

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

DIPARTIMENTO FARMACEUTICO

**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOFARMACEUTICA-FARMACOCINETICA**

**Studi di preformulazione di sistemi a
rilascio sito-specifico e prolungato di
vancomicina e teicoplanina**

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. PAOLO COLOMBO

Tutore:
Chiar.mo Prof. GIAMPIERO BETTINETTI

Tesi di Dottorato di:
Dott.ssa Ilaria Salvadeo

XXI CICLO (2006-2008)

A Christian e Federico
A mamma e papà
A Rachele

INDICE

	Pag.
Introduzione	1
Premessa alla ricerca	1
Vancomicina cloridrato e teicoplanina	6
Ciclodestrine	11
Carragenano	14
Scopo della Ricerca	17
Parte Sperimentale	25
Materiali	25
<i>Vancomicina cloridrato (VCM·HCl)</i>	25
<i>Teicoplanina (TCP)</i>	27
<i>Triacetil α-ciclodestrina (TAαCd)</i>	28
<i>Triacetil β-ciclodestrina (TAβCd)</i>	29
<i>Triacetil γ-ciclodestrina (TAγCd)</i>	30
<i>λ-carragenano (CRG)</i>	31
Metodi e apparecchiature	32
<i>Cristallizzazione delle TACds</i>	32
<i>Preparazione delle miscele fisiche (MF)</i>	32
<i>Impasto molle o kneading (KN)</i>	35
<i>Coevaporazione (COEV)</i>	36
<i>Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)</i>	37
<i>Analisi termomicroscopica (HSM)</i>	37
<i>Calorimetria differenziale a scansione (DSC)</i>	37

<i>DSC a modulazione di temperatura (MDSC)</i>	38
<i>Analisi termogravimetrica (TG)</i>	39
<i>Determinazione della velocità di dissoluzione</i>	39
<i>Determinazione della velocità di dissoluzione intrinseca (IDR)</i>	40
<i>Cristallizzazione sferica</i>	41

Risultati e Discussione 43

Combinazioni con co-formulanti	43
--------------------------------	----

<u><i>Caratterizzazione chimico-fisica della VCM·HCl e della TCP</i></u>	43
--	----

<u><i>Sistema binario TCP-TAαCd</i></u>	48
---	----

<u><i>Sistema binario TCP-TAβCd</i></u>	53
--	----

<u><i>Sistema binario TCP-TAγCd</i></u>	59
---	----

<u><i>Caratterizzazione termoanalitica del λ-carragenano(CRG)</i></u>	65
--	----

<u><i>Sistemi binari VCM·HCl-CRG</i></u>	67
--	----

<u><i>Sistemi ternari VCM·HCl-CRG-TAγCd</i></u>	74
---	----

<u><i>Sistemi binari TCP-CRG</i></u>	78
--------------------------------------	----

<u><i>Sistemi ternari TCP-CRG-TAγCd</i></u>	83
---	----

Cristallizzazione sferica	87
---------------------------	----

<u><i>VCM·HCl e TCP</i></u>	87
-----------------------------	----

<u><i>TAαCd</i></u>	92
---------------------------------------	----

<u><i>TAβCd</i></u>	95
--------------------------------------	----

<u><i>TAγCd</i></u>	99
---------------------------------------	----

<u><i>VCM·HCl-TAαCd</i></u>	103
---	-----

<u><i>VCM·HCl-TAβCd</i></u>	108
--	-----

<u><i>VCM·HCl-TAγCd</i></u>	113
---	-----

Caratterizzazione dello stato solido amorfo	118
<u>VCM·HCl e TCP</u>	118
<u>TAαCd</u>	121
<u>VCM·HCl-TAαCd</u>	123
<u>TCP-TAαCd</u>	130
<u>TAβCd</u>	137
<u>VCM·HCl-TAβCd</u>	139
<u>TCP-TAβCd</u>	146
<u>TAγCd</u>	153
<u>VCM·HCl-TAγCd</u>	155
<u>TCP-TAγCd</u>	163
Conclusioni	170
Bibliografia	175

Introduzione

Premessa alla ricerca

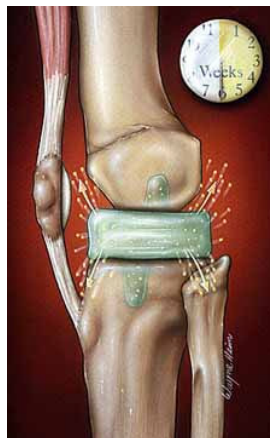
Il manifestarsi di un'infezione dopo l'impianto di un'artroprotesi d'anca o di ginocchio comporta normalmente il fallimento dell'impianto stesso. Di fronte a tale evenienza è necessario procedere all'espanto della protesi infetta e al reimpianto di una nuova protesi in un unico intervento o in due tempi chirurgici. In entrambi i casi è comunque necessario ricorrere ad una terapia antibiotica mirata per via sistemica associata ad un'antibioticoterapia locale per avere maggiore successo nell'eradicare l'infezione.

Nelle infezioni ossee la crescita batterica è favorita da alcune condizioni locali (tessuti devitalizzati, compromissione del circolo, eventuale presenza di corpi estranei) che allo stesso tempo riducono l'efficacia terapeutica degli antibiotici somministrati per via sistemica in quanto non riescono a raggiungere concentrazioni adeguate nella sede dell'infezione. Per ovviare ai limiti e agli inconvenienti (possibili effetti tossici collaterali, ridotta compliance del paziente,

costi elevati in caso di cicli prolungati nel tempo) dell'antibioticoterapia sistemica, sono state intraprese nuove modalità di somministrazione locale dei farmaci antibatterici per il trattamento e la profilassi delle infezioni dell'osso. Tra queste si colloca la miscelazione di antibiotico al cemento acrilico, una metodica descritta per la prima volta da Bucholz e Engelbrecht nel 1970 per prevenire le infezioni nella chirurgia protesica dell'anca.

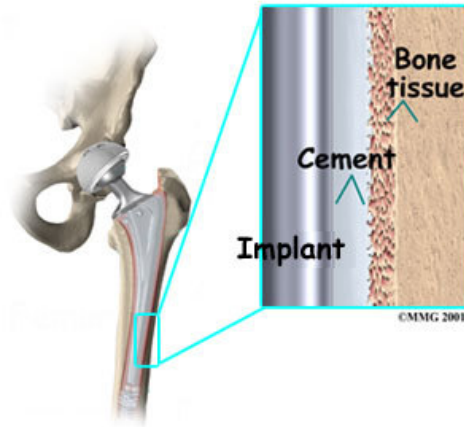
I vantaggi di questa tecnica includono la possibilità di raggiungere elevate concentrazioni locali di farmaco mantenendone bassi i livelli sistemici, la capacità di inibire l'adesività batterica al metacrilato nelle protesi cementate, l'ottima tolleranza della terapia da parte del paziente e i costi estremamente contenuti [1].

In particolare, nella terapia delle infezioni che si instaurano dopo impianto di un'artroprotesi, si interviene attualmente con una procedura di revisione chirurgica in due tempi che prevede il reimpianto di una nuova protesi da 4 a 8 settimane dopo la rimozione di quella infetta. In questo periodo di tempo viene inserito, al posto della protesi stessa, uno spaziatore costituito da polimetilmetacrilato (PMMA) caricato di antibiotico che ha lo scopo di evitare l'accorciamento dei tessuti molli periarticolari e di mantenere un corretto posizionamento dei capi ossei, oltre a quello di sterilizzare l'area infetta [2]. In Figura 1 è riportato lo spaziatore usato in una protesi di ginocchio.



* **Figura 1.** Applicazione dello spaziatore di PMMA antibiotato nel ginocchio.

Dopo la rimozione dello spaziatore, la nuova protesi viene ancorata al tessuto osseo circostante tramite cementi acrilici antibiotati che hanno il duplice scopo di mantenere la protesi in posizione corretta e prevenire un'ulteriore focolaio di infezione, come schematizzato in Figura 2 per una protesi d'anca.

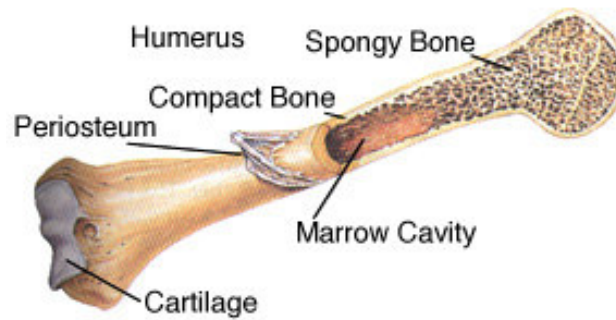


* **Figura 2.** Applicazione di cemento osseo all'interno del canale femorale in una protesi d'anca.

Le mescole cemento-antibiotico si sono dimostrate efficaci anche in presenza di osso necrotico, trovando un'indicazione particolare nella cura dell'osteomielite [1].

L'osteomielite è una forma di infezione dell'osso il cui più comune responsabile è lo *Staphylococcus aureus* che può derivare dalla contaminazione per contatto dell'osso con l'esterno o dalla formazione di focolai settici di provenienza ematica che dalla cavità midollare o dalla membrana sinoviale si diramano alle formazioni articolari e ossee circostanti.

Tale infezione, che nel tempo può diventare cronica, interessa alcune parti ben specifiche dell'osso come la cavità midollare, la corteccia o il periostio (Figura 3).



* **Figura 3.** Anatomia dell'osso.

Gli antibiotici più ampiamente utilizzati per questo tipo di terapia locale sono quelli glicopeptidici, con la vancomicina cloridrato (VCM·HCl) e la teicoplanina (TCP) come principali rappresentanti, che vengono caricati nel cemento in modo tale da essere veicolati nel focolaio di infezione e da raggiungere *in situ* concentrazioni terapeuticamente attive anche molto superiori a quelle minime inibitorie (MIC), senza gli effetti collaterali della somministrazione sistemica.

Si configura, a questo punto, la possibilità di “regolare” la diffusione del farmaco dal cemento antibiotato in modo da mantenere costante la concentrazione localmente efficace di farmaco nel sito d’impianto per il periodo di tempo necessario.

Da qui l’opportunità di progettare e realizzare sistemi a rilascio prolungato sito-specifico dell’antibiotico in grado di liberare quantità relativamente elevate di principio attivo subito dopo l’impianto e successivamente dosi inferiori per tempi prolungati (es. due settimane) in modo da mantenere costante la concentrazione del farmaco nel sito di impianto.

A tal scopo si è pensato di saggiare come co-formulanti per sistemi a base di ciascun antibiotico due tipi di carrier:

-per sistemi a base di TCP i triacetil derivati delle tre ciclodestrine naturali (triacetil α -, β - e γ -ciclodestrina, TA α Cd, TA β Cd e TA γ Cd), sostanze di natura estremamente idrofoba che in precedenti studi condotti nel nostro laboratorio si

sono rivelate adatte a controllare il rilascio della VCM·HCl, sia in forma di microsfere reticolate di calcio alginato sia sotto forma di sospensioni oleose [3];
-per sistemi a base di VCM·HCl e di TCP il carragenano, idrocolloide in grado di modificare il rilascio di farmaci mediante interazioni ioniche [4].

In entrambi i casi l'obiettivo era di ottenere sistemi in grado da un lato di stabilizzare il farmaco e dall'altro di ritardarne il rilascio dalla formulazione.

Vancomicina cloridrato e Teicoplanina

La VCM·HCl è un antibiotico glicopeptidico riportato nelle Farmacopee (USP 31, BP 2008, Eur. Pharm. VI Ed., FU XI) attivo nei confronti dei microrganismi Gram-positivi e particolarmente efficace nei confronti di ceppi resistenti ad altri tipi di antibiotici come lo *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA) e i Gram-positivi resistenti alla penicillina. La struttura chimica della VCM·HCl dimostrata da studi di diffrazione dei raggi X e confermata dalla sintesi totale rivela una molecola piuttosto complessa comprendente una porzione disaccaridica (costituita dal glucosio e dall'amminozucchero vincosamina) legata all'amminoacido centrale (fenilglicina) di una catena peptidica di sette unità, precisamente tre fenilglicine sostituite, due beta-idrossitirosine clorurate, un acido aspartico (come ammide) e una N-metil-leucina (Figura 4) [5].

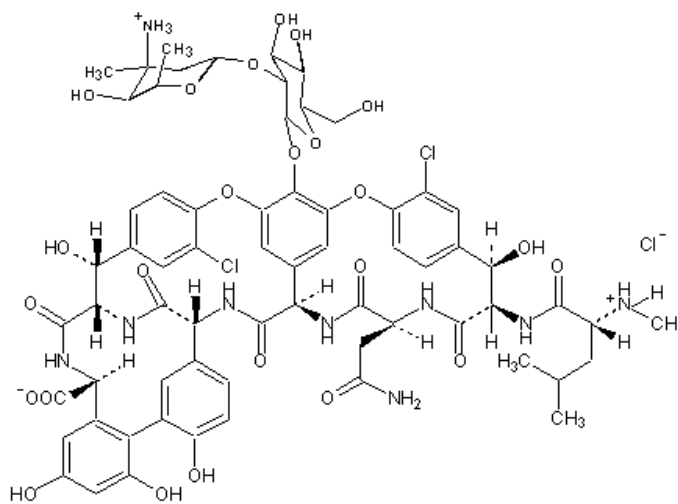


Figura 4. Formula di struttura della VCM·HCl.

Il meccanismo d'azione della VCM·HCl si esplica attraverso l'interazione di una porzione della molecola con le due molecole terminali di D-alanina del muramilpentapeptide, precursore del peptidoglicano (Figura 5).

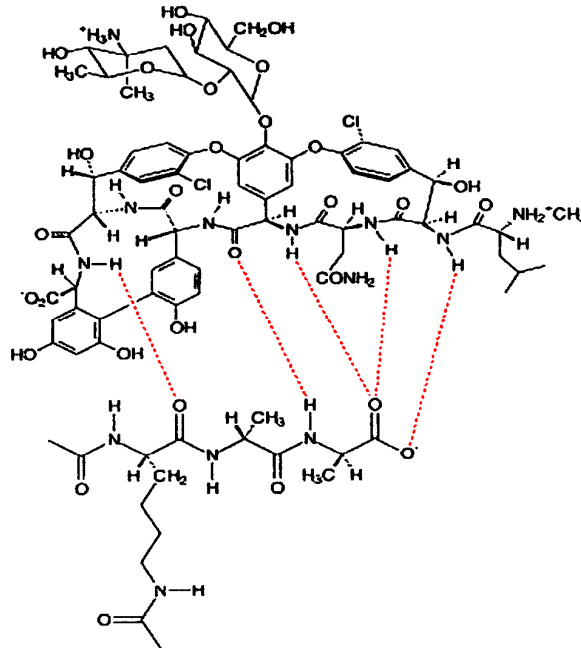


Figura 5. Interazione della VCM·HCl con i due residui terminali di D-alanina del muramilpentapeptide.

Il complesso che si forma inibisce, per ingombro sterico, le reazioni di transglicolazione e transpeptidazione bloccando così l'incorporazione del muramilpentapeptide nella parete cellulare e di conseguenza la sintesi del peptidoglicano. Lo strato di peptidoglicano permette alla cellula batterica di resistere alle variazioni di pressione osmotica, e quindi la sua assenza manda la cellula batterica incontro a lisi per effetto osmotico.

Il peptidoglicano è presente esternamente alla membrana citoplasmatica dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi. La selettività d'azione della VCM·HCl nei confronti dei batteri Gram-positivi è dovuta al fatto che in quelli Gram-negativi è presente esternamente un'altra membrana di tipo lipopolisaccaridico che agisce da

barriera impermeabile ai farmaci come la VCM·HCl, i quali non riescono quindi a raggiungere e penetrare lo strato di peptidoglicano per esplicare la loro proprietà antibatterica [6].

In Tabella 1 sono stati riportati i valori di MIC della VCM·HCl nei confronti di alcuni microrganismi. L'attività antibatterica si esplica principalmente contro i microrganismi Gram-positivi e alcuni microrganismi anaerobi, mentre l'azione contro quelli Gram-negativi è solo marginale [7].

Tabella 1. MIC (mg L^{-1}) della VCM·HCl nei confronti di batteri Gram-positivi e Gram-negativi.

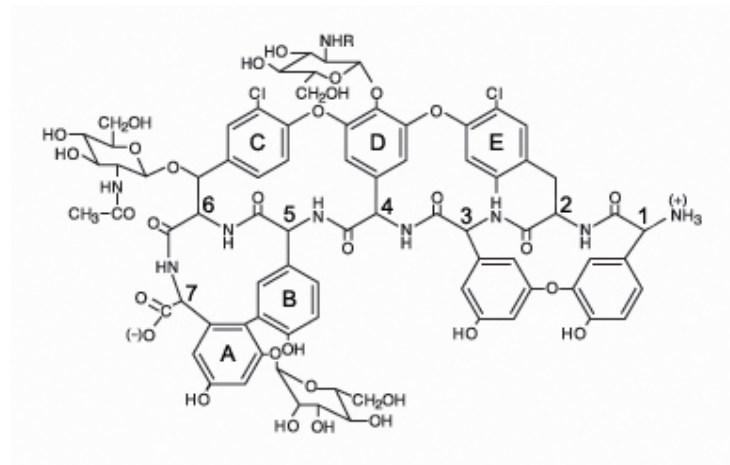
Microrganismo	MIC (mg L^{-1})
<i>Staphylococcus aureus</i> meticillina resistente	0,5-4
<i>Staphylococcus epidermidis</i> meticillina resistente	1-4
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> meticillina resistente	0,5-8
<i>Streptococcus piogenes</i>	0,5-0,5
<i>Streptococcus pneumoniae</i> penicillina resistente	0,25-2
<i>Enterococcus</i> spp.	0,25-4
<i>Listeria</i> spp.	0,25-2
<i>Clostridium difficile</i>	0,5-4
<i>Clostridium perfringens</i>	0,025-4
<i>Haemophilus influenzae</i>	≥ 16

MIC = minima concentrazione inibitoria

Alcuni ceppi di *Staphylococcus aureus* hanno cominciato a mostrare una certa resistenza alla VCM·HCl dovuta alla capacità da parte della cellula batterica di sintetizzare un precursore modificato del peptidoglicano [8,9].

Considerato l'insorgere di questi fenomeni di resistenza, a partire dagli anni '80, ha destato un crescente interesse un altro antibiotico glicopeptidico, la TCP; introdotta nella terapia clinica come analogo della VCM·HCl con la stessa attività intrinseca. Ancora oggi la TCP rappresenta una valida alternativa alla VCM·HCl nei casi in cui i microrganismi presentino resistenza a questo antibiotico [7].

La struttura chimica della TCP comprende una catena peptidica centrale di sette unità a cui sono legati tre diversi zuccheri costituiti da un D-mannosio, una N-acil-D-glucosammina e una N-acil-D-glucosammina sostituita a cui possono essere legati cinque differenti tipi di catene alifatiche C₁₀-C₁₁ (Figura 6) [10].



Teicoplanina A ₂ -1	R = acido 4-decenoico
Teicoplanina A ₂ -2	R = acido 8-metil-nonanoico
Teicoplanina A ₂ -3	R = acido n-decanoico
Teicoplanina A ₂ -4	R = acido 8-metil-decanoico
Teicoplanina A ₂ -5	R = acido 9-metil-decanoico

Figura 6. Struttura della TCP con numerazione dei residui degli amminoacidi e designazione degli anelli aromatici.

La TCP presenta una potente azione battericida nei confronti di un gran numero di microrganismi Gram-positivi, in particolare degli stafilococchi inclusi i ceppi multiresistenti e meticillina-resistenti, e degli streptococchi compresi gli enterococchi che sono invece molto poco sensibili alla VCM·HCl. Anche in questo caso il meccanismo d'azione alla base dell'attività antimicrobica è

l'inibizione della biosintesi del peptidoglicano attraverso l'interazione di una porzione della molecola di antibiotico con le due molecole terminali di D-alanina del muramilpentapeptide (Figura 7), cosa che impedisce la corretta formazione della parete cellulare batterica.

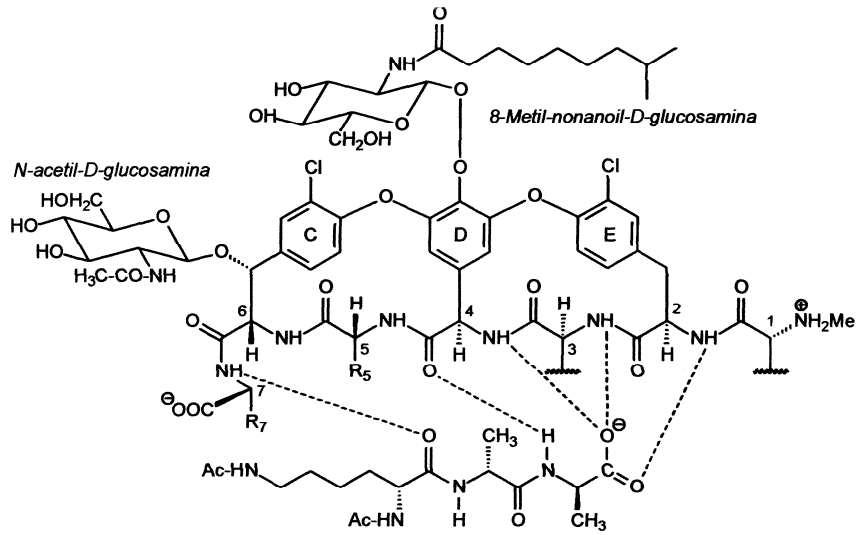


Figura 7. Interazione della TCP con i due residui terminali di D-alanina del muramilpentapeptide.

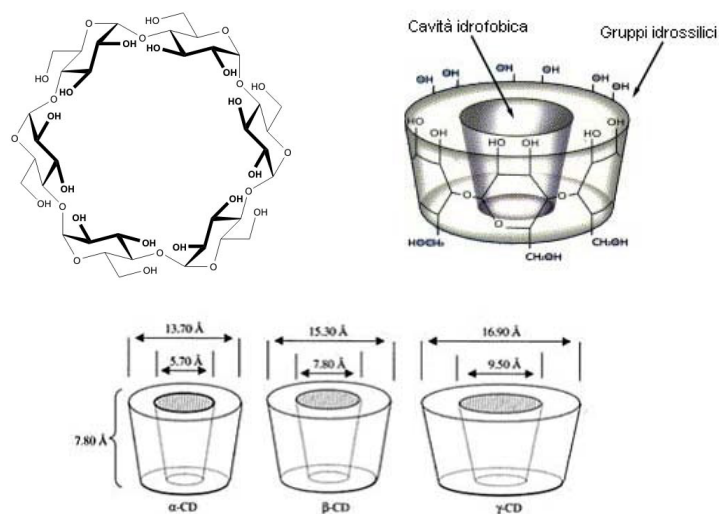
Ciclodestrine

Le ciclodestrine (Cd) sono oligosaccaridi ciclici costituiti da unità glucopiranosidiche unite da legami di tipo α -1,4 glucosidico, che si formano per degradazione dell'amido da parte del *Bacillus macerans* [11].

Le più diffuse sono le ciclodestrine naturali alfa-, beta- e gamma-ciclodestrina (α -, β - e γ -Cd), sostanze di natura cristallina costituite a livello molecolare rispettivamente da 6, 7 e 8 unità glucosidiche per macrociclo.

E' stato possibile isolare allo stato puro e caratterizzare le ciclodestrine contenenti da 9 (δ -Cd) fino a 39 unità glucopiranosidiche nel macrociclo, mentre ciclodestrine con meno di 6 unità non possono esistere per l'elevata tensione che si instaurerebbe in questi anelli [12,13].

Le ciclodestrine sono molecole caratterizzate da una forma tronco-conica o toroide con gruppi ossidrilici primari e secondari proiettati verso l'esterno che conferiscono alla superficie un carattere idrofilo responsabile della loro solubilità in acqua, mentre la cavità interna è apolare e in grado di ospitare molecole organiche (o porzioni di esse) di dimensioni adatte (Figura 8).

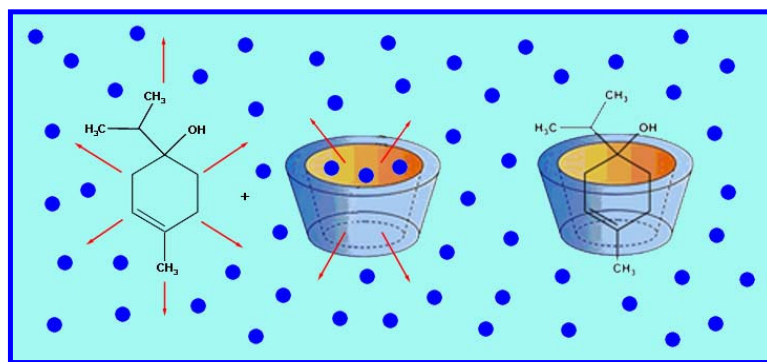


* **Figura 8.** Struttura chimica della α -Cd e rappresentazione tronco-conica della α -Cd, β -Cd e γ -Cd.

