

3. Materiali

I materiali utilizzati in questo lavoro sono i seguenti:

1. Sodio Alginato (Keltone LVCR, ISP Alginates Ltd, Waterfield, Tadworth, U.K)
lotto 680321.
2. Lattosio (Pharmatose 200M, DMV International, Veghel, Netherlands) lotto
7071/7.
3. Lattosio (Pharmatose DCL11, DMV International, Veghel, Netherlands)
4. Carbossimetilcellulosa (Avicel PH 102, FMC Biopolymes, Wallingstone, Irland)
lotto 7314 C.
5. Opadry II red (Colorcon Asia Pacific Pvt.Ltd, Singapore) lotto THL005845
6. HPMC K100M (Methocel[®] K100M Premium, Colorcon, Gallarate, Italia)
7. HPMC K15M (Methocel[®] K15M Premium, Colorcon, Gallarate, Italia)
8. HCl 37% (Carlo Erba, Milano, Italia)
9. KH₂PO₄ (Riedel-de Haen, Hannover, Germania) lotto 62570
10. Magnesio Stearato (Acef, Fiorenzuola, Italia) lotto C1402005
11. Calcio Fosfato F.U.
12. Talco (Acef, Fiorenzuola, Italia) lotto C5239004
13. TechneScan[®] HDP Tc 99m (Mallinckrodt, St. Louis, MO, USA)
14. Soluzione di Tecnezio (Mallinckrodt, St. Louis, MO, USA)
15. Soluzione di Gallio (Mallinckrodt, St. Louis, MO, USA)
16. Acetontrile (Carlo Erba, Milano, Italia) lotto 412412
17. Metanolo (VWR International, Milano, Italia) lotto 0873582

18. Explotab (JRS Pharma, Rosenberg, Germania) lotto 4111044052
19. Polivinilpirrolidone reticolato (Kollidon CL[®],BASF, Cesano Maderno, Milano, Italia) lotto 42367236WO
20. Lattosio/polivinilpirrolidone 96.5%/3.5% (Ludipress[®] ,BASF, Cesano Maderno, Milano, Italia) lotto 68-0845
21. Polivinilpirrolidone (Plasdone[®] K29-32 (ISP, Wayne, NJ, USA)
22. Ossido di ferro giallo F.U
23. Amido F.U.
24. Calciodiidrogenofosfato diidrato (Emcompress[®], JRS Pharma, Rosenberg, Germania) lotto F17G
25. Sodio Dedocil Solfato (Fluka) lotto1405478
26. Cloruro di sodio (Acef, Fiorenzuola, Italia) lotto B1336001

Tutti i materiali utilizzati sono di grado analitico.

4. Metodi

4.1 Granulazione in High Shear Mixer

La produzione di granulati è stata condotta utilizzando un vertical high shear mixer Collette Micrograll 10 (Niropharma system GEA, Wommelgem, Belgium) (Figura 7). Esso consiste in una camera di granulazione in cui la polvere viene mescolata e addizionata del legante. Lo strumento è dotato di due elementi rotanti chiamati impeller e chopper. La funzione del primo è quella di mescolare la polvere mentre la cui funzione del chopper è di ridurre, grazie alle lame presenti su di esso, i grumi che si formano durante l'aggiunta della soluzione legante. Durante il processo di granulazione la soluzione granulante viene pompata nella camera di granulazione attraverso una pompa peristaltica a velocità costante.

Durante la produzione dei granulati, la velocità degli elementi rotanti come anche la velocità di aggiunta della soluzione granulante sono visualizzati su un monitor e registrati in tempo reale da un computer collegato allo strumento. Altro parametro che viene monitorato e registrato dal computer è il valore di forza di coppia (torque) che viene abitualmente utilizzato come indice di end point del processo di granulazione.



Figura 7. Collette Micrograll 10 (Niropharma system GEA, Wommelgem, Belgium)

4.1.1 Schema operativo del processo di granulazione

I granuli sono stati ottenuti mescolando ad alta velocità la polvere e aggiungendo ad essa la soluzione granulante che in questo caso era costruita da acqua distillata. La fine del processo di granulazione corrispondeva al momento in cui tutta la soluzione legante veniva sgocciolata, in tale momento veniva fermata la granulazione e i granuli venivano raccolti con l'utilizzo di una spatola. In seguito i granuli erano setacciati manualmente attraverso un setaccio con apertura di 2 mm, tutti i granuli al di sotto di tale dimensione venivano posti in stufa per 24 ore a 60°C, mentre i restanti erano considerati grumi (lumps).

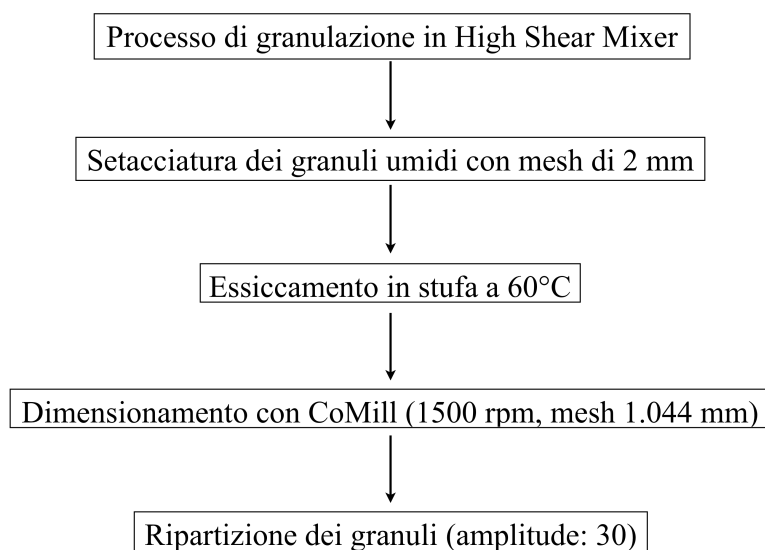


Figura 8. Diagramma dello schema produttivo dei granulati

In seguito all'essiccamento in stufa i granulati erano ridimensionati utilizzando un mulino ad alta velocità Quadro Comill (Quadro Engineering, Waterloo, Canada) con una maglia con apertura di 1.049 mm. Al fine di suddividere in frazioni omogenee i

granulati, ciascun lotto fabbricato fu ripartito in otto frazioni utilizzando un ripartitore Sample divider PT 100 (Retsch GmbH, Haan, Germania); le frazioni ottenute furono impiegate per i test di caratterizzazione.

4.1.2. Determinazione della resa del processo di granulazione

La resa del processo di granulazione è stato calcolato come percentuale in peso dei granuli essiccati aventi dimensioni inferiori a 2 mm , rispetto al peso totale della miscela (tabella 1).

Tabella 1. Formulazione usata per la fabbricazione dei granuli

	Quantità (g)	Parti (%)
Pharmatose DCL11	66	33
Avicel PH102	68	34
Keltone LVCR	66	33
Totale	200	100

I differenti lotti di granuli prodotti furono pesati e la resa valutata secondo la seguente equazione:

Equation 1

$$resa = \frac{W_M}{W_G} * 100$$

dove W_M sta per il peso della miscela da granulare e W_M è il peso del granulato secco pesato dopo essere stato mantenuto a 60°C per 24 ore.

4.1.3. Friabilità dei granuli

La determinazione della friabilità dei granuli è stata condotta analizzando per ciascun lotto di granulato un campione rappresentativo. Quest'ultimo è stato setacciato con la seguente sequenza di setacci: 1.0mm, 710 μ m, 500 μ m e 355 μ m; le frazioni separate sono state pesate ed è stata calcolata la dimensione media dei granuli (D_{50}). Tale operazione è stata eseguita prima e dopo il test di friabilità. Quest'ultimo è stato condotto ponendo un campione di granulato in un friabilometro (TA 20, Erweka, Henseinstann, Germania) con 25 biglie di acciaio (cad. $\varnothing=10$ mm, peso=1 gr.) a 25 rpm per 30 minuti. La friabilità (F) dei granuli è stata espressa come variazione percentuale della dimensione media dei granuli

Equation 2

$$F = \left(\frac{D_{50}^i - D_{50}^f}{D_{50}^f} \right)$$

dove D_{50}^i rappresenta la dimensione media dei granuli prima che il test di friabilità sia condotto, D_{50}^f rappresenta la dimensione media dei granuli dopo aver effettuato il test di friabilità.

4.2. Granulazione in mortaio

I granulati per la fabbricazione dei moduli a rilascio controllato di Clindamicina sono stati preparati a partire da una miscela costituita dal principio attivo e dal polimero (HPMC K100M). I due componenti sono miscelati secondo diluizioni geometriche in un mortaio. Successivamente sono stati sgocciolati 3ml di soluzione legante EtOH/H₂O 50:50 al 10% di polivinilpirrolidone (Kollidon K30) fino ad ottenere un impasto il quale è stato passato in un granulatore a braccio oscillante (ERWEKA AR400 D, Düsseldorf, Germania) dotato di una rete con maglie aventi apertura di 0.5 mm. Il granuli così ottenuti sono stati essiccati in stufa a 45° C per circa 12 ore.

