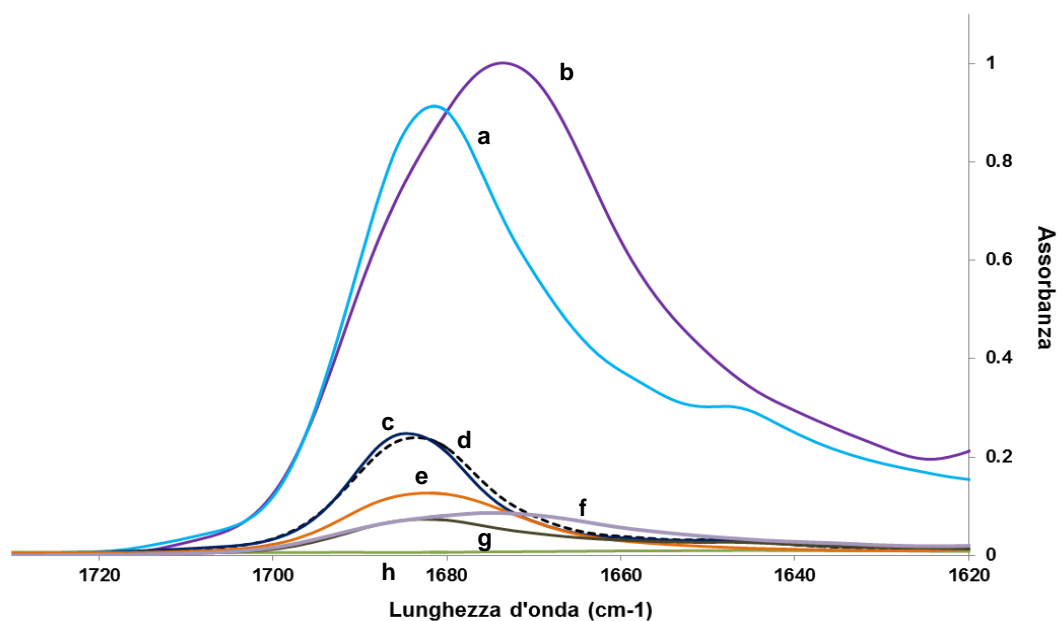


Figura 113. Spettro ATR-IR di PEG 4000 (**h**), 10% diazepam amorfo-PEG 4000 miscela fisica (**f**), 10% diazepam cristallino-PEG4000 miscela fisica (**g**), diazepam amorfo (**b**), diazepam cristallino (**a**), diazepam-PEG4000 10% 55 °C 100 bar (**c**) e 200 bar preparate (**d**) con PGSS, diazepam-PEG4000 10% preparata con metodo della fusione (**e**).

Nel caso delle dispersioni preparate con PEG 6000 valgono le stesse osservazioni fatte per le dispersioni con PEG 4000.

I tracciati DSC delle dispersioni ad entrambe le concentrazioni e pressioni non presentano il picco di fusione del diazepam ma esclusivamente quello del polimero.

Le immagini al microscopio polarizzato evidenziano cristalli di farmaco solo nelle dispersioni a concentrazione maggiore (Figura 116 e 117) mentre in quelle a concentrazione minore (Figura 114 e 115) si osserva solo la fusione del polimero.

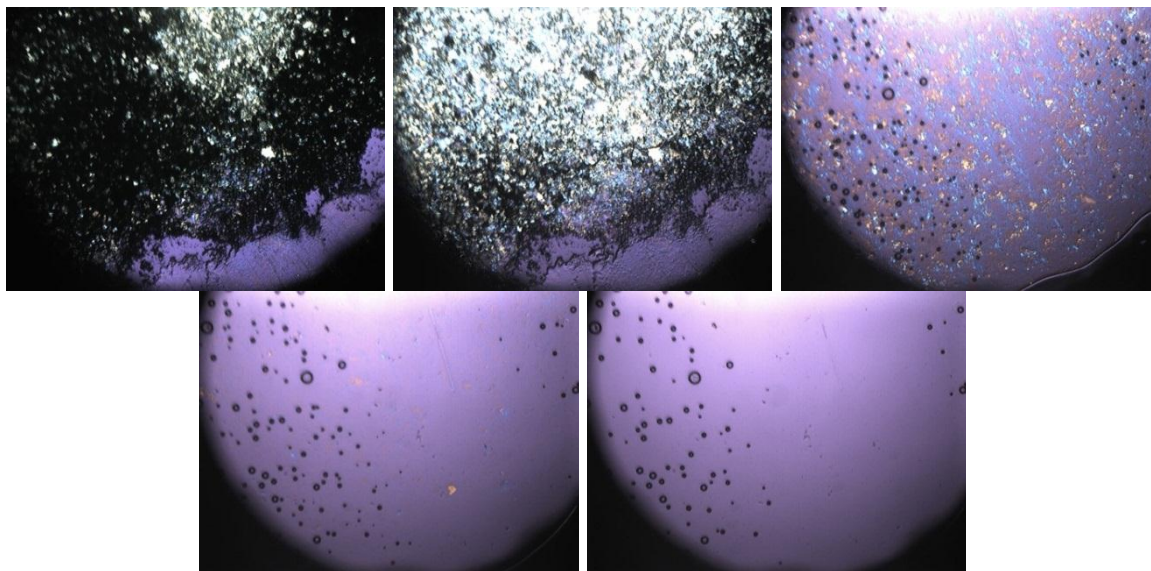


Figura 114. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della dispersione solida diazepam-PEG6000 5% p/p ottenuta a 55 °C 100 bar e riscaldata da 30 °C a 70 °C.

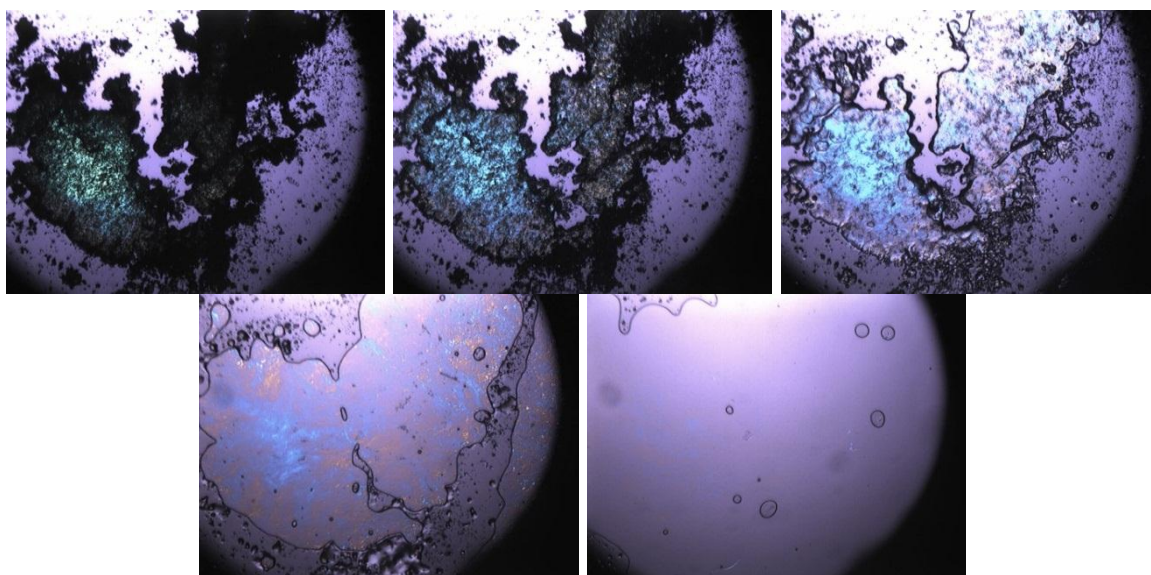


Figura 115. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della dispersione solida diazepam-PEG6000 5% p/p ottenuta a 55 °C 200 bar e riscaldata da 30 °C a 70 °C.

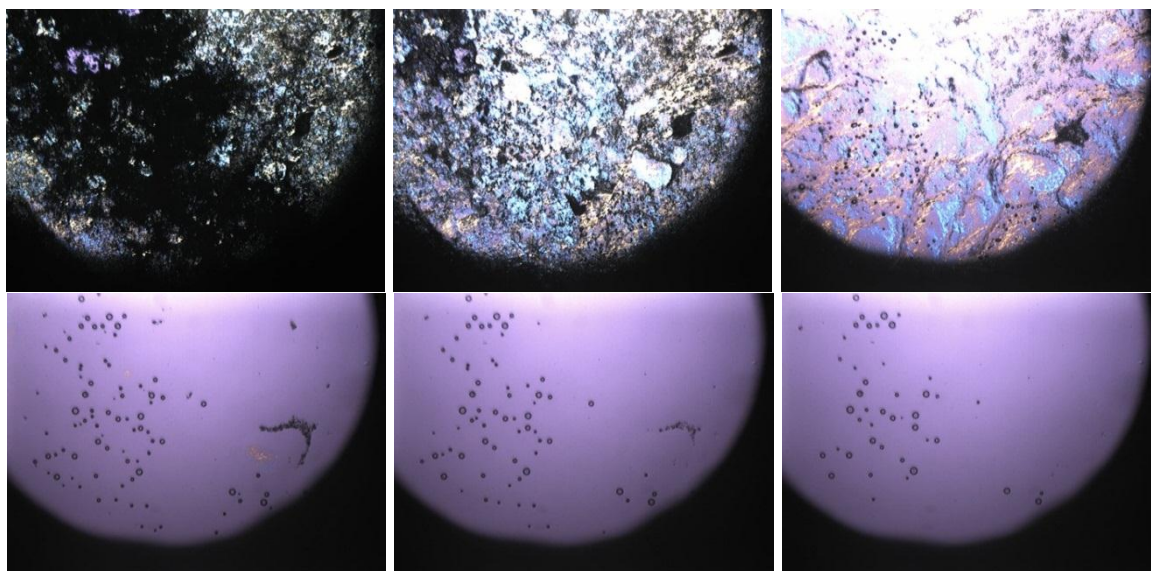


Figura 116. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della dispersione solida diazepam-PEG6000 10% p/p ottenuta a 55 °C 100 bar e riscaldata da 30 °C a 130 °C.

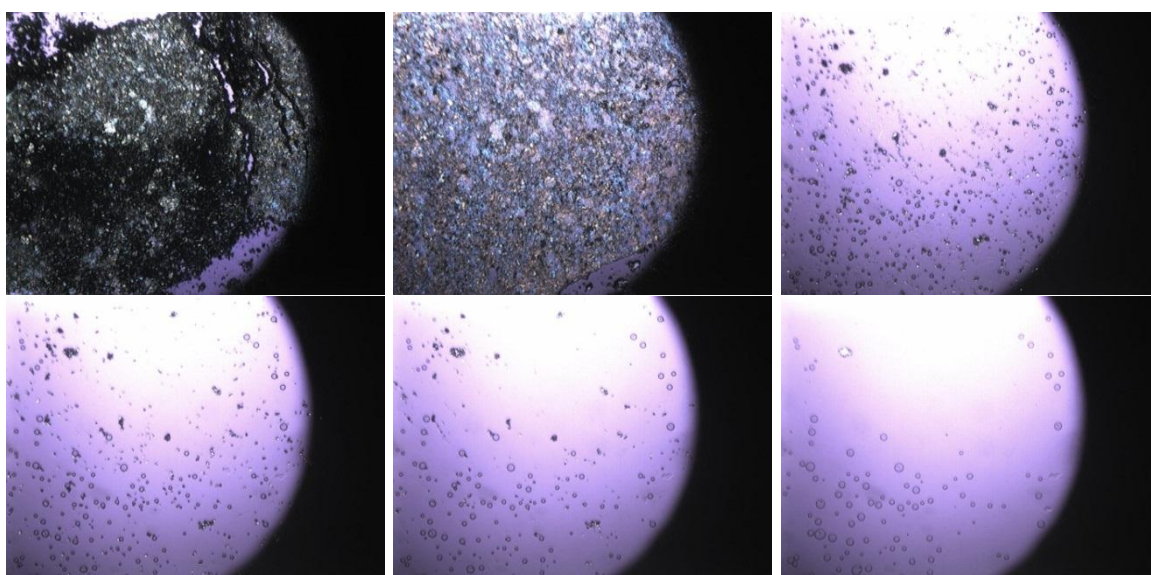


Figura 117. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della dispersione solida diazepam-PEG6000 10% p/p ottenuta a 55 °C 200 bar e riscaldate da 30 °C a 130 °C.

I diffrattogrammi di raggi X confermano l'analisi di microscopia su piastra riscaldante: per le dispersioni a concentrazione minore (Figura 118 e 119) non si ha alcun picco riconducibile alla ricristallizzazione del farmaco dopo 4 mesi di conservazione a 4 °C, mentre si può notare una parziale ricristallizzazione nelle dispersioni al 10% p/p di diazepam (Figura 120 e 121).

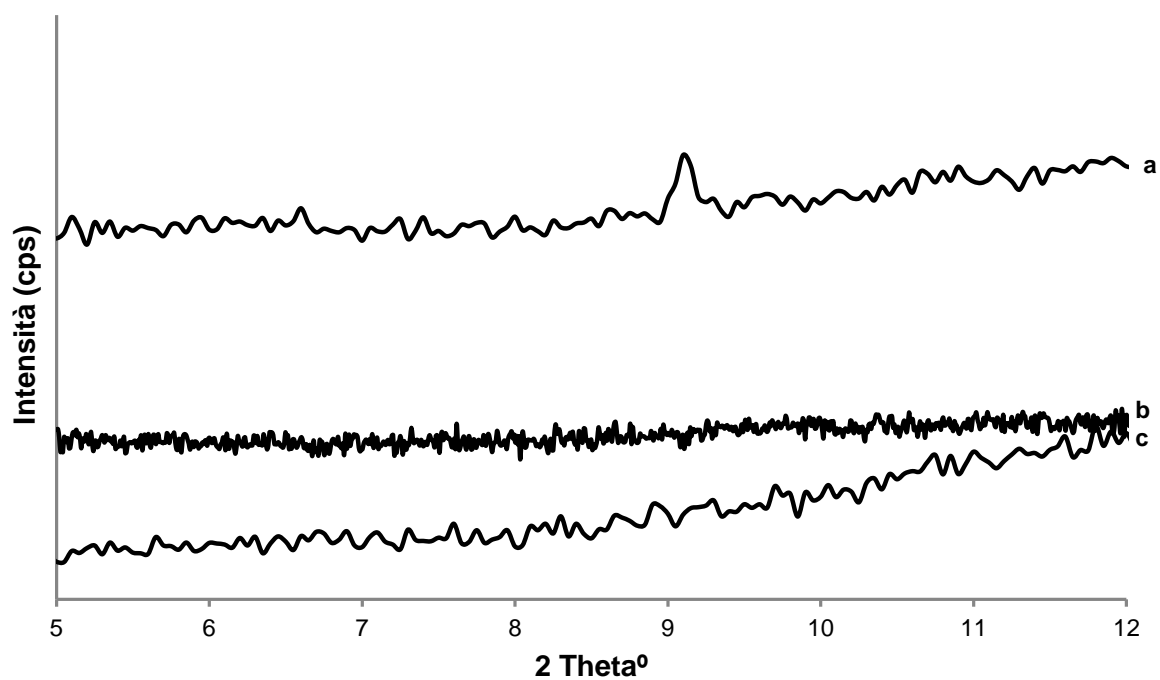


Figura 118. Diffratogrammi di raggi X su polvere della miscela fisica di PEG6000 con 5% di diazepam (a), diazepam-PEG6000 5% 55 °C 100 bar al tempo zero (c) e dopo 4 mesi a 4 °C (b).