Le ciclodestrine (host) possono formare complessi di inclusione con molecole farmacologicamente attive (guest) e servire quindi a migliorare le loro caratteristiche biofarmaceutiche e tecnologiche [14]. In particolare, sono in grado di aumentare la solubilità e la velocità di dissoluzione in acqua e di migliorare la stabilità fisica e chimica e l'efficacia terapeutica di un farmaco [15].

Le ciclodestrine naturali cristallizzano da soluzioni acquose allo stato idrato e il numero di molecole d'acqua di cristallizzazione per molecola di ciclodestrina dipende dal tipo di ciclodestrina, dalle condizioni di cristallizzazione e dal successivo trattamento del campione. Le molecole di acqua si collocano in parte nella cavità della ciclodestrina e in parte negli interstizi fra i macrocicli all'interno della struttura cristallina. Le diverse forze di legame dell'acqua di cristallizzazione si riflettono nel comportamento termico delle ciclodestrine, in particolare nella temperatura alla quale le molecole d'acqua, caratterizzate da diversa energia di legame, si staccano per effetto dell'aumento della temperatura dai loro siti di legame [16].

In soluzione acquosa, le molecole d'acqua che occupano la cavità apolare delle ciclodestrine possono essere rimpiazzate da molecole di guest, meno polari dell'acqua, attraverso un processo di inclusione che risulta favorito da un punto di vista termodinamico (Figura 9).



* **Figura 9.** Schema di formazione di un complesso di inclusione.

Per sostituzione degli ossidrili primari e secondari delle ciclodestrine naturali con catene aciliche è possibile ottenere dei derivati semisintetici come le triacetil α -, β - e γ -ciclodestrina (rispettivamente $TA\alpha Cd$, $TA\beta Cd$ e $TA\gamma Cd$) e omologhi superiori (tripropanoil ciclodestrine e tributanoil ciclodestrine), caratterizzati da una solubilità in acqua notevolmente più bassa delle Cds naturali e dei loro derivati alchilici o idrossialchilici.

I derivati peracilati, a causa delle loro caratteristiche molecolari e strutturali, non permettono la formazione di veri e propri complessi di inclusione tra la molecola guest e la ciclodestrina host in quanto la cavità è ostacolata e in parte occupata dai sostituenti acilici [17-19]. Per questo motivo si parla generalmente di interazione tra un farmaco e una ciclodestrina peracilata piuttosto che di complessazione per inclusione.

Le ciclodestrine peracilate precipitano da soluzioni inglobando nella loro struttura cristallina molecole di acqua o di altri solventi, come nel caso della $TA\alpha Cd$ biidrato [20] e della $TA\beta Cd$ metanolato [21] dove la localizzazione del solvente è stata possibile grazie alla risoluzione della struttura cristallina mediante diffrattometria dei raggi X su cristallo singolo. La risoluzione della struttura della $TA\gamma Cd$ come doppio solvato con isopropanolo e acqua è stata effettuata recentemente in uno studio in collaborazione con il Prof. Mino Caira e il nostro gruppo di ricerca [22].

Carragenano

Il carragenano è un polisaccaride naturale ad alto peso molecolare riportato nelle diverse Farmacopee (31st United States Pharmacopeia, 26th National Formulary e Farmacopea Ufficiale XI Ed.) che si estrae da alcuni tipi di alghe rosse appartenenti alla classe delle *Rhodophyceae* [23].

La sua struttura chimica, riportata in Figura 10, consiste di esteri solfonici di unità di galattosio e di 3,6 anidro galattosio connesse tra loro da legami α -1,3 e β -1,4 glucosidici alternati [4].

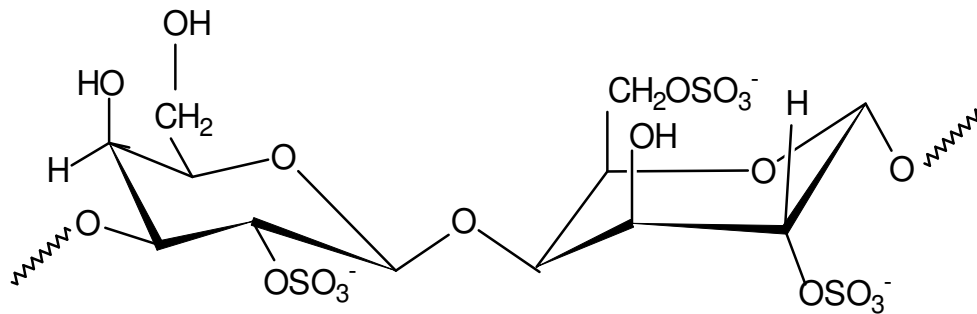


Figura 10. Struttura chimica del λ -CRG.

Esistono tre tipi fondamentali di carragenano (*landa* (λ), *iota* (ι), e *kappa* (κ) carragenano) che differiscono per il numero e la posizione dei gruppi solfonici sulle unità di galattosio, nonché per il diverso peso molecolare. Tali differenze strutturali comportano variazioni in alcune proprietà chimico-fisiche quali solubilità e proprietà di gelificazione.

Il λ -carragenano (CRG) è un polimero non gelificabile contenente circa il 35% in peso di esteri solfonici e anche il 3,6 anidro galattosio.

Nella sua struttura si alternano unità monomeriche di D-galattosio-2-solfato unite da legami α -1,3 glucosidici e unità di D-galattosio 2,6-disolfato unite da legami β -1,4 glucosidici.

Lo ι -carragenano è invece un polimero gelificabile contenente circa il 32% in peso di esteri solfonici e approssimativamente il 30% di 3,6 anidro galattosio. Nella sua struttura si alternano unità monomeriche di D-galattosio-4-solfato e di 3,6 anidro D-galattosio 2-solfato.

Il κ -carragenano è un polimero fortemente gelificabile contenente circa il 25% in peso di esteri solfonici e circa il 34% di 3,6 anidro galattosio. L'alternanza delle unità monomeriche è simile a quella dello ι -carragenano, con la differenza che nel κ -carragenano il 3,6 anidro-D-galattosio non presenta gruppi solfonici [4].

I carragenani sono ampiamente utilizzati nell'industria alimentare come agenti gelificanti, viscosizzanti e anche stabilizzanti.

La loro capacità di gelificazione e di formazione di soluzioni viscosi e la loro sicurezza d'uso li ha resi buoni candidati per un utilizzo anche nell'industria farmaceutica come carrier per realizzare sistemi a rilascio prolungato. Il rilascio del farmaco da una matrice dipende, infatti, dalla capacità del polimero di idratarsi a contatto con un fluido di dissoluzione e quindi dalle sue proprietà di gelificazione e di rigonfiamento, nonché dall'eventuale erosione della matrice polimerica stessa [24].

Il carragenano posto a contatto con un liquido di dissoluzione assorbe una considerevole quantità di acqua e rigonfia molto velocemente [25]. È stato proposto l'utilizzo del carragenano nelle formulazioni a rilascio controllato ottenendo matrici che, incorporando farmaci di natura non ionica, cationica o anionica, consentono di ottenere profili di rilascio lineari con cinetica indipendente dal pH del mezzo di dissoluzione [26].

Con il λ -carragenano (CRG) l'interazione farmaco-polimero può tradursi nella formazione di complessi con diverse caratteristiche di solubilità, come ad esempio con il diltiazem cloridrato con il quale interagisce in acqua per dare un prodotto d'interazione molto poco solubile di composizione in peso farmaco-polimero di circa 2:1 [27]. Si è pensato quindi di considerare il CRG come carrier per ottenere prodotti di interazione con i due antibiotici ed eventualmente valutare l'apporto

della TA γ Cd sulle caratteristiche di rilascio. A tale scopo sono stati preparati sistemi binari antibiotico-CRG e sistemi ternari antibiotico-CRG-TA γ Cd, utilizzando diversi rapporti in peso e differenti metodi di preparazione.

Scopo della Ricerca

In nostri precedenti studi sulla VCM·HCl allo scopo di progettare e realizzare sistemi a rilascio prolungato sito-specifico di questo antibiotico, sono stati saggiati come co-formulanti sostanze di natura idrofoba come i triacetil derivati delle tre ciclodestrine naturali (TA α Cd, TA β Cd e TA γ Cd), di cui abbiamo isolato e caratterizzato da un punto di vista chimico-fisico e strutturale forme anidre e pseudopolimorfe [28]. Da tale studio era emerso che le tre TACds risultavano adatte a controllare il rilascio della VCM·HCl da microsfere reticolate di calcio alginato e in sospensioni oleose [3], e in particolare che il rallentamento del rilascio di farmaco era direttamente correlabile al grado di idrofobicità del carrier (TA γ Cd>TA β Cd>TA α Cd) e alla sua frazione di massa nella combinazione con il farmaco (0,75>0,67>0,50). Pertanto tali combinazioni sono state proposte per l'allestimento di sistemi microparticellari a rilascio prolungato sito-specifico della VCM·HCl [29-37].

Considerando i risultati ottenuti per la VCM·HCl si è quindi pensato di saggiare gli stessi co-formulanti in associazione con la TCP, inizialmente caratterizzando i

sistemi dal punto di vista chimico-fisico e successivamente valutando, tramite test di rilascio *in vitro*, la loro capacità di controllare il rilascio di questo antibiotico.

Dopo un'iniziale approfondita indagine chimico-fisica della TCP, sono state preparate miscele binarie di questo principio attivo con le tre TACds in diversi rapporti in peso, precisamente TCP-TACd 1:1 (p/p), 1:2 (p/p), 1:3 (p/p), successivamente trattate con i classici procedimenti per ottenere complessi di inclusione o più in generale composti di interazione allo stato solido come le tecniche di coevaporazione e di kneading. Come metodo di eliminazione del solvente dalle soluzioni e dagli impasti si è fatto ricorso anche all'irraggiamento con microonde non solo perché questo procedimento è stato utilmente impiegato nella preparazione di complessi di inclusione farmaco-ciclodestrina, ma anche perché, oltre ad essere rapido, permette un buon controllo delle condizioni operative e una buona riproducibilità tant'è che viene vantaggiosamente utilizzato nell'industria farmaceutica per l'essiccamento in alternativa a quelli tradizionali per convezione di calore [38].

I sistemi preparati sono stati poi caratterizzati dal punto di vista termoanalitico mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC) e analisi termogravimetrica (TG), rilevando per ogni campione l'influenza del processo di preparazione sull'interazione antibiotico-carrier. Avendo la preparazione di tali addotti come scopo finale il rilascio protratto nel tempo e possibilmente controllato del farmaco, il passo successivo è stato saggiare le diverse combinazioni e confrontarle in termini di velocità di dissoluzione intrinseca (IDR) al fine di individuare quelle più promettenti per il nostro scopo.

L'IDR può essere definita come la velocità di dissoluzione di un principio attivo in condizioni di area superficiale esposta al mezzo di dissoluzione costante (in genere da compatti che non disgregano), a una determinata temperatura, velocità di agitazione, pH e forza ionica del mezzo di dissoluzione. Generalmente viene espressa in $\text{mg cm}^{-2} \text{min}^{-1}$ come si ottiene dividendo per l'area superficiale esposta (espressa in cm^2) la pendenza della retta del grafico che riporta in ordinata la quantità di farmaco rilasciata (in mg) e in ascissa il tempo (in min). Un valore di IDR $<0,1 \text{ mg cm}^{-2} \text{min}^{-1}$ indica che l'assorbimento del farmaco è limitato dalla velocità di dissoluzione, mentre quando è $>0,1 \text{ mg cm}^{-2} \text{min}^{-1}$ la velocità di

dissoluzione non dovrebbe rappresentare uno stadio limitante l'assorbimento del farmaco [39]. Le combinazioni a IDR più bassa (quindi con più spiccate caratteristiche di rallentamento del rilascio) si potranno proporre come candidati nell'allestimento di sistemi microparticellari a rilascio controllato sito-specifico della TCP.

Un ulteriore approccio per l'allestimento di sistemi a rilascio sito-specifico e prolungato della VCM·HCl e della TCP è stato quello di utilizzare co-formulanti diversi dalle tre TACds, come ad esempio il CRG, idrocolloide sfruttato in ambito farmaceutico per le proprietà che lo rendono in grado di modificare il rilascio di farmaci mediante interazioni ioniche [4].

Alla caratterizzazione chimico-fisica del CRG allo stato solido è seguita inizialmente la preparazione di miscele binarie di VCM·HCl e TCP con il carrier in diversi rapporti in peso e quindi di miscele ternarie dei due antibiotici con il CRG e con la TAγCd, il derivato peracetilato rivelatosi più efficiente nel controllare il rilascio dei due farmaci in esame [36,37]. I sistemi sono stati preparati per semplice miscelazione fisica o con i classici procedimenti per ottenere composti di interazione allo stato solido come lo kneading e la coevaporazione. Per l'eliminazione del solvente è stato utilizzato sia il Rotavapor sia l'irraggiamento con microonde della soluzione e degli impasti. Gli stessi sistemi sono stati poi caratterizzati dal punto di vista termooanalitico mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC), analisi termogravimetrica (TG) e spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR), accertando l'influenza del metodo di preparazione e dei diversi rapporti in peso sull'interazione antibiotico-carrier.

Avendo la preparazione di tali addotti come scopo finale il rilascio protratto nel tempo e possibilmente controllato del farmaco, le diverse combinazioni sono state anche saggiate e confrontate in termini di velocità di dissoluzione *in vitro* con il metodo del cestello rotante (apparecchiatura 2 secondo FU XI) al fine di individuare le combinazioni più indicate a prolungare per un maggior periodo di tempo il rilascio del farmaco.

Successivamente è stato tentato un ulteriore approccio per la preparazione dei sistemi farmaco-carrier prendendo in considerazione le tecniche di cristallizzazione sferica tra cui la “spherical agglomeration” (SA), la “transient emulsion” (TE) e la “crystal-co-agglomeration” (CCA).

I singoli farmaci, VCM·HCl e TCP, e ciascuna TACd sono stati individualmente trattati con le tecniche di SA e TE utilizzate per realizzare la cristallizzazione di un principio attivo e la sua contemporanea sferonizzazione, ossia la formazione di agglomerati cristallini sferici [40-43]. Ai sistemi farmaco-carrier sono state applicate sia le tecniche di SA e TE opportunamente modificate sia in particolare la tecnica di CCA che permette di ottenere la cristallizzazione e la contemporanea formazione di agglomerati sferici di un farmaco in miscela con un carrier o con un altro farmaco [44,45].

Tanto i singoli componenti quanto i sistemi farmaco-carrier così preparati sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico-fisico mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC), analisi termogravimetrica (TG), analisi termomicroscopica (HSM) e spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR).

Nell'ultimo anno di ricerca si è pensato di ampliare la caratterizzazione fisico-chimica allo stato solido dei due antibiotici e delle tre TACds utilizzate per l'allestimento dei sistemi a rilascio prolungato e dei sistemi binari farmaco-carrier di varia composizione, in particolare per quanto concerne lo stato amorfo dei singoli componenti e delle combinazioni farmaco-carrier. La parte preponderante di questa ricerca è stata svolta presso il Pharmaceutical Department, College of Pharmacy, University of Minnesota (Minneapolis, MN, USA) con la supervisione del Prof. Raj Suryanarayanan ed è stata principalmente rivolta allo studio dei fenomeni termici caratteristici dello stato amorfo come la “glass transition” e la “enthalpic recovery” eventualmente associata.

Le sostanze amorphe, infatti, possono essere caratterizzate da una temperatura di transizione vetrosa in corrispondenza della quale si verifica, nel corso del raffreddamento, il passaggio da una fase a bassa viscosità definita “rubbery” ad una a più alta viscosità, caratterizzata anche da maggior rigidità e fragilità,

definita “glassy” oppure, nel corso del riscaldamento, il passaggio inverso. In particolare, quando una sostanza nello stato rubbery (definito anche “supercooled liquid” e caratterizzato da elevata mobilità molecolare) viene raffreddata velocemente, si raggiunge una temperatura, definita appunto di transizione vetrosa, alla quale, per effetto dell’incremento della viscosità, si ha una deviazione da una fase di equilibrio ad una di non-equilibrio che presenta entalpia, entropia e volume specifico superiori a quelli del corrispondente “supercooled liquid” alla stessa temperatura (Figura 11).

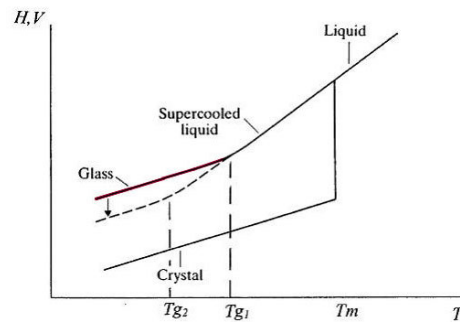


Figura 11. Illustrazione schematica della variazione di volume e di entalpia in funzione della temperatura per un materiale che passa attraverso la temperatura di transizione vetrosa.

Il materiale viene bloccato nel suo stato “glassy” in cui i movimenti traslazionali e rotazionali delle molecole sono significativamente ridotti e si manifestano solo i movimenti di tipo vibrazionale.

La “glass transition” è quindi caratterizzata da una variazione della capacità termica C_p del materiale espressa dalla derivata dell’entalpia rispetto alla temperatura $((\partial H/\partial T)_p)$ [46] ed è rappresentata in un profilo DSC da una deflessione endotermica della linea di base (Figura 12).

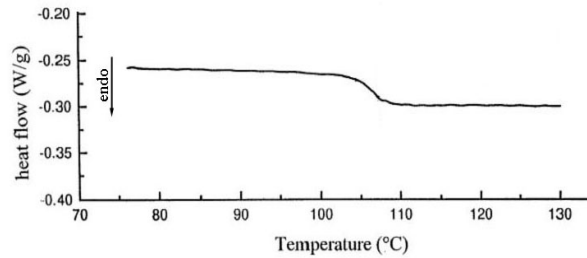


Figura 12. Profilo DSC di una “glass transition”.

Il materiale nello stato “glassy”, quindi di non equilibrio termodinamico, tende però nel tempo a spostarsi verso quello “rubbery”, cioè ad uno stato di equilibrio, con un processo definito “aging” o di “enthalpic relaxation”. Questo processo di rilassamento, che è massimo vicino alla temperatura di “glass transition”, si traduce appunto in una perdita di entalpia. In effetti, quando una sostanza viene raffreddata rapidamente e raggiunge lo stato “glassy”, acquisisce, alla temperatura di “glass transition”, un eccesso di entalpia la cui entità dipende da fattori come la velocità di raffreddamento, la geometria del campione, ecc. Nel tempo, e specialmente a temperature vicine a quelle della “glass transition”, il materiale tende a cedere questo eccesso di entalpia e a muoversi verso la condizione di “supercooled liquid”. Riscaldando questo materiale e facendogli attraversare la temperatura di “glass transition” fino a raggiungere lo stato “rubbery”, l’entalpia ceduta viene riacquistata e l’evento termico corrispondente prende il nome di “enthalpic recovery” che si osserva in DSC come ritorno esotermico verso la linea di base a prosecuzione della deflessione della “glass transition”. Nel suo insieme il fenomeno può presentare un andamento simile a quello di un picco DSC endotermico (Figura 13).

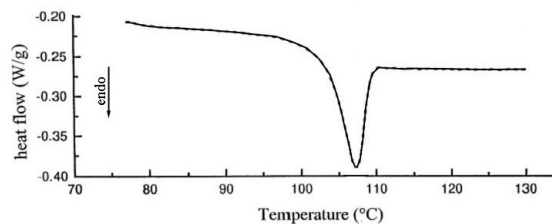


Figura 13. Profilo DSC di una “glass transition” associata ad “enthalpic recovery”.

Assumendo che l'entalpia recuperata sia equivalente a quella ceduta, il processo di "enthalpic relaxation" può essere studiato attraverso misure di "enthalpic recovery" associata alla "glass transition". Inoltre la velocità del processo di rilassamento è indice della mobilità molecolare del materiale amorfo, una proprietà che influenza la sua stabilità fisica e chimica. Nell'assunto che il processo di rilassamento molecolare possa essere correlato alla shelf life di un preparato farmaceutico di natura amorfa, la misura della "enthalpic recovery" può essere applicata negli studi di stabilità dei farmaci [47].

Mentre la VCM·HCl e la TCP presentano una natura intrinsecamente amorfa, le tre TACds considerate sono sostanze caratterizzate da un elevato grado di cristallinità, ma si isolano spesso allo stato amorfo quando si applicano tecniche di preparazione di sistemi farmaco-carrier come la ricristallizzazione da solventi, la cristallizzazione evaporativa e lo kneading. Queste tecniche sono state appunto applicate a combinazioni binarie di ciascun antibiotico con ciascuna TACd a due diversi rapporti in peso, facendo ricorso all'irraggiamento con microonde per l'eliminazione del solvente dalle soluzioni e dagli impasti.

Come i singoli componenti, tutti i preparati sono stati inizialmente sottoposti ad analisi DSC tradizionale allo scopo di mettere in evidenza eventuali transizioni vetrose. Nei casi in cui tale fenomeno termico era associato ad "enthalpic recovery" oppure mascherato da un altro evento termico come la desolvatazione o anche poco evidente nella curva DSC, il comportamento termico è stato studiato con la DSC a modulazione di temperatura (MDSC), una tecnica che, a differenza della DSC convenzionale, permette, con l'elaborazione matematica dei segnali generati, di separare il flusso di calore totale nella componente di capacità termica (definita anche flusso di calore reversibile) e nella componente cinetica (definita anche flusso di calore non reversibile). In questo modo è possibile separare gli eventi termici reversibili (come la "glass transition") da quelli non reversibili (come la "enthalpic recovery") che in una curva DSC standard risultano sovrapposti. Il principio su cui si basa la tecnica della MDSC è quello di sovrapporre ad un programma di riscaldamento lineare, quindi a velocità di riscaldamento costante, un programma di riscaldamento modulato, cioè a velocità non costante ma variabile nel tempo. Quest'ultima, definita appunto "velocità di

riscaldamento modulata”, permette di ottenere contemporaneamente informazioni sulla capacità termica e sul flusso di calore del campione in esame. La prima, definita “velocità di riscaldamento di base”, fornisce invece dati di flusso di calore totale che sono poi coincidenti con quelli della DSC standard.

La modulazione di temperatura è descritta in genere da una funzione sinusoidale ed è quindi caratterizzata da parametri come il periodo e l’ampiezza di modulazione [48].

Sui campioni analizzati sono stati poi determinati i profili di rilascio dei due farmaci dalle varie combinazioni con ciascuna TACd dopo invecchiamento per alcuni mesi nelle normali condizioni di conservazione.

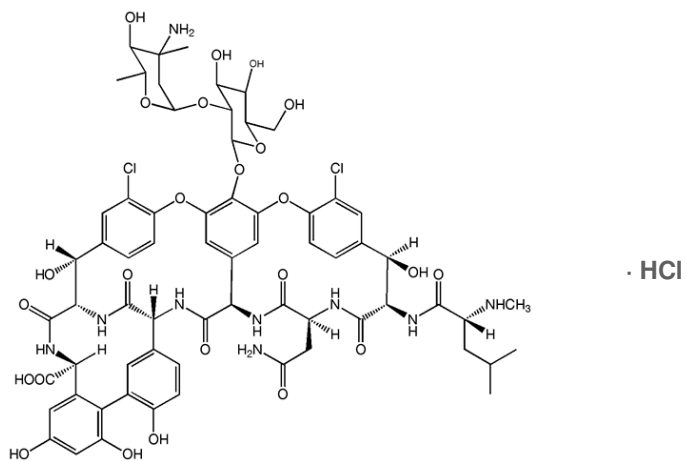
Le misure in termini di velocità di dissoluzione intrinseca (IDR) sono state condotte in tampone fosfato a pH 7,4 e 37 °C e i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli dei rispettivi campioni appena preparati.

Le combinazioni a IDR più bassa sono quelle con più spiccate caratteristiche di rallentamento del rilascio, adatte a prolungare per un maggiore periodo di tempo il rilascio di ciascun antibiotico nei sistemi microparticellari proposti per il rilascio sito-specifico di VCM·HCl e TCP.