	1 modulo
Clindamicina fosfato	80 mg
HPMC K100 M	30 mg
PVP K25 10% in EtOH:H₂O (50:50)	3ml≈3mg

Tabella 2. Composizione della miscela per la produzione di moduli a rilascio controllato di clindamicina fosfato

4.3. Misure di densità

4.3.1 Densità vera

La densità vera dei granulati è stata determinata usando un picnometro (Pentapycnometer, Quantachrome Instrument, USA). I campioni di granulato prima di essere analizzati sono stati essiccati in una stufa a 110°C per 3 ore e in seguito fatti raffreddare in un cristallizzatore per 24 ore a temperatura ambiente. In seguito i campioni dei

granulati sono stati posti nella apposita cella in cui era insufflato l'elio. L'analisi era condotta in triplicato e il valore di densità vera espressa come valore medio.

4.3.2. Densità apparente e densità all'impaccamento

La densità apparente è stata determinata secondo la procedura riportata in F.U.I. XI Ed. Le densità apparenti di polveri e granulati si ottengono a partire dai volumi apparenti prima e dopo impaccamento. Lo strumento utilizzato, in grado di generare in 1 minuto 250 colpi, è munito di supporto per cilindro graduato da 10 ml opportunamente ancorato ad un sistema di bloccaggio. Dopo aver introdotto nel cilindro 10 ml di granulato si legge il volume apparente V_0 non impaccato. L'apparecchio viene programmato per generare prima 10 e in seguito 500 colpi, i volumi corrispondenti V_{10} , V_{500} vengono confrontati, e se la differenza fra i due volumi è maggiore di 2ml l'apparecchio viene programmato per eseguire un ciclo supplementare di 750 colpi. Le densità apparenti prima e dopo l'impaccamento sono espresse come il rapporto fra il peso del granulato e il volume da esso occupato.:

- ρ_0 densità apparente prima dell'impaccamento : peso/ V_0 (espresso in grammi per millilitro)
- ρ_i densità apparente dopo l'impaccamento : peso/ V_{1250} (espresso in grammi per millilitro).

Le misure di densità apparente e densità apparente dopo l'impaccamento sono state utilizzate per determinare le proprietà di scorrevolezza dei granulati. Tale proprietà è stata espressa calcolando due indici:

Hausner Ratio (HR):

Equation 3

$$HR = \frac{\rho_i}{\rho_v}$$

Indice di Carr (CI):

Equation 4

$$CI = \left(\frac{(\rho_i - \rho_0)}{\rho_0} \right) * 100$$

Un indice di Carr inferiore a 15 così come un valore di Hausner ratio inferiore a 1.2 indicano ottime proprietà di scorrevolezza delle polveri.

4.4 Analisi dimensionale del granulato

L'analisi dimensionale è stata effettuata mediante setacci, con apertura di maglia 1000 μm , 710 μm , 500 μm , 355 μm . Prima di iniziare l'analisi ogni setaccio è stato accuratamente pesato. Un campione di rappresentativo per ogni lotto di granulato era posto sulla pila dei setacci e sottoposto alla vibrazione sul vibrovaglio (Fritsch, Germania) per 10 minuti ad una oscillazione di 1mm. In seguito tutti i setacci furono nuovamente pesati e la quantità di granulato per ogni frazione dimensionale è espressa come frazione percentuale rispetto al peso del granulato analizzato.

4.5. Misura umidità residua

La misura di umidità residua è stata eseguita in triplicato con l'apparecchio TitroMatic Karl Fischer (CRISON INSTRUMENTS, S.A., Barcellona, Spagna).

Questo strumento effettua una titolazione volumetrica sulla quantità di acqua contenuta nel campione utilizzando come soluzione titolante HYDRANAL® - Composite 5 (Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland).

4.6 Miscelazione dei componenti

Per tutte le formulazioni utilizzate, i componenti di ogni formulazione sono stati miscelati in Turbula (WAB, Basilea, Svizzera) per circa 30 minuti.

4.7 Produzione tramite compressione dei moduli Dome Matrix®

4.7.1 Compressione di granulati ottenuti in High Shear Mixer.

La produzione dei moduli Dome Matrix® è stata effettuata utilizzando una comprimitrice rotativa (Pressima, Killian, IMA, Italia) a otto stazioni. Durante gli esperimenti sono state utilizzate solo due stazioni della comprimitrice, ognuna delle quali dotata di un punzone superiore di diametro 7.4 mm, di un punzone inferiore di diametro 4mm e di una matrice (Figura 9) opportunamente sagomata in modo da facilitare l'espulsione del manufatto.

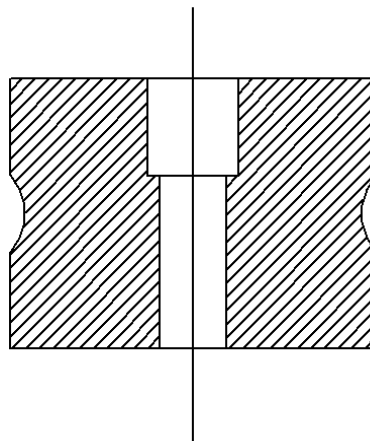


Figura 9. Matrice a doppio diametro utilizzata per la produzione dei moduli Dome Matrix®

Sono stati preparati due diversi tipi di moduli denominati maschio e femmina:

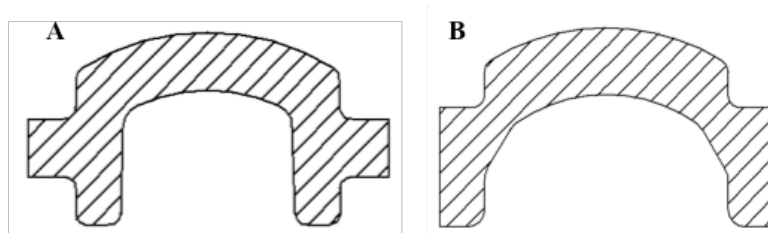


Figura 10. Modulo maschio (A) e modulo femmina (B)

I moduli definiti “maschio” (Figura 10), sono stati ottenuti impiegando un punzone superiore di diametro 7.4 mm come da figura 11, caratterizzato da una particolare sagomatura in grado di formare una protrusione anulare sulla base concava del compatto figura.

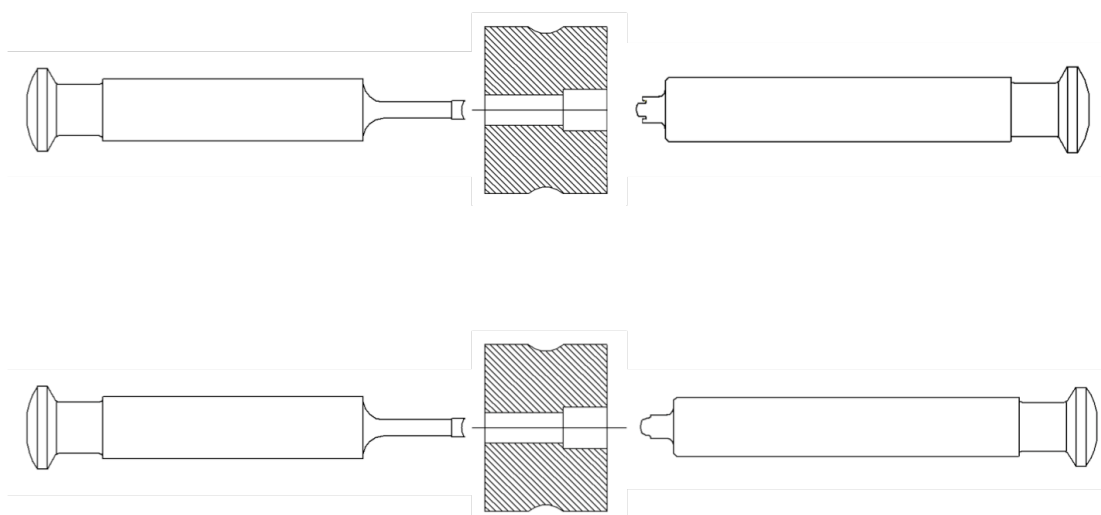


Figura 11. Coppia di punzoni per la fabbricazione dei moduli maschio (in alto) e femmina (in basso)

I moduli definiti femmina (Figura 10), sono stati ottenuti utilizzando un punzone superiore di diametro 7.4 mm bombato in grado di fabbricare moduli che possono

accogliere nella loro concavità la protrusione anulare del modulo maschio.