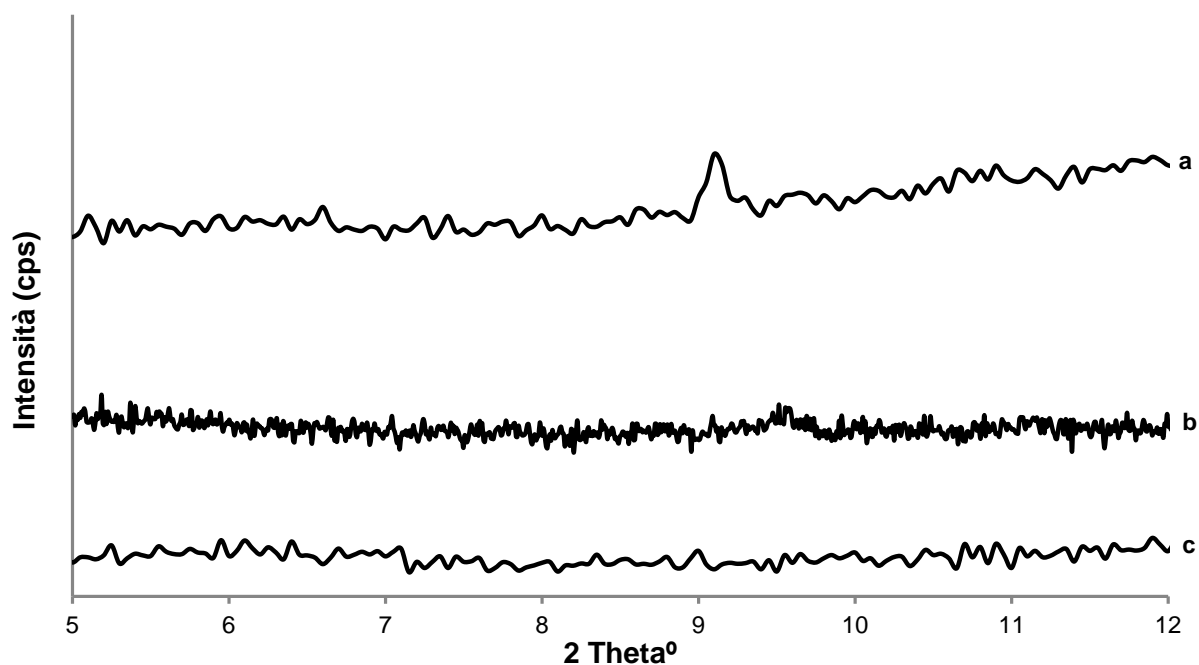


Figura 119. Diffratogrammi di raggi X su polvere della miscela fisica di PEG6000 con 5% di diazepam (a), diazepam-PEG6000 5% 55 °C 200 bar al tempo zero (c) e dopo 4 mesi a 4 °C (b).

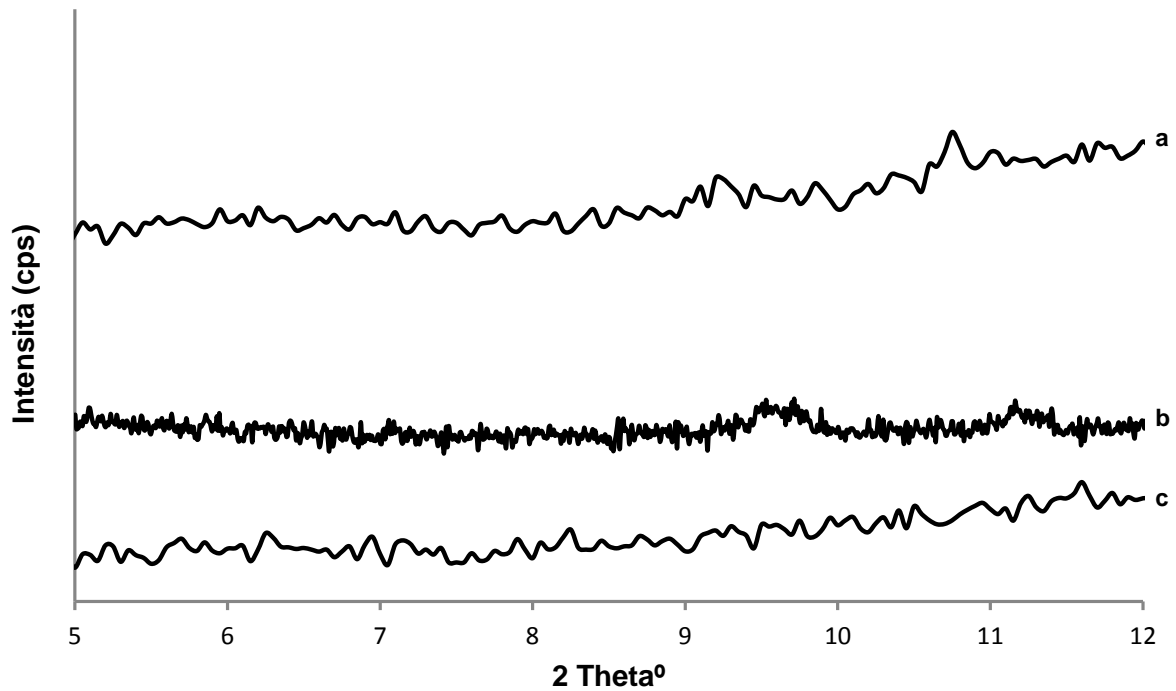


Figura 120. Diffratogrammi di raggi X su polvere della miscela fisica di PEG6000 con 10% di diazepam **(a)**, diazepam-PEG6000 10% 55 °C 100 bar al tempo zero **(c)** e dopo 4 mesi a 4 °C **(b)**.

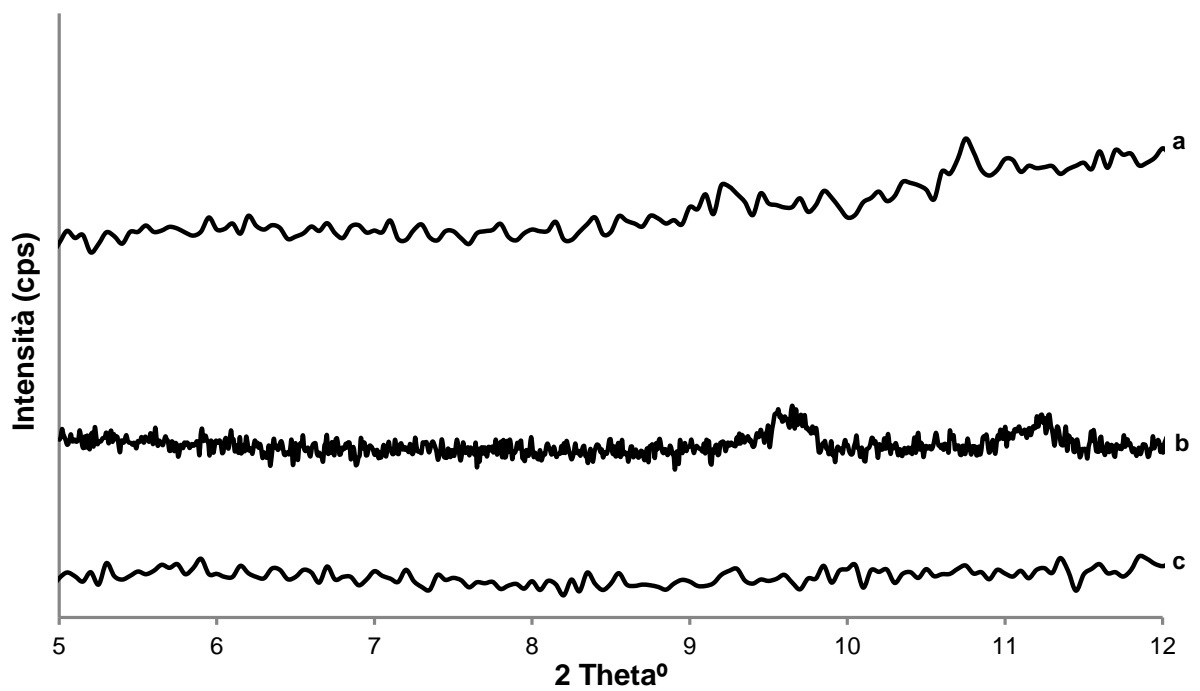
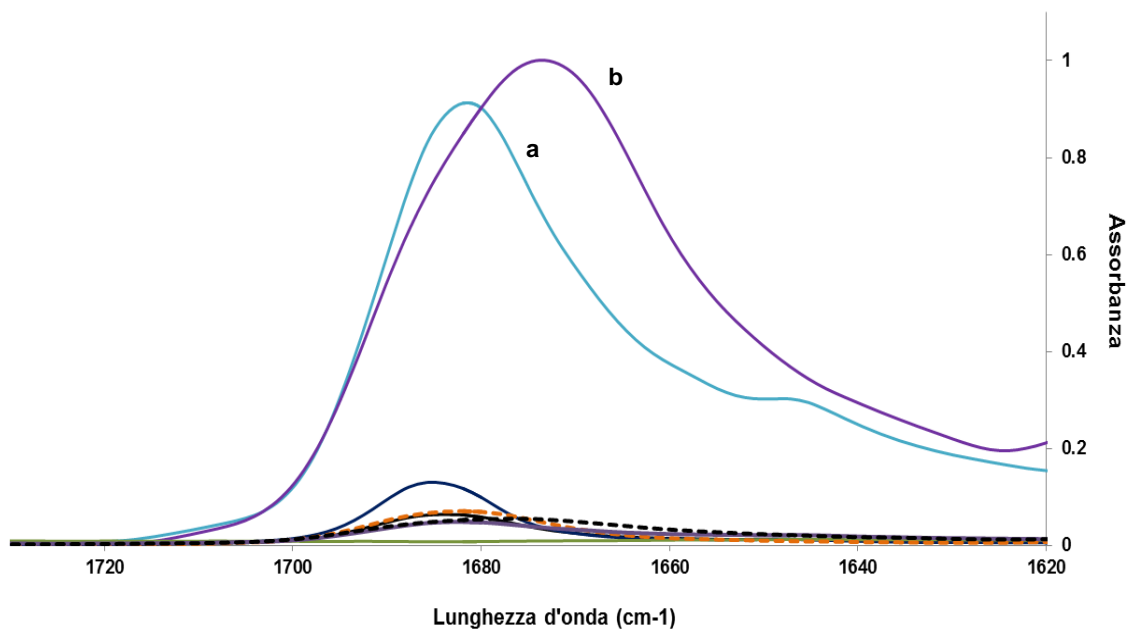


Figura 121. Diffratogrammi di raggi X su polvere della miscela fisica di PEG6000 con 10% di diazepam **(a)**, diazepam-PEG6000 10% 55 °C 200 bar al tempo zero **(c)** e dopo 4 mesi a 4 °C **(b)**.

Gli spettri IR (Figura 122 e 123) mostrano come già discusso nel caso del PEG 4000 uno shift verso numeri d'onda minori del picco relativo allo stretching del carbonile nel farmaco allo stato amorfo rispetto alla forma cristallina, shift evidenziato anche nel caso delle miscele fisiche preparate sia con farmaco cristallino che amorfo. Nel caso della dispersione solida contenente il 5 % p/p di farmaco e preparata con il metodo della fusione non si evidenzia alcuno shift rispetto alla miscela fisica contenente farmaco cristallino. Le dispersioni invece preparate con la tecnica PGSS mostrano entrambe uno shift verso numeri d'onda maggiori in particolare, uno shift di $3,5 \text{ cm}^{-1}$ rispetto al farmaco cristallino. Le stesse considerazioni valgono anche nel caso delle dispersioni contenenti il 10 % p/p di farmaco, in questo caso il picco del carbonile del diazepam nelle miscele preparate con il metodo PGSS ad entrambe le pressioni risulta spostato verso numeri d'onda maggiori di $3,8 \text{ cm}^{-1}$ rispetto al farmaco cristallino.

l)



II)

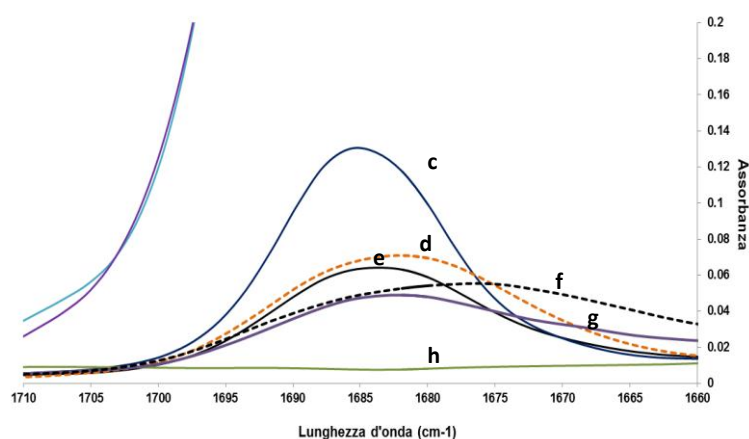


Figura 122. I. Spettro ATR-IR di PEG 6000 (**h**), 5% diazepam amorfo-PEG 6000 miscela fisica (**f**), 5% diazepam cristallino-PEG6000 miscela fisica (**g**), diazepam amorfo (**b**), diazepam cristallino (**a**), diazepam-PEG6000 5% 55 °C 100 bar (**c**) e 200 bar (**e**) preparate con PGSS, diazepam-PEG6000 5% preparata con metodo della fusione (**d**). II Zoom della regione tra 1710 cm^{-1} e 1660 cm^{-1} .

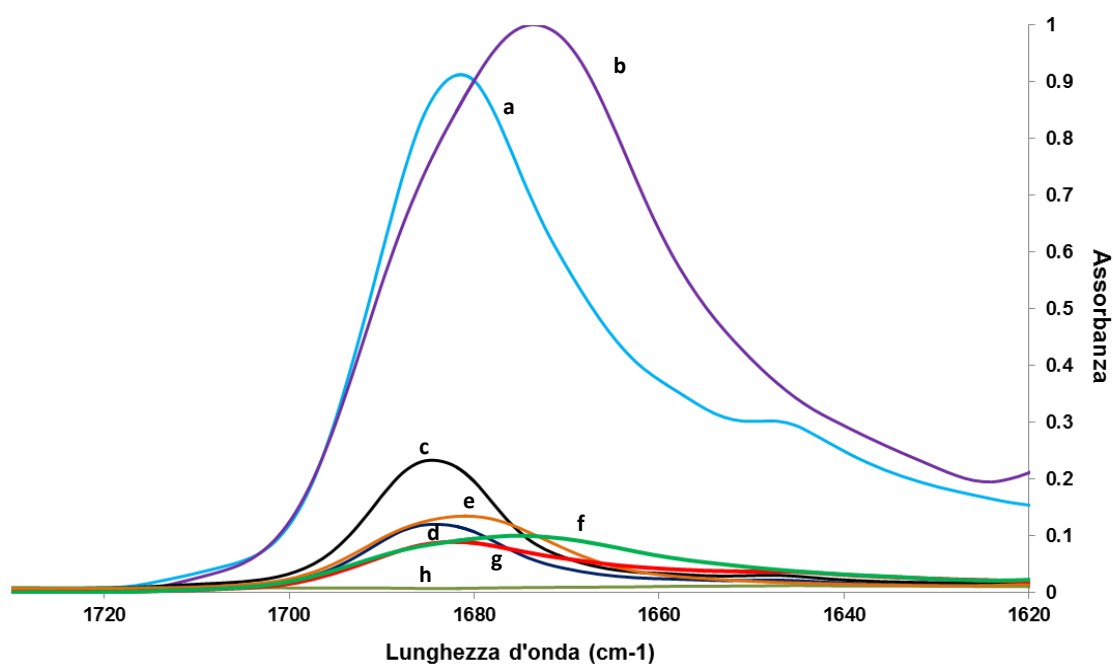


Figura 123. Spettro ATR-IR di PEG 6000 (**h**), 10% diazepam amorfo-PEG 6000 miscela fisica (**f**), 10% diazepam cristallino-PEG6000 miscela fisica (**g**), diazepam amorfo (**b**), diazepam cristallino (**a**), diazepam-PEG6000 10% 55 °C 100 bar (**d**) e 200 bar (**c**) preparate con PGSS, diazepam-PEG6000 10% preparata con metodo della fusione (**e**).

4.9.1.3 Studi di dissoluzione

Nelle Figure seguenti sono presentati i profili di dissoluzione delle dispersioni solide preparate ad entrambe le pressioni confrontate con il farmaco cristallino e amorfo, con le miscele fisiche contenenti farmaco sia cristallino che amorfo e infine con la dispersione preparata col metodo della fusione.

Nel caso delle dispersioni preparate col diazepam al 5% p/p e il PEG 4000 (Figura 124) si osserva un netto incremento della velocità di dissoluzione sia delle dispersioni solide preparate con il metodo della fusione che con la tecnica PGSS rispetto al farmaco da solo e alla miscela fisica. Anche se nel caso della dispersione preparata con il metodo della fusione l'alta variabilità dei dati permette di evidenziare in modo significativo questo incremento solo a 120 minuti. Si deve anche evidenziare come il farmaco amorfo presenti una velocità di dissoluzione superiore al farmaco cristallino solo nei primi 10 minuti, dopo di che presentano un profilo del tutto sovrapponibile. Questo fenomeno può essere spiegato ammettendo che avvenga una ricristallizzazione del farmaco amorfo durante la dissoluzione.

Si può notare anche che le dispersioni preparate a 100 e 200 bar presentano una velocità di dissoluzione non significativamente diversa da quella della dispersione preparata col metodo della fusione e alla miscela fisica contenente farmaco amorfo. Infine la miscela fisica contenente farmaco cristallino presenta una velocità di dissoluzione maggiore rispetto al farmaco cristallino ma non significativamente maggiore rispetto al farmaco amorfo. Nel caso della miscela fisica si osserva anche una variabilità dei dati molto alta che si pensa sia dovuta ad una scarsa omogeneità della miscela stessa a causa della difficoltà di miscelazione dei due componenti.