Parte Sperimentale

Materiali

Vancomicina cloridrato (VCM·HCl)

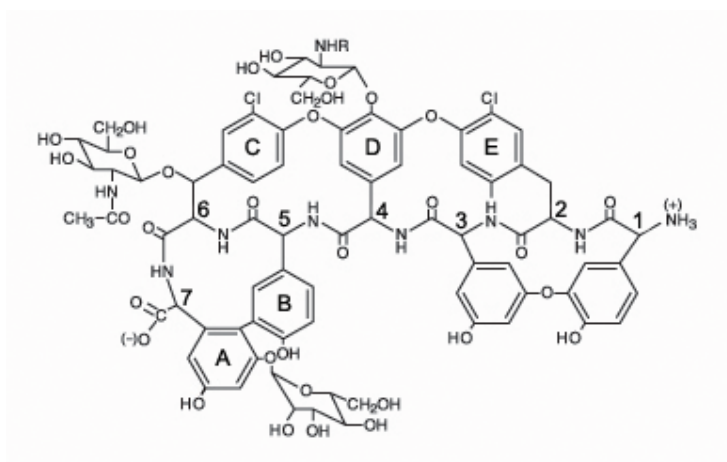


Prodotta da Pharmatex Italia s.r.l. (Milano, Italia) con le seguenti caratteristiche dichiarate:

▪ grado di purezza:	≈99%
▪ formula bruta:	$C_{66}H_{76}Cl_3N_9O_{24}$
▪ peso molecolare ($g\ mol^{-1}$):	1485,72
▪ contenuto d'acqua in peso (da analisi TG, %)	≈10
▪ solubilità in acqua a 25 °C ($g\ L^{-1}$):	>100
▪ punto isoelettrico:	7,7 [49]; 8,3 [50]
▪ pK_a :	$pK_1=12$; $pK_2=10,40$; $pK_3=9,59$; $pK_4=8,89$; $pK_5=7,75$; $pK_6=2,18$

La VCM·HCl commerciale è stata setacciata raccogliendo la frazione granulometrica <180 μm .

Teicoplanina (TCP)



R:

- A₂-1 (Z)-4-decenoic acid
- A₂-2 8-methylnonanoic acid
- A₂-3 n-decanoic acid
- A₂-4 8-methyldecanoic acid
- A₂-5 9-methyldecanoic acid

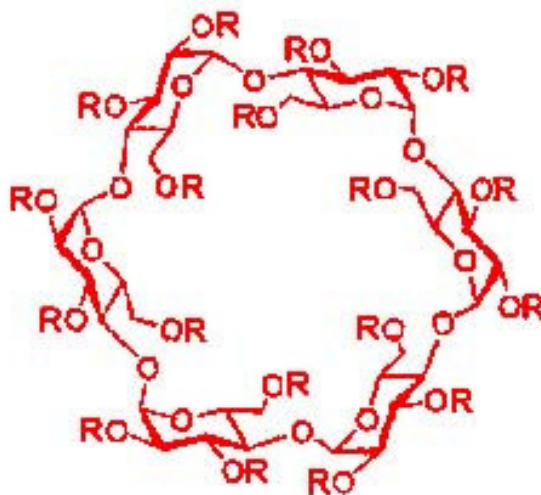
Prodotta da Pharmatex Italia s.r.l. (Milano, Italia) con le seguenti caratteristiche dichiarate:

- grado di purezza: $\approx 90\%$
- formula bruta:
 - A₂-1 C₈₈H₉₅Cl₂N₉O₃₃
 - A₂-2 C₈₈H₉₇Cl₂N₉O₃₃
 - A₂-3 C₈₈H₉₇Cl₂N₉O₃₃
 - A₂-4 C₈₉H₉₉Cl₂N₉O₃₃
 - A₂-5 C₈₉H₉₉Cl₂N₉O₃₃
- peso molecolare medio (g mol⁻¹): 1885
- contenuto d'acqua in peso (da analisi TG, %): 6,2
- solubilità in acqua a 25 °C (g L⁻¹): tra 10 e 30

La TCP commerciale è stata setacciata raccogliendo la frazione granulometrica <180 µm.

Triacetil α -ciclodestrina (TA α Cd)

Prodotta da Wacker Chemie GmbH (Monaco, Germania) con le seguenti caratteristiche dichiarate:



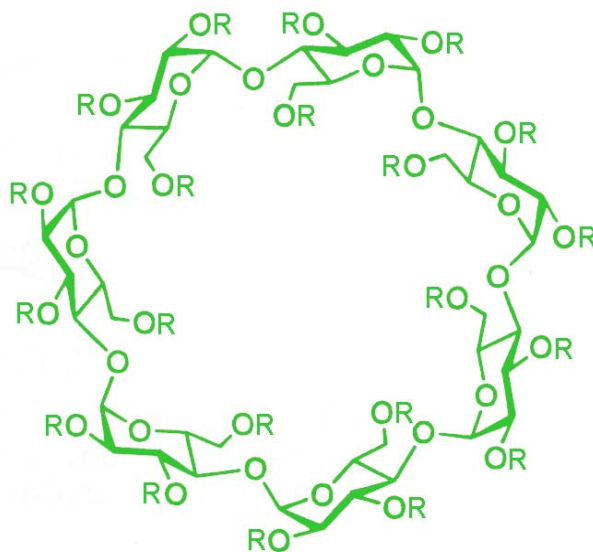
R=COCH₃

- | | |
|---|------|
| • peso molecolare (g mol ⁻¹): | 1728 |
| • solubilità in acqua a 25 °C (g L ⁻¹): | <1 |
| • punto di fusione (°C): | ≈232 |
| • contenuto d'acqua in peso (da analisi TG, %): | 1,2 |

La TA α Cd commerciale è stata setacciata raccogliendo la frazione granulometrica <180 μ m.

Triacetil β -ciclodestrina (TA β Cd)

Prodotta da Wacker Chemie GmbH (Monaco, Germania) con le seguenti caratteristiche dichiarate:

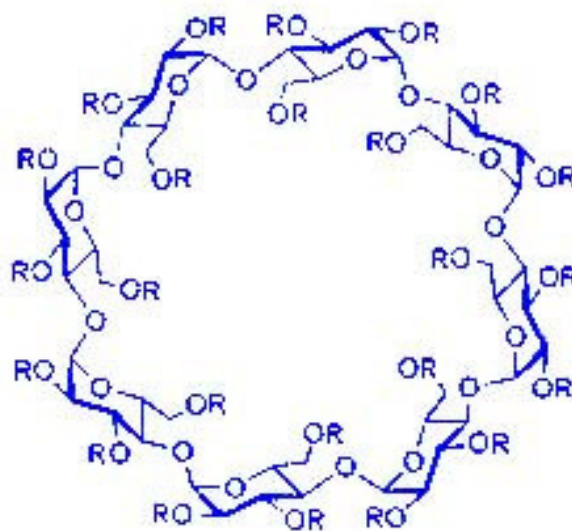


- peso molecolare (g mol^{-1}): 2017
- solubilità in acqua a 25 °C (g L^{-1}): <1
- punto di fusione (°C): \approx 218
- contenuto d'acqua in peso (da analisi TG, %): 0,7

La TA β Cd commerciale è stata setacciata raccogliendo la frazione granulometrica <180 μm .

Triacetil γ -ciclodestrina (TA γ Cd)

Prodotta da Wacker Chemie GmbH (Monaco, Germania) con le seguenti caratteristiche dichiarate:

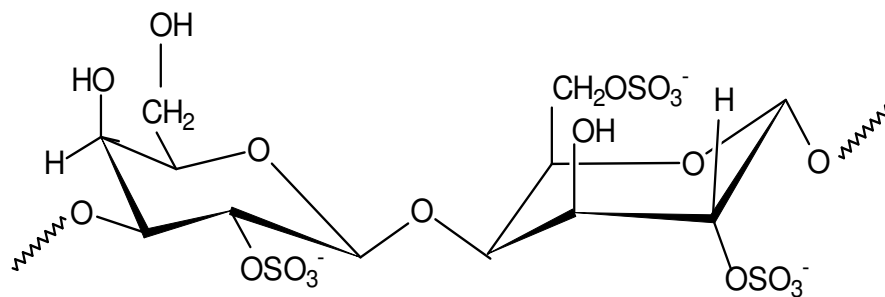


- peso molecolare (g mol⁻¹): 2305
- solubilità in acqua a 25 °C (g L⁻¹): <1
- punto di fusione (°C): ≈225
- contenuto d'acqua in peso (da analisi TG, %): ≈1

La TA γ Cd commerciale è stata setacciata raccogliendo la frazione granulometrica <180 μ m.

λ-carragenano (CRG)

Prodotto da Gianni S.p.A. (Milano, Italia) il cui nome commerciale è Viscarin GP 209 NF.



Il CRG si presenta come polvere di colore giallo ocra, solubile in acqua a 80 °C. E' una sostanza stabile, abbastanza igroscopica e deve essere conservata in luogo fresco e asciutto.

Metodi e apparecchiature

Cristallizzazione delle TACds

Porzioni di circa 500 mg di ciascuna TACd sono state sciolte nella minima quantità necessaria di acetato di etile (1-3 mL) oppure di una soluzione acetone:acqua 1:1 (v/v) (2-5 mL) sotto agitazione manuale e blando riscaldamento (circa 40 °C) fino ad ottenere una soluzione limpida. Ciascuna soluzione è stata tenuta in condizioni di temperatura e pressione ambientali fino al completo allontanamento del solvente. I residui sono stati macinati in mortaio con pestello e setacciati raccogliendo la frazione granulometrica <180 µm.

Preparazione delle miscele fisiche (MF)

Sistemi binari VCM·HC-TACd e TCP-TACd

Le miscele fisiche binarie composte da VCM·HCl o TCP e ciascuna delle TACds saggiate a varie composizioni (Tabelle 2a e 2b) sono state preparate mescolando in turbola per 20 min, a 60 rotazioni al minuto, adeguate quantità di due componenti in polvere (frazione granulometrica <180 µm) tali da ottenere circa 5 g di ciascuna miscela. I campioni sono stati omogeneizzati per blanda macinazione manuale con pestello in mortaio d'agata per 2 min.

Tabella 2a. Rapporti in peso (p/p) e in moli (mol/mol) farmaco/carrier e frazioni di massa (W_{carrier}) e molari (X_{carrier}) del carrier nelle combinazioni VCM·HCl-TACd.

Campione	Rapporti farmaco/carrier		Frazione di carrier	
	p/p	mol/mol	W_{carrier}	X_{carrier}
VCM·HCl-TA α Cd	1:1	1:0,86	0,50	0,46
	1:3	1:2,58	0,75	0,72
VCM·HCl-TA β Cd	1:1	1:0,74	0,50	0,43
	1:3	1:2,21	0,75	0,69
VCM·HCl-TA γ Cd	1:1	1:0,64	0,50	0,39
	1:3	1:2,00	0,75	0,67

Tabella 2b. Rapporti in peso (p/p) e in moli (mol/mol) farmaco/carrier e frazioni di massa (W_{carrier}) e molari (X_{carrier}) del carrier nelle combinazioni TCP-TACd.

Campione	Rapporti farmaco/carrier		Frazione di carrier	
	p/p	mol/mol	W_{carrier}	X_{carrier}
TCP-TA α Cd	1:1	1:1,09	0,50	0,52
	1:2	1:2,18	0,67	0,69
	1:3	1:3,27	0,75	0,76
TCP-TA β Cd	1:1	1:0,93	0,50	0,48
	1:2	1:1,87	0,67	0,65
	1:3	1:2,81	0,75	0,74
TCP-TA γ Cd	1:1	1:0,82	0,50	0,45
	1:2	1:1,63	0,67	0,62
	1:3	1:2,45	0,75	0,71

Sistemi binari VCM·HCl-CRG e TCP-CRG

Sistemi ternari VCM·HCl-CRG-TA γ Cd e TCP-CRG-TA γ Cd

Le miscele fisiche binarie composte da VCM·HCl e CRG e da TCP e CRG e quelle ternarie composte da VCM·HCl, CRG e TA γ Cd e da TCP, CRG e TA γ Cd in vari rapporti in peso (Tabella 3) sono state preparate mescolando in turbula per 20 minuti, a 60 rotazioni al minuto, adeguate quantità dei componenti in polvere (frazione granulometrica <180 μ m) tali da ottenere circa 3 g per ciascuna miscela. Ogni campione è stato poi omogeneizzato per blanda macinazione manuale con pestello in mortaio d'agata per circa 2 minuti.

Tabella 3. Composizione delle combinazioni VCM·HCl-CRG, TCP-CRG, VCM·HCl-CRG-TA γ Cd e TCP-CRG-TA γ Cd.

Campione	Rapporti farmaco-carrier (p/p)
VCM·HCl-CRG	1:1
	1:2
	1:3
	1:9
VCM·HCl-CRG-TA γ Cd	1:1:1
	1:1:3
TCP-CRG	1:1
	1:2
	1:3
TCP-CRG-TA γ Cd	1:1:1
	1:1:3

*Impasto molle o kneading (KN)**Sistemi binari VCM·HCl-TACd e TCP-TACd*

Si tratta di un metodo di macinazione in fase semisolida nel quale alle singole TACds (circa 500 mg) o alle miscele fisiche della VCM·HCl o della TCP con ciascuna TACd (circa 1,5 g) viene aggiunta la minima quantità di una miscela acetone:acqua 1:1 (v/v) (circa 1-2 mL per ciascun impasto) necessaria per formare un impasto molle che viene poi stemperato manualmente in un cristallizzatore di vetro con una spatola. Quando la massa è omogenea il campione viene irraggiato con microonde in uno strumento Pabish CM-Acquatronic a 450 W (pari al 50% della sua potenza massima) per circa 10 min e quindi, una volta essiccato, viene setacciato raccogliendo la frazione granulometrica <180 µm.

*Sistemi binari VCM·HCl-CRG e TCP-CRG**Sistemi ternari VCM·HCl-CRG-TAγCd e TCP-CRG-TAγCd*

Si tratta di un metodo preparativo in fase semisolida nella quale alle miscele fisiche (circa 1 g) di ciascun antibiotico con i diversi carrier viene aggiunta la minima quantità di etanolo (circa 1-2 mL per ciascun impasto) sufficiente a formare un impasto molle poi miscelato manualmente su un vetro di orologio con una spatola. Il prodotto così ottenuto viene messo in stufa alla temperatura di 50 °C fino a peso costante per un tempo necessario a permettere l'evaporazione del solvente. La polvere viene macinata in mortaio d'agata per alcuni minuti e setacciata raccogliendo la frazione granulometrica <180 µm.

Coevaporazione (COEV)

Sistemi binari VCM·HCl-TACd e TCP-TACd

Porzioni di circa 500 mg di ciascuna TACd e di circa 1,5 g delle miscele fisiche della VCM·HCl o della TCP con ciascuna TACd sono sciolte in beuta con opportune quantità (5-20 mL) di una soluzione acetone:acqua 1:1 (v/v) sotto agitazione magnetica e blando riscaldamento (circa 40 °C) fino ad ottenere una soluzione limpida. Le soluzioni sono poi state trasferite in un becker e irraggiate con microonde di potenza pari a 450 W fino ad eliminazione completa del solvente (peso costante). I prodotti di coevaporazione sono stati poi setacciati raccogliendo la frazione granulometrica <180 µm.

Sistemi binari VCM·HCl-CRG e TCP-CRG

Sistemi ternari VCM·HCl-CRG-TAγCd e TCP-CRG-TAγCd

Una determinata quantità di antibiotico viene sciolta nella minima quantità di solvente (acqua) necessaria ad ottenere una soluzione limpida (es. 750 mg di VCM·HCl in 55 mL di acqua, 750 mg di TCP in 150 mL di acqua).

Allo stesso modo viene sciolta una quantità opportuna di CRG nella minima quantità di solvente (750 mg di CRG in 172 mL di acqua) necessaria a permettere la solubilizzazione del polimero sotto agitazione magnetica e blando riscaldamento (circa 60 °C).

La soluzione di antibiotico viene quindi aggiunta goccia a goccia alla soluzione di CRG sotto agitazione magnetica e blando riscaldamento fino a ottenere una soluzione limpida. La successiva eliminazione del solvente viene effettuata in Rotavapor oppure per irraggiamento con microonde di potenza pari a 450 W. I prodotti di coevaporazione sono stati poi macinati in mortaio e setacciati raccogliendo la frazione granulometrica <180 µm.

Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)

Per la registrazione degli spettri IR è stato utilizzato uno spettrofotometro FT-IR Perkin Elmer Mod. Spectrum One (Perkin Elmer, Monza (MI), Italia) equipaggiato con un accessorio Pike MIRacle™ ATR (risoluzione 4 cm^{-1}).

Analisi termomicroscopica (HSM)

Per l'osservazione microscopica della morfologia dei campioni e degli eventi termici conseguenti al riscaldamento è stato utilizzato un microscopio a luce polarizzata Reichert dotato di obiettivo con ingrandimento 10x, equipaggiato con un apparecchio Mettler FP82HT/FP80 (Mettler Toledo, Novate Milanese, (MI), Italia) alla velocità di riscaldamento di 10 °C min^{-1} nell'intervallo di temperatura compreso tra i 30 e 300 °C. I campioni, posti tra due vetrini, sono stati osservati come tali (cioè in aria) oppure dispersi in olio di silicone. Le immagini registrate con una videocamera Moticam 2000 sono state poi trasferite a un computer per la loro elaborazione con il programma Adobe Photoshop 7.0.

Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

I valori di temperatura e di entalpia sono stati misurati con due diversi strumenti:



-sistema Mettler Star^e (Mettler Toledo, Novate Milanese, Milano, Italia) equipaggiato con una cella DSC 821^e e un sistema di raffreddamento Intracooler (Julabo mod. FT 900) in cui le analisi sono state condotte in atmosfera di N_2 su campioni del peso di 2-5 mg (microbilancia Mettler M3)

posti in crogioli di alluminio da 40 μL . Tramite una pressa i crogioli sono stati poi chiusi con un coperchio nel quale è stato praticato un piccolo foro con uno spillo. Come riferimento è stato utilizzato un analogo crogiolo vuoto.

Le analisi sono state condotte ad una velocità di riscaldamento di $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ nell'intervallo di temperatura tra -10 e $300\text{ }^{\circ}\text{C}$.

-DSC modello 2920 (TA Instrument, New Castle, DE)

equipaggiato con un sistema di raffreddamento in cui le analisi sono state condotte in atmosfera di N_2 su campioni del peso di 5-8 mg (microbilancia Mettler



UMT2) posti in crogioli di alluminio da 40 μL . Tramite una pressa i crogioli sono stati poi chiusi con un coperchio nel quale è stato praticato un piccolo foro con uno spillo. Come riferimento è stato utilizzato un analogo crogiolo vuoto.

Le analisi sono state condotte ad una velocità di riscaldamento di $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ nell'intervallo di temperatura tra -10 e $280\text{ }^{\circ}\text{C}$.

DSC a modulazione di temperatura (MDSC)

Le analisi sono state condotte con uno strumento DSC modello 2920 (TA Instrument, New Castle, DE) equipaggiato con un sistema di raffreddamento, in atmosfera di N_2 su campioni del peso di 10-12 mg (microbilancia Mettler UMT2) posti in crogioli di alluminio da 40 μL . Tramite una pressa i crogioli sono stati poi chiusi con un coperchio nel quale è stato praticato un piccolo foro con uno spillo. Come riferimento è stato utilizzato un analogo crogiolo vuoto.

Le analisi sono state condotte nell'intervallo di temperatura tra 30 e $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ impiegando una velocità di riscaldamento di $1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, un periodo di modulazione di 60 secondi e un'ampiezza di modulazione di $0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Analisi termogravimetrica (TG)

Le perdite di massa sono state registrate con tre diversi strumenti:



-apparecchio Mettler TA (Mettler Toledo, Novate Milanese, Milano, Italia) equipaggiato con una cella TG 50 in cui le analisi sono state condotte ad una velocità di scansione di $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ nell'intervallo di temperatura da 30 a $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ in atmosfera di aria statica.

I campioni, posti in crogioli di allumina, avevano un peso compreso fra 4 e 6 mg.

-apparecchio TGA/DSC 1 (Mettler Toledo, Novate Milanese, Milano, Italia) in cui le analisi sono state condotte ad una velocità di scansione di $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ nell'intervallo di temperatura da 30 a $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ in atmosfera di aria statica. I campioni, posti in crogioli di allumina, avevano un peso compreso fra 4 e 6 mg.



-apparecchio Q50 (TA Instrument, New Castle, DE) in cui le analisi sono state condotte ad una velocità di scansione di $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ nell'intervallo di temperatura da 30 a $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ in atmosfera di N_2 . I campioni, posti in crogioli di alluminio da $40\text{ }\mu\text{L}$ aperti, avevano un peso compreso fra 5 e 8 mg.

Determinazione della velocità di dissoluzione

Sistemi binari VCM-HCl-CRG e TCP-CRG

Sistemi ternari VCM-HCl-CRG-TA γ Cd e TCP-CRG-TA γ Cd

I test di dissoluzione sono stati condotti con il metodo del cestello rotante (apparecchiatura 2 secondo FU XI) in un dissolutore Electrolab Mod. TDT-08L

(Electrolab, Bombay, India). I test sono stati condotti in tampone fosfato a pH 7,4 (il volume variava da 250 mL a 600 mL) in bagno termostato a $37 \pm 0,5$ °C. Le compresse sono state preparate comprimendo 200-250 mg di polvere con una pressa idraulica Perkin Elmer a una forza di compressione di 5 ton applicata per 3 minuti.

A intervalli di tempo prefissati si prelevavano circa 5 mL di fluido di dissoluzione rimpiazzando il volume di volta in volta con tampone fresco.

Le concentrazioni di VCM·HCl e TCP sono state determinate per via spettrofotometrica UV utilizzando uno strumento Perkin Elmer Mod. Lambda 20 (Perkin-Elmer, Monza (MI), Italia), alla lunghezza d'onda di massimo assorbimento (λ_{\max} VCM=281 nm; λ_{\max} TCP=280 nm in solvente acquoso) in una cella dello spessore di 1 cm. Le analisi sono state condotte in triplicato.

La quantità cumulativa di VCM·HCl e TCP rilasciata al tempo t è stata calcolata utilizzando la seguente equazione:

$$Q_t = V_R C_t + \sum_{i=0}^{t-1} V_S C_i \quad \text{Eq. 1}$$

dove:

V_R = volume totale della fase ricevente (250-600 mL)

V_S = volume del campione (5 mL)

C_i = concentrazione del farmaco al tempo i ($i < t$) ($\mu\text{g/L}$)

C_t = concentrazione del farmaco al tempo t ($\mu\text{g/L}$)

Determinazione della velocità di dissoluzione intrinseca (IDR)

Sistemi binari VCM·HCl-TACd e TCP-TACd

I test di IDR sono stati condotti con un dissolutore Electrolab Mod. TDT-08L (Electrolab, Bombay, India) a otto vessel equipaggiato con un kit per la determinazione della velocità di dissoluzione intrinseca, in 150 mL di tampone

fosfato a pH 7,4 in bagno termostato a $37\pm 0,5$ °C. I compatti di 8 mm di diametro erano preparati comprimendo 250 mg di polvere direttamente in un adatto supporto in acciaio con una pressa idraulica Perkin Elmer a una forza di compressione di 2 ton applicata per 1 min. Il supporto contenente la compressa veniva quindi fissato al sistema rotante del dissolutore, dando così inizio al test.

A intervalli di tempo prefissati mediante una pipetta venivano prelevati circa 4,2 mL di fase ricevente rimpiazzando il volume prelevato di volta in volta con tampone fresco.

Le concentrazioni di VCM·HCl e di TCP sono state determinate per via spettrofotometrica nell'UV utilizzando uno strumento Perkin Elmer Mod. Lambda 20 (Perkin-Elmer, Monza (MI), Italia), alla lunghezza d'onda di massimo assorbimento (λ_{\max} VCM·HCl=281 nm; λ_{\max} TCP=280 nm in solvente acquoso) in una cella dello spessore di 1 cm. Le analisi sono state condotte in triplicato.

La quantità cumulativa di VCM·HCl e di TCP rilasciata al tempo t è stata calcolata utilizzando l'equazione 1.

Alla fine di ciascun test di dissoluzione le compresse venivano recuperate e asciugate con carta da filtro e si prelevava con una spatola una porzione di polvere da analizzare in DSC e in TG allo scopo di verificare eventuali modificazioni dello stato solido del preparato iniziale avvenute durante il processo di dissoluzione.

Cristallizzazione sferica

Spherical agglomeration (SA) e transient emulsion (TE)

Un determinato quantitativo di sostanza viene sciolto in un opportuno volume di “good solvent” mantenendo la temperatura a 50 °C. La soluzione così ottenuta è poi aggiunta goccia a goccia ad un determinato volume di “poor solvent” alla temperatura di 25 °C mantenendo un'agitazione magnetica costante di 600 rpm per 10 min. Al sistema così ottenuto viene aggiunto un opportuno

volume di “bridging liquid” mantenendo l’agitazione costante a 600 rpm per altri 60 min. La sospensione così ottenuta è poi centrifugata e il residuo solido viene posto in essiccatore su P₂O₅ fino a peso costante.

La scelta dei solventi dipende dal loro grado di miscibilità e dalla solubilità della sostanza in esame in ciascuno di essi.