4.7.2 Fabbricazione dei moduli Dome Matrix[®] utilizzati per gli studi *in vitro* e *in vivo*

Tutti i moduli utilizzati per gli studi *in vitro* e *in vivo* presentati in questa tesi sono stati fabbricati utilizzando una comprimitrice alternativa (EKO Korsh, Berlino, Germania). Le miscele sono state compresse manualmente. Quando è stato necessario, i punzoni sono stati puliti con una dispersione di magnesio stearato in acetone (1% p/v) al fine di favorire l'espulsione dei manufatti.

I moduli fabbricati erano di due tipi:

il primo tipo definito maschio, impiegando punzoni di diametro 7.4 mm, caratterizzati da una base concava per il punzone inferiore e da una particolare conformazione a incastro per il punzone superiore;

il secondo tipo definito femmine, utilizzando punzoni di 7.4 mm di diametro, caratterizzati da una base concava per il punzone inferiore e da una particolare base convessa per il punzone superiore che permette l'incastro con il modulo "maschio".

4.8 Caratterizzazione tecnologica dei moduli

4.8.1 Test di Durezza

La misura della durezza è stata effettuata utilizzando un misuratore di durezza (TBH 255, Erweka, Seveso, Italia) secondo la procedura riportata in F.U.I. XI. L'apparecchio è costituito da due ganasce contrapposte, una delle quali si muove verso l'altra. Le superfici piane delle ganasce sono perpendicolari alla direzione del movimento. I

moduli sono stati fissati con la faccia concava alla ganascia fissa tramite una striscia di nastro biadesivo (Figura 12). I risultati, secondo farmacopea, sono stati espressi come valori medi in Newton per una misura condotta su 10 moduli.

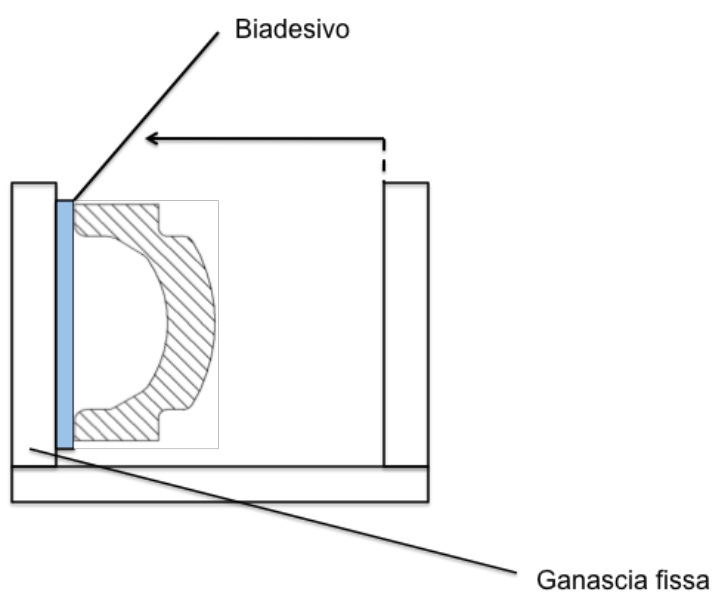


Figura 12. Rappresentazione schematica del posizionamento dei moduli Dome Matrix[®] durante il test di durezza.

4.8.2 Test di friabilità

La misura della friabilità è stata effettuata secondo la procedura riportata in F.U.I. XI. Lo strumento utilizzato è il friabilometro Roche (Erweka[®] GmbH, Düsseldorf, Germania) costituito da un tamburo rotante di diametro 30 cm e di spessore 4 cm, girevole su un supporto di cuscinetti a sfere.

L'apparecchio, in plexiglas, permette l'osservazione del saggio ed è dotato di un lato removibile per l'introduzione delle compresse. Venti moduli sono stati posti su un setaccio n° 1000 e la polvere in eccesso è stata rimossa con l'aiuto dell'aria compressa. I moduli Dome Matrix[®] sono stati accuratamente pesati e posti nel tamburo rotante. Qui le compresse sono state sottoposte per 4 minuti (25 giri di rotazione al minuto) all'abrasione per rotolamento e agli urti risultanti da cadute libere causate da un setto ricurvo che trascinava le compresse dalla parte inferiore del tamburo e, dopo averle trasportate fino al centro dell'apparecchio, le lasciava cadere sul fondo da una altezza di 15 cm.

Dopo 100 rotazioni le compresse sono state rimosse e la polvere in eccesso è stata eliminata.

La perdita in peso delle compresse, espressa in percentuale è indice della friabilità.

Secondo la F.U.I. XI, la perdita massima accettabile deve essere pari all'1% della massa delle compresse.

4.9 Assemblaggio dei moduli

La speciale geometria dei moduli di rilascio è stata progettata per consentirne l'assemblaggio in differenti configurazioni, con la possibilità di creare vari sistemi di rilascio del farmaco. L'assemblaggio dei moduli viene effettuato mediante incastro.

4.9.1 Assemblati utilizzati per lo studio di gastroretenzione.

Per lo studio *in vitro* e *in vivo* delle proprietà gastroflottanti dei sistemi Dome Matrix[®] sono stati prodotti due tipi di assemblati: assemblati in configurazione a camera vuota (Figura 10 a) e assemblati costituiti da quattro moduli (Figura 10 b). Questi sono stati realizzati incastrando una dome femmina su ciascuna faccia dell'assemblato in configurazione “a camera vuota”.

4.9.2 Sistema multi-cinetico antimalarico

Utilizzando la tecnologia Dome Matrix[®] è stato prodotto un sistema assemblato di quattro moduli costituito da:

- un modulo femmina a rilascio immediato di artesunato
- un modulo femmina a rilascio immediato di clindamicina
- due moduli, uno maschio e una femmina, a rilascio controllato di clindamicina sono assemblati in configurazione a camera vuota.

Il sistema nel suo insieme è stato assemblato incastrando i moduli femmina su ciascuna faccia dell'assemblato in configurazione a camera vuota.

4.10 Resistenza meccanica degli assemblati

4.10.1 Resistenza degli assemblati in configurazione a camera vuota agli urti

Il test è stato condotto utilizzando un friabilometro abitualmente impiegato per misurare la resistenza agli urti delle compresse. L'esperimento è stato adattato per misurare la solidità degli assemblati in configurazione a camera vuota ottenuti incastrando tra di loro le due facce concave di un modulo maschio e un modulo femmina. Venti assemblati sono stati posti nel friabilometro impostato ad una velocità di rotazione di 25 rpm/min; l'esperimento aveva durata di 4 minuti. In seguito la resistenza agli urti è stata espressa come la percentuale di assemblati in configurazione a camera vuota rimasti chiusi.

4.10.2 Forza di trazione

Le prove meccaniche sono state realizzate per valutare la forza d'incastro delle Dome Matrix[®] in configurazione a "camera vuota". I test sono stati eseguiti utilizzando un dinamometro digitale monocolonna (Acquati, Mod. AG MC, Arese (MI), Italia, Figura 13). Il dinamometro è uno strumento per la misurazione delle forze. La sua struttura è molto semplice poiché è costituito da una barra mobile trasversale e da due pinze (o sistemi analoghi di ancoraggio) per bloccare le due estremità della Dome Matrix[®] da testare.



Figura 13 Dinamometro digitale motocolonna

Dopo aver pesato e misurato gli spessori dei singoli moduli questi sono stati assemblati in configurazione a camera vuota e posizionati fra i due morsetti del dinamometro.

La variazione della forza di trazione nel tempo è stata acquisita mediante un'unità di registrazione PowerLab/400 (ML401) della ADInstruments ed elaborate per mezzo del software Scope ver. 3.5.7 per MacOS.

Il test è stato condotto a velocità costante (2 mm/min), con lo strumento che misurava la forza (Newton) esercitata per disassemblare i moduli Dome Matrix[®].

4.11 Studi di galleggiamento *in vitro*

La misura della forza di galleggiamento è un parametro essenziale per la caratterizzazione di un sistema gastroflottante. Nel 1993 Timmermans e Moës costruirono un apparato (18) in grado di misurare le variazioni della forza di galleggiamento nel tempo sottoforma di resultant weight (19, 20, 21). Questa, per un oggetto posto in un fluido a densità nota, è definita come la differenza fra la forza peso e la forza di galleggiamento.

Equazione 5

$$F_{result} = F_{gall} - F_{peso}$$

Per convenzione si attribuisce resultant weight positiva ad un sistema galleggiante e resultant weight negativa ad un sistema che tende a non emergere dal fluido in cui è immerso. In particolare la capacità di galleggiamento di un oggetto è funzione della sua densità e del suo volume.

Esprimendo l'equazione 5 in funzione della densità e del volume:

Equazione 6

$$F_{result} = (df - ds)gV$$

Dove df è la densità del fluido, g l'accelerazione di gravità, ds la densità dell'oggetto immerso nel fluido e V il volume dell'oggetto.