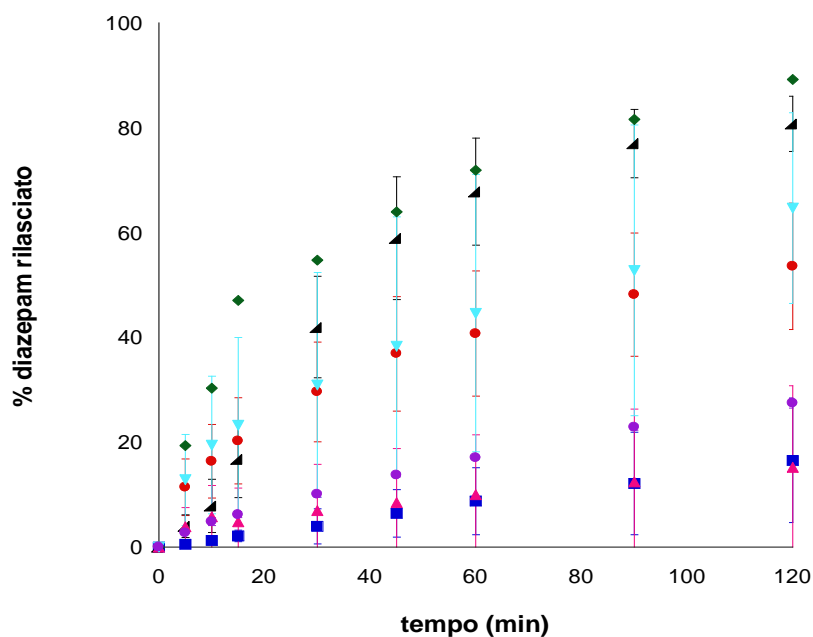


Figura 124. Profili di dissoluzione di diazepam cristallino (quadrato blu), diazepam amorfo (triangolo rosa), miscela fisica di PEG 4000 con 5% di farmaco amorfo (rombo verde), miscela fisica di PEG 4000 con 5% di farmaco cristallino (cerchio viola), diazepam-PEG4000 5% 55 °C 100 (triangolo nero) e 200 bar (cerchio rosso) preparate con PGSS, diazepam-PEG4000 5% preparate con metodo della fusione (triangolo azzurro).

Per quanto riguarda invece le dispersioni contenenti il 10 % p/p in farmaco (Figura 125) si può notare un aumento della velocità di dissoluzione per tutte le dispersioni, sia preparate con la tecnica PGSS che con il metodo della fusione, rispetto al farmaco sia in forma cristallina che amorfa ma anche rispetto alla miscela fisica contenente farmaco cristallino. La velocità di dissoluzione delle dispersioni solide è invece risultata non significativamente diversa da quella della miscela fisica preparata con farmaco amorfo.

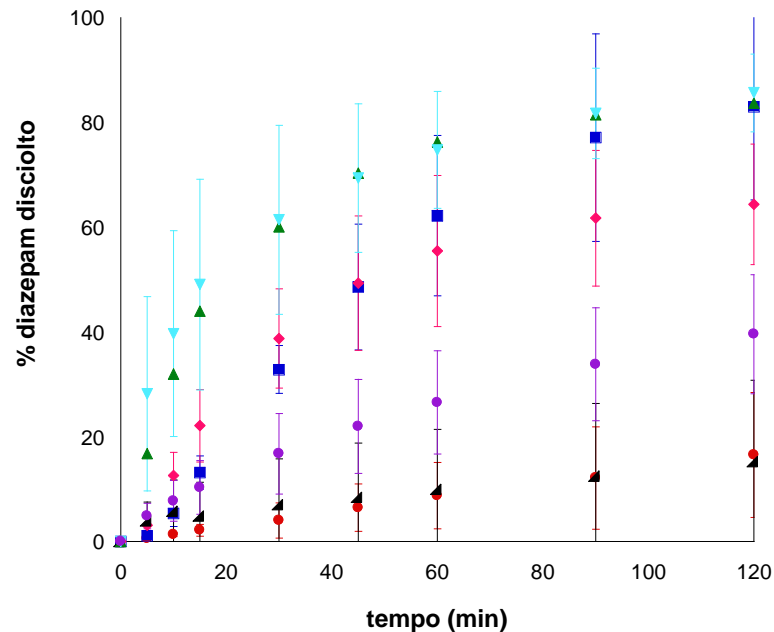


Figura 125. Profili di dissoluzione di diazepam cristallino (cerchio rosso), diazepam amorfo (triangolo nero), miscela fisica di PEG 4000 con 10% di farmaco amorfo (triangolo verde), miscela fisica di PEG 4000 con 10% di farmaco cristallino (cerchio viola), diazepam-PEG4000 10% 55 °C 100 (rombo rosa) e 200 bar (quadrato blu) preparate con PGSS, diazepam-PEG4000 10% preparate con metodo della fusione (triangolo azzurro).

Per quanto riguarda le dispersioni preparate con PEG 6000 e il 5% in diazepam (Figura 126) permane l'aumento di velocità rispetto al farmaco cristallino e amorfo in particolare, la dispersione preparata con la tecnica PGSS a 100 bar è risultata avere una velocità di dissoluzione maggiore rispetto alle altre dispersioni e alle miscele fisiche. Non ci sono invece differenze significative tra le velocità di dissoluzione della dispersione preparata a 200 bar e quella preparata con il metodo della fusione rispetto alla miscela fisica contenente farmaco amorfo. La miscela fisica contenente farmaco cristallino in termini di valori medi è risultato avere una velocità di dissoluzione maggiore rispetto ai farmaci tal quali ma l'alta variabilità dei dati (non mostrata in Figura) ancora una volta indica una disomogeneità significativa.

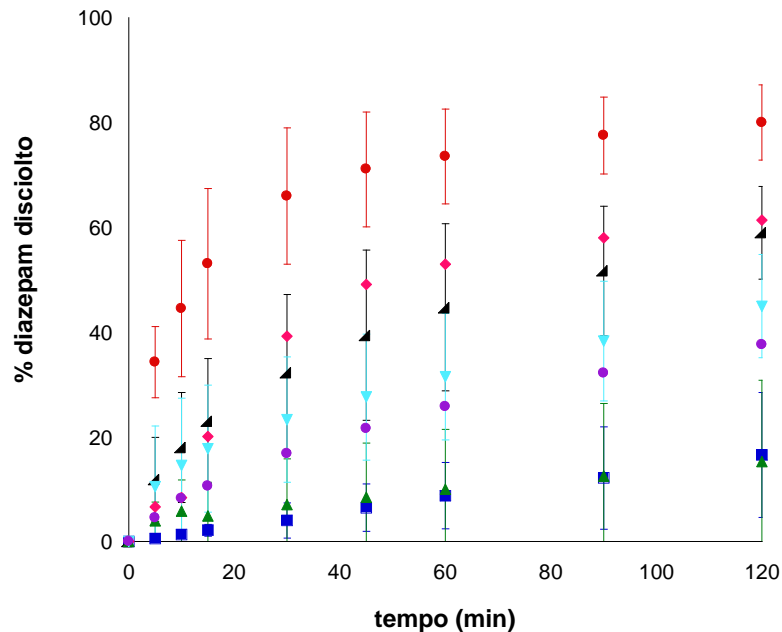


Figura 126. Profili di dissoluzione di diazepam cristallino (quadrato blu), diazepam amorfo (triangolo verde), miscela fisica di PEG 6000 con 5% di farmaco amorfo (rombo rosa), miscela fisica di PEG 6000 con 5% di farmaco cristallino (cerchio viola) diazepam-PEG6000 5% 55 °C 100 (cerchio rosso) e 200 bar (triangolo nero) preparate con PGSS, diazepam-PEG6000 5% preparate con metodo della fusione (triangolo azzurro).

Nel caso invece delle dispersioni preparate sempre con PEG 6000 ma con un 10% p/p (Figura 127) di farmaco la dispersione preparata a 100 bar con la tecnica PGSS presenta una velocità di dissoluzione simile a quella preparata col metodo della fusione, mentre la dispersione preparata a 200 bar presenta una velocità di dissoluzione maggiore di entrambe ma minore della miscela fisica preparata con farmaco amorfo. Anche in questo caso si è osservato un problema di miscelazione di diazepam cristallino e PEG 6000 che porta ad un'alta variabilità del dato (non mostrato in Figura).

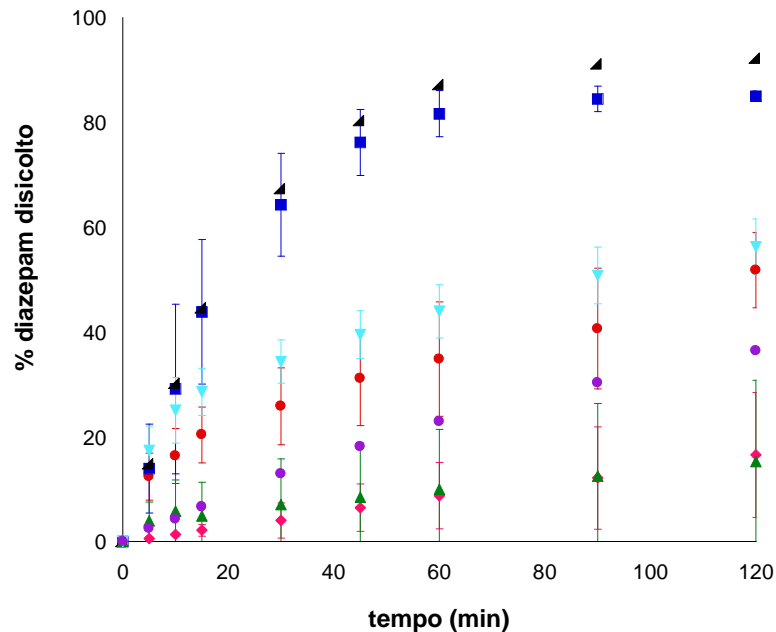


Figura 127. Profili di dissoluzione di diazepam cristallino (rombo rosa), diazepam amorfo (triangolo verde), miscela fisica di PEG 6000 con 10% di farmaco amorfo (triangolo nero), miscela fisica di PEG 6000 con 10% di farmaco cristallino (cerchio viola), diazepam-PEG6000 10% 55 °C 100 (cerchio rosso) e 200 bar (quadrato blu) preparate con PGSS, diazepam-PEG6000 10% preparate con metodo della fusione (triangolo azzurro).

Questi dati suggeriscono che la formulazione del diazepam in dispersioni solide con PEG 4000 e 6000 porti a dei miglioramenti nella velocità di dissoluzione rispetto al farmaco cristallino tal quale ma anche rispetto al farmaco allo stato amorfo, questo suggerisce che l'incremento dei profili di dissoluzione delle miscele fisiche e delle dispersioni solide preparate con le diverse tecniche sia dovuta essenzialmente alla presenza di un polimero idrofilo con proprietà bagnanti più che ad una modificazione dello stato solido del farmaco stesso. Si è osservato infatti che nelle condizioni alla quale si è misurata la velocità di dissoluzione (tampone fosfato pH 6,5 e 37 °C) il diazepam allo stato amorfo tende a ricristallizzare nei primi 20 minuti. Per quanto riguarda il PEG 4000 inoltre non si sono osservate differenze significative tra le velocità di dissoluzione delle dispersioni preparate con la tecnica PGSS, quelle preparate con il metodo della fusione e con la miscela fisica del farmaco amorfo.

Nel caso invece del PEG 6000 con una concentrazione di farmaco del 5 % p/p la dispersione preparata a 100 bar presenta una velocità di dissoluzione maggiore sia della dispersione preparata a 200 bar che con il metodo della fusione, ma anche della miscela fisica contenente farmaco amorfo. Ad una concentrazione del 10 % p/p

in farmaco è la dispersione ottenuta a 200 bar ad avere una velocità di dissoluzione maggiore di quella delle dispersioni preparate a 100 bar e con il metodo della fusione mentre è paragonabile a quella della miscela fisica del farmaco amorfo.

Non sembra quindi esserci un'influenza significativa delle condizioni di preparazione delle dispersioni sulla loro velocità di dissoluzione.

4.9.2 Caratterizzazione delle dispersioni contenenti lorazepam

4.9.2.1 Determinazione del contenuto di principio attivo

In tabella 13 sono mostrati i titoli delle dispersioni solide preparate al 5% e al 10% p/p di lorazepam con PEG 4000 o 6000 e a 55 °C e 100 o 200 bar.

Tabella 13. Titoli delle dispersioni solide ottenute con la tecnica PGSS, deviazione standard in parentesi, n=3.

Dispersione	Titolo %
LZPEG4000 5% 55 °C 100 bar	4,98 (0,07)
LZPEG4000 5% 55 °C 200 bar	5,11 (0,64)
LZPEG4000 10% 55 °C 100 bar	9,46 (0,08)
LZPEG4000 10% 55 °C 200 bar	9,37 (0,07)
LZPEG6000 5% 55 °C 100 bar	4,67 (0,02)
LZPEG6000 5% 55 °C 200 bar	5,01 (0,09)
LZPEG6000 10% 55 °C 100 bar	9,58 (0,07)
LZPEG6000 10% 55 °C 200 bar	9,38 (0,19)

Con l'eccezione delle dispersioni preparate con PEG 4000 e 6000 a 200 bar ed una concentrazione di lorazepam pari al 10 % p/p in tutti gli altri casi i titoli delle dispersioni sono risultati essere di poco inferiori al titolo teorico, non essendoci nei cromatogrammi indicazione di una degradazione del farmaco questo è

probabilmente dovuta ad una piccola perdita di farmaco durante la fase di preparazione o di precipitazione.

4.9.2.2 Caratterizzazione dello stato solido delle dispersioni

Anche le dispersioni contenenti lorazepam e preparate con PEG 4000 e 6000, due diverse concentrazioni (5% e 10% p/p) e due condizioni di pressioni (100 e 200 bar) sono state caratterizzate come per il diazepam con calorimetria differenziale a scansione, microscopia su piastra riscaldante e diffrazione di raggi X su polvere.

Nessuno dei tracciati DSC delle dispersioni con PEG 4000 e 6000 ad entrambe le concentrazioni e pressioni presenta il picco di fusione del lorazepam ma esclusivamente quello del polimero. Inoltre in questo caso non è stato evidenziato alcun fenomeno termico che porti a pensare sia avvenuta una degradazione del farmaco. A titolo di esempio è riportato il tracciato DSC della dispersione solida col 5 % p/p di lorazepam e PEG 4000 (Figura 128)

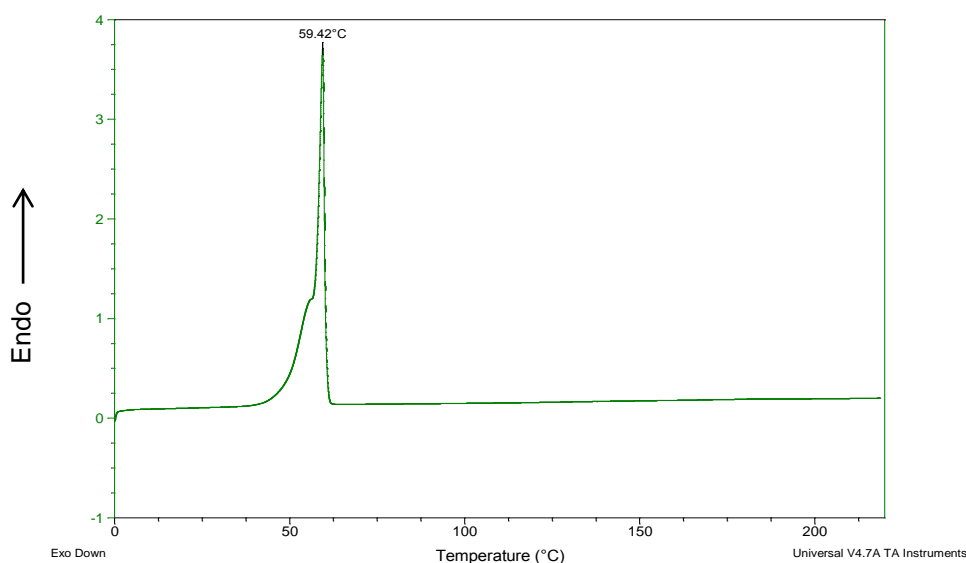


Figura 128. Tracciato DSC della dispersione solida lorazepam-PEG 4000 5% p/p ottenuta a 55 °C 100 bar.

Le immagini al microscopio a luce polarizzata evidenziano cristalli di farmaco solo nelle dispersioni a concentrazione maggiore (Figura 133, 134, 135, 136) mentre a concentrazione minore (Figura 129, 130, 131, 132) si può vedere solo la fusione del polimero, esattamente come avviene nel caso del diazepam.