In particolare la sostanza deve essere solubile nel “good solvent” e poco solubile nel “poor solvent” e i due solventi devono essere fra loro parzialmente miscibili. Il “bridging liquid” deve essere compatibile con la sostanza e generalmente immiscibile o poco miscibile con il “poor solvent”.

La TE è una modificazione della SA in cui il “bridging liquid” viene aggiunto direttamente al “good solvent”.

Crystal-co-agglomeration (CCA)

La tecnica consiste nello sciogliere una delle due sostanze in esame direttamente nel “bridging liquid”, che in questo caso funziona quindi anche da “good solvent”, lavorando sotto ghiaccio per evitare l’evaporazione del solvente. Nella soluzione così ottenuta viene uniformemente disperso un determinato quantitativo della seconda sostanza mantenendo un’agitazione del sistema di 300 rpm per pochi min. A questo sistema viene quindi aggiunto goccia a goccia il “poor solvent” al quale possono essere anche addizionati eventuali polimeri mantenendo un’agitazione di 800 rpm per 30 min. L’agitazione prosegue fino all’ottenimento degli agglomerati sferici che vengono poi recuperati mediante centrifugazione ed essiccati a temperatura ambiente.

Risultati e Discussione

Combinazioni con co-formulanti

Caratterizzazione chimico-fisica della VCM·HCl e della TCP

A completamento dell'indagine chimico-fisica della VCM·HCl allo stato solido, che è già stata ampiamente trattata in nostri precedenti studi [3], è stato preparato un campione per cristallizzazione del prodotto commerciale da una soluzione di tetraidrofurano (THF). Sperimentalmente si è operato sciogliendo a caldo ≈ 100 mg di VCM·HCl in 50 mL di THF. La soluzione però anche dopo riscaldamento a incipiente ebollizione non si presentava limpida ed è stato necessario quindi aggiungere una quantità di H₂O tale da raggiungere un rapporto volumetrico THF:H₂O di 5:1 (v/v) per la completa solubilizzazione della VCM·HCl. La soluzione viene lasciata quindi raffreddare spontaneamente a temperatura ambiente e quindi filtrata sotto vuoto su buckner per recuperare il precipitato.

In Figura 14 sono riportate le curve DSC della VCM·HCl commerciale (sopra) e di quella cristallizzata da THF (sotto).

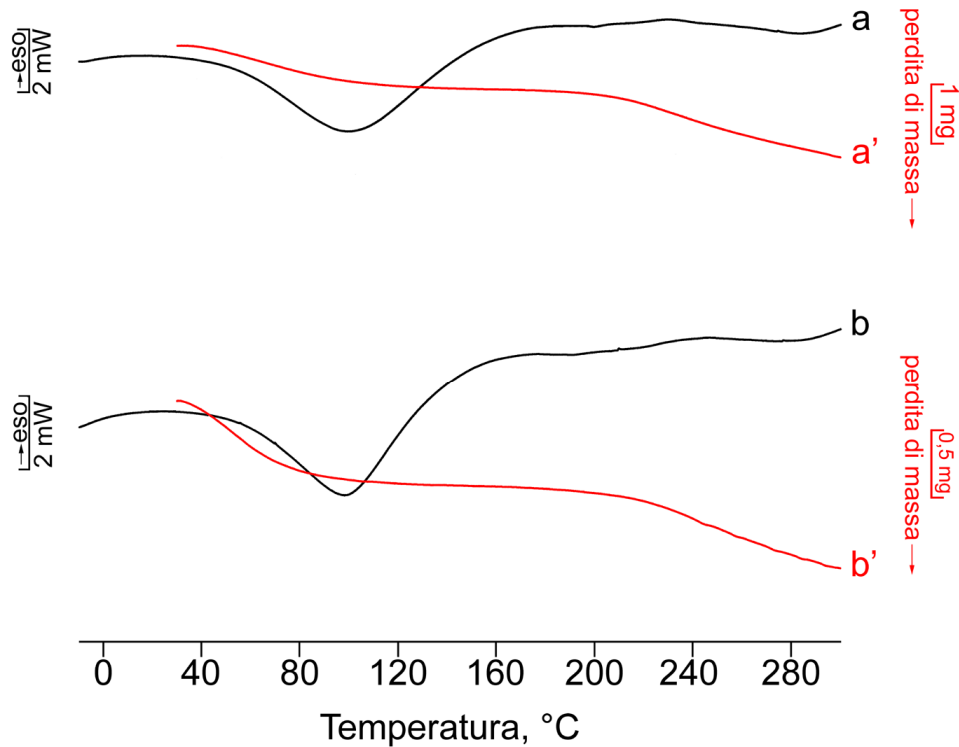


Figura 14. Curve DSC e TG della VCM·HCl commerciale (a,a') e di quella cristallizzata da THF (b,b').

Nel preparato cristallizzato da THF come nel prodotto commerciale l'endoterma di disidratazione nell'intervallo di temperatura compreso tra circa 20 e 173 °C, corrispondente ad una perdita di massa in TG di circa il 10% per la VCM·HCl commerciale e di circa il 15% per quella cristallizzata da THF, è seguita dalla decomposizione del campione senza che venga registrata prima alcuna endoterma di fusione. Questo tracciato è tipico delle sostanze amorfe con acqua di assorbimento superficiale.

Il campione ottenuto per cristallizzazione non risulta quindi cristallino in DSC. Il campione è stato anche posto su vetrino, disperso in olio di silicone e osservato al microscopio a luce polarizzata dotato di obiettivo con ingrandimento 10x. Le

immagini indicano che mentre la VCM·HCl commerciale è amorfa avendo un aspetto vetroso (Figura 15a), il preparato isolato da THF è cristallino a temperatura ambiente (Figura 15b).

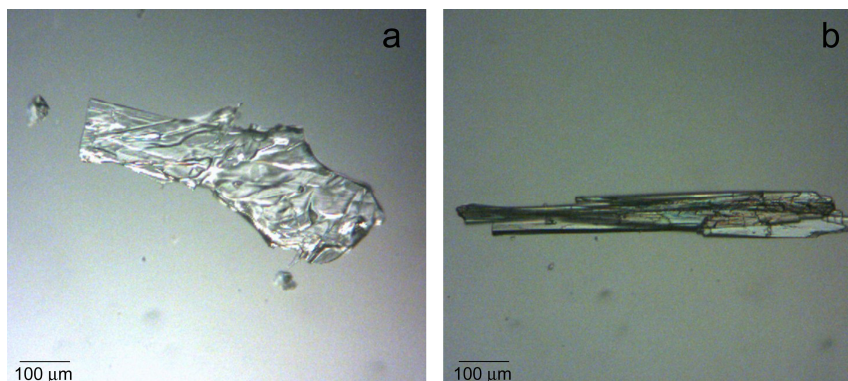


Figura 15. Fotografie registrate al microscopio ottico della VCM·HCl commerciale (a) e cristallizzata da THF (b).

In Figura 16 sono riportate le fotografie dei cristalli registrate durante il riscaldamento al termomicroscopio (HSM) in un intervallo di temperatura compreso tra 30 e 300 °C ad una velocità di scansione di 10 °C min⁻¹. Per effetto del riscaldamento il cristallo perde subito i contorni definiti e si assiste ad un progressivo imbrunimento del campione che rammollisce e poi si decompone. Il cristallo quindi sfiorisce per la desolvatazione indotta dal riscaldamento e perde la struttura cristallina convertendosi in amorfo. Questo spiega il comportamento in DSC del campione cristallizzato da THF, simile a quello della VCM·HCl commerciale amorfa.

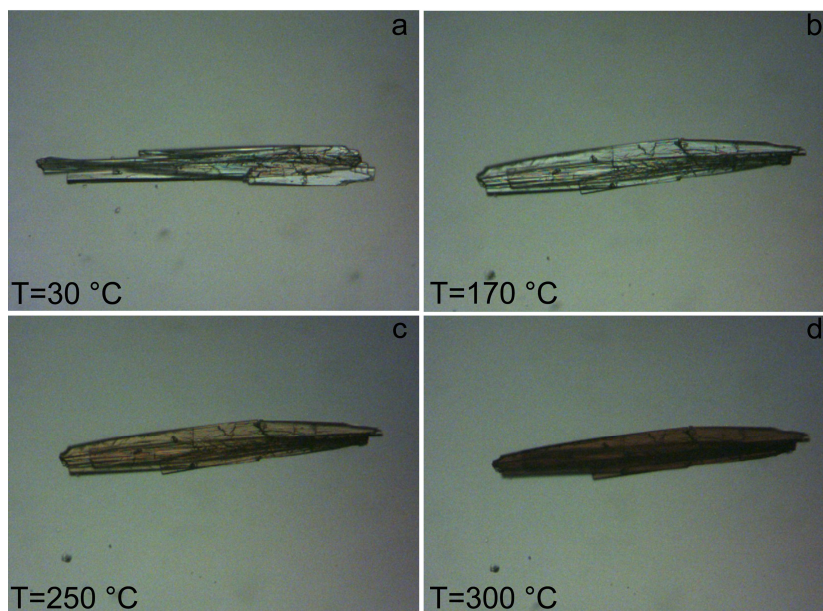


Figura 16. Fotografie registrate all'HSM della VCM-HCl cristallizzata da THF a temperatura ambiente (a), a 170 °C (b), a 250 °C (c) e a 300 °C (d).

Per l'indagine chimico-fisica della TCP allo stato solido sono stati preparati campioni per cristallizzazione del prodotto commerciale da soluzioni in diversi solventi. In particolare la TCP è stata sciolta nei solventi riportati in Tabella 4 nelle quantità indicate.

Tabella 4. Solventi utilizzati per la cristallizzazione della TCP.

solvente	mL per 50 mg di TCP
acqua	3
metanolo	30
etanolo	90
acetone	75
THF/H ₂ O 5:1 (v/v)	36

Le soluzioni di TCP nei solventi organici, anche dopo riscaldamento fino ad incipiente ebollizione, non si presentavano limpide ed è stato quindi necessario

filtrarle per filtro a pieghe in beuta. I filtrati sono stati poi lasciati raffreddare spontaneamente a temperatura ambiente. In nessun caso si è ottenuto un precipitato cristallino perché la sostanza di partenza amorfa si mantiene tale anche quando precipita dalla soluzione, come confermato dall'analisi termica. Anche dopo parecchi giorni non si è osservata invece precipitazione dalla soluzione di THF/H₂O 5:1 (v/v). In Figura 17 sono riportate le curve DSC e TG della TCP commerciale che mostrano il tracciato tipico di una sostanza amorfa con acqua di assorbimento superficiale.

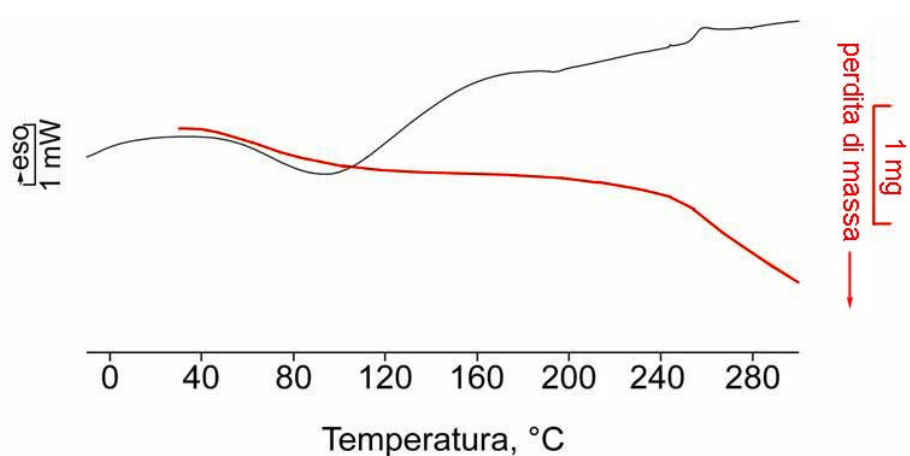


Figura 17. Curve DSC (nero) e TG (rosso) della TCP commerciale.

Dopo un primo effetto endotermico di disidratazione tra 26 e 175 °C, associato a una perdita di massa in TG pari a circa 6%, si ha la decomposizione del campione senza che si registri fusione.

La natura amorfa del campione è confermata anche dall'analisi termomicroscopica del prodotto commerciale che a temperatura ambiente appare di aspetto vetroso (Figura 18a). Durante il riscaldamento si assiste ad un progressivo annerimento del campione che rammollisce e poi decompone a ≈ 300 °C (Figura 18b e 18c).



Figura 18. Fotografie registrate all'HSM della TCP a temperatura ambiente (a), a 274 °C (b) e a 300 °C (c).

Sistema binario TCP-TA α Cd

Per l'indagine termoanalitica delle interazioni allo stato solido nei sistemi binari della TCP con le ciclodestrine peracetilate è bene ricordare che la TCP è un farmaco amorfo e quindi, negli studi di interazione con le TACds cristalline, l'effetto termico di riferimento nei tracciati DSC è l'endoterma di fusione del carrier. Eventuali variazioni di parametri caratteristici quali temperatura di picco (T_{fus}) e entalpia di fusione (ΔH_{fus}) possono essere infatti ricondotti a fenomeni di interazione allo stato solido.

In Figura 19 sono riportate le curve DSC della TCP, della TA α Cd, della loro miscela fisica in rapporto 1:2 (p/p) e dei preparati ottenuti per irraggiamento con microonde sia della soluzione acetone:acqua 1:1 (v/v) sia dell'impasto molle della stessa miscela.

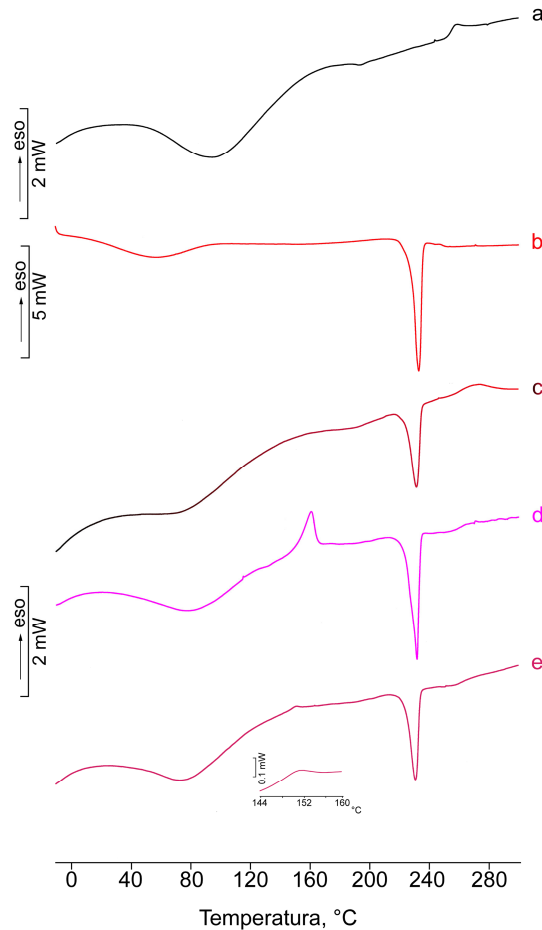


Figura 19. Curve DSC della TCP (a), della TA α Cd (b), della miscela fisica TCP-TA α Cd 1:2 (p/p) tal quale (c) e dopo irraggiamento con microonde da soluzione (d) e da impasto molle (e). In evidenza nella curva e l'effetto esotermico a circa 152 °C.

La TA α Cd (Figura 19b) mostra un comportamento termico caratteristico di una sostanza cristallina idrata [51] che si disidrata in una forma anidra a pf 231,0 \pm 0,3 °C ($\Delta H_{\text{fus}} = 43\pm 3 \text{ J g}^{-1}$).

La curva DSC della miscela fisica TCP-TA α Cd rivela un tracciato corrispondente alla somma pesata degli effetti termici caratteristici del principio attivo e del carrier (Figura 19c).

Dopo trattamento con le microonde si registra un effetto esotermico a circa 152 °C dovuto all'amorfizzazione del carrier in seguito all'interazione allo stato solido

tra TCP e TA α Cd, più marcata nel preparato ottenuto da cristallizzazione evaporativa (Figura 19d) rispetto a quello da impasto molle (Figura 19e).

Un comportamento simile è stato registrato anche per i sistemi della TCP con TA α Cd rispettivamente 1:1 e 1:3 (p/p) e pertanto le rispettive curve termiche non vengono riportate.

In Tabella 5 sono riportati i valori di IDR ottenuti per le diverse combinazioni TCP-TA α Cd saggiate e ciascun dato è la media di almeno tre determinazioni (coefficiente di variazione $\leq 7\%$).

Tabella 5. Velocità di dissoluzione intrinseca del sistema binario TCP-TA α Cd.

		IDR ($\text{mg cm}^{-2} \text{min}^{-1}$)		
	p/p	MF ^a	COEV ^a	KN ^a
TCP-TA α Cd	1:1	0,518	0,512	0,378
	1:2	0,262	0,252	0,226
	1:3	0,176	0,164	0,142

^aMF=miscela fisica, COEV=prodotto ottenuto per irraggiamento con microonde da una soluzione idroacetoneica, KN= prodotto ottenuto per irraggiamento con microonde da un impasto molle.

Come si può vedere dai risultati sperimentali, l'effetto rallentante sul rilascio della TCP, che allo stato puro presenta un valore di IDR pari a $2,76 \text{ mg cm}^{-2} \text{min}^{-1}$, si manifesta già nelle miscele fisiche e in misura direttamente proporzionale alla quantità di carrier presente nella combinazione (Figura 20).

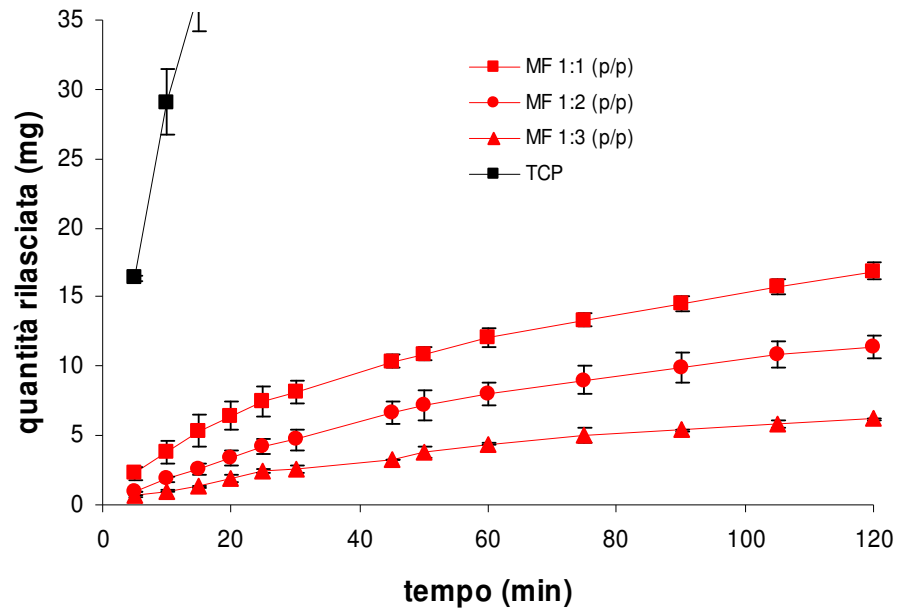


Figura 20. Profili IDR della TCP (■) e delle miscele fisiche TCP-TA α Cd 1:1 (p/p) (■), 1:2 (p/p) (●), 1:3 (p/p) (▲).

In Figura 21 sono messi a confronto i profili IDR della miscela fisica con quelli dei preparati ottenuti per irraggiamento con microonde ai tre diversi rapporti in peso considerati.

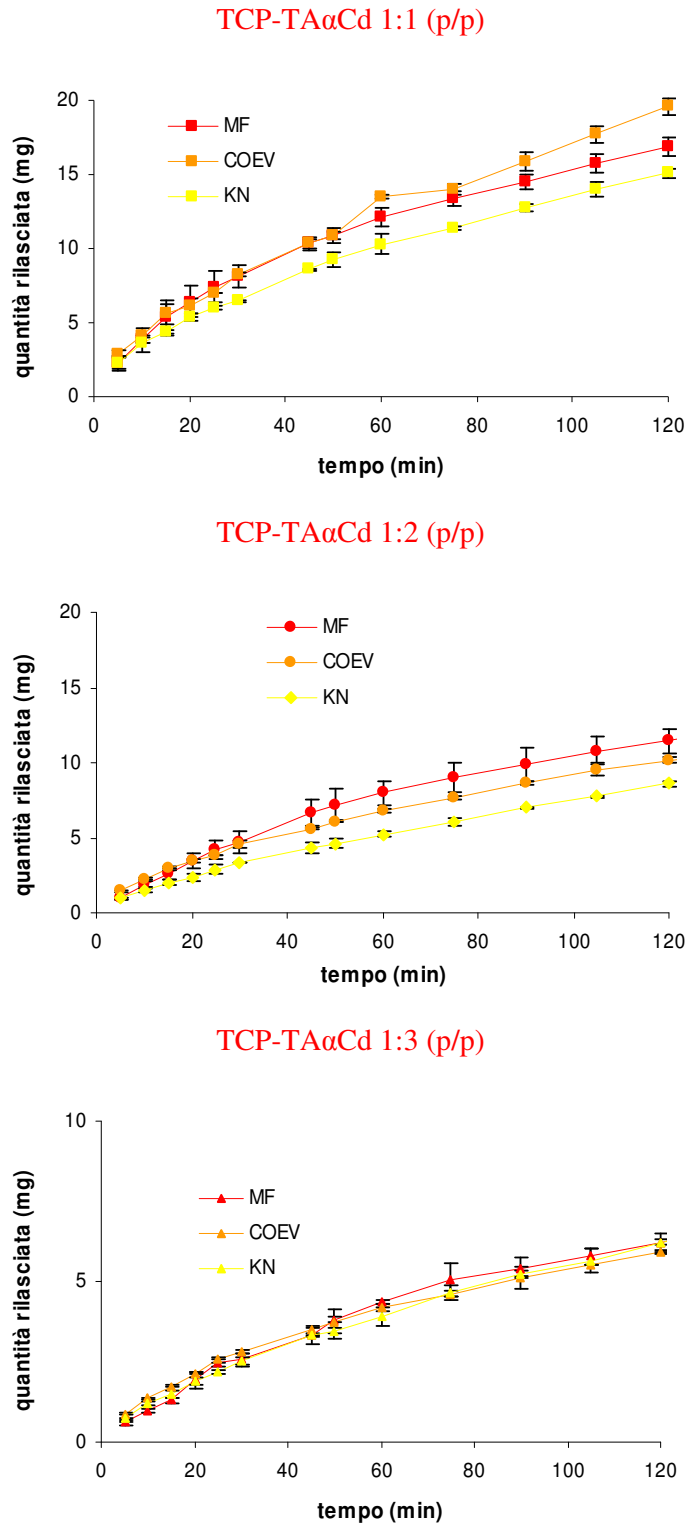


Figura 21. Profili IDR dei sistemi binari TCP-TAαCd (rapporti in peso indicati in figura) come miscele fisiche (MF), come coevaporati (COEV) e come prodotti di kneading (KN).

A parità di composizione, nei prodotti per irraggiamento con microonde dell'impasto molle, si osserva un rallentamento del rilascio del principio attivo più spiccato rispetto alle miscele fisiche, specie nelle combinazioni in rapporto in peso 1:1 e 1:2, mentre nei prodotti per irraggiamento con microonde della soluzione si osserva un rallentamento del rilascio di farmaco paragonabile a quello della miscela fisica (differenza tra i valori di IDR valutata mediante analisi della varianza (ANOVA) non significativa a $p < 0,05$).

Probabilmente il processo di impasto e il successivo irraggiamento con microonde inducono una maggiore aggregazione particellare tra TCP e TA α Cd e quindi un più completo trasferimento del carattere idrofobo del carrier all'antibiotico con conseguente ulteriore diminuzione della sua solubilità in acqua.

Dopo dissoluzione i compatti sono stati recuperati e asciugati, prelevando un campione di polvere per l'analisi DSC. Le curve ottenute (non riportate) non rivelano differenze sostanziali rispetto ai preparati di partenza.

Sistema binario TCP-TA β Cd

In Figura 22 sono rappresentate le curve DSC della TCP, della TA β Cd, della loro miscela fisica in rapporto 1:2 (p/p) e dei prodotti ottenuti per irraggiamento con microonde sia della soluzione idroacetoneica sia dell'impasto molle della stessa miscela.