Lo strumento messo a punto da Timmerman e Moës per misurare F_{result} è schematicamente rappresentato in Figura 14.

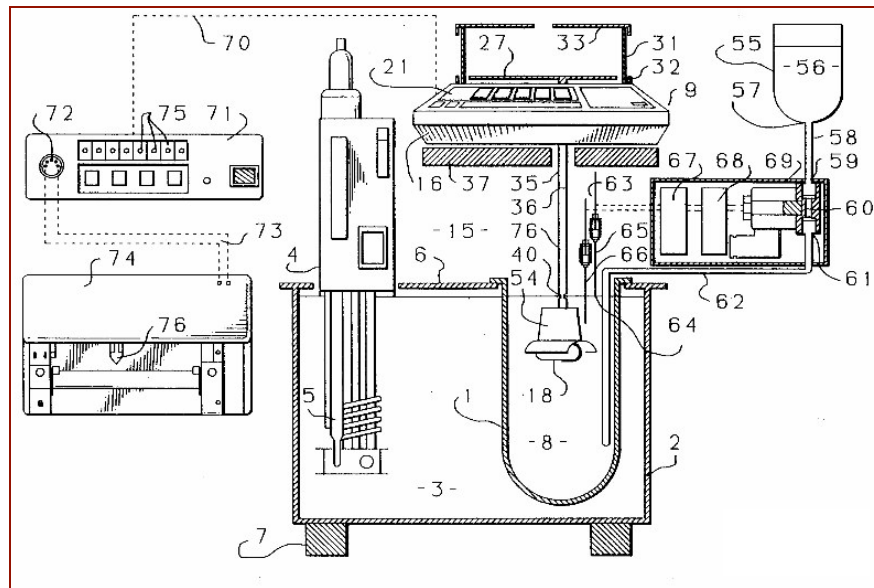


Figura 14 Dispositivo utilizzato per la misurazione della resultant weight. Riprodotto da Patent 5,076,107 Dec. 31, 1991

L'apparato utilizzato durante questo lavoro di tesi (Figura 15) è stato realizzato sull'esempio di quello di Timmermans e Moës.

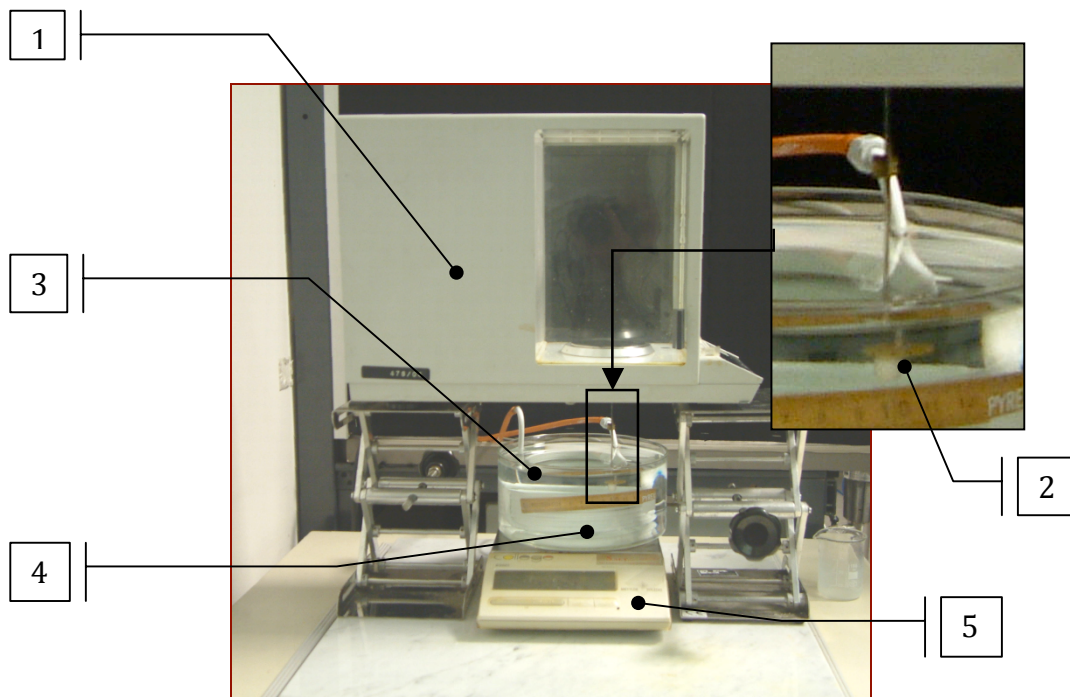


Figura 15. Dispositivo utilizzato per la misurazione della resultant weight

Ad una bilancia Mettler Toledo mod. DeltaRange AE260 (Figura 15. 1) con sensibilità 0.0001 g è stato collegato un force transmitter device (Figura 15. 2) che consta di un corpo cilindrico e di un disco in ottone. Il corpo lungo 10 cm e spesso 2 mm è collegato in maniera solidale alla cella di carico della bilancia; il piattino presenta un diametro di 9 mm ed è saldato perpendicolarmente al corpo cilindrico. L'FTD viene immerso, ad una profondità di 1 cm dalla superficie, in 2 litri di fluido gastrico simulato realizzato secondo FU. Il medium contenuto nel cristallizzatore (Figura 15. 3) viene termostato ad una temperatura di $37\text{ °C} \pm 0.1$ grazie alla serpentina di rame smaltato (Figura 15. 4) collegata ad un termostato. La temperatura del bagno è monitorata tramite una termocoppia digitale. L'evaporazione del medium viene evidenziata mediante l'uso della

bilancia Mettler Toledo mod. College B3001 (Figura 15. 5) con sensibilità 0.1 g ed il reintegro avviene manualmente (19, 21, 22).

4.11.1 Reintegro del medium

E' stata valutata l'influenza del reintegro del medium evaporato sulle variazioni della linea di base della bilancia modificata per la misurazione della resultant weight. Le fluttuazioni della linea di base sono state valutate in presenza o meno del reintegro.

4.11.2 Misurazione della Resultant weight

Il cristallizzatore (Figura 15. 3) è stato riempito con 2.0 L di fluido gastrico simulato senza enzimi e termostato ad una temperatura di $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. L'FTD è stato immerso per un centimetro all'interno del medium. Dopo aver registrato il peso e lo spessore delle Dome maschio e femmina queste sono state assemblate in configurazione "a camera vuota" e poste sotto l'FTD per la misurazione. Ogni 5 min è stata scattata una fotografia del sistema immerso e ne è stato registrato il valore di resultant weight.

4.11.3 Misura del volume dei sistemi Dome Matrix[®]

Durante l'esperimento di resultant weight, sono state scattate delle foto alle compresse immerse nel medium, mantenendo l'asse maggiore di queste ultime parallelo alla videocamera. Mediante l'elaborazione delle foto in questione con il software SolidEdge[®] v.18 (<http://www.solid-edge.com>) sono state realizzate le sezioni longitudinali delle Dome. Considerato che la sezione trasversale delle compresse è

circolare (diametro 7.4 mm) e che il rigonfiamento del gel è sostanzialmente simmetrico è stato possibile ottenere una ricostruzione 3D (Figura 16) delle compresse per semplice protrusione di rivoluzione intorno all'asse longitudinale delle sezioni. I modelli 3D sono stati utilizzati per calcolare i volumi nei vari tempi presi in esame.

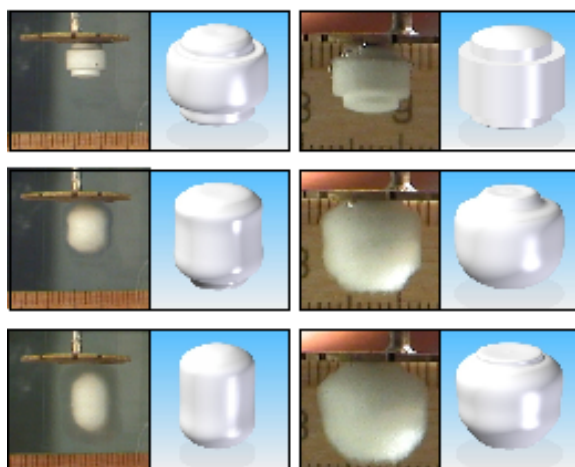


Figura 16 Modelli 3D delle compresse realizzati con il software SolidEdge® v. 18

4.12 Determinazione quantitativa dei farmaci

4.12.1 Clindamicina fosfato

La determinazione quantitativa della Clindamicina fosfato è stata effettuata mediante HPLC (Shimadzu, Giappone) dotato di pompa isocratica LC-10AS, rivelatore spettrofotometrico UV-visibile SPD-10A, integratore C-R6A.