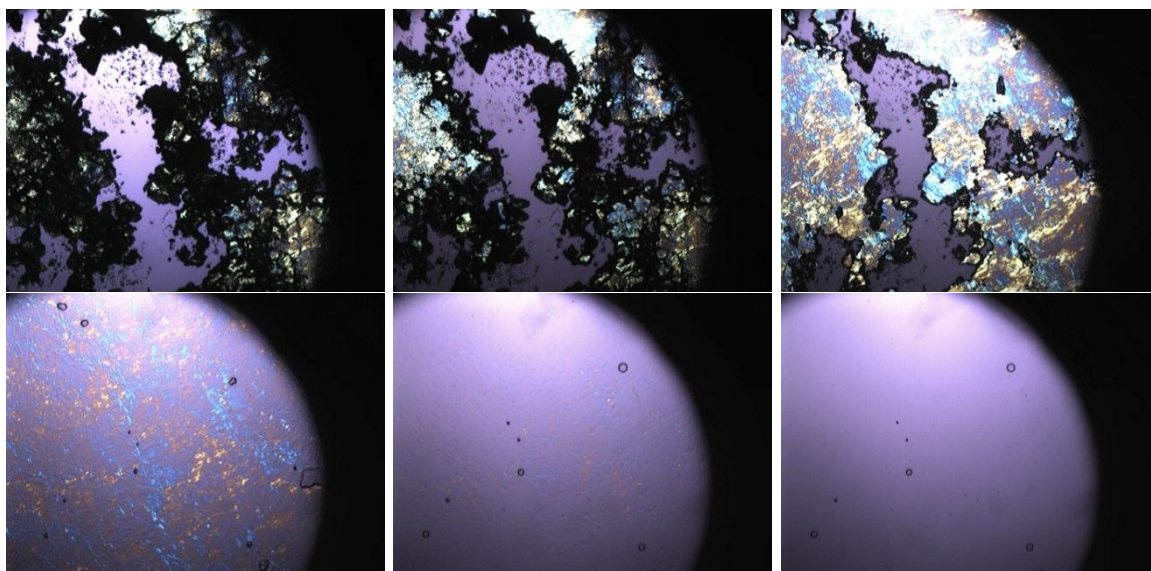


Figura 129. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della dispersione solida lorazepam-PEG4000 5% p/p ottenuta a 55 °C 100 bar e riscaldata da 30 °C a 70 °C.

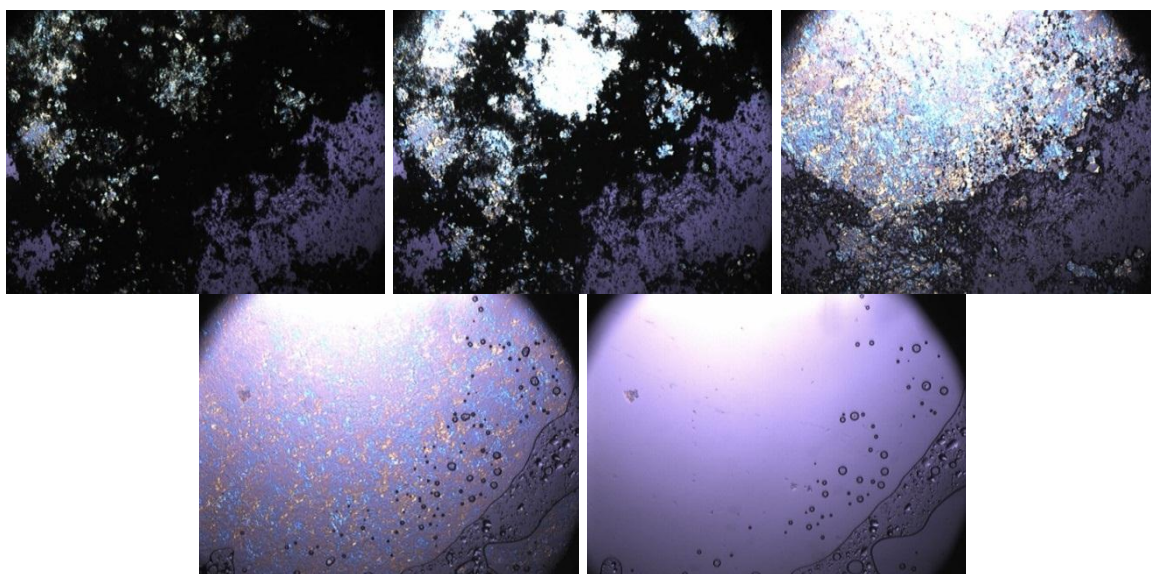


Figura 130. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della dispersione solida lorazepam-PEG4000 5% p/p ottenuta a 55 °C 200 bar e riscaldata da 30 °C a 70 °C.

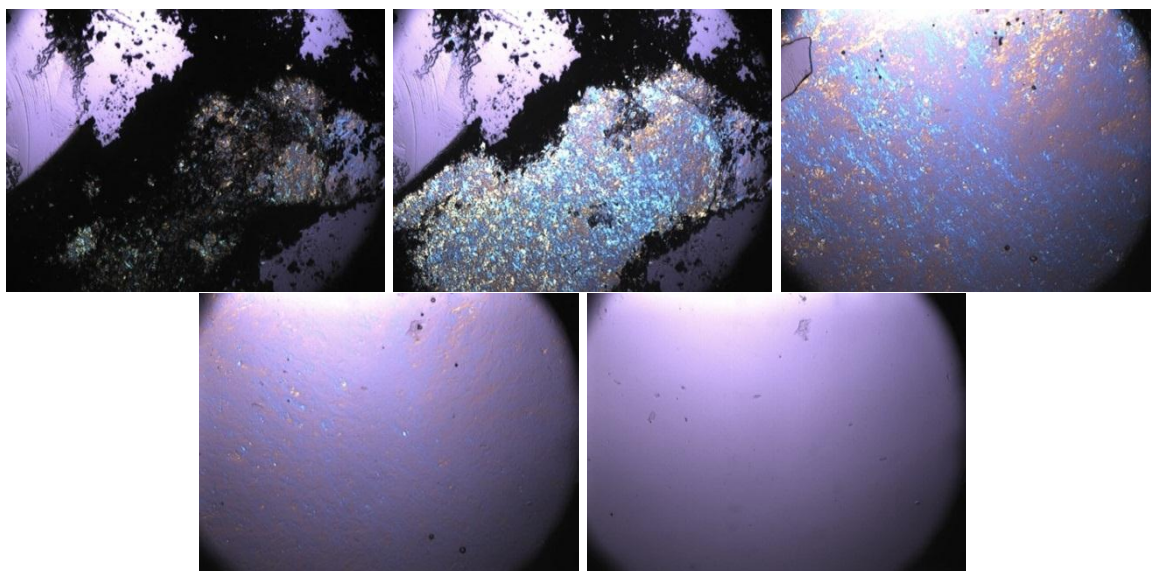


Figura 131. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della dispersione solida lorazepam-PEG6000 5% p/p ottenuta a 55 °C 100 bar e riscaldata da 30 °C a 70 °C.

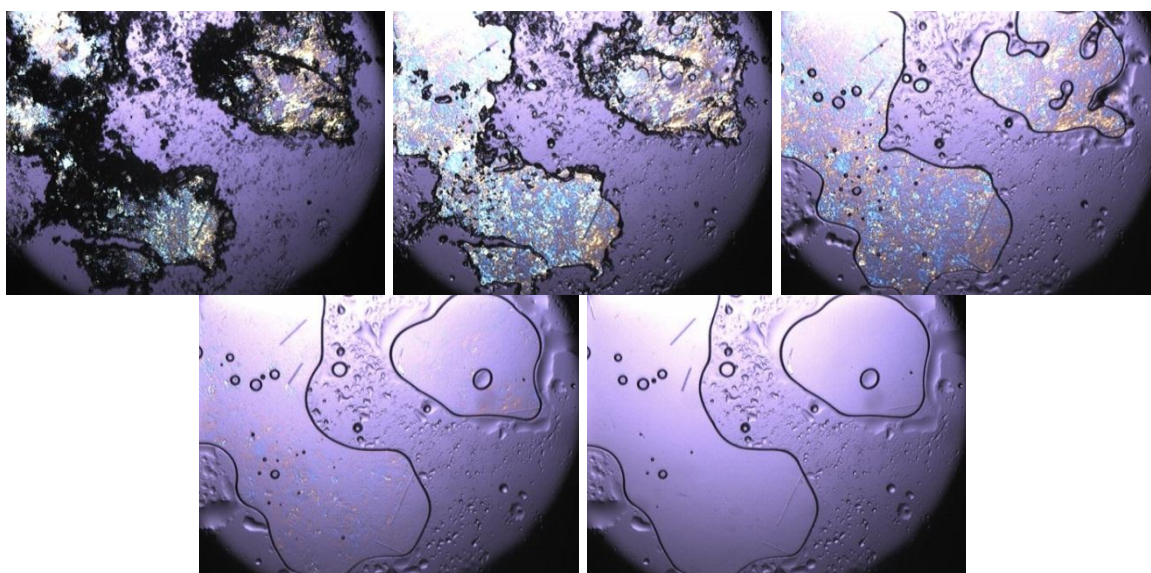


Figura 132. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della dispersione solida lorazepam-PEG6000 5% p/p ottenuta a 55 °C 200 bar e riscaldata da 30 °C a 70 °C.

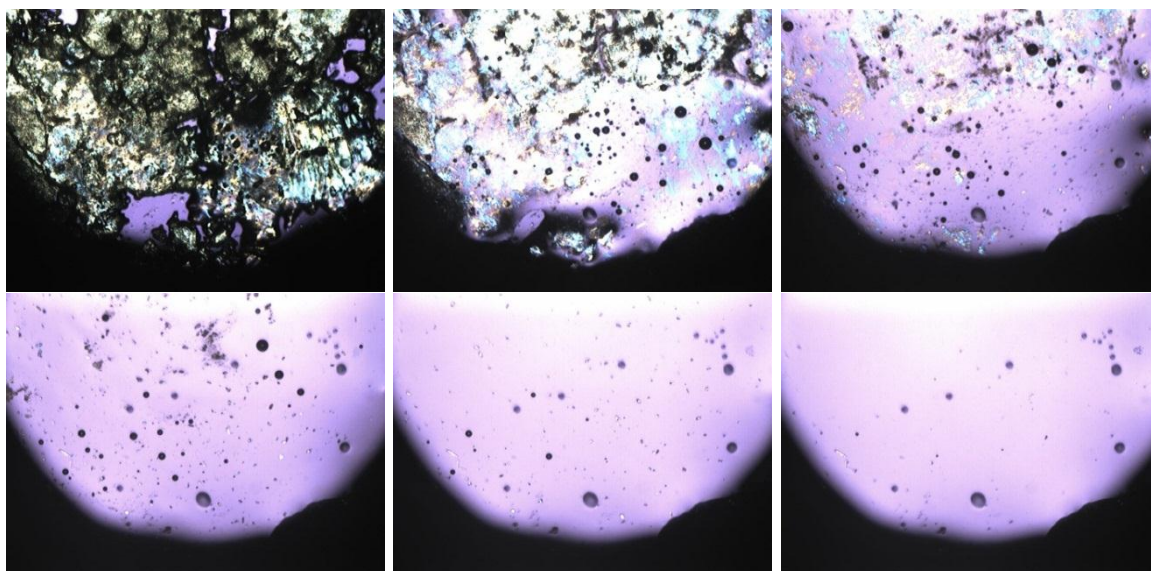


Figura 133. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della dispersione solida lorazepam-PEG4000 10% p/p ottenuta a 55 °C 100 bar e riscaldata da 30 °C a 150 °C.

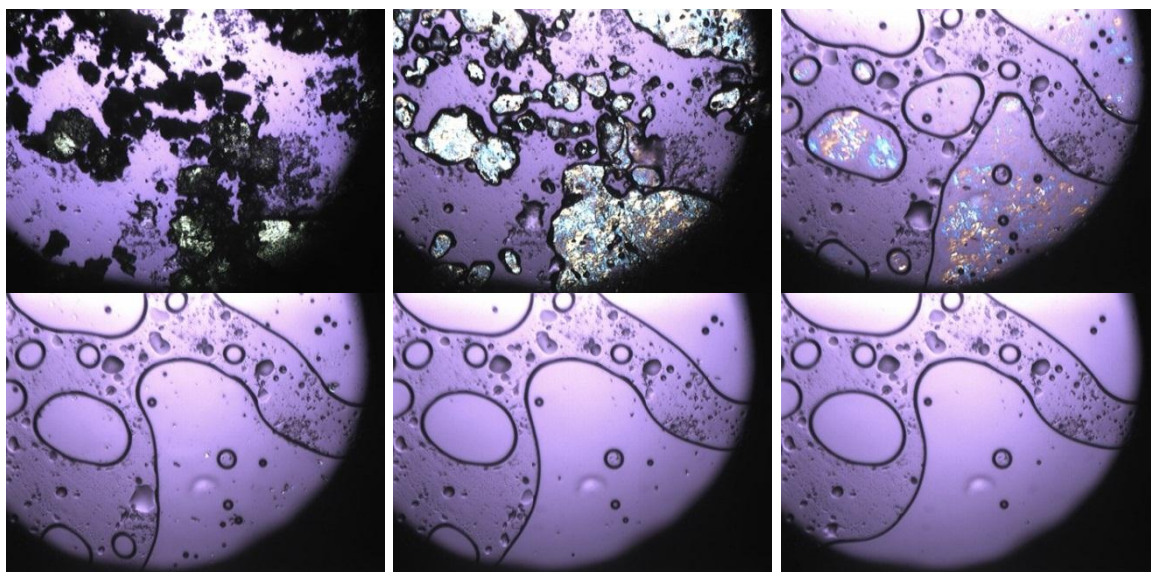


Figura 134. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della dispersione solida lorazepam-PEG4000 10% p/p ottenuta a 55 °C 200 bar e riscaldata da 30 °C a 150 °C.

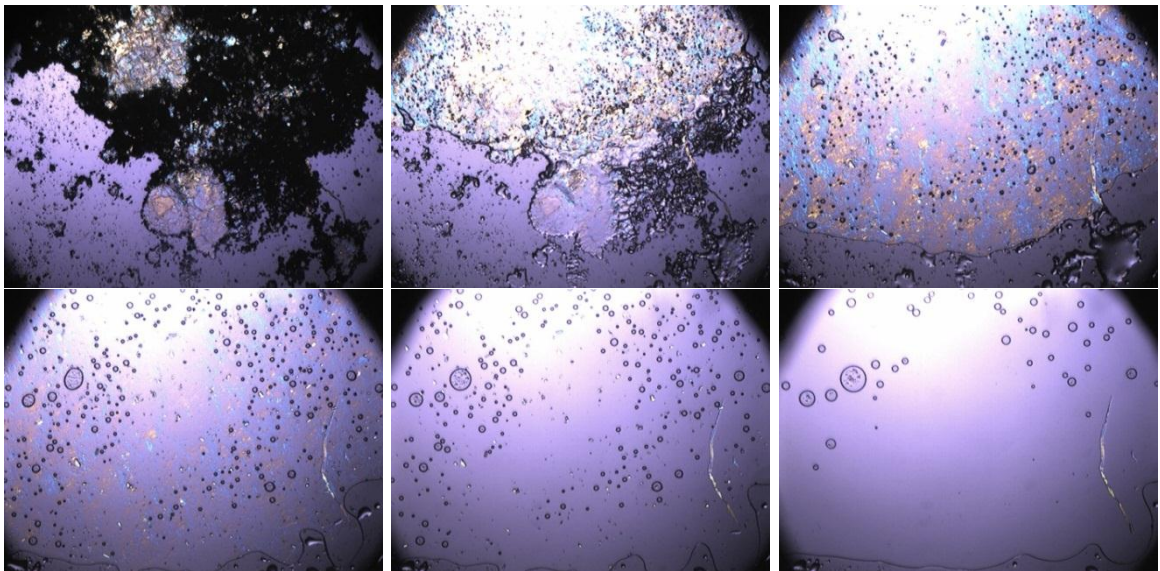


Figura 135. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della dispersione solida lorazepam-PEG6000 10% p/p ottenuta a 55 °C 100 bar e riscaldato da 30 °C a 150 °C.