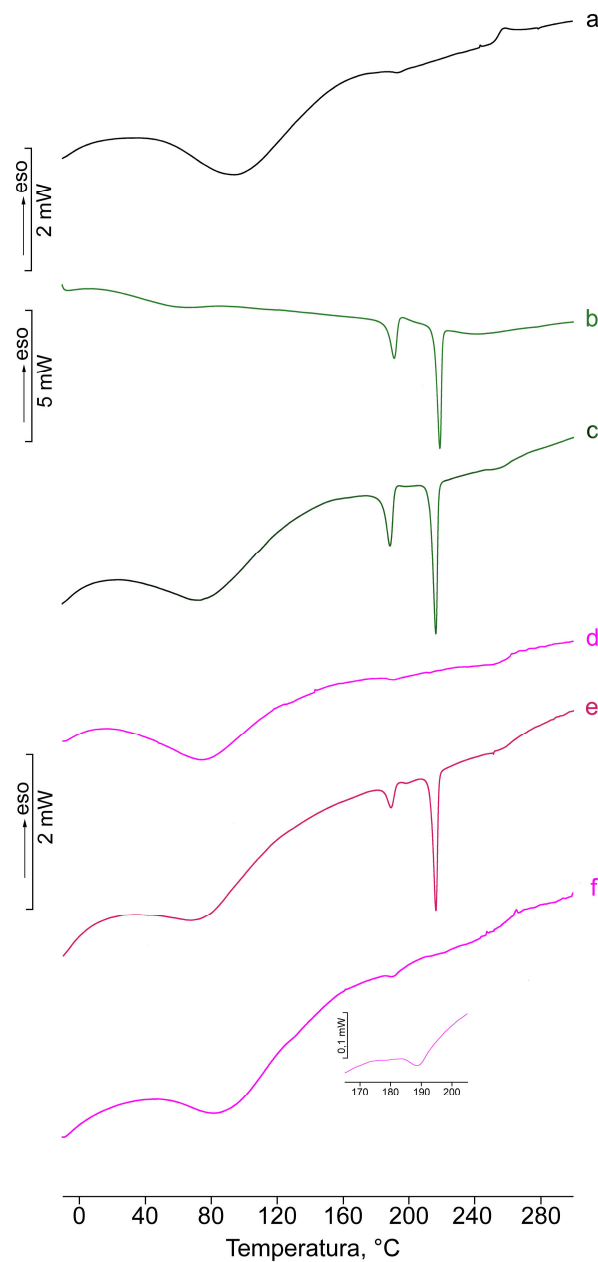


Figura 22. Curve DSC della TCP (a), della TA β Cd (b), della miscela fisica TCP-TA β Cd 1:2 (p/p) tal quale (c) e dopo irraggiamento con microonde da soluzione (d) e da impasto molle (e) e del compatto dopo dissoluzione del prodotto di irraggiamento con microonde da soluzione (f). In evidenza nella curva f l'effetto endotermico a circa 190 °C.

La TA β Cd (Figura 22b) mostra un comportamento termico tipico di un solvato con metanolo cristallino [52] che si desolvata (perdita di massa in TG pari allo $0,7\pm 0,1\%$) in una forma anidra cristallina ($T_{\text{fus,I}} = 192,2\pm 1,8$ °C, $\Delta H_{\text{fus,I}} = 13\pm 1$

J g⁻¹) dal cui fuso ricristallizza una modificazione polimorfa caratterizzata da temperatura ed entalpia di fusione maggiori ($T_{\text{fus,II}} = 218,5 \pm 0,8$ °C, $\Delta H_{\text{fus,II}} = 23 \pm 1$ J g⁻¹).

In base alla regola del calore di fusione [28] è stato possibile stabilire che le due modificazioni polimorfe sono tra di loro in relazione di monotropia.

La curva DSC della miscela fisica antibiotico-carrier rivela un tracciato corrispondente alla somma pesata degli effetti termici caratteristici del principio attivo (endoderma di desolvatazione con un picco allargato tra circa 30 e 170 °C) e del carrier (endoterme corrispondenti alla fusione delle due fasi polimorfe precedute da una larga endoterma di desolvatazione) (Figura 22c).

La scomparsa di entrambi i picchi di fusione nella curva DSC del prodotto ottenuto per irraggiamento con microonde della soluzione idroacetonica dimostra la completa amorfizzazione della TAβCd dovuta all'interazione con il farmaco (Figura 22d). Nel prodotto di kneading tale interazione è invece associata a una diminuzione dell'entalpia di fusione del polimorfo bassofondente ($\Delta H_{\text{fus,I}} = 6 \pm 2$ J g⁻¹) (Figura 22e). Il procedimento di preparazione per cristallizzazione evaporativa per irraggiamento con microonde determina perciò la completa amorfizzazione del carrier solo nel caso del prodotto ottenuto da soluzione idroacetonica.

Al contrario, la piccola quantità di solvente utilizzata e la blanda miscelazione impiegata nella preparazione dell'impasto molle non sono in grado di indurre modificazioni sostanziali dello stato solido del carrier.

Un comportamento analogo è stato registrato per i sistemi della TCP con TAβCd rispettivamente 1:1 e 1:3 (p/p) e pertanto le rispettive curve termiche non vengono riportate.

In Tabella 6 sono presentati i valori di IDR ottenuti per le diverse combinazioni TCP-TAβCd saggiate e ciascun dato è la media di almeno tre determinazioni (coefficiente di variazione ≤6%).

Tabella 6. Velocità di dissoluzione intrinseca del sistema binario TCP-TA β Cd.

	IDR (mg cm ⁻² min ⁻¹)			
	p/p	MF ^a	COEV ^a	KN ^a
TCP-TA β Cd	1:1	0,349	0,826	0,502
	1:2	0,166	0,216	0,176
	1:3	0,094	0,148	0,095

^aMF=miscela fisica, COEV=prodotto ottenuto per irraggiamento con microonde da una soluzione idroacetonica, KN= prodotto ottenuto per irraggiamento con microonde da un impasto molle.

Anche in questo caso, a parità del tipo di preparato, l'effetto ritardante sul rilascio del farmaco è tanto più marcato quanto maggiore è la frazione di massa del carrier presente, come si può vedere dal confronto dei profili IDR della miscela fisica TCP-TA β Cd ai tre diversi rapporti in peso (Figura 23).

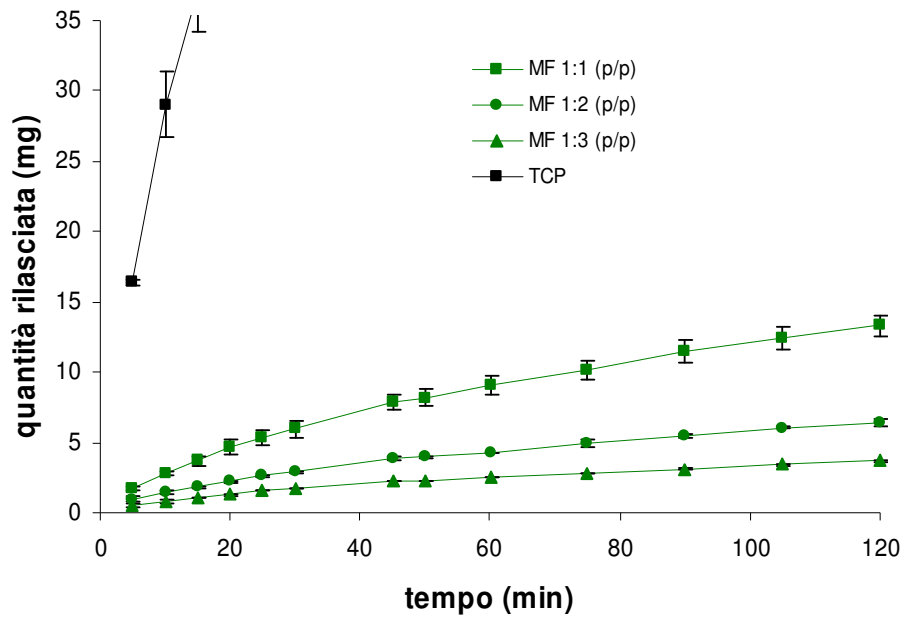


Figura 23. Profili IDR della TCP (■) e delle miscele fisiche TCP-TA β Cd 1:1 (p/p) (■), 1:2 (p/p) (●), 1:3 (p/p) (▲).

In Figura 24 sono riportati i profili IDR delle miscele fisiche, dei coevaporati e dei prodotti di kneading per ciascuna composizione considerata.

Confrontando i risultati dei sistemi TCP-TA β Cd nei diversi rapporti in peso si può rilevare come il trattamento con microonde tanto della soluzione quanto dell'impasto molle porti generalmente a preparati con proprietà di rallentamento del rilascio del farmaco meno spiccati di quelle osservate per la miscela fisica tal quale. Solo nel caso delle combinazioni nel rapporto in peso farmaco-carrier 1:2 e 1:3, il trattamento con microonde dell'impasto molle presenta proprietà di rallentamento paragonabili a quelle osservate per la miscela fisica tal quale (differenza tra i valori di IDR valutata mediante analisi della varianza (ANOVA) non significativa a $p < 0,05$).

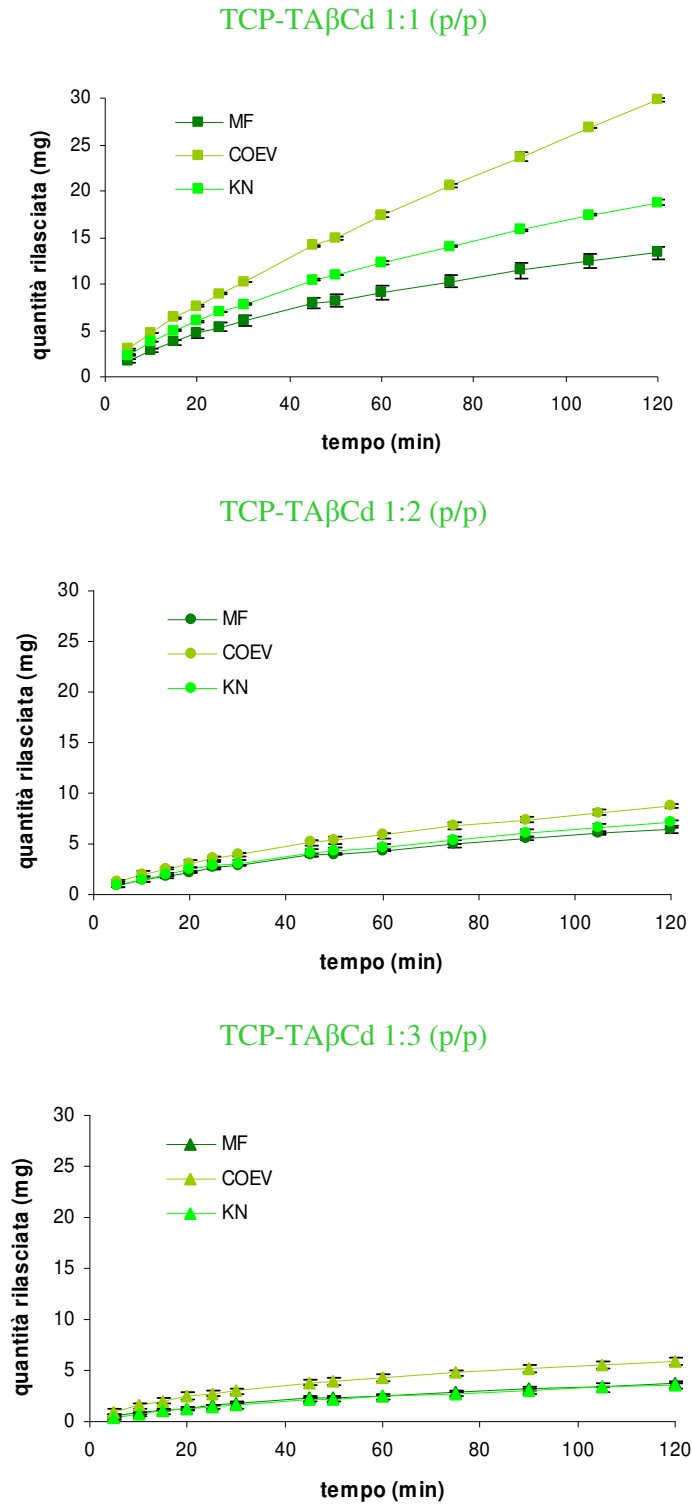


Figura 24. Profili IDR dei sistemi binari TCP-TA β Cd (rapporti in peso indicati in figura) come miscele fisiche (MF), come coevaporati (COEV) e come prodotti di kneading (KN).

Si può ipotizzare che in questi sistemi la presenza di un carrier più idrofobo della TA α Cd permetta di ottenere il massimo rallentamento della velocità di rilascio possibile già per semplice miscelazione fisica.

Dopo dissoluzione i compatti sono stati recuperati e asciugati, prelevando un campione di polvere per l'analisi DSC. I tracciati DSC (non riportati) della miscela fisica e del prodotto ottenuto per irraggiamento con microonde da impasto molle non rivelano differenze sostanziali rispetto ai preparati di partenza. Nel caso invece del compatto ottenuto per irraggiamento con microonde da soluzione idroacetone, si osserva, dopo il test di dissoluzione, la nucleazione parziale del polimorfo bassofondente della TA β Cd (vedi Figura 22f).

Sistema binario TCP-TA γ Cd

In Figura 25 sono riportate le curve DSC della TCP, della TA γ Cd, della loro miscela fisica in rapporto 1:1 (p/p) e dei prodotti di cristallizzazione evaporativa e di kneading ottenuti dalla miscela stessa.

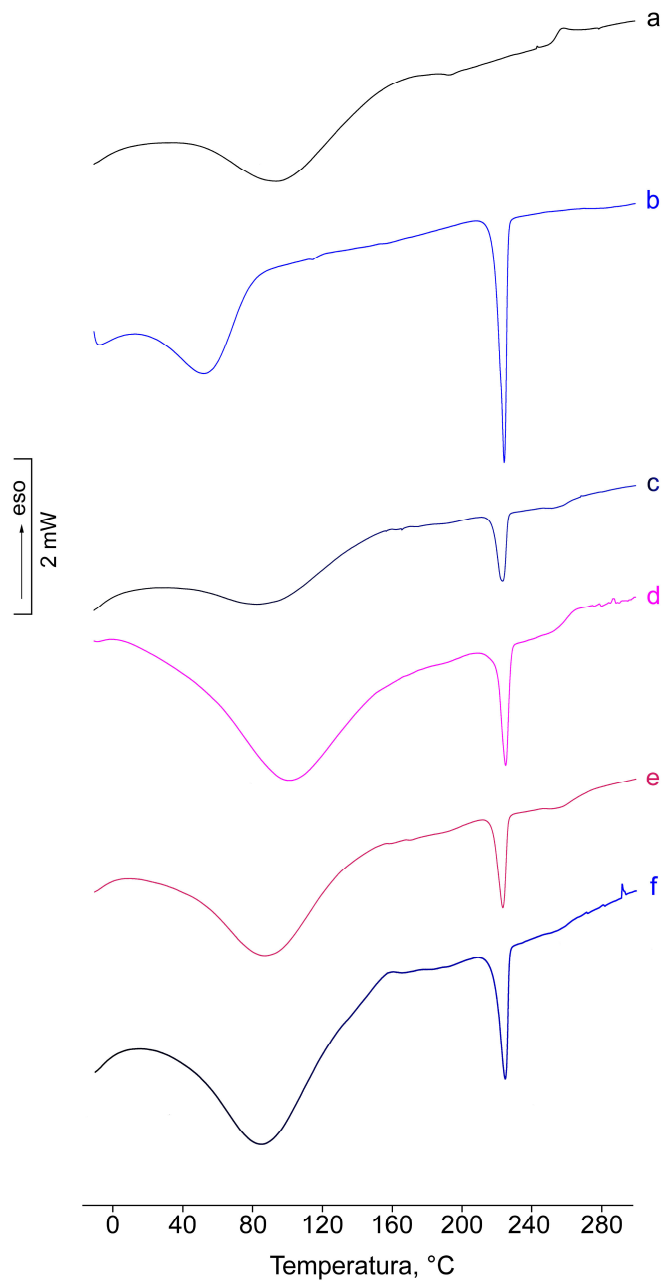


Figura 25. Curve DSC della TCP (a), della $TA\gamma Cd$ (b), della miscela fisica TCP- $TA\gamma Cd$ 1:1 (p/p) tal quale (c) e dopo irraggiamento con microonde da soluzione (d) e da impasto molle (e) e del compatto dopo dissoluzione della miscela fisica TCP- $TA\gamma Cd$ 1:1 (p/p) (f).

La $TA\gamma Cd$ mostra un comportamento termico tipico di un idrato cristallino (registrata in TG una perdita di acqua pari all' $1,0\pm 0,3\%$) che, dopo disidratazione,

mostra un picco endotermico a $223,5 \pm 0,3$ °C ($\Delta H_{\text{fus}} = 25,3 \pm 0,2$ J g⁻¹) attribuibile alla fusione (Figura 25b). La presenza nei tracciati DSC della miscela fisica tale quale e trattata di un picco di fusione con valori di temperatura e entalpia (normalizzata) praticamente coincidenti a quelli della sola TA γ Cd esclude che si siano verificate interazioni allo stato solido tra farmaco e carrier (Figure 25c, d ed e).

Un comportamento simile è stato rilevato anche nei sistemi binari TCP-TA γ Cd 1:2 e 1:3 (p/p) e quindi i relativi tracciati DSC non vengono riportati.

In Tabella 7 sono riportati i valori di IDR ottenuti per le diverse combinazioni TCP-TA γ Cd saggiate e ciascun dato è la media di almeno tre determinazioni (coefficiente di variazione $\leq 4\%$).

Tabella 7. Velocità di dissoluzione intrinseca del sistema binario TCP-TA γ Cd.

		IDR (mg cm ⁻² min ⁻¹)			
		p/p	MF ^a	COEV ^a	KN ^a
TCP-TA γ Cd	1:1		0,298	0,512	0,496
	1:2		0,137	0,187	0,288
	1:3		0,081	0,131	0,162

^aMF=miscela fisica, COEV=prodotto ottenuto per irraggiamento con microonde da una soluzione idroacetonica, KN= prodotto ottenuto per irraggiamento con microonde da un impasto molle.

Come nei casi precedenti l'effetto ritardante sul rilascio della TCP si manifesta, tanto nelle miscele fisiche quanto nei coevaporati, in misura direttamente correlata alla proporzione di carrier presente nel sistema.

In Figura 26 sono riportati i profili IDR della TCP pura e delle miscele fisiche TCP-TA γ Cd nei diversi rapporti in peso che vengono poi confrontati con i rispettivi prodotti ottenuti per irraggiamento con microonde (Figura 27).

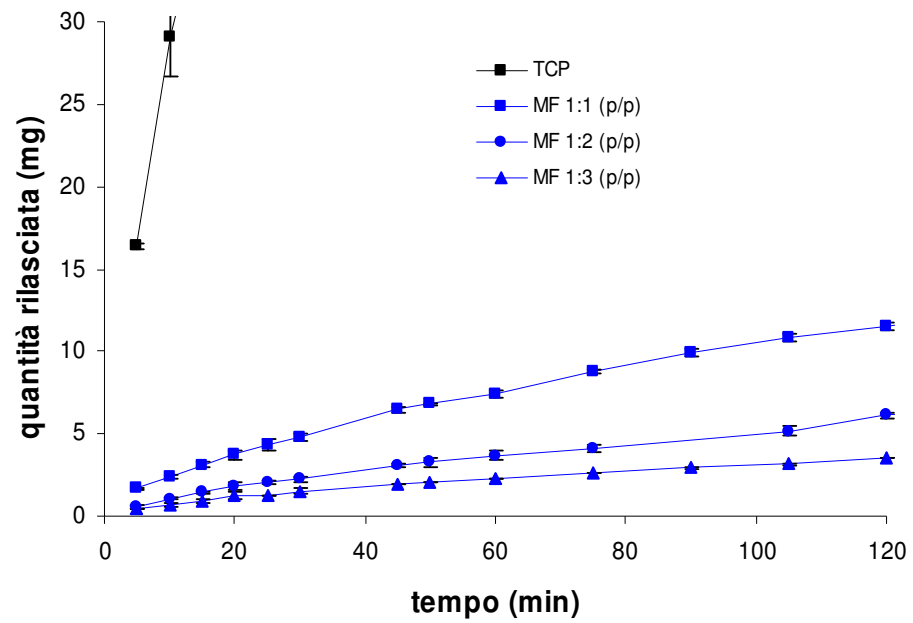


Figura 26. Profili IDR della TCP (■) e delle miscele fisiche TCP-TA γ Cd 1:1 (p/p) (■), 1:2 (p/p) (●), 1:3 (p/p) (▲).

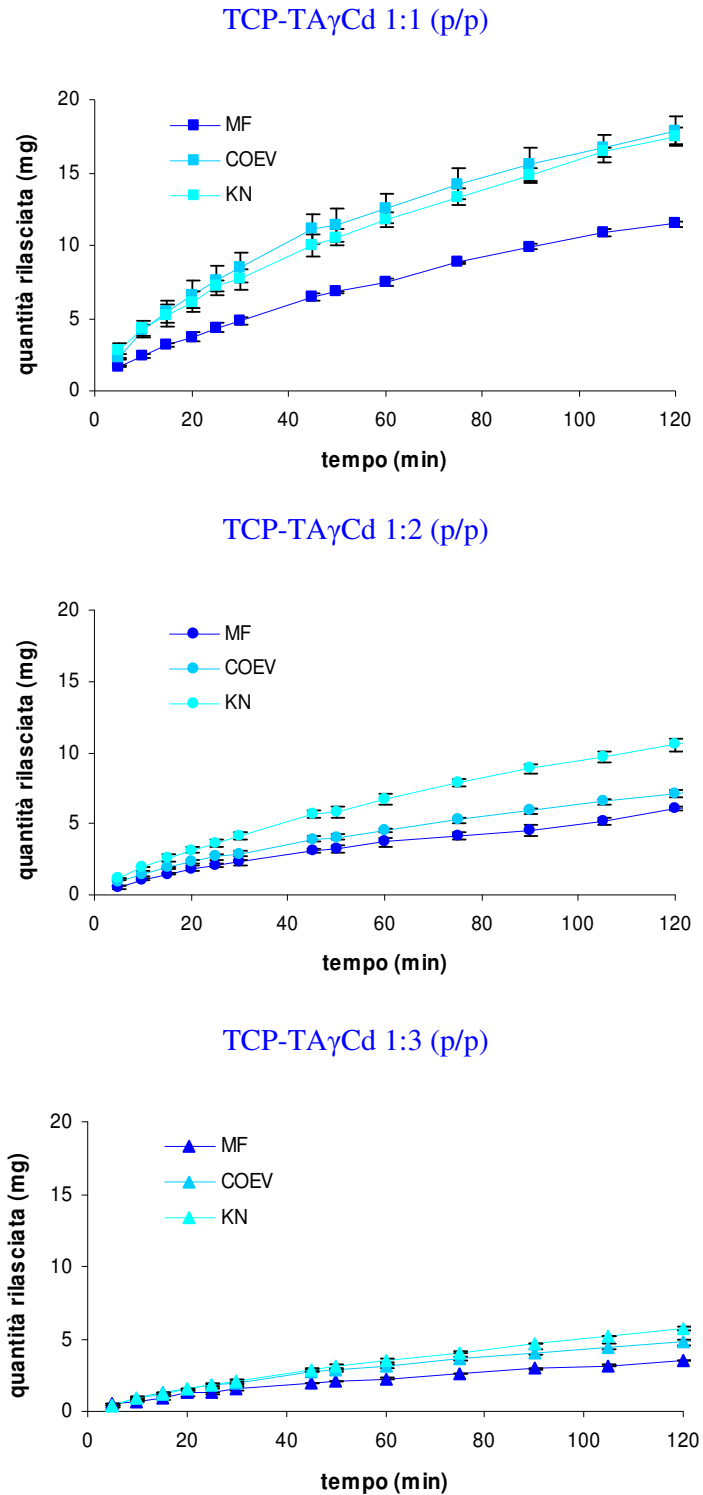


Figura 27. Profili IDR dei sistemi binari TCP-TA γ Cd (rapporti in peso indicati in figura) come miscele fisiche (MF), come coevaporati (COEV) e come prodotti di kneading (KN).

Ad ogni composizione saggiata, a parità di quantità di TA γ Cd presente nel sistema, la miscela fisica risulta più efficiente nel rallentare il rilascio del farmaco rispetto ai due preparati ottenuti per trattamento della miscela stessa. Anche in questo caso, in analogia con il sistema con la TA β Cd, le più spiccate proprietà idrofobiche del carrier sono in grado di esercitare il massimo rallentamento della velocità di rilascio dell'antibiotico per semplice miscelazione fisica con il carrier. Anche per questo sistema i compatti recuperati dopo i test di dissoluzione sono stati asciugati prelevando campioni di polvere per le analisi DSC. Mentre nei preparati ottenuti per irraggiamento con microonde non si osservano differenze sostanziali rispetto al prodotto di partenza (dati non riportati), nella miscela fisica è stato possibile osservare la comparsa di un picco esotermico a circa 157 °C (vedi Figura 25f) indicativo della presenza di una porzione amorfa di carrier che a questa temperatura cristallizza. L'analisi DSC (non riportata) della miscela fisica subito dopo compressione e prima del test di dissoluzione ha rivelato la presenza dello stesso effetto esotermico, e ciò dimostra che un parziale trasferimento di carattere amorfo dalla TCP al carrier avviene in seguito alla compressione e non durante il processo di dissoluzione.