Il metodo analitico utilizzato è stato quello usato descritto nella monografia della clindamicina Ph. Eur. 5 Ed. Tale metodo richiede l'uso di una colonna Nova-Pak® C8, 150 x 3.9 mm, 3 µm (Waters), e come fase mobile una miscela tampone fosfato pH 2.5 : acetonitrile 80:20. Il volume del loop è di 20 µl e il flusso è di 1 ml/min. Il volume d'iniezione è pari a 100 µl . Il rivelatore UV è stato impostato alla lunghezza d'onda di 210 nm.

4.12.2 Artesunato

La determinazione quantitativa dell'Artesunato è stata effettuata mediante HPLC Shimadzu (Shimadzu, Giappone) dotato di pompa isocratica LC-10AS, rivelatore spettrofotometrico UV-visibile SPD-10A, integratore C-R6A.

Il metodo analitico utilizzato è stato quello usato descritto nella monografia dell'Artesunato Int. Phar I Ed. Tale metodo richiede l'uso di una colonna Nova-Pak® C8, 250 x 3.9 mm, 3 µm (Waters), e come fase mobile una miscela tampone fosfato pH 3 : acetonitrile 50:50. Il volume del loop è di 20 µl e il flusso è di 1 ml/min. Il volume d'iniezione è pari a 100 µl . Il rivelatore UV è stato impostato alla lunghezza d'onda di 210 nm.

4.12.3 Determinazione del titolo di Clindamicina fosfato

Cinque moduli sono stati pesati e finemente macinate in un mortaio. La polvere ottenuta è stata divisa in tre campioni, ciascuno corrispondente al peso di un modulo, e ogni campione è disciolto in un becker contenente 900 ml di fluido gastrico simulato pH 1.2. Da ciascun becker è stata prelevata un'aliquota di 3ml, filtrata con filtro a chiocciola da 0.45 mm e analizzata tramite HPLC.

4.12.4 Determinazione del titolo di Artesunato

Cinque moduli sono stati pesati e finemente macinate in un mortaio. La polvere ottenuta è stata divisa in tre campioni, ciascuno corrispondente al peso di un modulo, e ogni campione è disciolto in un becker contenente 250 ml di una miscela di tampone fosfato a pH 3 e acetonitrile (50:50). Da ciascun becker è stata prelevata un'aliquota di 3ml, filtrata con filtro a chiocciola da 0.45 mm e analizzata tramite HPLC.

4.13 Studi di dissoluzione

4.13.1 Dissoluzione dei moduli contenenti Clindamicina fosfato

Gli studi di dissoluzione dei moduli contenuti Clindamicina singoli e assemblati, sono stati condotti utilizzando un dissolutore in linea (ERWEKA DT6R, Düsseldorf, Germania) dotato di agitatore a paletta (paddle).

Ogni vessel conteneva 900 ml di fluido gastrico simulato pH 1.2 (USP 30) termostato a 37°C. Il fluido gastrico simulato era ottenuto dissolvendo 2 g di cloruro di sodio in 1 litro di acqua deionizzata (precedentemente degasata) e aggiungendo 7 ml di HCl 37%. In ogni vessel veniva introdotto il modulo o l'assemblato che veniva sottoposto ad un agitazione di 50rpm ad una temperatura di 37°C.

I tempi di durata della dissoluzione variavano a seconda del tipo di modulo o assemblato preso in esame:

- nel caso dei moduli singoli a rilascio immediato lo studio è effettuato per 30 minuti effettuando prelievi a: 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minuti.
- nel caso dei singoli moduli maschio e femmina a rilascio modificato lo studio è condotto per 8 ore effettuando prelievi a: 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 minuti. In questi studi di dissoluzione sul fondo del vessel è stata messa una retina per evitare che le compresse si attaccassero sul fondo;
- nel caso dei moduli a camera vuota (maschio + femmina) e nel caso dell'assemblato di Clindamicina fosfato (assemblato a camera vuota + modulo a rilascio immediato), lo studio è stato condotto per 8 ore effettuando i prelievi ai seguenti tempi: 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 minuti.

- nel caso del sistema multicinetico antimalarico (assemblato di Clindamicina fosfato + modulo contenente Artesunato) lo studio è stato condotto per 10 ore effettuando prelievi ai seguenti tempi: 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600 minuti.

Ogni campione prelevato (3ml) era filtrato con filtro a chiocciola 0.45 µm.

4.13.2 Dissoluzione di capsule contenenti Clindamicina fosfato

Gli studi di dissoluzione dei moduli contenenti Clindamicina singoli e assemblati, sono stati condotti utilizzando un dissolutore in linea (ERWEKA DT6R, Düsseldorf, Germania) dotato di agitatore a paletta (paddle).

Ogni vessel conteneva 900 ml di fluido gastrico simulato pH 1.2 (USP 30) termostato a 37°C. Il fluido gastrico simulato era ottenuto dissolvendo 2 g di cloruro di sodio in 1 litro di acqua deionizzata (precedentemente degasata) e aggiungendo 7 ml di HCl 37%. In ogni vessel venivano introdotte due capsule contenenti clindamicina che erano sottoposte ad un'agitazione di 50rpm ad una temperatura di 37°C. Lo studio è effettuato per 30 minuti effettuando prelievi a: 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minuti.

4.13.3 Dissoluzione dei moduli contenenti Artesunato

A causa della scarsa solubilità dell'Artesunato, gli esperimenti di dissoluzione dei moduli femmina a rilascio immediato contenenti Artesunato sono stati condotti a 37°C utilizzando l'apparecchio a flusso continuo (Dissostest CE-1, Sotax, Basel, F.U.), mostrato in Figura 17. Come mezzo di dissoluzione sono stati utilizzati 1200 ml di tampone fosfato a pH 3 (Ph.Eur 5 Ed.). Il medium era pompato attraverso le celle

termostatate ad una velocità di 60ml/min. I campioni venivano prelevati dai becker di raccolta ai seguenti tempi: 10, 20, 30, 40, 50, 60 minuti.

4.13.4 Dissoluzione dei sistemi multi cinetici per la cura della malaria

Come già detto in precedenza a causa della ridotta solubilità dell'Artesunato, è stato necessario condurre gli esperimenti di dissoluzione dei sistemi multi cinetici per la cura della malaria utilizzando l'apparecchio a flusso continuo (Dissostest CE-1, Sotax, Basel, F.U.), mostrato in Figura 17. Come mezzo di dissoluzione sono stati utilizzati 1200 ml di tampone fosfato a pH 3 (Ph.Eur 5 Ed.). Il medium era pompato attraverso le celle termostatate ad una velocità di 60ml/min. I campioni venivano prelevati dai becker di raccolta ai seguenti tempi: 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600 minuti.

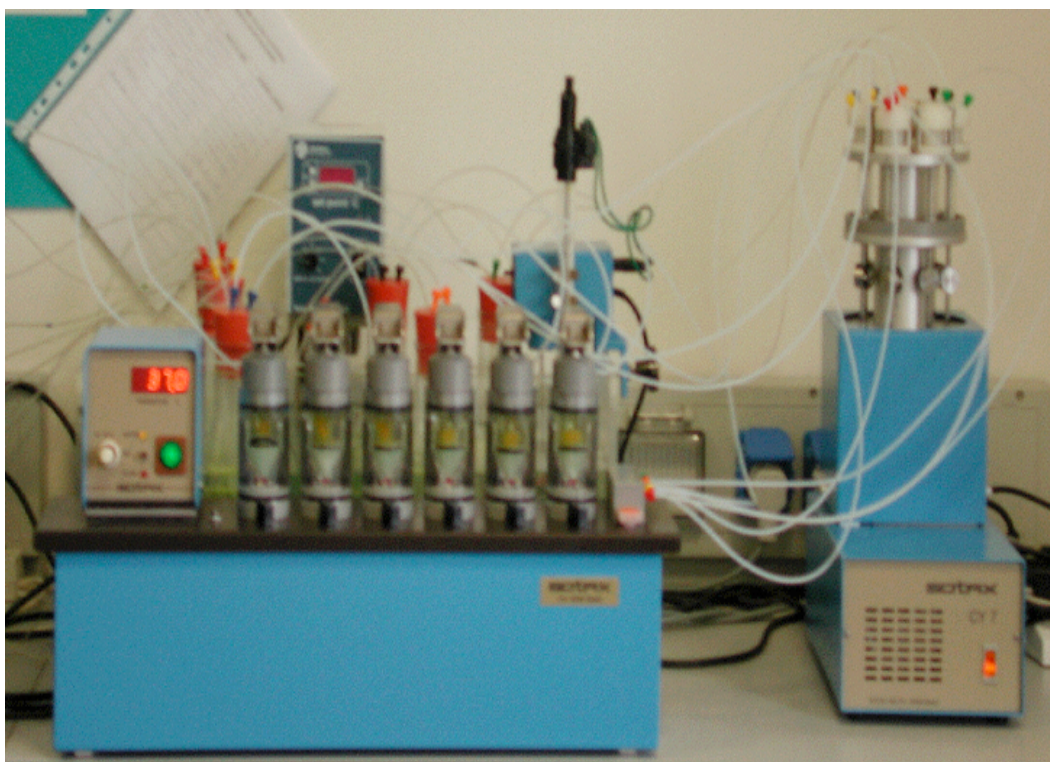


Figura 17 Dissolutore a flusso continuo (Dissostest CE-1, Sotax, Basel, F.U.)