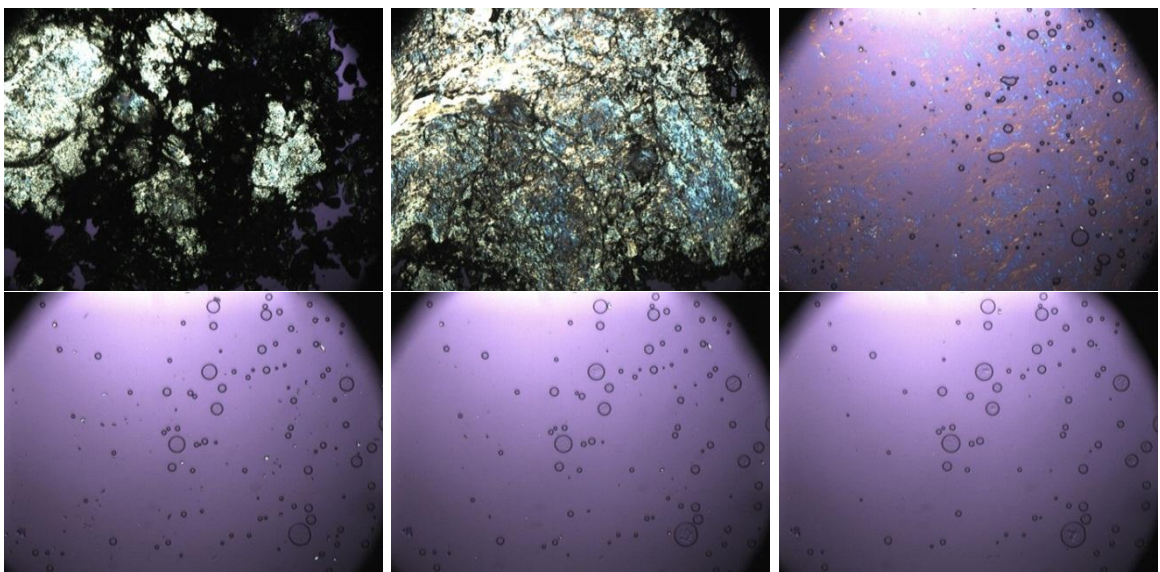


Figura 136. Immagini da microscopio a luce polarizzata (ingrandimento 4x) equipaggiato con piastra riscaldante della dispersione solida lorazepam-PEG6000 10% p/p ottenuta a 55 °C 200 bar e riscaldata da 30 °C a 150 °C.

I diffrattogrammi di raggi X confermano l'analisi termica mediante microscopia su piastra riscaldante tranne nel caso delle dispersioni con lorazepam al 10% p/p con PEG 4000 ad entrambe le pressioni. Infatti, mentre è stata possibile evidenziare la presenza di cristalli di farmaco mediante microscopia con luce polarizzata (Figura

133 e 134) mentre i diffrattogrammi non mostrano alcun picco di ricristallizzazione del lorazepam (Figura 141 e 142). Questo disaccordo potrebbe essere riconducibile ad un problema di sensibilità dello strumento.

Per le dispersioni a concentrazione minore (Figura 137, 138, 139, 140) non si ha alcun picco riconducibile alla ricristallizzazione del farmaco fino a 4 mesi dalla preparazione, mentre si può notare una parziale ricristallizzazione nelle dispersioni al 10% p/p di lorazepam e PEG 6000 (Figura 143 e 144), confermando in questo modo l'analisi effettuata con microscopio a luce polarizzata.

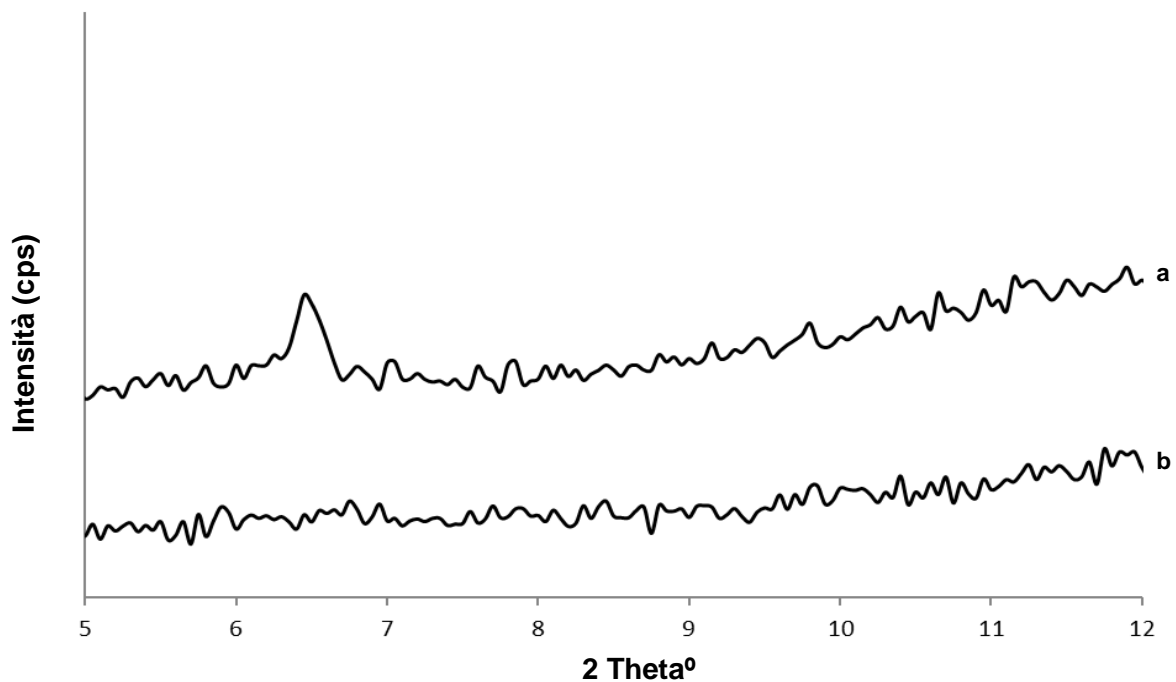


Figura 137. Diffrattogrammi di raggi X su polvere della miscela fisica di PEG4000 con 5% di lorazepam **(a)**, lorazepam-PEG4000 5% 55 °C 100 bar al tempo zero **(b)**.

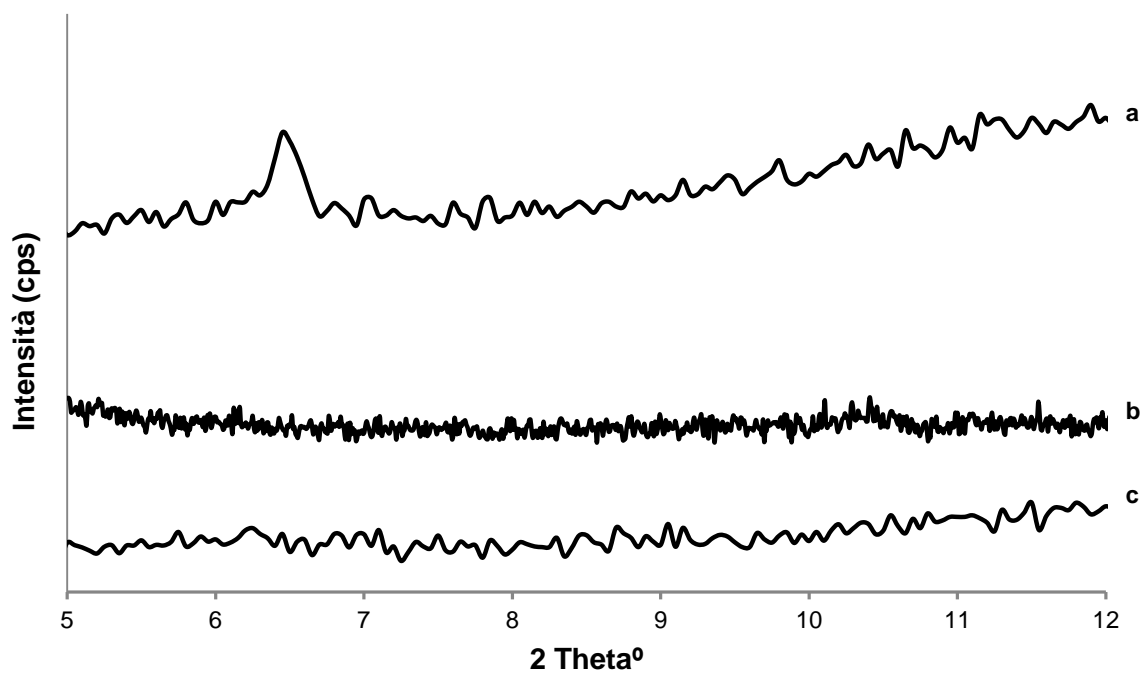


Figura 138. Diffratogrammi di raggi X su polvere della miscela fisica di PEG4000 con 5% di lorazepam (a), lorazepam-PEG4000 5% 55 °C 200 bar al tempo zero (c) e dopo 4 mesi a 4 °C (b).

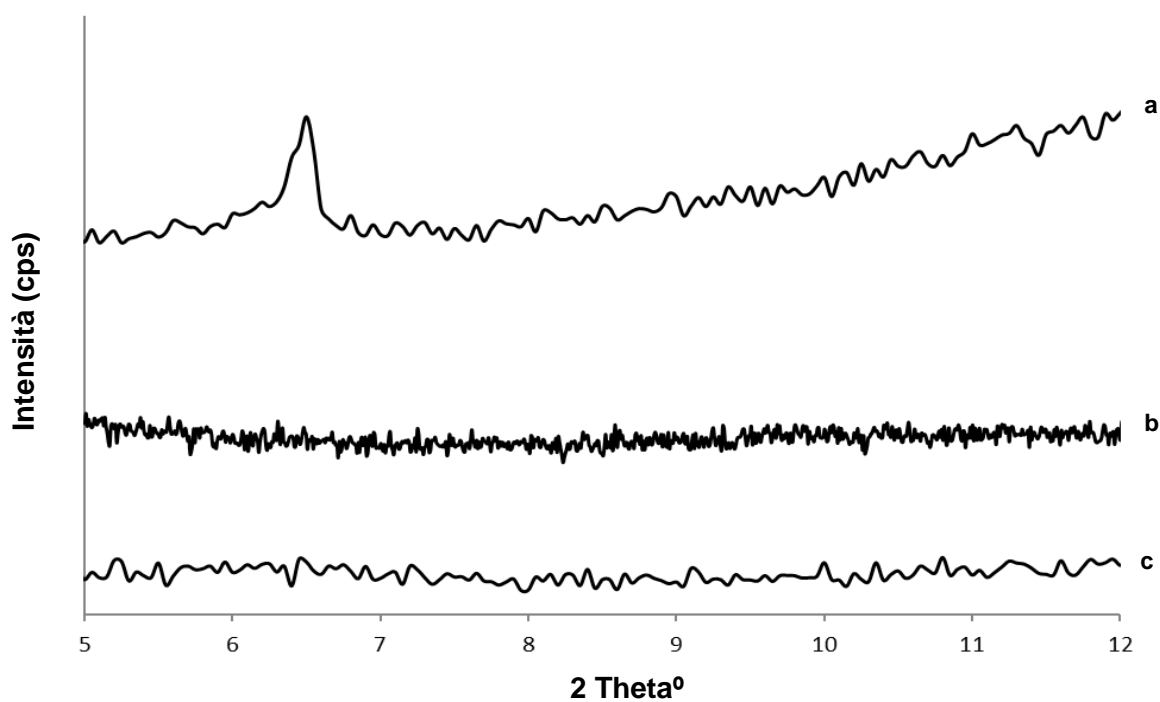


Figura 139. Diffratogrammi di raggi X su polvere della miscela fisica di PEG6000 con 5% di lorazepam (a), lorazepam-PEG6000 5% 55 °C 100 bar al tempo zero (c) e dopo 4 mesi a 4 °C (c).

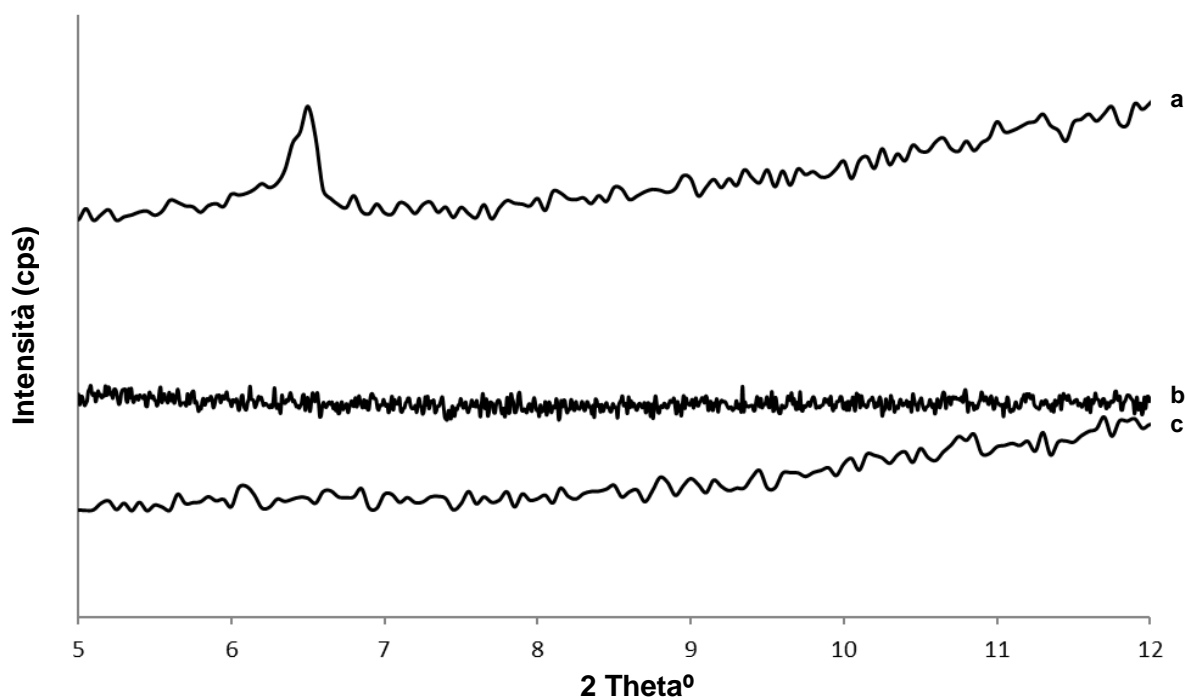


Figura 140. Diffratogrammi di raggi X su polvere della miscela fisica di PEG6000 con 5% di lorazepam (a), lorazepam-PEG6000 5% 55 °C 200 bar al tempo zero (c) e dopo 4 mesi a 4 °C (b).

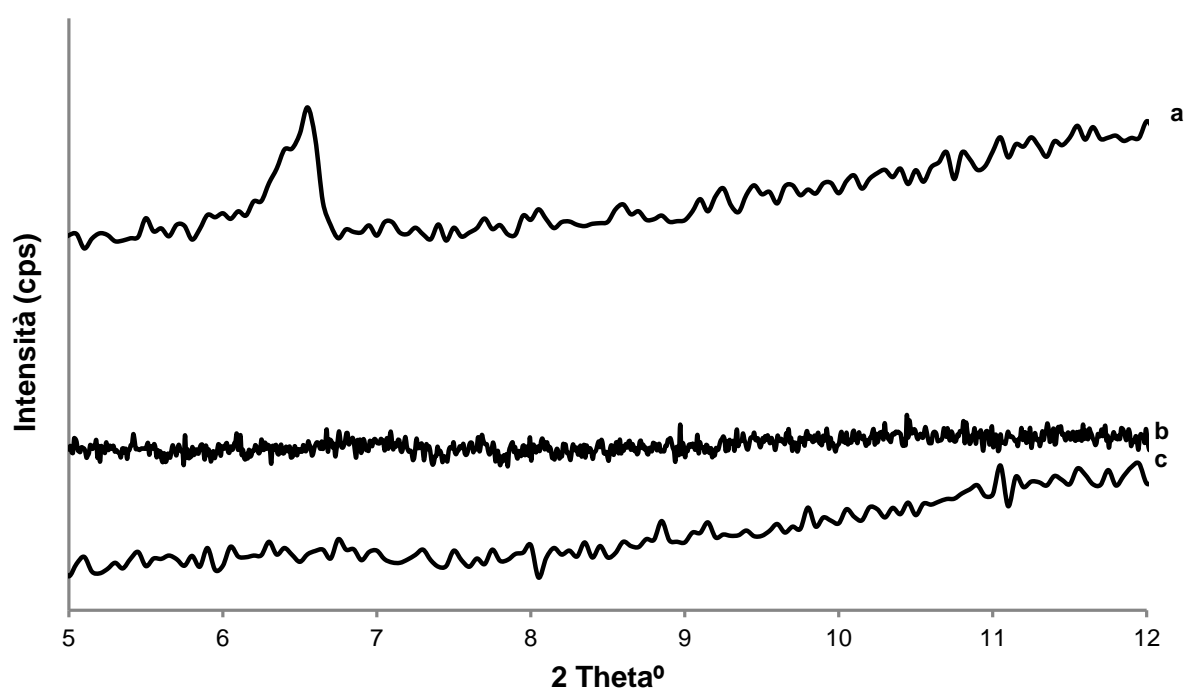


Figura 141. Diffratogrammi di raggi X su polvere della miscela fisica di PEG4000 con 10% di lorazepam (a), lorazepam-PEG4000 10% 55 °C 100 bar al tempo zero (c) e dopo 4 mesi a 4 °C (b).