Caratterizzazione termoanalitica del λ -carragenano (CRG)

Le curve DSC e TG del CRG commerciale riportate in Figura 28 (curva a,a') mostrano il tracciato tipico di una sostanza amorfa con acqua di assorbimento superficiale. Dopo un primo effetto endotermico di disidratazione tra 23 e 163 °C, associato a una perdita di massa in TG pari a $12\pm 1\%$, si osserva un effetto esotermico a circa 195 °C ($\Delta H_{\text{dec}} = 250\pm 4 \text{ Jg}^{-1}$) attribuibile alla decomposizione del polimero. Le curve DSC del CRG trattato (Figura 28, curve b,c,d) non mostrano particolari differenze rispetto a quelle registrate sul campione commerciale, ad eccezione di uno spostamento verso temperature più elevate del picco esotermico di decomposizione ed in particolare a 206 °C, 205 °C e 212 °C, rispettivamente per il CRG sottoposto a kneading, irraggiamento con microonde ed essiccamento in Rotavapor.

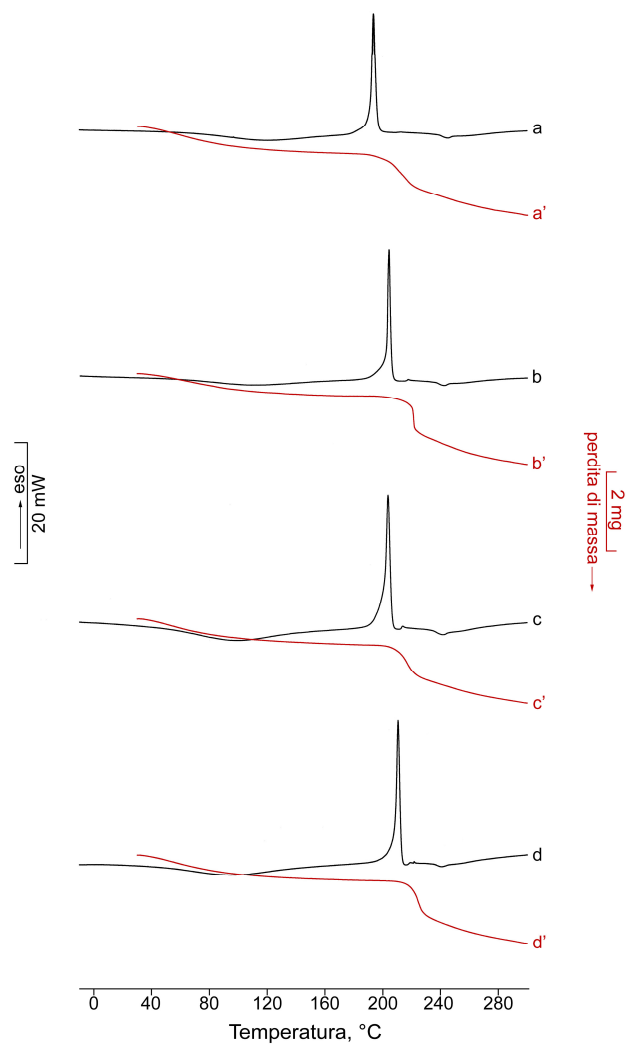


Figura 28. Curve DSC e TG del CRG tal quale (a,a'), dopo kneading (b,b'), irraggiamento con microonde (c,c') ed essiccamento con Rotavapor (d,d').

Questo spostamento indica che il processo di impasto molle e quelli di coevaporazione tendono a conferire una maggiore stabilità termica al polimero.

La perdita di massa registrata in TG (Figura 28, curve b',c',d') dei campioni trattati è praticamente identica a quella del prodotto commerciale.

Sistemi binari VCM·HCl-CRG

Per l'indagine termooanalitica dei sistemi binari della VCM·HCl con il CRG è opportuno ricordare che il farmaco è amorfo e presenta in DSC un'endoterma di disidratazione allargata e una successiva decomposizione senza alcuna fusione (vedi Figura 14).

In Figura 29 sono riportate le curve DSC delle miscele fisiche VCM·HCl-CRG ai vari rapporti in peso.

Nelle miscele fisiche con un eccesso di farmaco (Figura 29, curva a) è evidente un allargamento del picco associato ad una riduzione dell'entalpia di decomposizione del polimero dovuto alla sovrapposizione della decomposizione termica della VCM·HCl.

Tale allargamento, ancora presente, anche se di minore intensità, nella miscela fisica equiponderale (Figura 29, curva c), tende a scomparire nelle miscele fisiche più ricche in polimero dove il picco esotermico presenta valori di temperatura di picco e di entalpia del tutto paragonabili a quelle del CRG tal quale (Figura 29, curva f).

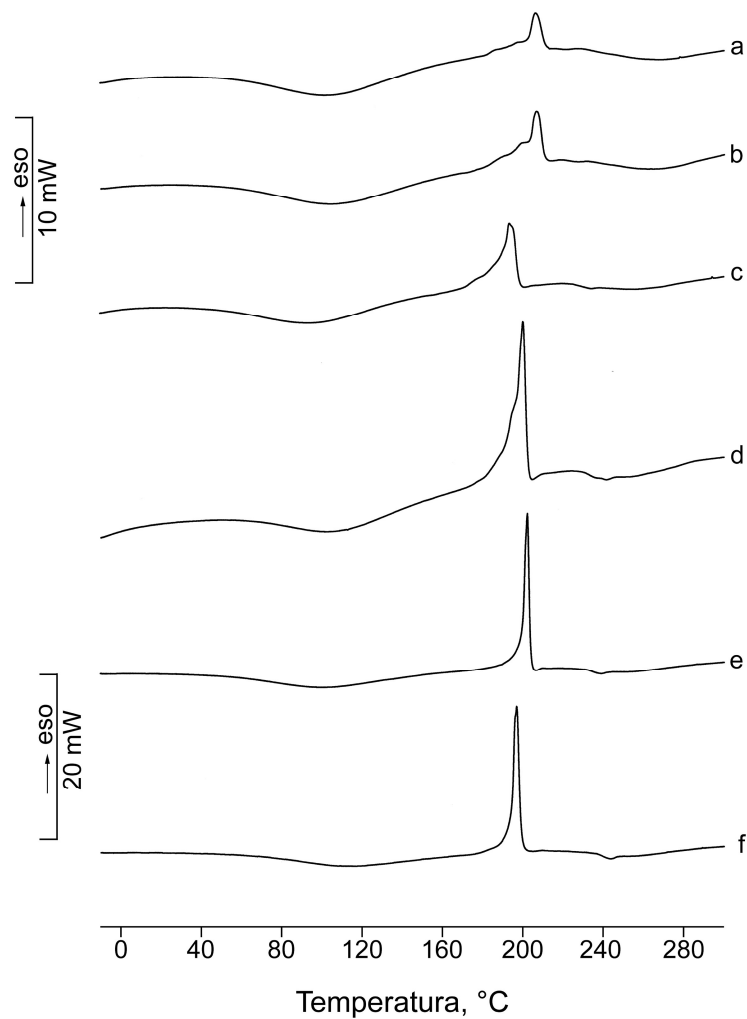


Figura 29. Curve DSC delle miscele fisiche VCM·HCl-CRG nei rapporti in peso 3:1 (a), 2:1 (b), 1:1 (c), 1:2 (d), 1:3 (e), 1:9 (f).

In Figura 30 è riportata l'analisi FT-IR delle miscele fisiche di diversa composizione.

Non si riscontrano particolari modificazioni spettrali indicative di interazioni allo stato solido tra VCM·HCl e CRG. Appare invece evidente che il picco a 1585 cm^{-1} caratteristico del farmaco tende a ridursi fino quasi a scomparire nelle miscele più ricche in polimero.

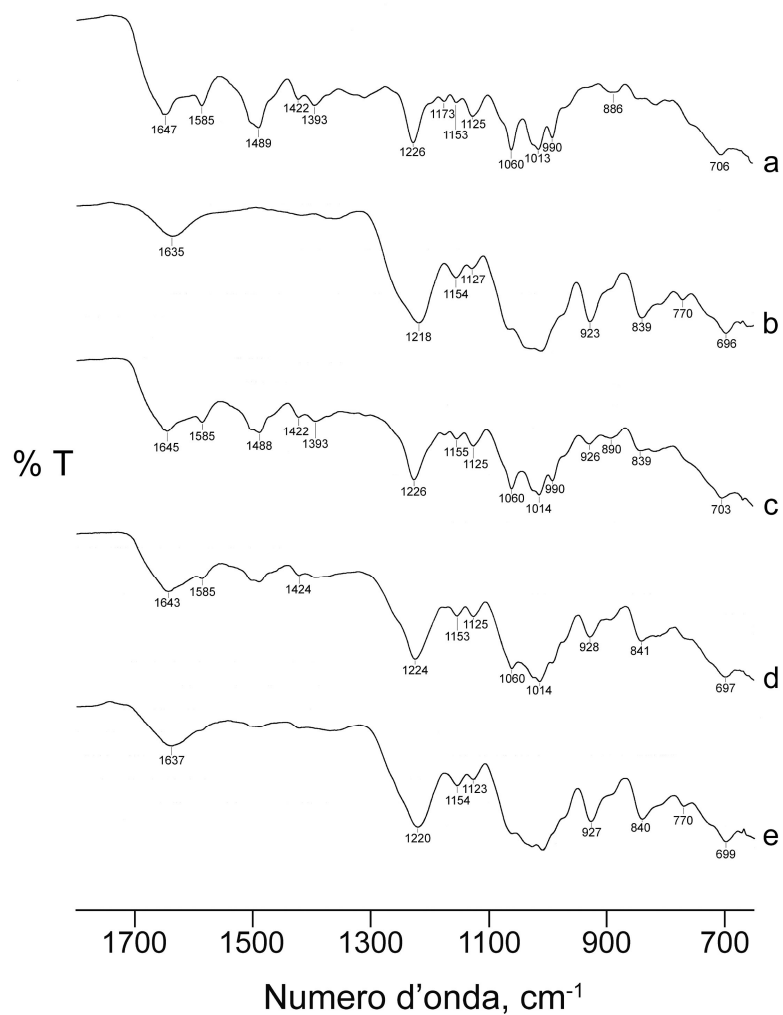


Figura 30. Spettri FT-IR della VCM·HCl (a), del CRG (b) e delle miscele fisiche nei diversi rapporti in peso VCM·HCl-CRG 3:1 (c), 1:1 (d) e 1:3 (e).

In Figura 31 sono riportate le curve DSC della miscela fisica VCM·HCl-CRG in rapporto 1:1 (p/p) tal quale e dopo kneading, come pure del residuo ottenuto per irraggiamento con microonde oppure per essiccamento in Rotavapor della sua soluzione acquosa.

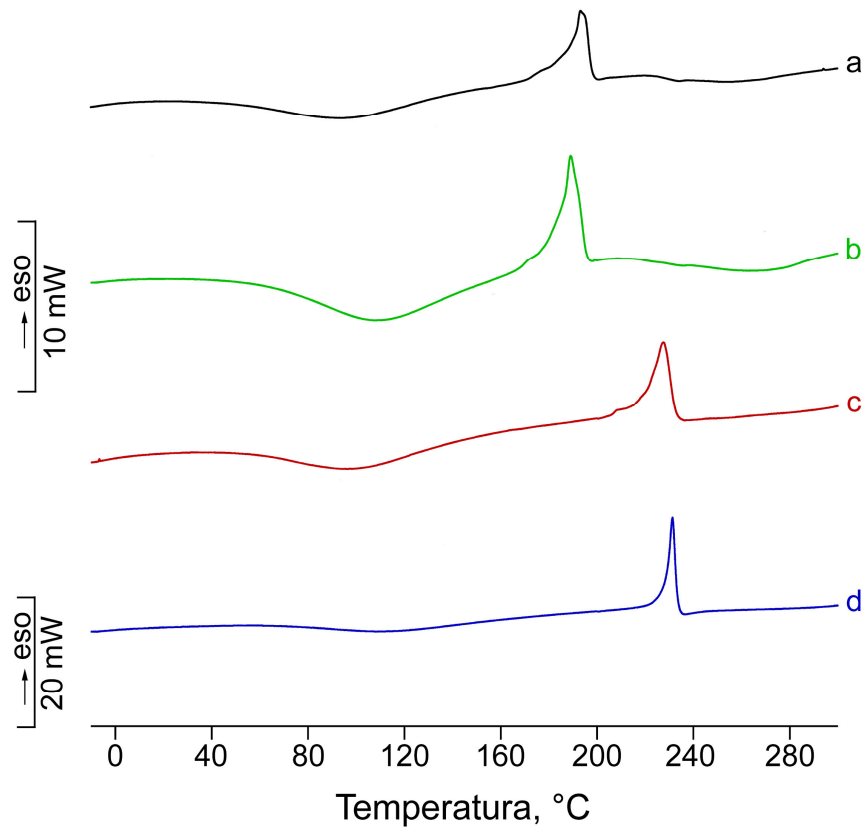


Figura 31. Curve DSC della miscela fisica VCM·HCl-CRG 1:1 (p/p) tal quale (a), dopo kneading (b) e del residuo ottenuto per irraggiamento con microonde (c) o per essiccamento in Rotavapor (d) della sua soluzione acquosa.

La miscela fisica VCM·HCl-CRG 1:1 (p/p) tal quale e dopo kneading presenta un'endoterma di disidratazione tra 15 e 150 °C circa, seguita da un'esoterma di decomposizione, tipica del CRG, intorno a circa 193 °C. I picchi esotermici di decomposizione nelle miscele trattate si spostano verso temperature più alte, indice del fatto che il processo di coevaporazione della soluzione della miscela porta ad un prodotto termicamente più stabile.

Un comportamento analogo è stato osservato anche per gli altri sistemi binari e pertanto le relative curve DSC non vengono riportate.

L'indagine dello stato solido è stata effettuata anche con l'analisi FT-IR (Figura 32). Lo spettro della miscela fisica non trattata (a) dove sono ben visibili i picchi caratteristici dei singoli componenti (vedi Figura 30, spettri a,b) non mostra

sostanziali differenze rispetto agli spettri del prodotto di kneading (b) e degli altri preparati per essiccamento con microonde (c) e in Rotavapor (d).

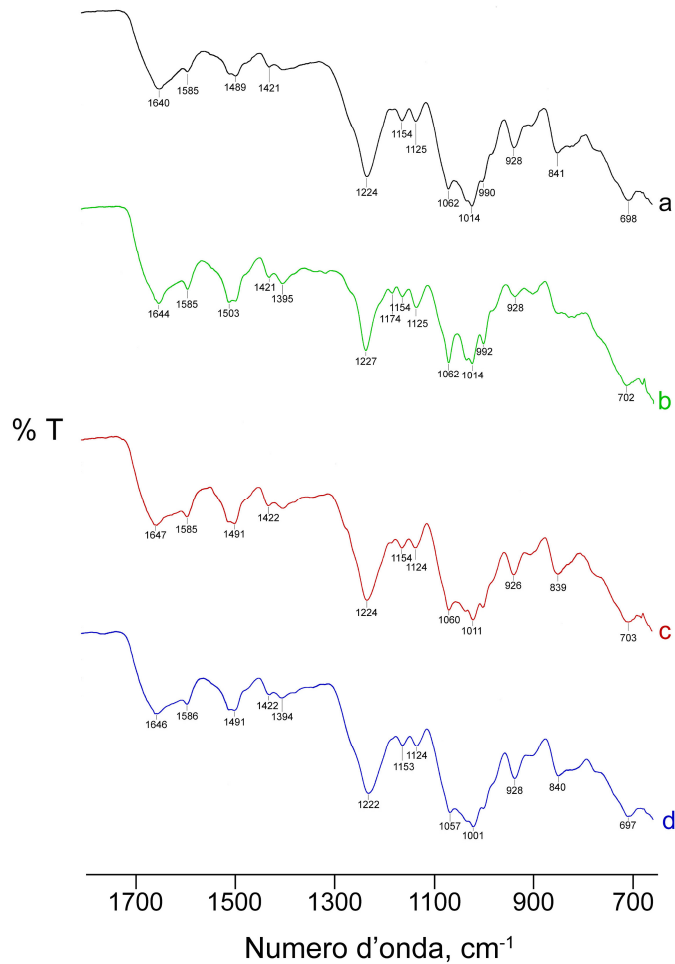


Figura 32. Spettri FT-IR della miscela fisica VCM·HCl·CRG tal quale (a), dopo kneading (b) e del residuo ottenuto per irraggiamento con microonde (c) o per essiccamento in Rotavapor (d) della sua soluzione acquosa.

In Figura 33 i profili di rilascio delle miscele fisiche VCM·HCl·CRG nei rapporti 1:1, 1:2, 1:3, e 1:9 (p/p) sono confrontati con quello della VCM·HCl tal quale.

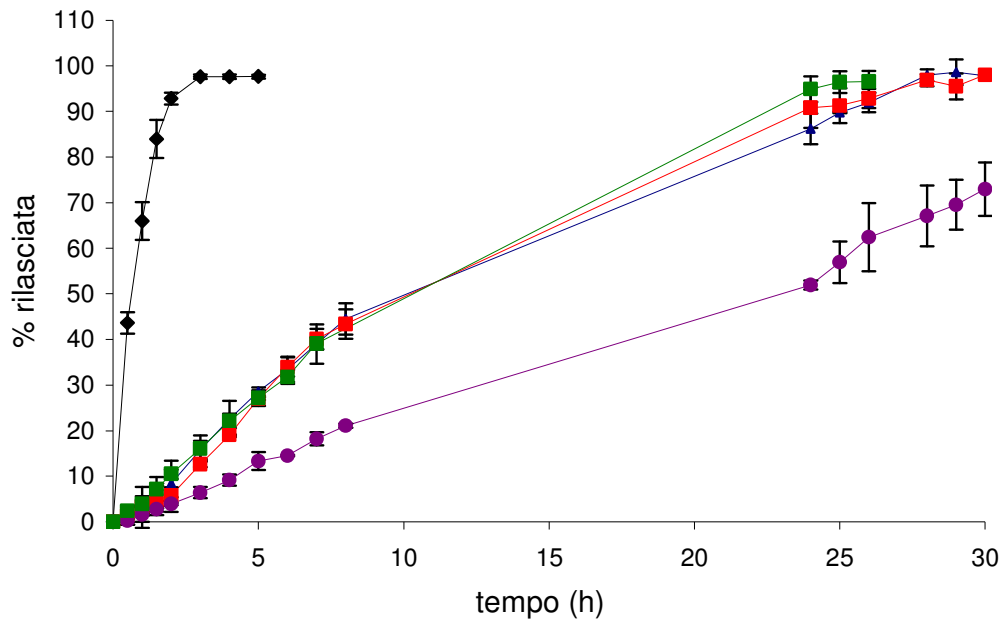


Figura 33. Profili di rilascio della VCM·HCl (◆), e delle miscele fisiche VCM·HCl-CRG nei rapporti in peso 1:1 (■), 1:2 (▲), 1:3 (■), 1:9 (●).

Come si può osservare dai risultati sperimentali, l'effetto rallentante sul rilascio della VCM·HCl, che allo stato puro impiega meno di tre ore per essere completamente rilasciata, si manifesta già nelle miscele fisiche. Il maggior rallentamento si osserva in presenza di un grande eccesso di polimero, mentre non si riscontrano sostanziali differenze nelle miscele fisiche a minor contenuto di CRG.

In Figura 34 sono messi a confronto i profili di rilascio della VCM·HCl e della miscela fisica VCM·HCl-CRG 1:9 (p/p) tal quale e dopo kneading e del residuo ottenuto per irraggiamento con microonde della sua soluzione acquosa.

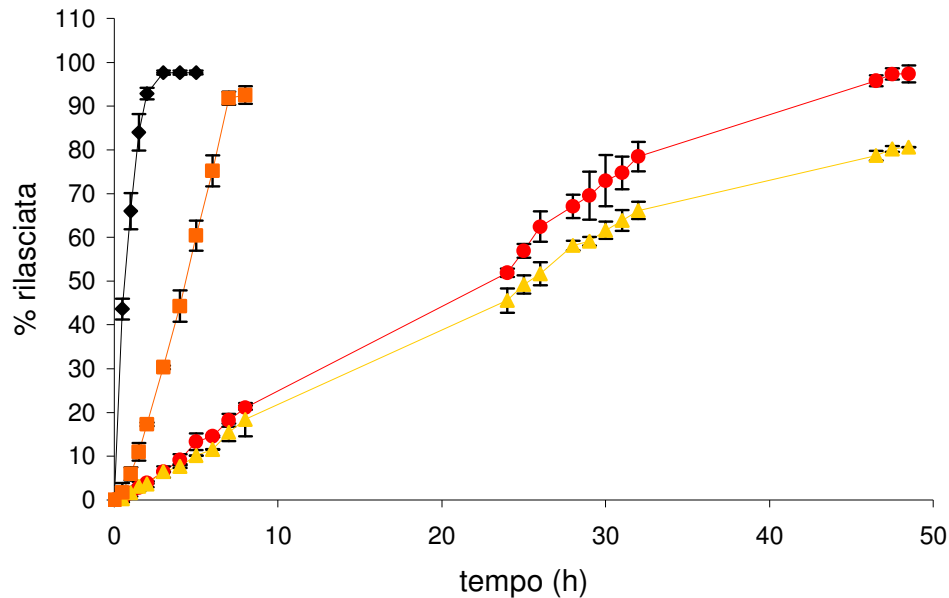


Figura 34. Profili di rilascio della VCM·HCl (◆), della miscela fisica VCM·HCl-CRG 1:9 tal quale (●), dopo kneading (▲) e del residuo ottenuto per irraggiamento con microonde (■) della sua soluzione acquosa.

Alla semplice miscelazione fisica è ancora attribuibile un forte effetto ritardante sul rilascio della VCM·HCl, mentre il trattamento della miscela per kneading non risulta determinante ai fini dell'interazione allo stato solido in quanto il prodotto presenta un profilo di rilascio del tutto paragonabile a quello della miscela fisica tal quale.

La solubilizzazione in acqua della VCM·HCl e del CRG e il successivo essiccamento con microonde portano probabilmente alla formazione di una dispersione del farmaco nel polimero che, data la natura idrofila di entrambi, non è in grado di ritardare il rilascio della VCM·HCl. Le compresse di miscela fisica tal quale e dopo kneading, invece, una volta poste a contatto con il fluido di dissoluzione, rigonfiano e la gelificazione del CRG è tale da ritardare il rilascio del farmaco che viene completamente ceduto in circa 48 ore.

In Figura 35 sono riportati i profili di rilascio della miscela fisica VCM·HCl-CRG 1:1 (p/p) tal quale e del residuo dopo essiccamento con microonde o in Rotavapor della sua soluzione acquosa, a confronto con quello della VCM·HCl.

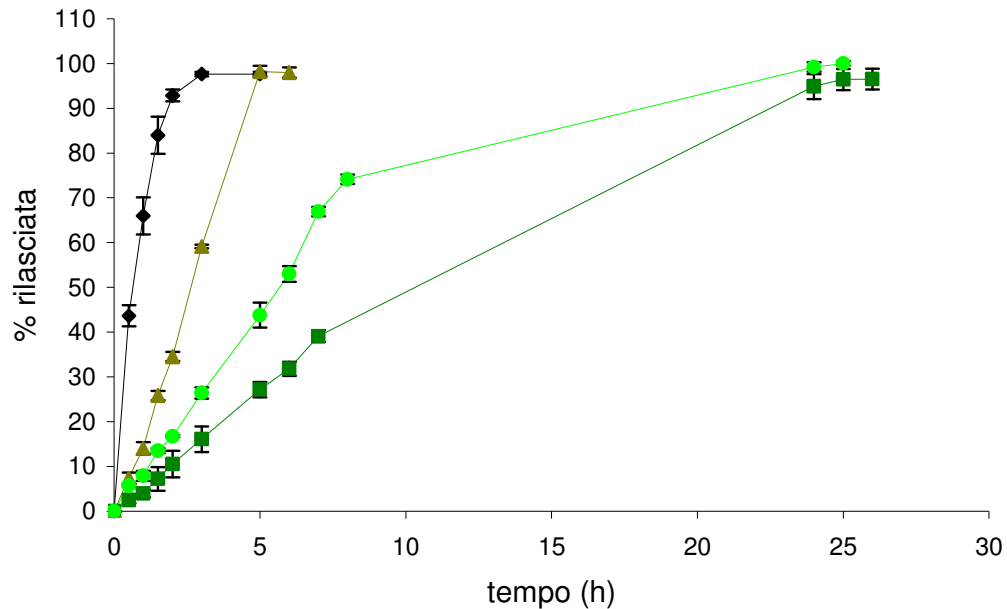


Figura 35. Profili di rilascio della VCM·HCl commerciale (♦), della miscela fisica VCM·HCl-CRG 1:1 (p/p) tal quale (■) e del residuo dopo essiccamento con microonde (▲) o in Rotavapor (●) della sua soluzione acquosa.