4.14 Saggio di disgregazione

Il saggio di disgregazione è stato effettuato per misurare il tempo impiegato dai moduli a rilascio immediato a disgregare. La misura del tempo di disgregazione è determinata secondo la procedura riportata in F.U.I. XI Ed., utilizzando come mezzo il fluido gastrico simulato pH 1.2 (preparato secondo F.U.I. XI Ed.).

L'apparecchio utilizzato per la misura del tempo di disgregazione ha come componente essenziale un cestello in plexiglas, formato da 6 tubi aperti. I tubi di vetro sono tenuti insieme in posizione verticale da 2 dischi di plastica, ciascuno di 90 mm di diametro e di 6 mm di spessore, recanti 6 fori. Sotto al disco inferiore è fissata una rete a maglie di 2 mm, costruita con fili di acciaio inossidabile. Ogni tubo è provvisto di un disco

cilindrico di materiale plastico trasparente. Il cestello è alzato ed abbassato, con movimento meccanico, entro un becker contenente il mezzo considerato, termostato a 37°C. In ciascuno dei 6 tubi era inserito una modulo appoggiandoci sopra un dischetto; si immergeva il cestello nel becker e si metteva in funzione l'apparecchio per 15 minuti. Il limite imposto dalla F.U.XI Ed. entro il quale tutte le compresse devono disgregare è 15 minuti.

4.15 Analisi delle cinetiche di rilascio del farmaco dai moduli Dome Matrix®

Lo studio dei meccanismi che sono alla base delle cinetiche di rilascio dei moduli Dome Matrix® e dei sistemi assemblati è stato condotto mediante due modelli matematici in grado di descrivere il rilascio di un soluto da matrici polimeriche idrofili che in condizioni di diffusione non-fickiana. Queste equazioni sono spesso utilizzate per descrivere il rilascio di principio attivo da sistemi attivati dal solvente, nei quali la liberazione del farmaco è il risultato del sovrapporsi dei due contributi, uno diffusionale e l'altro dovuto alla distensione delle catene polimeriche.

La prima di queste equazioni, applicabile solo al primo 60% di farmaco rilasciato è proposta da Peppas (23) :

Equazione 7

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

dove M_t/M_∞ è la frazione di farmaco rilasciata al tempo t , k è una costante cinetica che include le caratteristiche del sistema di rilascio ed n è l'esponente diffusionale

Il valore di n può variare tra 0.43 e 1 a seconda della geometria del sistema (piana, sferica, cilindrica) e della prevalenza di un trasporto di farmaco rispettivamente più diffusivo o più dovuto al rilassamento delle catene del polimero. In particolare, il rilascio si considera fickiano per valori di n pari a 0.5 riconducendo l'equazione 7 alla soluzione approssimata della legge di Fick che prevede che la frazione di farmaco rilasciata sia dipendente dalla radice quadrata del tempo. Quando n è uguale ad 1 la liberazione del farmaco dipende esclusivamente dal rilassamento macromolecolare o dalla erosione della matrice e la cinetica di liberazione è lineare in quanto la frazione rilasciata risulta indipendente dal tempo.

In tutti i casi in cui i valori n sono compresi tra 0.5 e 1, i meccanismi di diffusione e di distensione delle catene polimeriche si sovrappongono nel determinare la cinetica di liberazione e il rilascio è definito anomalo fickiano perché dovuto a entrambi i fenomeni in precedenza descritti. In quest'ultimo caso, quando n è più vicino a 0.5 il rilascio del farmaco è maggiormente influenzato dalla diffusione, mentre per valori di n vicini a 1 si parla di cinetiche maggiormente lineari, dovute al prevalere di fenomeni di tipo convettivo a seguito della transizione del polimero.

Tali considerazioni sono valide solo in condizioni di diffusione monodimensionale (ossia in una sola direzione spaziale), come quelle che si verificano per sistemi costituiti da sottili film di polimero. L'equazione 7 può essere applicata anche a sistemi di rilascio aventi una diversa geometria, come quella sferica o cilindrica, tenendo

presente che, per quest'ultimi casi, i fattori geometrici implicati nell'analisi matematica fanno sì che i valori dell'esponente diffusionale n siano solo indicativi di un rilascio di tipo fickiano o non-fickiano.

Peppas e Salin hanno proposto di considerare i due contributi come cumulativi (24). L'equazione esponenziale 7 appare quindi una equazione binomiale, nella quale le due componenti si riferiscono a due contributi distinti (diffusivo e di rilassamento):

Equation 8

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^{2m}$$

dove M_t/M_∞ è la frazione di farmaco rilasciata al tempo t , k_1 è un coefficiente legato al contributo diffusionale, k_2 è un coefficiente legato al contributo del rilassamento delle catene polimeriche, m è l'esponente fickiano in relazione alla forma geometrica del sistema.

Attraverso questo modello è possibile quantificare e valutare l'importanza relativa del contributo dovuto alla distensione delle catene polimeriche e del contributo legato alla diffusione del farmaco attraverso lo strato gelificato.

4.15.1 Fattore di similarità

La similarità dei profili di dissoluzione è stata valutata usando un approccio a modello indipendente ossia il fattore di similarità f_2 che è, da un punto di vista matematico, la trasformazione logaritmica del reciproco della radice quadrata della somma degli scarti quadratici fra gli stessi punti di un campionamento di formulazioni a confronto.

I profili di dissoluzione sono stati confrontati un fattore di similarità f_2 calcolato mediante l'equazione 1 che ha la seguente formula:

Equazione 9

$$f_2 = 50 * \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{0.5} * 100 \right\}$$

dove R_t e T_t rappresentano la percentuale disciolta di farmaco ad ogni punto di campionamento (t), rispettivamente del prodotto di riferimento e del campione di studio, ed n è il numero di punti di campionamento.

Un fattore f_2 compreso tra 50 e 100 indica la similarità dei profili di dissoluzione di due formulazioni (25).

Studi *in vivo*

Gastroritenzione

In un primo studio, dedicato al confronto dei sistemi galleggianti e non, i volontari hanno assunto il sistema galleggiante Dome Matrix[®] e 24 ore più tardi la matrice non galleggiante. I volontari non sono stati autorizzati a mangiare o bere durante il periodo di osservazione. Ogni mezz'ora veniva registrata un'immagine dell'area dello stomaco di ogni volontario. Quando il sistema si trovava vicino al piloro, il tempo di acquisizione delle immagini veniva aumentato a 15 minuti. Lo studio si considerava concluso nel momento in cui veniva registrata una chiara immagine del sistema al di fuori dello stomaco. Per l'acquisizione delle immagini, i volontari sono stati seduti sotto la g-camera per un periodo di 2 minuti. Per il resto del tempo potevano muoversi liberamente ma non gli era concesso di sdraiarsi. Le immagini sono state ottenute utilizzando una g-camera a doppia testa (Millennium MG, GE Healthcare, Waukesha, Winsconsin, USA, Figura 18) dotata di collimatori MEGP (Medium Energia General Purpose) e LEHR (Low Energie High Resolution).



Figura 18. γ -camera a doppia testa Millennium MG

In un secondo studio, due volontari, dopo l'assunzione hanno mangiato, ogni due ore, uno snack e 100 ml di acqua fino alla fine dell'esperimento.

In un terzo studio, le Dome Matrix[®] galleggianti e il sistema non galleggiante sono stati marcati con diversi radionuclidi (^{99m}Tc per le compresse non galleggianti e ^{67}Ga per i sistemi Dome Matrix[®]) e sono stati somministrati contemporaneamente a un soggetto.

In un quarto di studio, due volontari hanno ricevuto dei sistemi Dome Matrix[®] composti da quattro moduli, ossia due moduli assemblati in configurazione “a camera vuota” e due moduli impilati sui due lati opposti del modulo precedente.

Lo studio in vivo ha osservato i principi della Dichiarazione di Helsinki ed è stato approvato dal comitato etico dell'Hospital de S. João, Porto, Portogallo (numero di protocollo 29402 del 26 ottobre 2006 presentato il 30 giugno 2005, responsabile dello studio Prof Filipe Almeida).