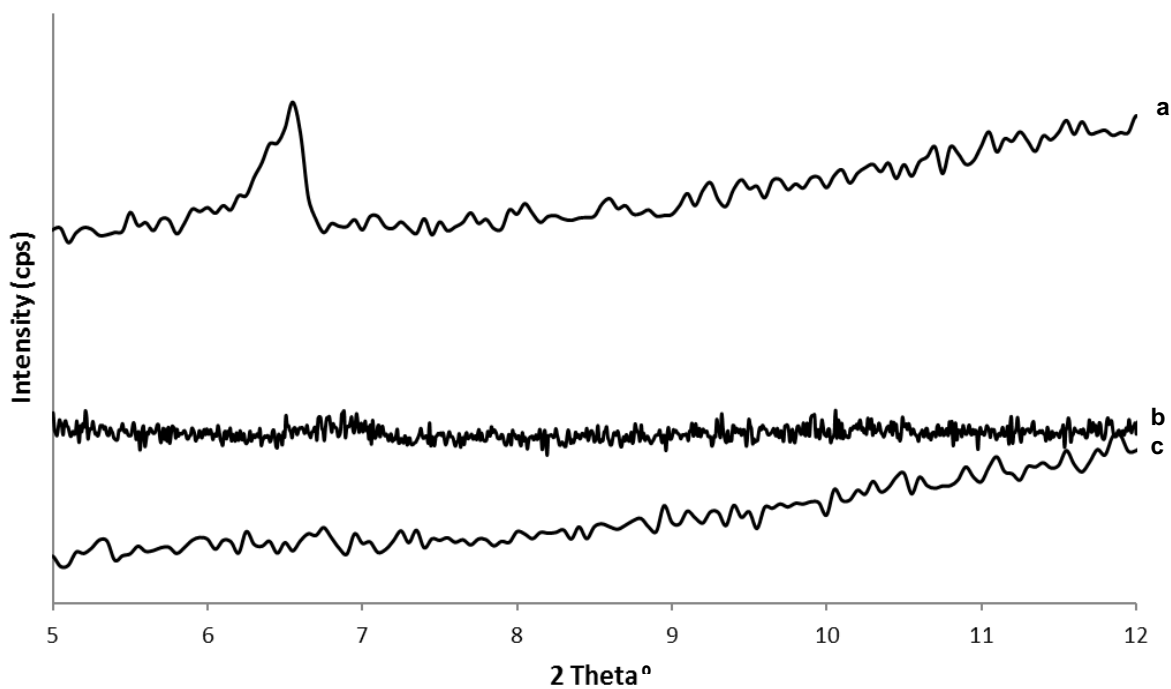


Figura 142. Diffratogrammi di raggi X su polvere della miscela fisica di PEG4000 con 10% di lorazepam (a), lorazepam-PEG4000 10% 55 °C 200 bar al tempo zero (c) e dopo 4 mesi a 4 °C (b).

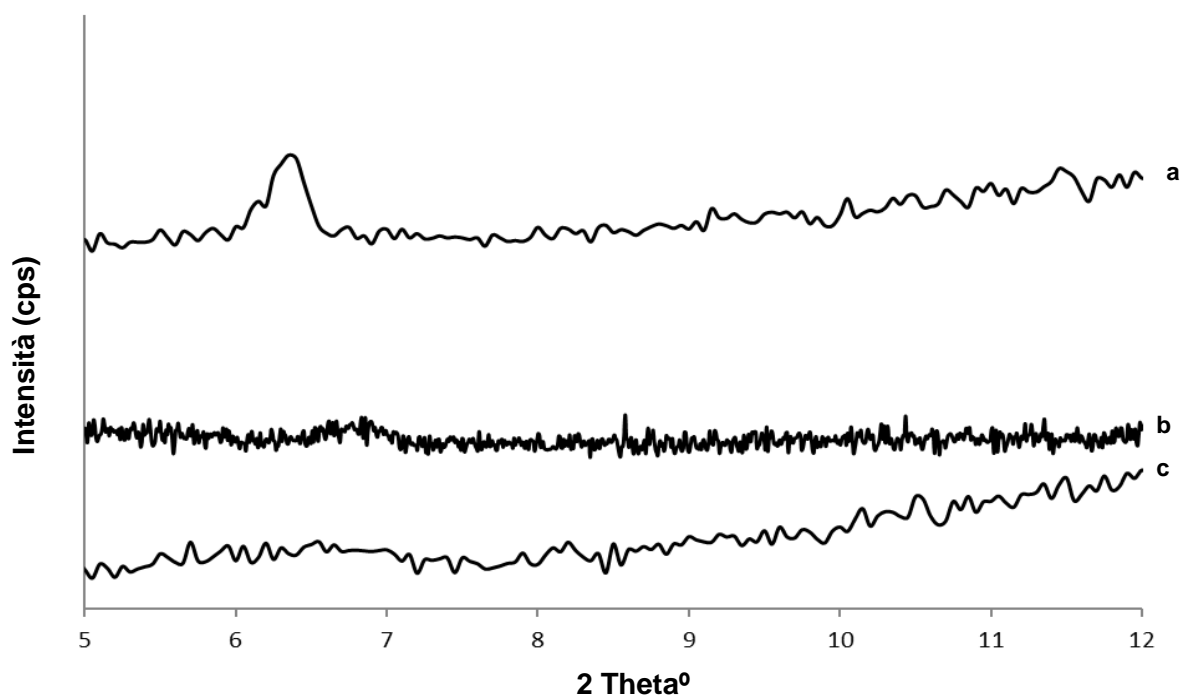


Figura 143. Diffratogrammi di raggi X su polvere della miscela fisica di PEG6000 con 10% di lorazepam (a), lorazepam-PEG6000 10% 55 °C 100 bar al tempo zero (c) e dopo 4 mesi a 4 °C (b).

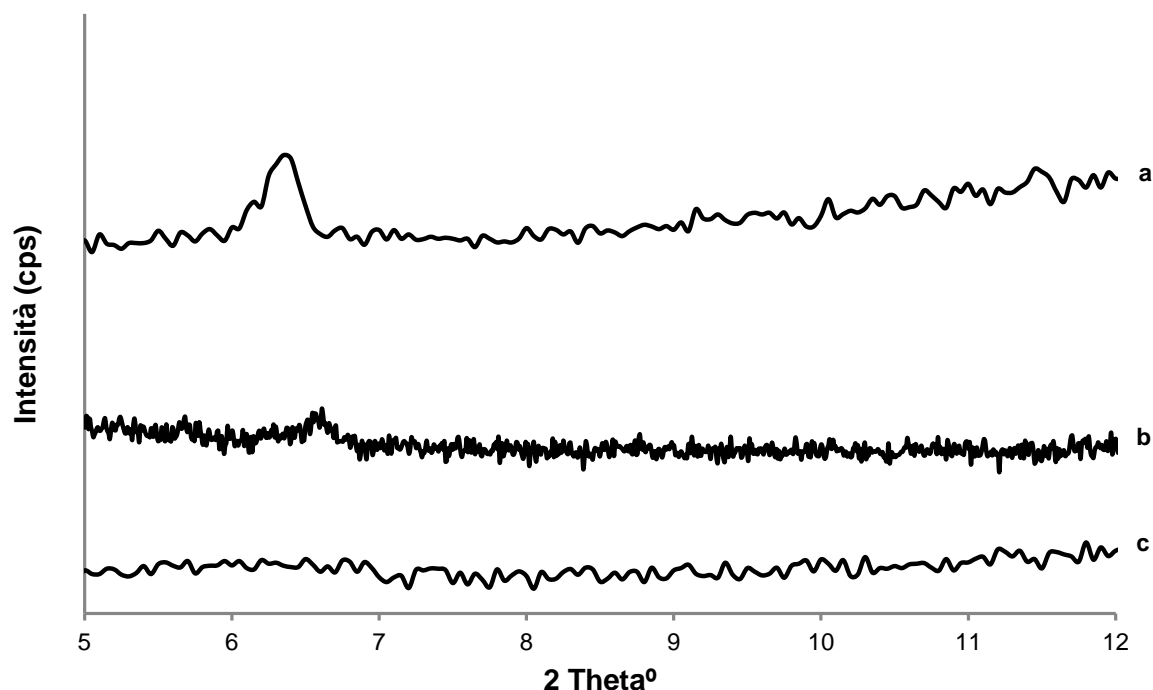


Figura 144. Diffratogrammi di raggi X su polvere della miscela fisica di PEG6000 con 10% di lorazepam **(a)**, lorazepam-PEG6000 10% 55 °C 200 bar al tempo zero **(c)** e dopo 4 mesi a 4 °C **(b)**.

Dai seguenti spettri IR (Figura 145, 146, 147, 148) si può notare come l'interazione col polimero del lorazepam sembra essere più marcata rispetto a quella tra polimero e diazepam in quanto nelle dispersioni contenenti lorazepam il picco preso in considerazione, sempre riconducibile allo stretching del carbonile amidico del farmaco, cambia forma e questo avviene in tutte le concentrazioni e condizioni di pressione valutate.

Questa ipotesi trova giustificazione dalla struttura chimica del lorazepam, in quanto rispetto al diazepam esso presenta siti non solo accettori di legami a idrogeno ma anche donatori. Di conseguenza è possibile una maggiore formazione di interazioni con i gruppi non solo ossidrilici ma anche eteri dei polietilenglicoli.

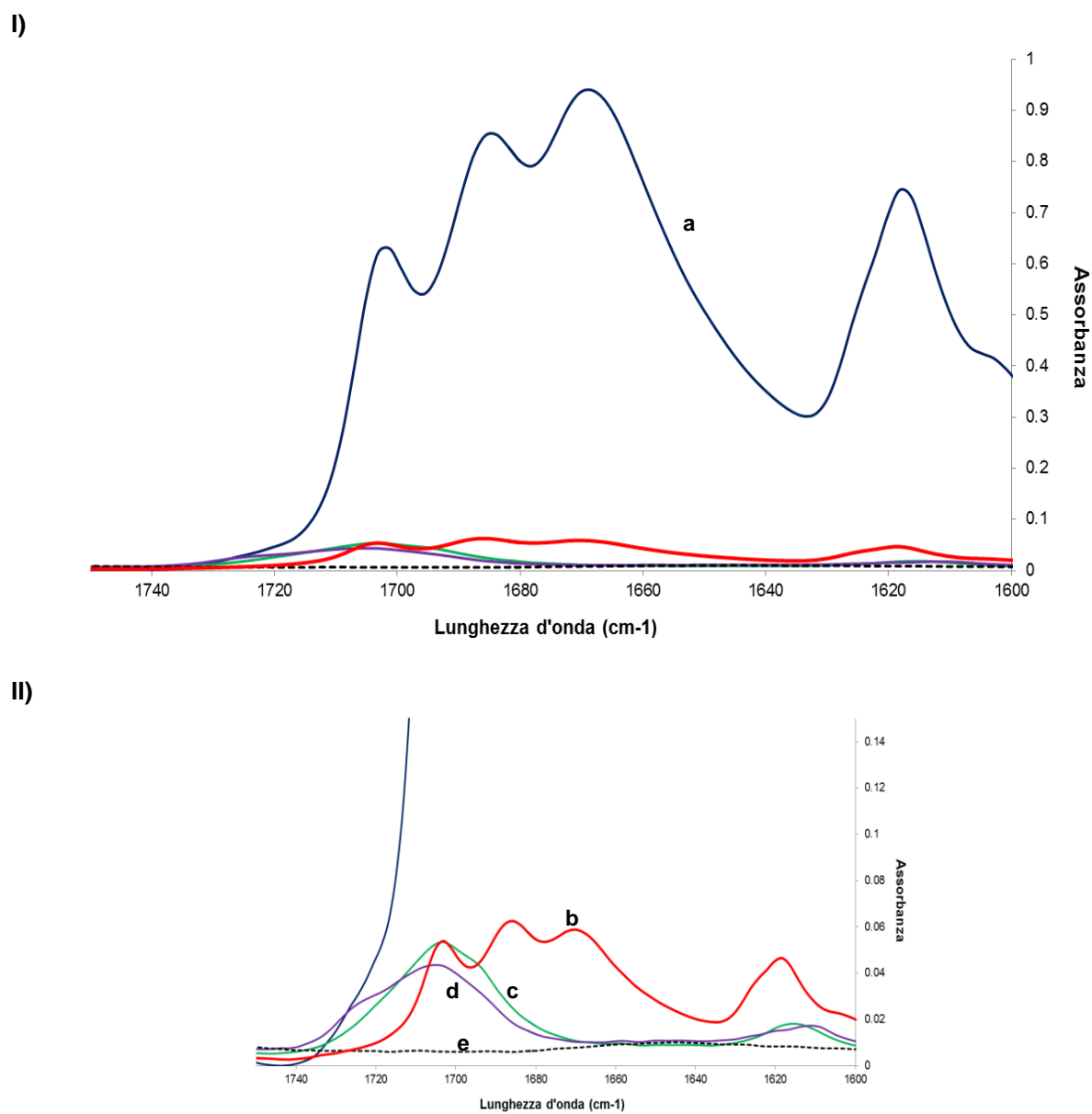


Figura 145. I. Spettro ATR-IR di lorazepam cristallino (a), PEG 4000 (e), miscela fisica 5% lorazepam-PEG 4000 (b), Izipeg4000 5% 55 °C 100 bar (c) e 200 bar (d) preparate con PGSS. II. Zoom della regione tra 1750 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} .

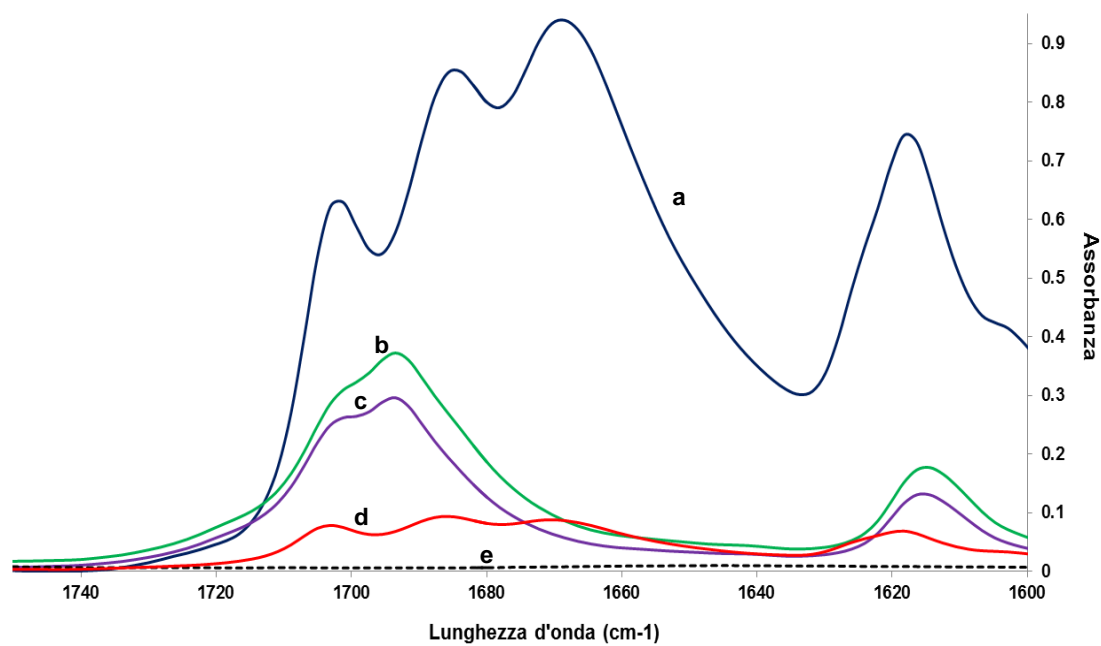


Figura 146. Spettro ATR-IR di lorazepam cristallino (a), PEG 4000 (e) miscela fisica 10% lorazepam-PEG 4000 (d), lorazepam-PEG4000 10% 55 °C 100 bar (b) e 200 bar (c) preparato con PGSS.