L'andamento dei profili di rilascio per le miscele binarie in rapporto 1:1 (p/p) è simile a quello delle miscele contenenti un eccesso di CRG (vedi Figura 34). La miscela fisica è già di per sé in grado di rallentare il rilascio della VCM·HCl che, data la minor quantità di polimero presente, è completo in circa 24 ore.

Il trattamento della miscela comporta un rallentamento del rilascio del farmaco solo nel caso del preparato essiccato in Rotavapor, per quanto meno spiccato rispetto alla miscela non trattata.

Sistemi ternari VCM·HCl-CRG-TA γ Cd

In Figura 36 sono riportate le curve DSC dei singoli componenti e delle miscele fisiche della VCM·HCl con la TA γ Cd in rapporto 1:1 (p/p) e delle miscele ternarie VCM·HCl-CRG-TA γ Cd nei rapporti ponderali 1:1:1 e 1:1:3.

La TA γ Cd ha un comportamento termico tipico di un idrato che al riscaldamento perde il solvente di cristallizzazione nell'intervallo di temperatura tra 14 e 95 °C (perdita di massa in TG pari allo 0,8 \pm 0,1%) trasformandosi in un anidro cristallino che fonde a 225 \pm 1 °C ($\Delta H_{\text{fus}} = 25\pm 1 \text{ J g}^{-1}$) (curva b).

L'effetto endotermico di fusione della TA γ Cd è ancora evidente nella curva DSC della miscela fisica binaria VCM·HCl-TA γ Cd (curva c) mentre scompare quasi completamente nella miscela ternaria VCM·HCl-CRG-TA γ Cd (curva e). Probabilmente l'effetto esotermico di decomposizione del polimero copre la fusione del carrier cristallino.

Nella miscela fisica ternaria in eccesso di TA γ Cd (curva f), il picco di fusione della ciclodestrina riappare con parametri termici ($T_{\text{peak}} = 220\pm 1 \text{ °C}$, $\Delta H_{\text{fus}} = 24\pm 2 \text{ J g}^{-1}$) simili a quelli rilevati nel prodotto commerciale.

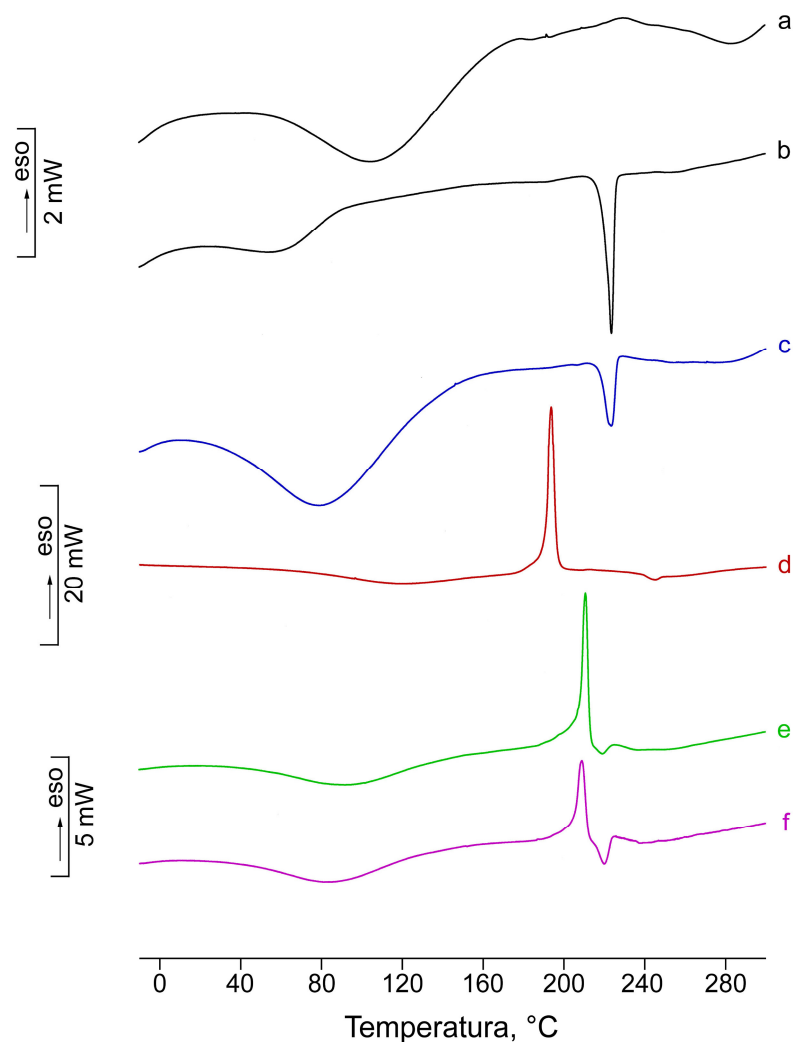


Figura 36. Curve DSC della VCM·HCl (a), della TA γ Cd (b), della miscela fisica VCM·HCl-TA γ Cd 1:1 (p/p) (c), del CRG (d), delle miscele fisiche VCM·HCl-CRG-TA γ Cd 1:1:1 (p/p/p) (e) e VCM·HCl-CRG-TA γ Cd 1:1:3 (p/p/p) (f).

In Figura 37 sono riportati gli spettri FT-IR della TA γ Cd, della miscela fisica binaria VCM·HCl-TA γ Cd 1:1 (p/p) e delle miscele fisiche ternarie VCM·HCl-CRG-TA γ Cd nei rapporti in peso 1:1:1 e 1:1:3.

In tutti gli spettri registrati appaiono evidenti solo gli assorbimenti caratteristici della TA γ Cd, l'unico componente della miscela di natura cristallina, che sono preminenti rispetto a quelli meno risolti della controparte amorfa.

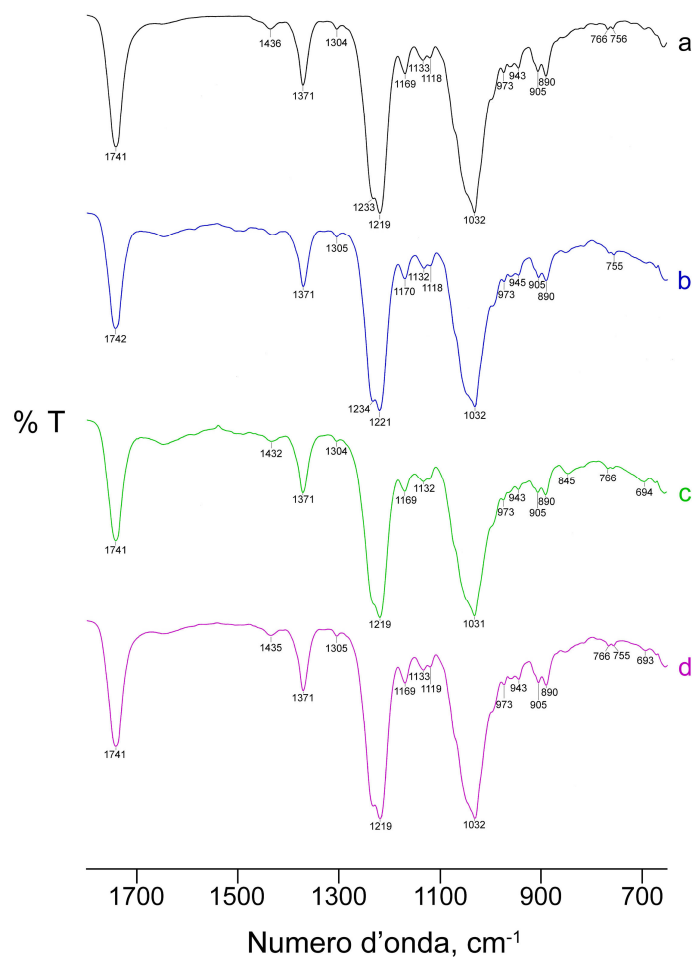


Figura 37. Spettri FT-IR della TA γ Cd (a), della miscela fisica VCM·HCl-TA γ Cd 1:1 (p/p) (b) e delle miscele fisiche VCM·HCl-CRG-TA γ Cd nei rapporti ponderali 1:1:1 e 1:1:3 (c,d).

I profili di rilascio delle miscele binarie VCM·HCl-TA γ Cd e ternarie VCM·HCl-CRG-TA γ Cd nei diversi rapporti in peso sono riportati in Figura 38.

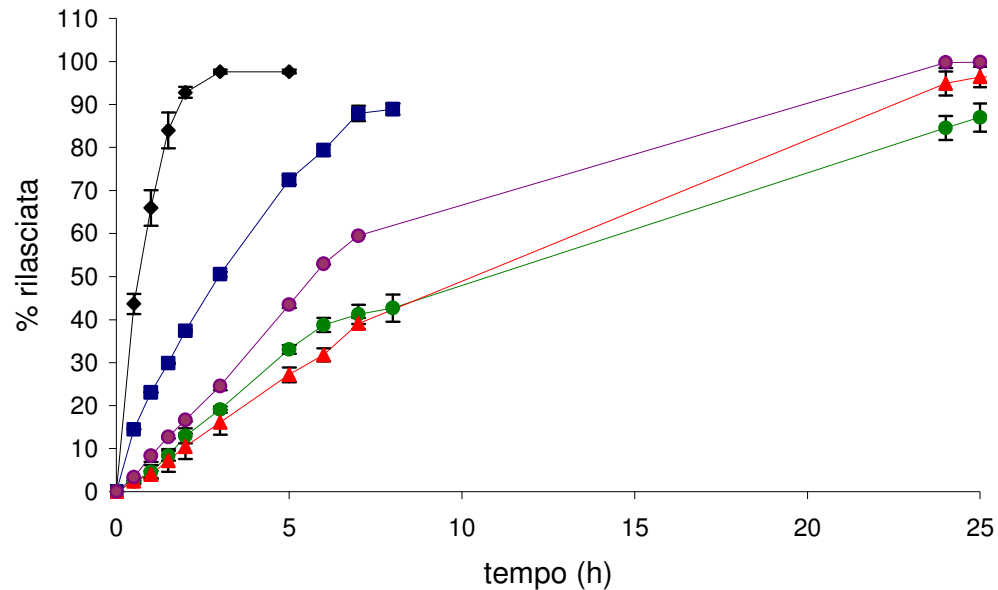


Figura 38. Profili di rilascio della VCM·HCl (♦), delle miscele fisiche VCM·HCl-CRG 1:1 (p/p) (▲), VCM·HCl-TAγCd 1:1 (p/p) (■), e VCM·HCl-CRG-TAγCd 1:1:1 (p/p/p) (●) e 1:1:3 (p/p/p) (●).

Il contributo della TAγCd al rallentamento del rilascio della VCM·HCl non risulta particolarmente importante. Nelle miscele fisiche ternarie con un eccesso di ciclodestrina il rilascio della VCM·HCl è addirittura più veloce che in quella senza ciclodestrina. La compressa, che appare ben compatta e uniforme, dopo 5 ore dall'inizio del test di dissoluzione si disgrega e sul fondo del vessel si ritrova una polvere che, recuperata e sottoposta ad analisi DSC (curve non riportate), si rivela costituita da TAγCd.

Sistemi binari TCP-CRG

Per la caratterizzazione termooanalitica allo stato solido dei sistemi binari della TCP con il CRG si deve tener presente che la TCP è un farmaco amorfo caratterizzato in DSC da un'endoterma di disidratazione seguita da decomposizione del campione (vedi Figura 17).

In Figura 39 sono riportate le curve DSC delle miscele fisiche della TCP con il CRG nei vari rapporti in peso.

Come già visto per la VCM-HCl, nelle curve DSC delle miscele fisiche con un eccesso di antibiotico (curve a,b) è evidente un allargamento del picco con contemporanea riduzione dell'entalpia di decomposizione del CRG dovuto alla sovrapposizione della contemporanea decomposizione endotermica della TCP.

Tale allargamento, ancora presente, anche se di minor intensità, nella miscela equiponderale (curva c) tende a scomparire nelle miscele più ricche in polimero (curve d,e) dove il picco esotermico appare con forma e valori di temperatura al picco e di entalpia del tutto paragonabili a quelli del CRG tal quale (vedi Figura 28, curva a).

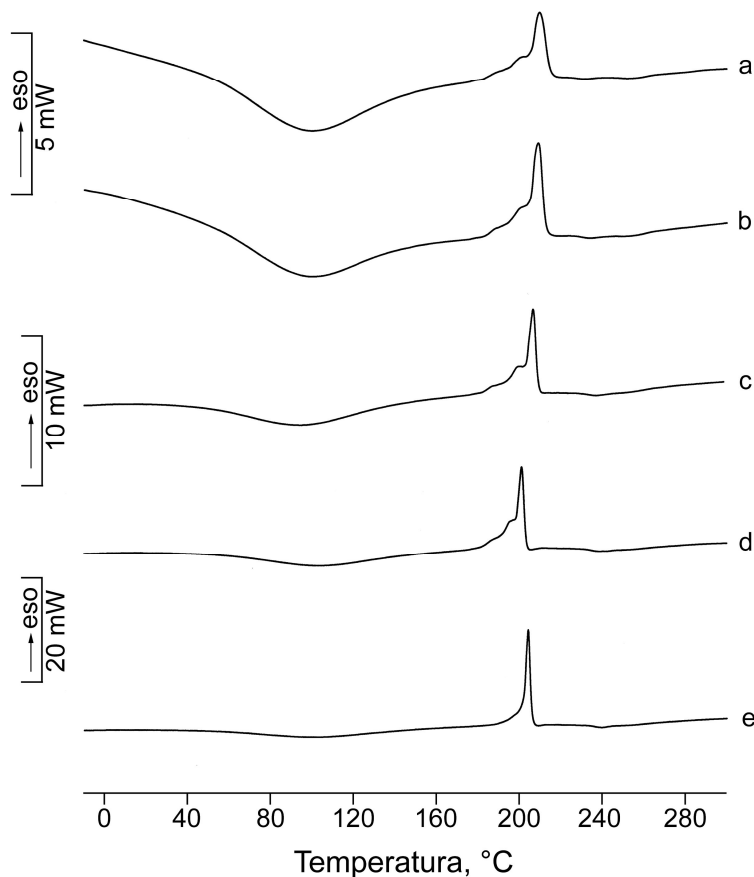


Figura 39. Curve DSC delle miscele fisiche nei rapporti in peso TCP-CRG 3:1(a), 2:1(b), 1:1 (c), 1:2 (d), 1:3 (e).

In Figura 40 è riportata l'analisi FT-IR delle miscele fisiche TCP-CRG a diversa composizione in peso. Negli spettri sono ben visibili gli assorbimenti caratteristici dei singoli componenti. Non si osservano effetti particolari che potrebbero essere indice di un'avvenuta interazione allo stato solido tra TCP e CRG. Il picco a 1588 cm^{-1} caratteristico del farmaco tende a scomparire nelle miscele più ricche in polimero.

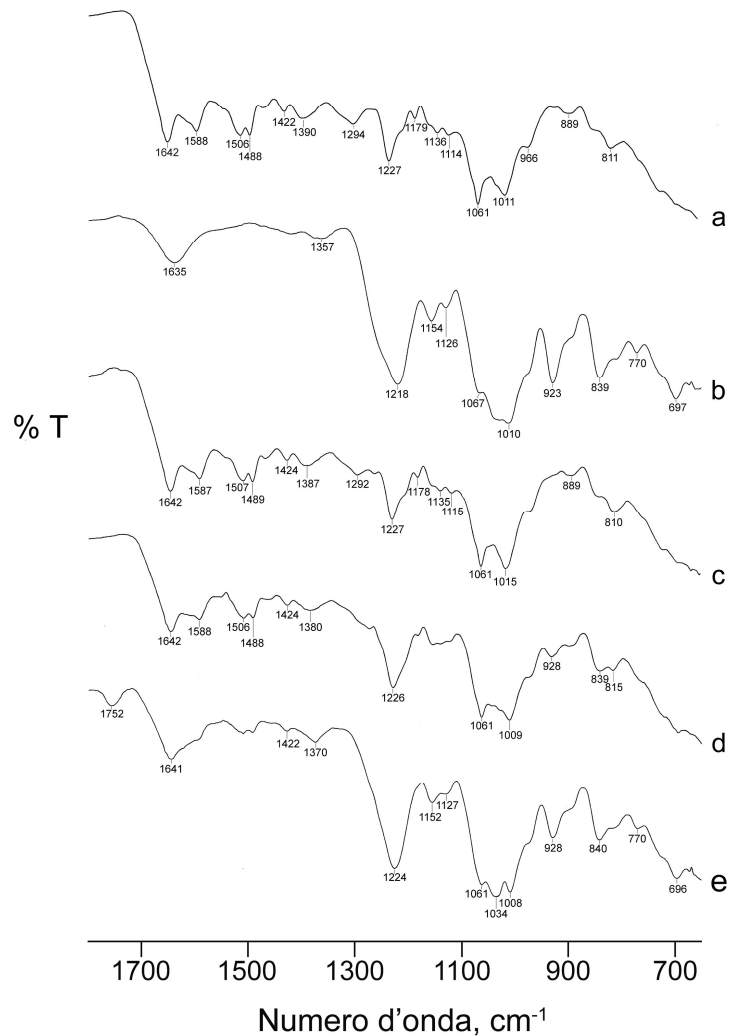


Figura 40. Spettri FT-IR della TCP (a), del CRG (b) e delle miscele fisiche TCP-CRG nei rapporti in peso 3:1 (c), 1:1 (d) e 1:3 (e).

In Figura 41 sono riportate le curve DSC della miscela fisica TCP-CRG in rapporto in peso 1:1 tal quale, dopo kneading e del residuo dell'evaporazione per irraggiamento con microonde della sua soluzione acquosa.

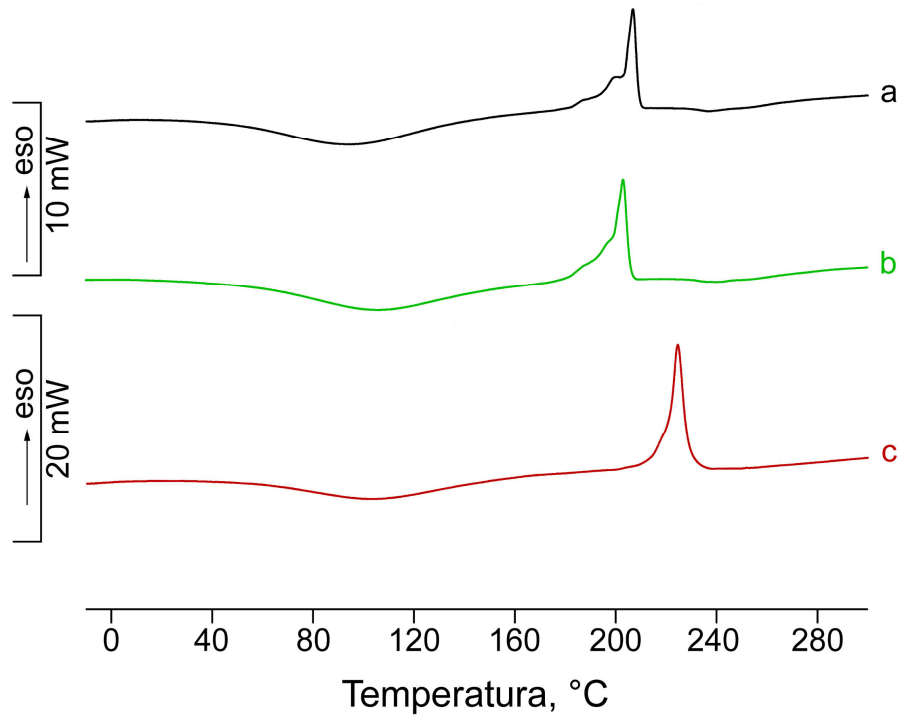


Figura 41. Curve DSC della miscela fisica TCP-CRG 1:1 (p/p) tal quale (a), dopo kneading (b) e del residuo per irraggiamento con microonde (c) della sua soluzione acquosa.

La miscela fisica TCP-CRG 1:1 (p/p) tal quale e dopo kneading presenta un'endoterma di disidratazione tra 9 e 172 °C circa, seguita da un'esoterma di decomposizione, caratteristica del CRG, intorno a circa 207 °C. Il picco esotermico di decomposizione del preparato ottenuto nel coevaporato per irraggiamento con microonde è spostato verso temperature più alte (circa 225 °C), indice del fatto che il trattamento porta a un preparato termicamente più stabile.

Un comportamento analogo in DSC è stato registrato anche per sistemi binari a varia composizione e pertanto le curve non vengono riportate.

Anche negli spettri FT-IR (non riportati) non si osservano differenze sostanziali tra lo spettro delle miscele fisiche non trattate e quelli dei prodotti di kneading e di essiccamento con microonde.

In Figura 42 sono messi a confronto i profili di rilascio della TCP e della miscela fisica TCP-CRG 1:1 (p/p) tal quale e del residuo dopo essiccamento con microonde della sua soluzione acquosa.

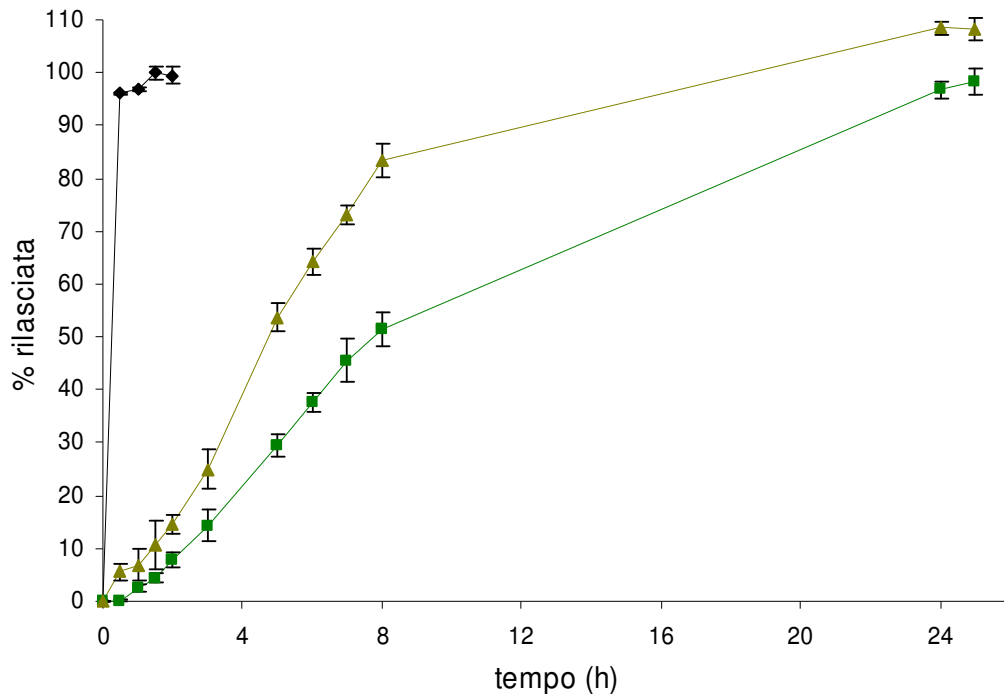


Figura 42. Profili di rilascio della TCP commerciale (♦), della miscela fisica TCP-CRG 1:1 (p/p) tal quale (■) e del residuo dopo irraggiamento con microonde (▲) della sua soluzione acquosa.

Nella miscela fisica tal quale si osserva un più marcato effetto ritardante sul rilascio della TCP che, come tale, viene rilasciata in circa 2 ore. Le compresse di miscela fisica tal quale e del coevaporato per irraggiamento con microonde, a contatto con il fluido di dissoluzione rigonfiano e la gelificazione del CRG ritarda il rilascio del farmaco che viene ceduto completamente in circa 24 ore.

In Figura 43 sono riportati i profili di rilascio delle miscele fisiche TCP-CRG nei rapporti ponderali 1:1, 1:2 e 1:3.

All'aumentare della quantità di carrier presente nella miscela si osserva un aumento dell'effetto ritardante sul rilascio della TCP che appare più marcato nella miscela fisica in rapporto 1:3 (p/p) dove il rilascio dell'antibiotico è protratto per circa 30 ore.