Dieci volontari sani (5 maschi e 5 femmine, di età compresa tra i 22 ed i 30 anni, peso 53-115 kg) hanno sottoscritto il consenso informato per prendere parte agli studi di gscintigrafia. I soggetti sono stati tenuti a digiuno 12 ore prima dell'inizio dell'esperimento. Alle 13:00 hanno assunto un pasto di ca. 1000 Kcal seguito dall'assunzione, con 200 ml d'acqua, del sistema da testare.

4.17.2 Marcatura degli assemblati

Per le prove in vivo, i sistemi assemblati in configurazione a camera vuota sono stati radio-marcati con tecnezio (^{99m}Tc ; $t_{1/2} = 6,02$ h), mediante l'assorbimento nella concavità di un modulo o di 0.1 ml di TechneScan HDP ricostituito con una soluzione di ^{99m}Tc (7.4 MBq / ml) (Mallinckrodt, St.Louis, MO, Stati Uniti d'America) o di 0.1 ml di una soluzione (6.4 MBq / ml) di Gallio citrato (^{67m}Ga ; $t_{1/2} = 78$ h) (Mallinckrodt). A questo punto, il modulo è stato assemblato incastrando la base concava del modulo marcato con la base concava di un modulo complementare non marcato. Un'ulteriore marcatura del sistema a "camera vuota" è stata effettuata immergendo quest'ultimo in una soluzione di TechneScan HDP per 1 minuto. La procedura di marcatura non ha influenzato l'integrità del sistema assemblato. Le compresse cilindriche non galleggianti sono state immerse in una soluzione di tecnezio per 5 minuti. I sistemi bagnati sono stati lasciati ad asciugare per eliminare l'eccesso di liquido. La radioattività del sistema è stata verificata per mezzo di un misuratore di radiazioni (Curiementor 3 Isotope Calibrator, PTW-Freiburg, Freiburg, Germania, Figura 19). Solo sistemi con radioattività compresa tra i 15-30 MBq sono stati somministrati.



Figura 19. Curiementor 3 Isotope Calibrator

Il rilascio di sostanze radioattive è stato utilizzato per valutare l'efficienza del metodo di marcatura. E' stata valutata l'emissione di radiazioni dal sistema dopo 4 ore di immersione in un becker contenente fluido gastrico simulato a 37 ± 0.5 °C per verificare che dopo tale intervallo temporale, il sistema presentasse ancora una radioattività tale da garantire un buon contrasto di emissione in vivo.

4.18. Profili plasmatici di Clindamicina fosfato in cani di razza beagle

Al fine di valutare i profili plasmatici di Clindamicina fosfato da un sistema assemblato Dome Matrix[®] (costituito da tre moduli contenenti Clindamicina fosfato di cui due a rilascio controllato in configurazione a camera vuota e un modulo femmina a rilascio immediato) fu eseguito uno studio preliminare su tre cani di razza beagle del peso medio di 20kg. Prima di somministrare la dose di clindamicina ai cani venne fornita una razione di cibo disponibile commercialmente.

Lo studio fu diviso in due periodi, nel primo vennero somministrati i sistemi multi cinetici antimalarici mentre nel secondo, come confronto, capsule contenenti clindamicina fosfato, i due periodi furono intervallati da una settimana per permettere la totale eliminazione del farmaco testato. La dose totale somministrata ai cani era di 12mg/kg, i campioni di sangue furono prelevati ai seguenti tempi: 0', 15', 30', 45', 60', 120', 180', 240', 360', 480' e 720'. Tutti i campioni di sangue furono centrifugati a 1500rpm per 10 minuti a 4°C, il siero surnatante fu raccolto e conservato a -60°C per essere in seguito analizzato.

4.19 Rivestimento in letto fluido di moduli Dome Matrix®

4.19.1 Preparazione della soluzione di rivestimento

La soluzione di Opadry Red è stata preparata usando un agitatore magnetico in modo da disperdere l'Opadry polvere in un beacker contenente acqua distillata a 25°C. La soluzione preparata conteneva il 15%p/p del polimero di rivestimento ed era tenuta in agitazione per 45 minuti.

4.19.2 Letto fluido

Il letto fluido utilizzato per il rivestimento dei moduli Dome Matrix® (Supercell, GEA Niro, Soeborg, Danimarca) consiste in una camera di rivestimento conica (Figura 20 A) la quale è posta sul piatto di distribuzione del flusso di aria (roto-nozzle) (Figura 20 B). Tale piatto contiene diversi ugelli (Figura 20 B) costruiti in modo insufflare aria e accelerare le compresse da rivestire attraverso la zona di ricopertura. Tali diffusori di aria impartiscono un momento rotatorio alle compresse facendole passare nella zona di rivestimento.

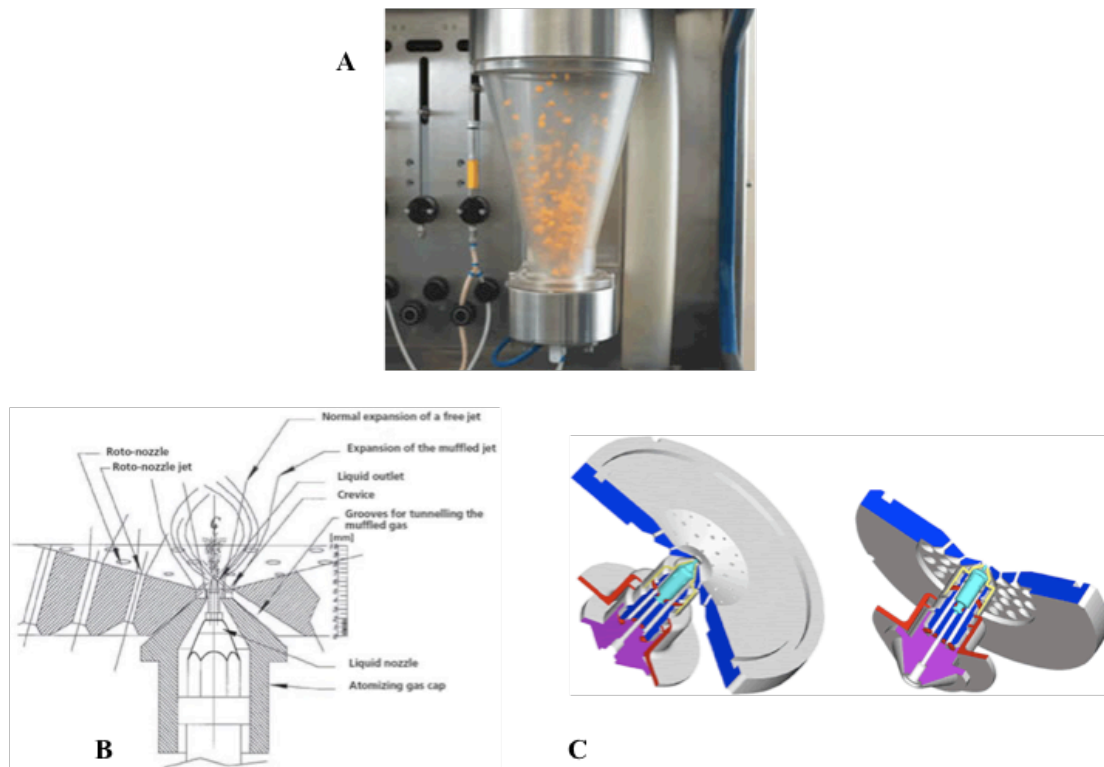


Figura 20. Letto fluido Supercell Gea. Camera di rivestimento (A), rotonozzole (B), sezione del piatto diffusore in cui si possono vedere gli ugelli attraverso cui passa l'aria (C).

Il materiale di rivestimento è atomizzato attraverso due convogliatori di aria che sono sotto al piatto di distribuzione del flusso di aria e ai lati dell'ugello che spruzza la soluzione di rivestimento. Nel letto fluido utilizzato il flusso di aria che permette l'atomizzazione della soluzione di rivestimento è mischiata con un gas a bassa pressione che provvede all'asciugatura delle compresse. In questa maniera il processo di rivestimento e di essiccamento sono contestuali riducendo così i tempi di lavorazione. Alla fine del processo di rivestimento le compresse sono convogliate nella zona di raccolta tramite una pompa di aspirazione pneumatica.

4.20 Resa del processo di rivestimento

La resa del processo di rivestimento (Y_d) è stata espressa come la percentuale dei moduli rimasti interi alla fine del ciclo di ricopertura.

Equazione 10

$$Y_d(\%) = \frac{N_t}{N_f} * 100$$

dove per N_t si intende il numero totale di moduli utilizzati nell'esperimento di ricopertura e per N_f il numero di moduli interi alla fine di tale esperimento.

4.21 Caratterizzazione dei moduli rivestiti

4.21.1 Rugosità

La rugosità della superficie dei moduli Dome Matrix[®] è stata misurata utilizzando uno strumento chiamato Optical profiler (NT1100, Wyko, Usa). Tale strumento divide un raggio di luce in due e lo dirige sulla superficie del campione da analizzare. La luce incidente è riflessa in modo da creare uno schema d'interferenza, il quale è utilizzato per ricostruire la superficie del campione.