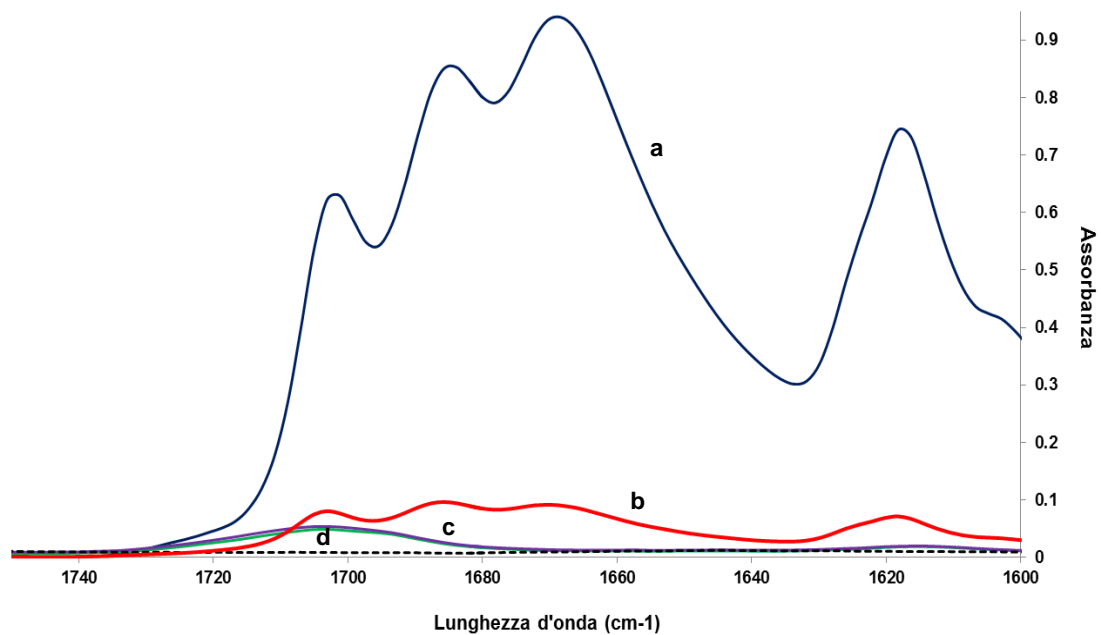


Figura 147. Spettro ATR-IR di lorazepam cristallino (a), PEG 6000 (linea tratteggiata) miscela fisica 5% lorazepam-PEG 6000 (b), lpeg6000 5% 55 °C 100 bar (d) e 200 bar (c) preparata con PGSS.

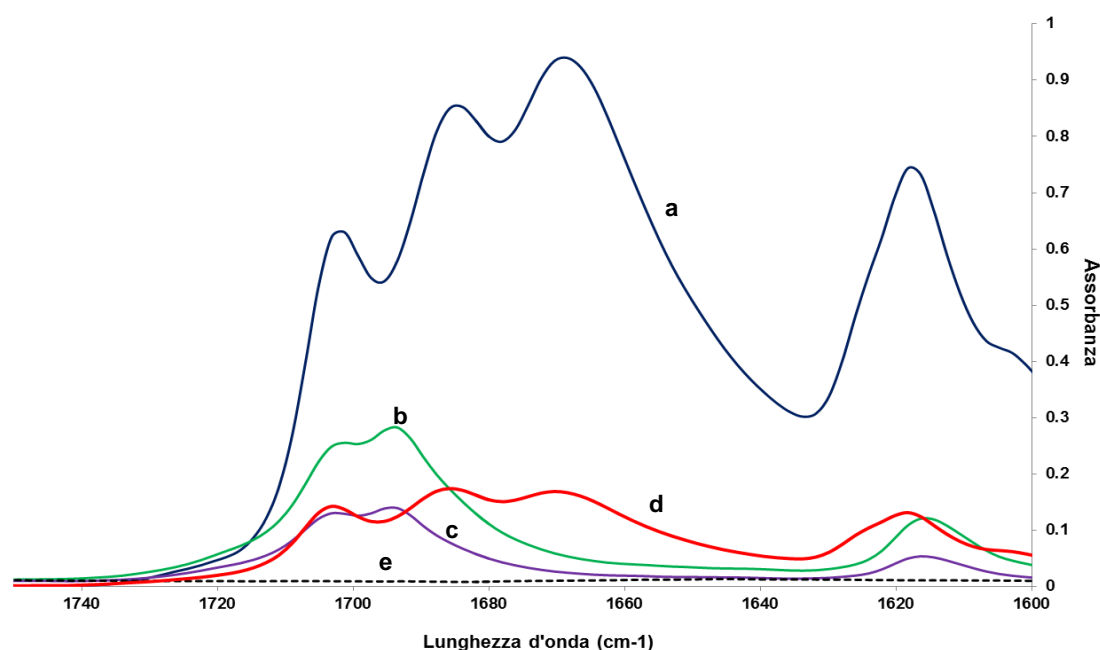


Figura 148. Spettro ATR-IR di lorazepam cristallino **(a)**, PEG 6000 **(e)**, miscela fisica 10% lorazepam-PEG 6000 **(d)**, lorazepam-PEG6000 10% 55 °C 100 bar **(b)** e 200 bar **(c)** preparate con PGSS.

4.9.2.3 Studi di dissoluzione

Nel caso delle dispersioni preparate con la tecnica della PGSS ed una concentrazione di lorazepam del 5 % o 10 % p/p ed entrambi i PEG si evidenzia sempre un netto miglioramento della velocità di dissoluzione rispetto sia la miscela fisica che il farmaco tal quale. In particolare, nel caso delle dispersioni solide si è raggiunta una percentuale di dissoluzione del 67 % ad eccezione della dispersione preparata con PEG 6000 al 10 % p/p in lorazepam che si ferma al 61 %.

In questo caso non è stato possibile confrontare questi profili di dissoluzione con quelli di dispersioni ottenute con la tecnica della fusione né col farmaco amorfo proprio per la scarsa stabilità del lorazepam soprattutto alla temperatura.

Come per il diazepam la semplice presenza del polietilenglicole porta ad un aumento dei profili di dissoluzione delle dispersioni e delle miscele fisiche rispetto al farmaco tal quale confermando le proprietà bagnanti del polimero ma in questo caso sembrano avere un ruolo fondamentale anche le interazioni che si formano tra farmaco e polimero, questo è dimostrato dal miglioramento dei profili di dissoluzione delle dispersioni solide rispetto alle miscele fisiche.

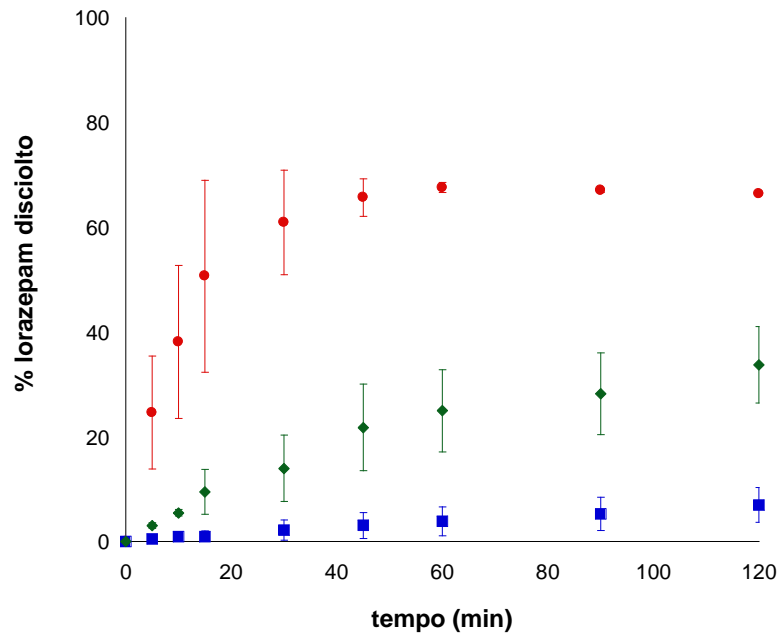


Figura 149. Profili di dissoluzione del lorazepam cristallino (quadrato blu), miscela fisica lorazepam-PEG4000 5% (rombo verde), dispersione solida lorazepam-PEG4000 5% ottenuta con PGSS a 55 °C 200 bar (cerchio rosso).

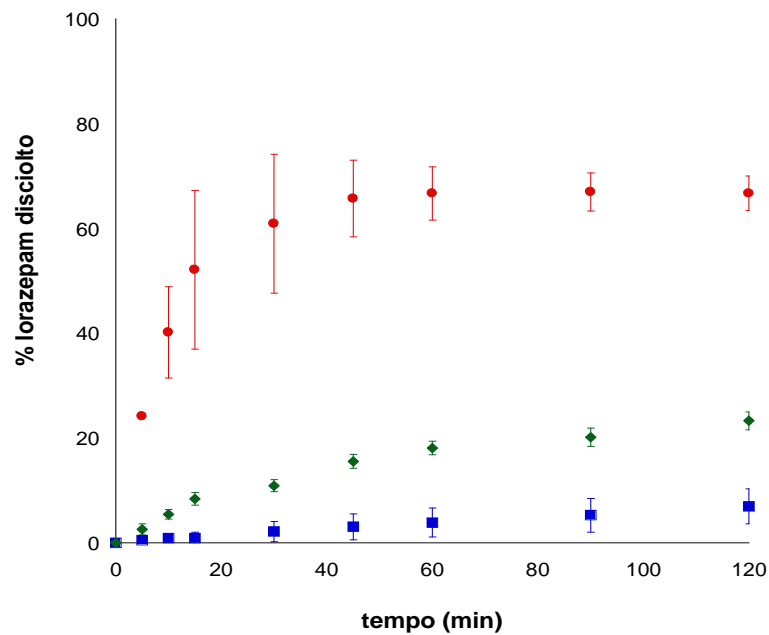


Figura 150. Profili di dissoluzione del lorazepam cristallino (quadrato blu), miscela fisica lorazepam-PEG4000 10% (rombo verde), dispersione solida lorazepam-PEG4000 10% ottenuta con PGSS a 55 °C 200 bar (cerchio rosso).

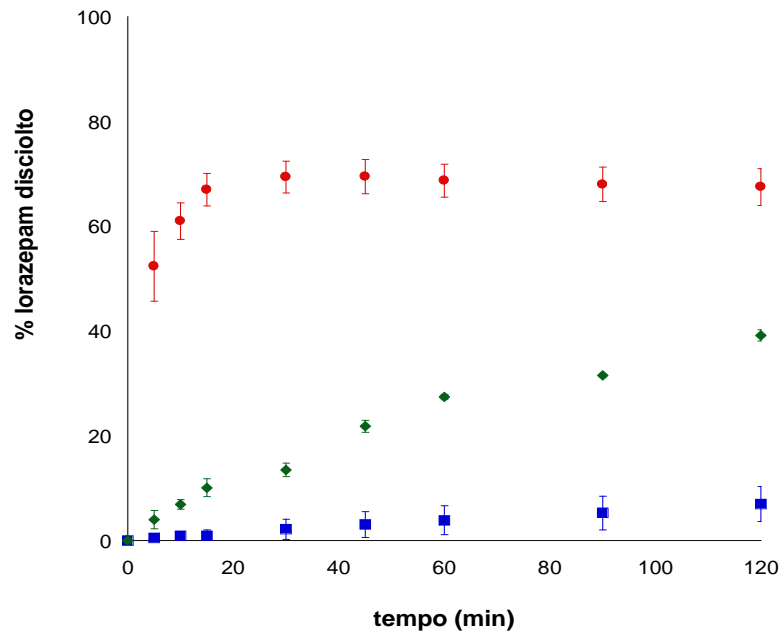


Figura 151. Profili di dissoluzione del lorazepam cristallino (quadrato blu), miscela fisica lorazepam-PEG6000 5% (rombo verde), dispersione solida lorazepam-PEG6000 5% ottenuta con PGSS a 55 °C 200 bar (cerchio rosso).

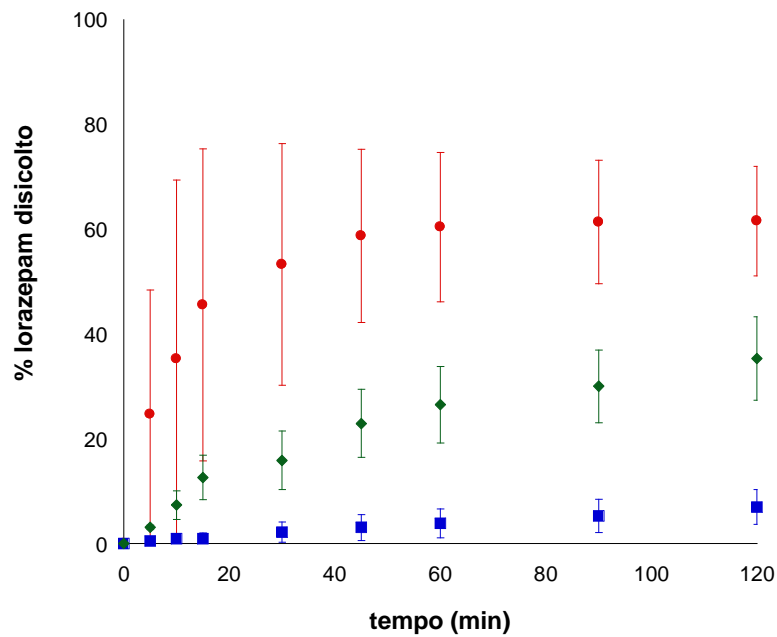


Figura 152. Profili di dissoluzione del lorazepam cristallino (quadrato blu), miscela fisica lorazepam-PEG6000 10% (rombo verde), dispersione solida lorazepam-PEG6000 10% ottenuta con PGSS a 55 °C 200 bar (cerchio rosso).

5. Conclusioni

In questo lavoro sono state preparate dispersioni solide di lorazepam e diazepam utilizzando sia la tecnica classica della fusione che la tecnica PGSS.

I diagrammi di solubilità di fase del diazepam indicano un aumento della solubilità del farmaco proporzionale all'aumento di temperatura ma indipendente dal peso molecolare. I punti di fusione sperimentali coincidono con la liquidus curve predetta dall'equazione di Schröder-Van Laar solo nel caso del sistema diazepam-PEG 1500. Con gli altri due polimeri si osserva un disaccordo tra dato sperimentale e dato teorico che aumenta all'aumentare del peso molecolare del polimero.

La dissoluzione del diazepam nei polimeri può essere sfruttata per preparare dispersioni solide contenenti sino al 50% in peso di farmaco, riscaldando i componenti della miscela a temperature alle quali il principio attivo mantiene la sua integrità chimica. Nel caso di tutti e tre i polietilenglicoli considerati è stato possibile ottenere dispersioni solide in cui il farmaco è risultato essere disperso molecolarmente all'interno di una matrice polimerica cristallina.

Dopo aver seguito il comportamento di queste dispersioni fino ad 1 anno si può concludere che tali dispersioni a 25 °C non hanno presentato ricristallizzazione del farmaco per quanto riguarda le dispersioni preparate con PEG 4000 e 6000, mentre quelle preparate con PEG 1500 hanno evidenziato ricristallizzazione del farmaco dopo un mese probabilmente a causa del basso punto di fusione del polimero e quindi di una maggiore mobilità molecolare del sistema. In condizioni di stabilità accelerata sono risultate stabili e non hanno quindi mostrato picchi di ricristallizzazione del farmaco solo le dispersioni preparate con PEG 6000.

Dall'analisi di dispersioni solide preparate con un contenuto in diazepam inferiore alla saturazione del polimero si è concluso che la cristallinità residua evidenziata nel caso delle dispersioni alla saturazione appena preparate è da ricondursi al polimero piuttosto che al farmaco, come dimostrato dal fatto che al diminuire della percentuale di polimero diminuisce la cristallinità della dispersione.

Nel caso del lorazepam invece non è stato possibile costruire i diagrammi di fase con i dati sperimentali in quanto questo farmaco si dissolve nel PEG indipendentemente dal peso molecolare del polimero, ma decompone progressivamente all'aumentare della temperatura. Per tale ragione non è possibile preparare soluzioni solide con metodi tradizionali; si deve quindi ricorrere a tecniche di preparazione che consentano di utilizzare temperature più basse rispetto a quelle di fusione dei

polimeri.

In questa ottica è stata sfruttata la tecnica PGSS nella quale è stata utilizzata l'anidride carbonica in fase supercritica, che è in grado di determinare una plasticizzazione dei polimeri studiati con significativo abbassamento della loro temperatura di fusione.

La PGSS si è dimostrata una tecnica utile per la preparazione di dispersioni solide in cui il farmaco, diazepam o lorazepam, è disperso molecolarmente all'interno di una matrice polimerica cristallina, rappresentata da PEG 4000 o PEG 6000.

Queste dispersioni sono però risultate essere stabili solo nel caso del diazepam e del lorazepam alla concentrazione minore, ossia il 5% p/p.

E' stata evidenziata anche la formazione di un'interazione tra il farmaco ed il polimero, più marcata nel caso del lorazepam rispetto al diazepam. Questa differenza è attribuibile alla stessa struttura chimica dei due farmaci; il diazepam presenta infatti solo siti accettori di legami idrogeno e può quindi interagire solo coi gruppi ossidrilici del polimero, il lorazepam invece presentando sia gruppi accettori che donatori di legami idrogeno è in grado di dare interazioni sia coi gruppi ossidrilici che eteri dei polietilenglicoli.