I moduli sono stati posti su un supporto di acciaio e disposti perpendicolarmente rispetto alla lente dello strumento. Le superfici analizzate sono quelle rappresentate dai pallini azzurri in Figura 21.

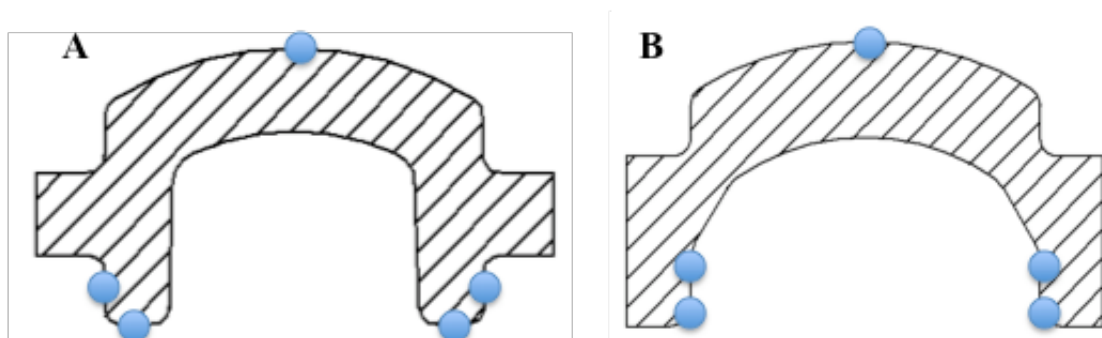


Figura 21. Modulo maschio (A) e femmina (B). In azzurro sono rappresentati i punti in cui è stata condotta la misura di rugosità.

Tali superfici furono esaminate usando un obiettivo avente ingrandimento 20X con un filtro 2X, in modalità VSI (vertical scanning interferometry). I filtri utilizzati per la elaborazione della superficie sono stati Curvature/Tilt e low pass. Ogni misura era condotta su una superficie di $2500\mu\text{m}^2$. La media delle altezze (R_a) ottenuta per ogni misura era usata come parametro per quantificare la rugosità della superficie. Per quanto riguarda la rugosità della superficie concava dei moduli, essa era calcolata come media delle rugosità (R_a) misurate nei diversi punti illustrati in Figura 21. Nel caso delle facce convesse la misurazione della R_a era condotta in triplicato su un unico punto e la media era considerato indice della rugosità della faccia convessa. Per ogni lotto furono analizzati 10 moduli maschio e 10 moduli femmina.

4.21.2 Misura del colore

Il colorimetro tristimulus (Chroma Meter CR-241, Minolta, Giappone) è stato usato per determinare il colore di una superficie avente 0.3 mm di diametro sulla parte concava e convessa di ogni modulo come da Figura 22.

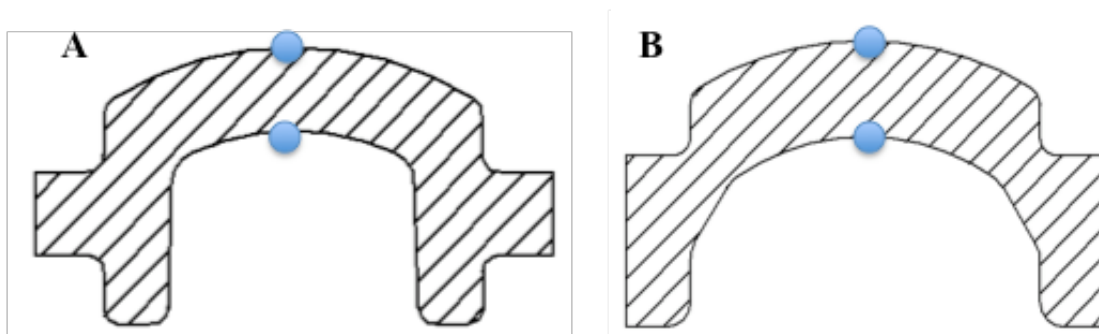


Figura 22 Modulo maschio (A) e femmina (B). In azzurro sono rappresentati i punti in cui è stata condotta la misura del colore.

La sorgente di luce, standard illuminant D65, consiste di una media della luce naturale in cui si include la regione delle lunghezze d'onda dell'ultravioletto. La misurazione del colore è stata presa nello spazio del colore Lab . L indica la luminosità e a e b indicano le direzioni del colore, dove $+a$ è la direzione del rosso, $-a$ è la direzione del verde, $+b$ è la direzione del giallo e $-b$ è la direzione del blu (Figura 23).

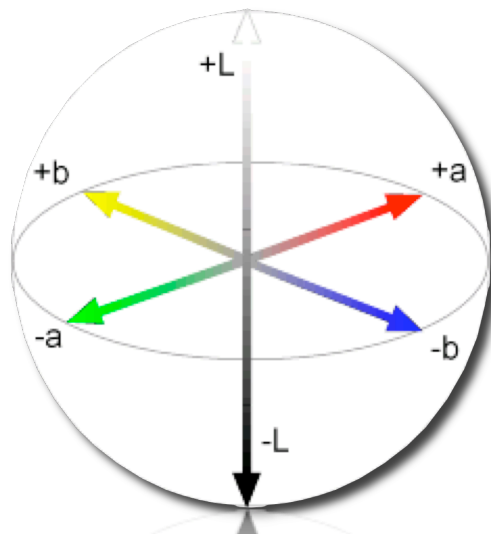


Figura 23. Spazio del colore *Lab*

La misurazione del colore è stata effettuata su 25 moduli maschio e su 25 moduli femmina per ogni lotto. La differenza di colore (∂E) rispetto al colore iniziale di ogni faccia per ogni tipo di modulo è stata calcolata tramite l'equazione 11:

Equazione 11

$$\partial E = \sqrt{(L_c - L_b)^2 + (a_c - a_b)^2 + (b_c - b_b)^2}$$

dove l'indice "c" si riferisce al campione colorato (modulo rivestito) e "b" al campione di riferimento (modulo non rivestito).

4.21.3 Forza di incastro

La misura della forza necessaria ad incastrare due moduli (uno maschio e uno femmina) in configurazione a camera vuota è stata condotta tramite un dinamometro EZ test (SM-100N, Shimadzu, Giappone). Lo strumento consiste in un piatto inferiore statico e da un piatto superiore mobile. Sul piatto inferiore era appoggiato una piastra di acciaio

provvista di buchi in modo da alloggiare la faccia convessa del modulo maschio (Figura 24). Il modulo femmina era appoggiato sul modulo maschio e i due venivano incastrati grazie alla forza applicata dal piatto superiore in movimento (1 mm/min).

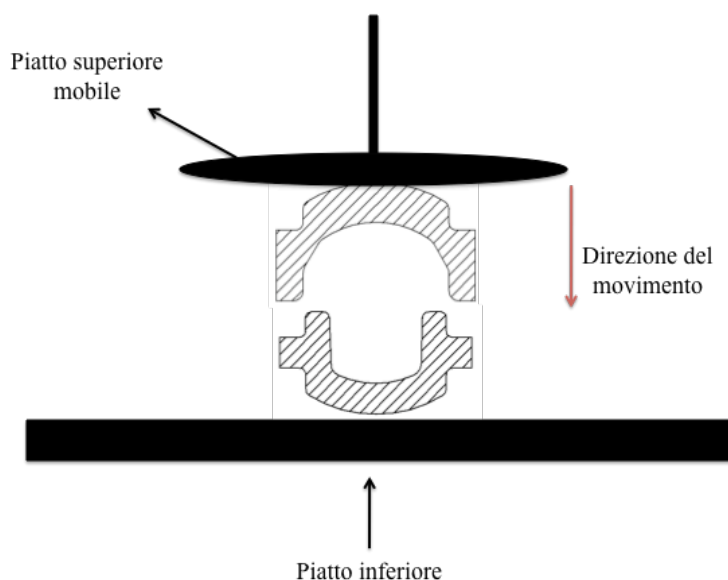


Figura 24. Rappresentazione schematica del test condotto per la misurazione della forza di incastro

La variazione della forza in funzione del tempo è stata registrata tramite l'utilizzo del software WINAGSLite. L'esperimento è stato condotto in triplicato per ogni lotto selezionato.

4.22 Analisi statistica dei dati

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata per mezzo del software Kaleida Graph, versione 4.01 (Synergy Software, <http://www.synergy.com/index.html>).

Unscramble 2.0 e Origin 8.0 sono stati utilizzati per l'analisi statistica e la modellizzazione dei disegni sperimentali utilizzati nella prima e seconda sezione della tesi.