Infine, le dispersioni solide contenenti diazepam e preparate con la PGSS sono risultate essere, in termini di profilo di dissoluzione, nella maggior parte dei casi equivalenti a quelle preparate con la tradizionale tecnica della fusione. L'incremento dei profili di dissoluzione del diazepam formulato con entrambi i polietilenglicoli rispetto al diazepam cristallino o amorfo, insieme all'equivalenza dei profili di dissoluzione delle dispersioni preparate con le diverse tecniche, indica che il fattore determinante è la presenza del polimero piuttosto che una modificazione dello stato solido del farmaco

La tecnica PGSS è risultata invece essere particolarmente utile nel caso del lorazepam, per il quale non si possono preparare dispersioni solide con il tradizionale metodo della fusione senza portare ad una degradazione del farmaco stesso. Come per il diazepam la semplice presenza del polimero porta ad un aumento dei profili di dissoluzione delle dispersioni rispetto al lorazepam tal quale ma sembra essere significativa anche la formazione di interazioni tra farmaco e polimero, in questo caso infatti il profilo di dissoluzione risulta essere ulteriormente aumentato rispetto alla miscela fisica.

Bibliografia

1. Martindale, *Martindale: The Complete Drug Reference, 33th Edition* ed. P. Press. 2002, London: Pharmaceutical Press.
2. Bredenberg S., D.M., Lennernas B., Lennernas H., Pettersson A., Westberg M., Nystrom C., *In vitro and in vivo evaluation of a new sublingual tablet system for rapid oromucosal absorption using fentanyl citrate as the active substance*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2003. **20**: p. 327-334.
3. Moffat A.C., *Absorption of drugs through the oral mucosa*. Top. Med. Chem., 1971. **4**: p. 21-29.
4. Leuner, C., Dressman, J., *Improving drug solubility for oral delivery using solid dispersions*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000. **50**: p. 47-60.
5. O' Driscoll C.M., G.B.T., *Biopharmaceutical challenges associated with drugs low aqueous solubility-The potential impact of lipid-based formulations*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008. **60**: p. 617-624.
6. Amidon, G.L., Lennernas, H., Shah, V.P., Crison, J.R., *A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability*. Pharm.Res., 1995. **12**: p. 413-420.
7. Cussler E.L., *Diffusion: Mass transfer in fluid system*. Third Edition ed, New York: Cambridge University Press.
8. Ramirez E., L.O., Guerra P., Duque B., Mosquera B., Borobia A.M., Lei S.H., Carcas A.J., Frias J., *Acceptability and characteristics of 124 human bioequivalence studies with active substances classified according to the Biopharmaceutic Classification System*. British Journal of Clinical Pharmacology, 2010. **70**(5): p. 694-702.
9. Wilson W.I, P.Y., Augsburger L.L., *Comparison of statistical analysis and Bayesian Networks in the evaluation of dissolution performance of BCS Class II model drugs*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. **94**: p. 2764-2776.
10. Noyes, A.A. and W.R. Whitney, *The rate of solution of solid substances in their own solutions*. J. Am. Chem. Soc. , 1897. **19** p. 930-934.
11. Nernst, W., *Theory of reaction velocity in heterogeneous systems*. Z. Phys. Chem., 1904. **47**: p. 52-55.
12. Zhang G.C.Z., L.D., Schmitt E.A., Qiu Y., *Phase transformation considerations during process development and manufacture of solid oral dosage forms*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2004. **56**: p. 371-390.
13. Li P., Z.L., *Developing early formulations: practice and perspective*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. **341**: p. 1-19.
14. Moore M.D., W.P.L.D., *Aqueous solubility enhancement through engineering of binary solid composites: Pharmaceutical applications*. J Pharm Innov, 2009. **4**: p. 36-49.
15. Chiou W.L., R.S., *Pharmaceutical applications of solid dispersion systems*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1971. **60**: p. 1281-1301.
16. Craig, D.Q.M., *The mechanisms of drug release from solid dispersions in water-soluble polymers*. International Journal of Pharmaceutics 2002. **231**: p. 131-144.
17. Sekiguchi, K., obi, N., *Studies on absorption of eutectic mixtures. I.A comparison of the behavior eutectic mixtures of sulphathiazole and that of ordinary sulphathiazole in man*. Chem.Pharm.Bull., 1961. **9**: p. 866-872.
18. Goldberg, A.H., Gibaldi, M., Kanig, J.L., *Increasing dissolution rates and gastrointestinal absorption of drugs via solid solutions and eutectic mixtures II- experimental evaluation of a eutectic mixture: urea-acetaminophen system*. J.Pharm.Sci., 1966. **55**: p. 482-487.
19. Goldberg, A.H., Gibaldi, M., Kanig, J.L., *Increasing dissolution rates and gastrointestinal absorption of drugs via solid solutions and eutectic mixtures I- theoretical considerations and discussion of the literature*. J.Pharm.Sci., 1965. **54**: p. 1145-1148.
20. Betageri, G.V., Makarla, K.R., *Enhancement of dissolution of glyburide by solid dispersion and lyophilization techniques*. international Journal of Pharmaceutics, 1995. **126**: p. 155-160.
21. Shah J.C., C., J.R., Chow, D., *Preformulation study of etoposide. 2. Increased solubility and dissolution rate by solid-solid dispersions*. International Journal of Pharmaceutics, 1995. **113**: p. 103-111.
22. Ford J.L., S.A.F., Dubois, J.L. , *The properties of solid dispersions of indomethacinor phenylbutazone in polyethylene glycol*. International Journal of Pharmaceutics, 1986. **28**: p. 11-22.

23. Mura P., F.M.T., Manderioli, A., Bramanti,G., Parrini,P., *Thermal behavior and dissolution properties of naproxen from binary and ternary solid dispersions*. Drug Dev. Ind. Pharm. , 1999. **25**: p. 257-264.
24. Forster, A., Hempenstall, J., Rades, T., , *Characterisation of glass solutions of poorly-soluble drugs produced by melt extrusion with hydrophilic amorphous polymers*. J.Pharm. Pharmacol., 2001. **53**: p. 57-66.
25. Matsumoto, T. and G. Zografi, *Physical properties of solid molecular dispersions of indomethacin with poly(vinylpyrrolidone) and poly(vinylpyrrolidone-co-vinyl-acetate) in relation to indomethacin crystallization*. Pharm Res, 1999. **16**(11): p. 1722-8.
26. Van den Mooter G., A.P., Kinget R., , *Stability prediction of amorphous benzodiazepines by calculation of the mean relaxation time constant using the Williams - Watts decay function*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1999. **48**: p. 43-48.
27. Tachibana T., N.A., *A method for preparing an aqueous colloidal dispersion of organic materials by using water-soluble polymers: dispersion of beta-carotene by polyvinylpyrrolidone*. Colloid. Polym. Sci., 1965. **203**: p. 130-133.
28. Perrut M., J.J., Leboeuf F., , *Enhancement of dissolution rate of poorly soluble active ingredients by supercritical fluid processe. Part II: Preparation of composite particles*. International Journal of Pharmaceutics, 2005. **288**: p. 11-16.
29. Jung, J. and M. Perrut, *Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey*. J. Supercrit. Fluids 2001. **20**: p. 179-219.
30. Pasquali, I., Bettini, R., *Are pharmaceuticals really going supercritical?* International Journal of Pharmaceutics, 2008. **364**: p. 176-187.
31. Kazarian, S.G., *Polymer processing with supercritical fluids*. Polym. Sci. Ser. C 2000. **42**: p. 78-101.
32. Kazarian, S.G., *Polymers and supercritical fluids: opportunities for vibrational spectroscopy*. Macromol. Symp. , 2002. **184**: p. 215-228.
33. Katzung, B.G., *Farmacologia generale e clinica*. V ed. 2003, Padova: Piccin Nuova Libreria, S.p.A.
34. Masse J., C.A., De Maury G., Terol A., *Etude thermoanalytique de substances psychotropes. IV Lorazepam et oxazepam*. Thermochimica Acta, 1985. **96**: p. 189-206.
35. Kibbe, A.H., *Handbook of pharmaceutical excipients*. Third ed. 2000, London: Pharm. Press. 392-398.
36. Fruijtier-Pölloth, C., *Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivates as used in cosmetic products*. Toxicology, 2005. **214**: p. 1-38.
37. Gref, R., et al., *The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres*. Adv. drug del. rev., 1995. **16**: p. 215-233.
38. Gref, R. *Pegylated polymers for "stealth" nanoparticles*. in *New trends in polymers for oral and parenteral administration from design to receptors*. 2001. Paris.
39. Brunner, G., *Gas Extraction*. 1994, New York: Steinkopff Darmstadt Springer. 6.
40. Cagniard de LaTour C., *The hydrodynamic properties of an SCF also lie between those of a liquid and a gas*. Ann.Chim.Phys, 1822. **21**p. 127-178.
41. Perrut, M., *Supercritical fluid applications in materials science*. Curr. Opin. Solid State Mater Sci., 2003. **7**: p. 319.
42. Perrut, M., *Supercritical fluid applications: industrial development and economic issue*. Ind. Eng. Chem. Res., 2000. **39**: p. 4531-4535.
43. Gosselin, P., et al., *Physicochemical evaluation of carbamazepine microparticles produced by the rapid expansion of supercritical solutions and by spray-drying*. Pharm Dev Technol, 2003. **8**(1): p. 11-20.
44. Kayrak, D., U. Akman, and Ö. Hortaçsu, *Micronisation of ibuprofen by RESS*. J. Supercrit. Fluids 2003. **26**: p. 17-31.
45. Phillips, E.M. and V.J. Stella, *Rapid Expansion from supercritical solutions: application to pharmaceutical processes*. Int. J. Pharm. , 1993. **94**: p. 1-10.
46. Meziani, M.J., et al., *Nanoparticle formation in rapid expansion of water-in-supercritical carbon dioxide microemulsion into liquid solution*. J. Supercrit. Fluids 2005. **34**: p. 91-97.
47. Gallagher, P.M., et al., *Gas antisolvent recrystallization: new process to recrystillize compounds insoluble in supercritical fluids*. ACS Symposium Series 406, ed. E. Penniger JML. 1989, Washington, DC: American chemical society. 334-354.
48. Bristow, S., et al., *Analysis of the supersaturation and precipitation process with supercritical CO₂*. J. Supercrit. Fluids 2001. **21**: p. 257-271.
49. Hannay, J.B. and J. Hogarth, *On the solubility of solids in gases*. Proc. Roy Soc., 1879. **29**: p. 324-327.

50. Charbit, G., E. Badens, and O. Boutin, *Methods of particle production*, in: *Supercritical fluid technology for drug product development*. Marcel Dekker, Inc ed. 2004, New York,: P. York, U.B. Kompella, B.Y. Shekunov
51. Hanna M., Y.P., *WO 95/01221*. 1995.
52. Graser, F. and G. Wickenhaeuser, *Conditioning of finely divided crude organic pigments*. 1982.
53. Pasquali, I., et al., *Swelling, melting point reduction, and solubility of PEG 1500 in supercritical CO₂*. *Int J Pharm*, 2008. **356**(1-2): p. 76-81.
54. Nalawade, S.P., F. Picchioni, and L.P.B.M. Janssen, *Supercritical carbon dioxide as a green solvent for processing polymer melts: processing aspects and application*. *Prog. Polym. Sci.*, 2006. **31**: p. 19-43.
55. Kerc J., S.S., Knez Z., Senčar-Božič P., *Micronization of drugs using supercritical carbon dioxide*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1999. **182**(1): p. 33-39.
56. Hao, J., et al., *Supercritical fluid assisted melting of poly(ethylene glycol): a new solvent-free route to microparticles* *J.Mater.Chem.*, 2005: p. 1148-1153.
57. Ventosa, N., S. Sala, and J. Veciana, *Depressurization of an expanded liquid organic solution (DELOS): a new procedure for obtaining submicron- or micron-sized crystalline particles*. *Cryst. Growth Des.*, 2001. **1**: p. 299-303.
58. Ventosa, N., S. Sala, and J. Veciana, *DELOS process: a crystallization technique using compressed fluids 1. Comparison to the GAS crystallization method*. *J. Supercrit. Fluids* 2003. **26**: p. 33-45.
59. Weidner, E., et al., *Manufacture of powder coatings by spraying of gas-enriched melts*. *Chem. Eng. Technol.*, 2001. **24**: p. 529-533.
60. Sievers, R.E., Karst U., *Methods and apparatus for fine particle production*. 1997, Board of Regents of University of Colorado.
61. Reverchôn, E., *Supercritical-assisted atomization to produce micro- and/or nano particles of controlled size and distribution*. 2002. **41**: p. 2405-2411.
62. Pasquali, I., R. Bettini, and F. Giordano, *Supercritical fluid technologies: an innovative approach for the manipulation of the solid-state of pharmaceuticals*. *Adv. drug del. rev.*, 2008. **60**: p. 399-410.
63. Eggers, R. and P. Jaeger, *interfacial phenomena in countercurrent and spray processing using supercritical fluids*, in: *G.Brunner (Ed) Supercritical fluids as solvents and reaction media*, *Steinkopff Darmstadt Springer, New York, USA*. 2004: p. 363-377.
64. Shekunov, B.Y., M. Hanna, and P. York, *Crystallization process in turbulent supercritical flows*, *J. Cryst. Growth*, 1999. **198/199** p. 1345-1351.
65. Werling, J.O. and P.G. Debenedetti, *Numerical modelling of mass transfer in the supercritical antisolvent process*. *J. Supercrit. Fluids*, 1999. **16** p. 167-181.
66. Baldwin, D.F.S., M. and N.P. Suh, *The role of gas dissolution and induced crystallization during microcellular polymer processing: a study of poly(ethylene terephthalate) and carbon dioxide systems*. *J. Eng. Mat. Technol.*, 1995. **117**: p. 62-74.
67. Mooney, D.J., et al., *Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents*. *Biomaterials*, 1996. **17**(14): p. 1417-22.
68. Park, C.B., *Effect of the pressure drop rate on cell nucleation in continuous processing of microcellular polymers*. *Polym. Eng. Sci.*, 1995. **35**: p. 432-440.
69. Van Krevelen, D.W., *Properties of polymers*. 1976: p. 403-425.
70. Sprokel, O.L., Sen, M.H., Shivanand, P., Prapaitrakul, W., *A melt-extrusion process for manufacturing matrix drug delivery systems*, in *International Journal of Pharmaceutics*. 1997 p. 191-199.
71. Zhang, F., McGinity, J.W., *Properties of hot-melt extruded theophylline tablets containing poly(vinyl acetate)*. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2000. **26**: p. 931-942
72. Pasquali, I., et al., *Measurement of CO₂ sorption and PEG 1500 swelling by ATR-IR spectroscopy*. *J. Supercrit. Fluids*, 2008. **45**: p. 384-390.
73. Pasquali I., *Microparticulate drug delivery systems based on hydrophilic polymers obtained with a supercritical CO₂ process*, in *Pharmaceutical Department*. 2008, University of Parma: Parma. p. 145.
74. Emea, *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology- Note for guidance on validation of analytical procedures*, in *ICH Topic Q2 (R1)*, Emea, Editor. 1995. p. 1-15.
75. Hearn G.M., *A guide to validation in HPLC*, Perkin Elmer.
76. Santi C., *Spettroscopia UV e visibile*, in *Appunti di metodi fisici in chimica organica*, d. universitaria, Editor. 2010: Perugia. p. 18-51.

77. Kao J.Y., M.C.M., Graeser K.A., Rades T., Gordon K.C., *Measurement of amorphous indomethacin stability with NIR and Raman spectroscopy*. *Vibrational Spectroscopy*, 2012. **58**: p. 19-26.
78. Shieh Y.T., Y.H.S., *Morphological changes of polycaprolactone with high-pressure CO₂ treatment*. *Journal of Supercritical Fluids*, 2005. **33**: p. 183-192.
79. Weidner, E., et al., *Phase equilibrium (solid-liquid-gas) in polyethylenglicol-carbon dioxide systems*. *J. Supercrit. Fluids* 1997. **10**: p. 139-147.
80. Lian, Z., et al., *Carbon dioxide-induced melting point depression of biodegradable semicrystalline polymers* *J. Supercrit. Fluids* 2006. **39**: p. 107-117.
81. Carstensen, J.T., *Advanced pharmaceuticals solids*, M. Dekker, Editor. 2001: New York.
82. Nicoli S., B.S., Santi P., Caira M.R., Li J., Bettini R., *Ethyl-Paraben and Nicotinamide mixtures: apparent solubility, thermal behavior and X-ray structure of the 1:1 co-crystal* *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008. **97**: p. 4830-4839.
83. Lin D., H.Y., *A thermal analysis method to predict the complete phase diagram of drug-polymer solid dispersions*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010. **399**: p. 109-115.
84. Law D., K.S.L., Schmitt E.A., Fort J.J., Qiu Y., Wang W., Porter W., *Physicochemical Considerations in the Preparation of Amorphous Ritonavir-Poly(ethylene glycol) 8000 Solid Dispersions*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001. **90**(8): p. 1015-1025.