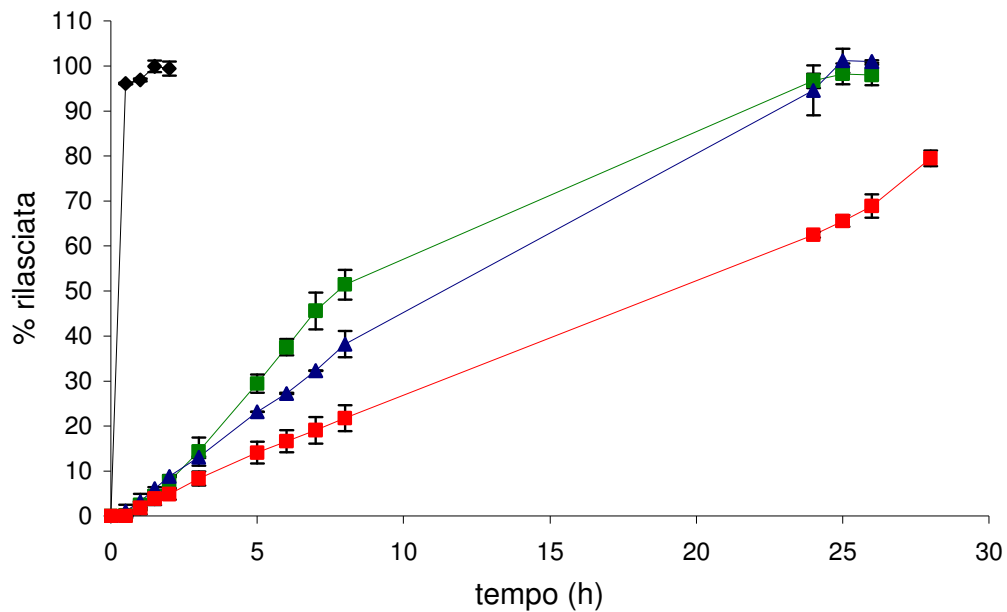


Figura 43. Profili di rilascio della TCP (♦) e delle miscele fisiche TCP-CRG nei rapporti in peso 1:1 (p/p) (■), 1:2 (p/p) (▲) e 1:3 (p/p) (■).

Sistemi ternari TCP-CRG-TA γ Cd

In Figura 44 sono riportate le curve DSC dei singoli componenti, delle miscele fisiche della TCP con la TA γ Cd in rapporto 1:1 in peso e delle miscele ternarie TCP-CRG-TA γ Cd nei rapporti ponderali 1:1:1 e 1:1:3.

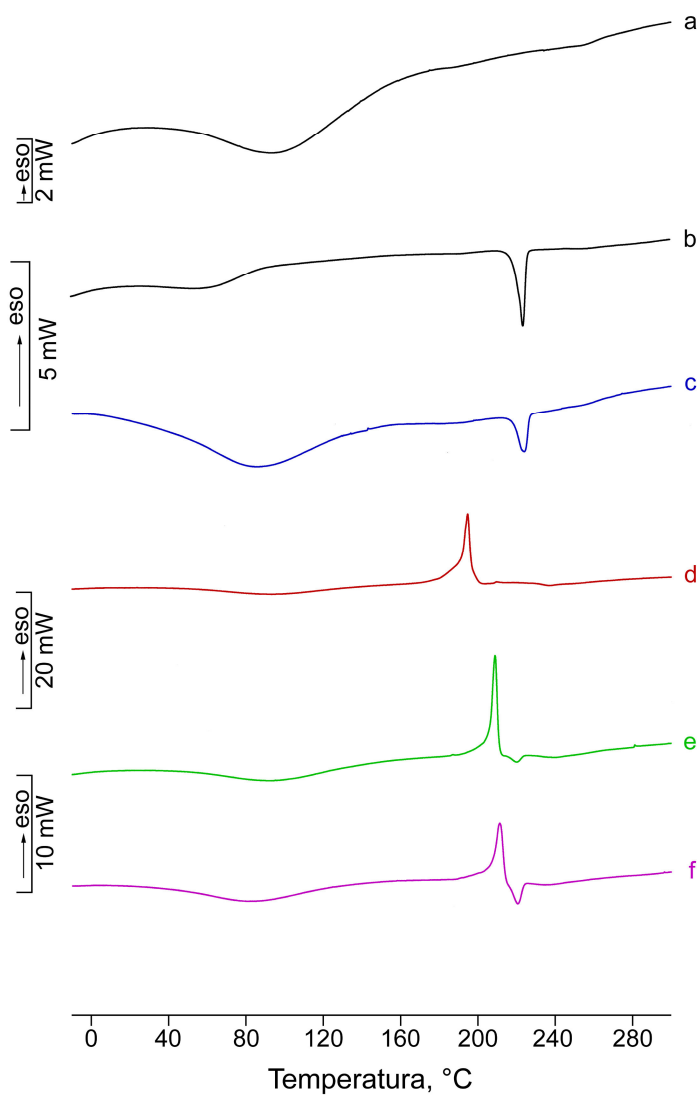


Figura 44. Curve DSC della TCP tal quale (a), della TA γ Cd (b), della miscela fisica TCP-TA γ Cd 1:1 (p/p) (c), del CRG (d) e delle miscele ternarie TCP-CRG-TA γ Cd nei rapporti in peso 1:1:1 (p/p/p) (e) e 1:1:3 (p/p/p) (f).

L'effetto endotermico di fusione della ciclodestrina a 225 ± 1 °C con $\Delta H_{\text{fus}} = 25 \pm 1$ J g⁻¹ (curva b) è ancora evidente nella curva DSC della miscela fisica binaria TCP-TA γ Cd 1:1 (p/p) (curva c) mentre scompare quasi completamente nella miscela ternaria TCP-CRG-TA γ Cd 1:1:1 (p/p/p). Probabilmente l'effetto esotermico di decomposizione del polimero copre la fusione del carrier cristallino. Nella miscela fisica ternaria in eccesso di TA γ Cd (curva f) il picco di fusione della

ciclodestrina riappare con parametri termici ($T_{\text{peak}} = 220 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$, $\Delta H_{\text{fus}} = 24 \pm 2 \text{ J g}^{-1}$) simili a quelli osservati nel prodotto commerciale.

Negli spettri FT-IR (non riportati) delle diverse miscele fisiche, come già osservato per i sistemi contenenti VCM·HCl, appaiono evidenti solo gli assorbimenti caratteristici della TA γ Cd cristallina che prevalgono su quelli meno risolti della controparte amorfa.

I profili di rilascio delle miscele ternarie TCP-CRG-TA γ Cd nei diversi rapporti in peso sono messi a confronto con le miscele fisiche binarie TCP-TA γ Cd e TCP-CRG in Figura 45.

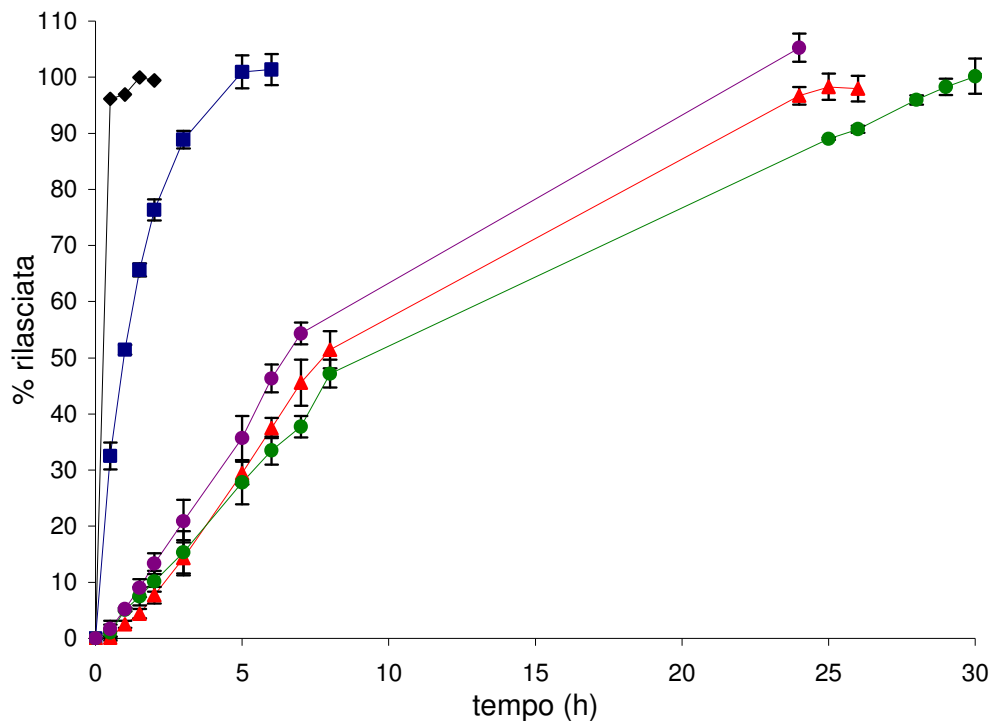


Figura 45. Profili di rilascio della TCP commerciale (♦), delle miscele fisiche TCP-TA γ Cd 1:1 (p/p) (■), TCP-CRG 1:1 (p/p) (▲) e TCP-CRG-TA γ Cd 1:1:1 (p/p/p) (●) e 1:1:3 (p/p/p) (◆).

Come nel caso della VCM·HCl, il contributo della TA γ Cd al rallentamento del rilascio della TCP non risulta determinante. Nelle miscele fisiche ternarie con un eccesso di ciclodestrina il rilascio della TCP è paragonabile a quello ottenuto con

la miscela fisica TCP-CRG 1:1 (p/p). Come osservato in precedenza per la VCM·HCl, anche le compresse a base di TCP presentano lo stesso problema, in quanto dopo qualche ora dall'inizio del test di dissoluzione compare sul fondo del vessel una polvere che, recuperata e sottoposta ad analisi DSC (curve non riportate), si rivela costituita da TA γ Cd. Probabilmente anche nel caso della TCP l'eccesso di TA γ Cd non riesce ad omogeneizzarsi completamente con gli altri componenti della miscela e tende quindi a separarsi una volta che la compressa è entrata in contatto con il fluido di dissoluzione.

Cristallizzazione sferica

VCM·HCl e TCP

Alla VCM·HCl è stata applicata la tecnica della “spherical agglomeration” (SA), la più semplice delle tecniche di cristallizzazione sferica che permette di ottenere la cristallizzazione di un principio attivo e la sua contemporanea sferonizzazione, ossia la formazione di agglomerati sferici di tali cristalli [40].

La SA si basa sull'impiego di un sistema di tre diversi solventi costituiti da un così detto “good solvent”, un “poor solvent” e un “bridging liquid”. La scelta di questi solventi dipende dal grado di reciproca miscibilità e dalla solubilità del farmaco in esame.

In particolare il farmaco deve essere solubile nel “good solvent” e poco solubile nel “poor solvent” e i due solventi devono essere fra loro parzialmente miscibili. Il “bridging liquid” deve essere compatibile con il farmaco e generalmente immiscibile o poco miscibile con il “poor solvent”.

La tecnica consiste nello sciogliere il farmaco, eventualmente addizionato di opportuni eccipienti, nel “good solvent” e quindi nell'aggiungere la soluzione così ottenuta al “poor solvent” sotto energica agitazione (300-800 rpm) mantenendo una differenza di temperatura tra i due solventi in modo da favorire il fenomeno della cristallizzazione. Dopo aver lasciato precipitare per qualche minuto i cristalli di farmaco, definiti cristalli primari, viene aggiunta al sistema un'adeguata quantità del cosiddetto “bridging liquid” (mantenendo sempre costante l'agitazione) che favorisce la coesione dei cristalli fino a formare agglomerati di forma sferica. Il prodotto finale è il risultato di un'agglomerazione casuale di cristalli primari più piccoli in seguito all'aggiunta del “bridging liquid” [41-43].

Sperimentalmente si è operato sciogliendo 250 mg di VCM·HCl in 7 mL di H₂O mantenuta a 50 °C, utilizzata come “good solvent”. La soluzione così ottenuta è stata poi aggiunta goccia a goccia a 100 mL di acetone a 25 °C, utilizzato come “poor solvent”, mantenendo un'agitazione magnetica costante di 600 rpm per 10 min. Al sistema così ottenuto sono stati aggiunti 4,8 mL di cloruro di metilene che

funge da “bridging liquid”, mantenendo l’agitazione costante a 600 rpm per altri 60 min. La sospensione così ottenuta è stata poi centrifugata e il residuo solido è stato posto in essiccatore su P_2O_5 fino a peso costante.

Le analisi DSC e TG del campione così ottenuto (curve non riportate) presentano un profilo praticamente sovrapponibile a quello della VCM·HCl commerciale (vedi Figura 14), dimostrando che, anche in seguito a SA, l’antibiotico precipita allo stato amorfo.

Le immagini al microscopio ottico in luce polarizzata di un campione di VCM·HCl commerciale e di VCM·HCl ottenuta per SA sono riportate in Figura 46. Dal confronto i preparati presentano un’evidente somiglianza morfologica e la comune natura amorfa, in accordo con i risultati dell’analisi DSC.

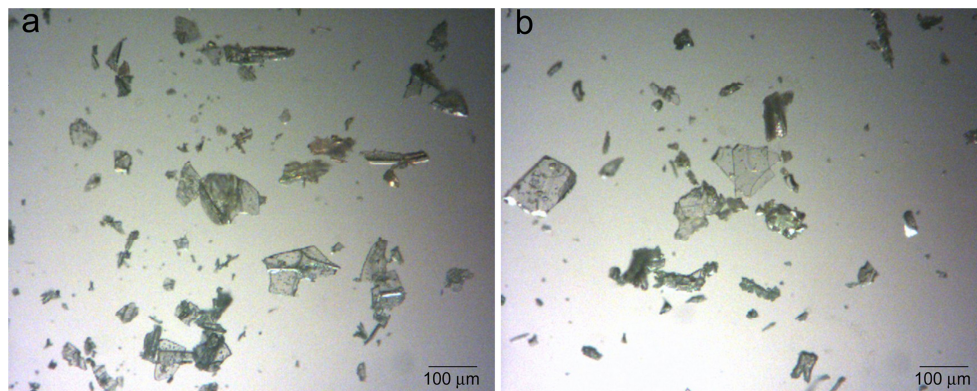


Figura 46. Fotografie registrate al microscopio ottico della VCM·HCl commerciale (a) e di quella ottenuta per SA (b).

La natura amorfa della VCM·HCl ottenuta per SA è stata anche confermata dall’analisi termomicroscopica che rivela come, per effetto del riscaldamento, il campione imbrunisce progressivamente e poi decompone senza fondere (Figura 47).

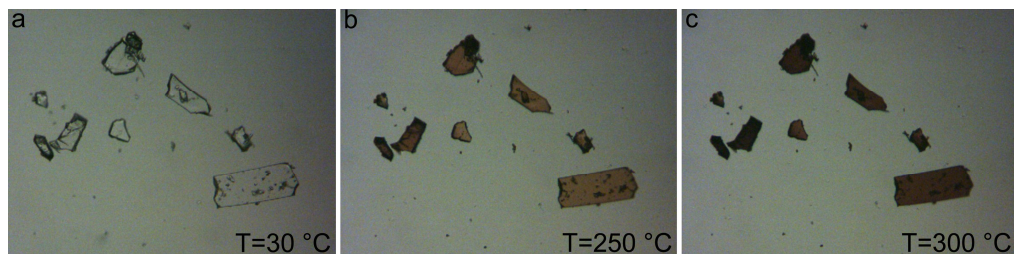


Figura 47. Fotografie registrate all’HSM della VCM·HCl ottenuta per SA a temperatura ambiente (a), a 250 °C (b) e a 300 °C (c).

Nel processo di SA la VCM·HCl si mantiene quindi nello stato amorfo iniziale senza formazione di agglomerati sferici.

La tecnica della SA è stata applicata anche alla TCP sciogliendo 250 mg di TCP in 7 mL di H₂O mantenuta a 50 °C, utilizzata come “good solvent”. La soluzione ottenuta è stata poi aggiunta goccia a goccia al “poor solvent” costituito da 100 mL di acetone a 25 °C, mantenendo un’agitazione magnetica costante di 600 rpm per 10 min. Al sistema così ottenuto sono stati aggiunti goccia a goccia 4,8 mL di cloruro di metilene utilizzato come “bridging liquid”, continuando l’agitazione a 600 rpm per altri 60 min. La sospensione, non centrifugabile, è stata posta in stufa a circa 80 °C per 2 giorni allo scopo di permettere il totale allontanamento del solvente; il solido recuperato è stato posto in essiccatore su P₂O₅ fino a peso costante.

L’analisi DSC del campione ottenuto presenta un profilo perfettamente sovrapponibile a quello della TCP commerciale (vedi Figura 17) dimostrando che anche in seguito a SA l’antibiotico si isola allo stato amorfo.

In Figura 48 sono riportate le fotografie ottenute al microscopio ottico di un campione di TCP commerciale (Figura 48a) e di uno di TCP ottenuta per SA (Figura 48b). In entrambi i casi i campioni sono apparsi vetrosi ed hanno mostrato una notevole somiglianza morfologica.

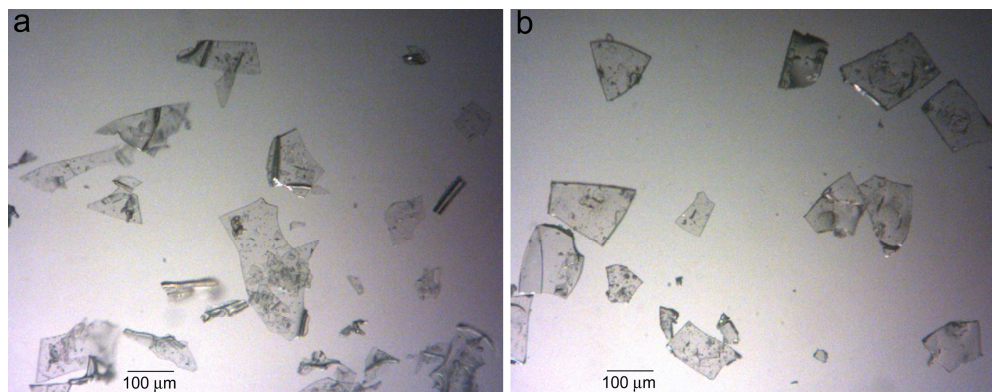


Figura 48. Fotografie registrate al microscopio ottico della TCP commerciale (a) e di quella ottenuta per SA (b).

Le immagini registrate nell'analisi HSM del campione di TCP isolato per SA non sono riportate in quanto molto simili a quelle della TCP commerciale (vedi Figura 18).

Per entrambi gli antibiotici si è quindi cambiato il “poor solvent” e si è utilizzata la tecnica di cristallizzazione sferica definita della “transient emulsion” (TE) [41]. La tecnica della TE è molto simile alla SA differenziandosi solo per il fatto che il “bridging liquid” viene aggiunto direttamente al “good solvent” in cui è disciolto il composto da cristallizzare. La soluzione che così si ottiene viene aggiunta, sotto energica agitazione, al “poor solvent” fino a formare un'emulsione nelle cui goccioline, a mano a mano che il “good solvent” diffonde nel “poor solvent”, la sostanza dapprima cristallizza e poi, per effetto del “bridging liquid”, dà origine ad agglomerati sferici.

In Tabella 8 sono riportati i tipi e i volumi dei sistemi di solventi utilizzati per la cristallizzazione sferica di 250 mg di VCM·HCl e di 250 mg di TCP.

Tabella 8. Solventi per la preparazione di agglomerati sferici della VCM·HCl e della TCP.

Metodo	Good solvent (volume, mL)	Poor solvent (volume, mL)	Bridging liquid (volume, mL)
SA	H ₂ O (7,5)	MeOH (100)	CH ₂ Cl ₂ (4,8)
SA	H ₂ O (7,5)	EtOH (100)	CH ₂ Cl ₂ (4,8)
SA	H ₂ O (7,5)	MeOH/acetone 1:1 v/v (100)	CH ₂ Cl ₂ (4,8)
SA	H ₂ O (7,5)	EtOH/acetone 1:1 v/v (100)	CH ₂ Cl ₂ (4,8)
SA	H ₂ O (7,5)	THF (50)	CH ₂ Cl ₂ (2,4)
TE	H ₂ O (7,5)	acetone (100) + CHCl ₃ (2,2)	-
TE	H ₂ O (7,5)	EtOH/acetone 1:1 v/v (100) + CHCl ₃ (2,2)	-

I risultati sono analoghi a quelli già ottenuti per il sistema H₂O/acetone/CH₂Cl₂ fatta eccezione per la VCM·HCl quando si è utilizzato come “poor solvent” la miscela di solventi EtOH/acetone nel rapporto volumetrico 1:1.

In Figura 49 sono riportate le fotografie registrate al microscopio ottico di campioni di VCM·HCl commerciale e ottenuta per SA utilizzando il sistema di solventi H₂O/EtOH-acetone/CH₂Cl₂ (Figura 49).

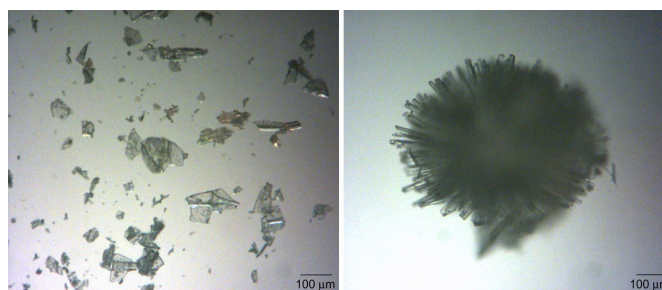


Figura 49. Fotografie registrate al microscopio ottico della VCM·HCl commerciale (a) e di quella ottenuta per SA con sistema di solventi H₂O/EtOH-acetone/CH₂Cl₂ (b).

Nel composto ottenuto per SA le particelle si sono aggregate a formare un agglomerato sferico nonostante la natura del composto resti comunque amorfa,

come confermato dall'analisi termica. In Figura 50 sono riportate le curve DSC della VCM·HCl commerciale e del campione ottenuto per SA utilizzando il sistema di solventi H₂O/EtOH-acetone/CH₂Cl₂. Entrambi i preparati mostrano un'endoterma di disidratazione nell'intervallo di temperatura compreso tra circa 20 e 175 °C, corrispondenti ad una perdita di massa in TG del 10% per la VCM·HCl commerciale e del 6% per quella prodotta per SA, seguita dalla decomposizione del campione senza alcuna precedente fusione, come è attendibile per sostanze di natura amorfa.

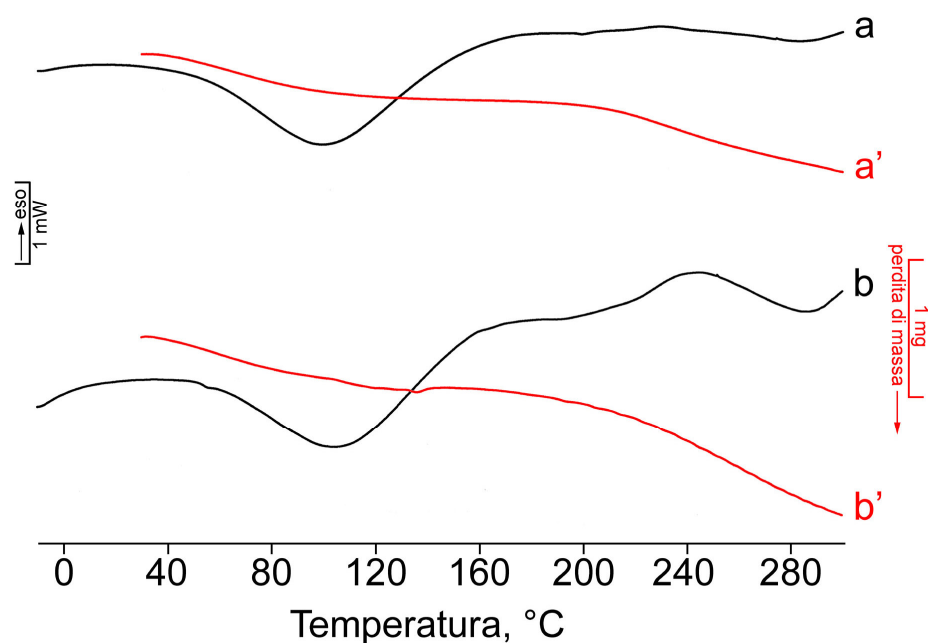


Figura 50. Curve DSC e TG della VCM·HCl commerciale (a,a') e di quella ottenuta per SA con sistema di solventi H₂O/EtOH-acetone/CH₂Cl₂ (b,b').

TAαCd

Sperimentalmente si è operato sciogliendo 250 mg di TAαCd in un opportuno volume di “good solvent” mantenuto a 50 °C. La soluzione così ottenuta è stata poi aggiunta goccia a goccia ad un determinato volume di “poor solvent” a 25 °C, mantenendo un'agitazione magnetica costante di 600 rpm per 10

min. Al sistema così ottenuto sono stati aggiunti adeguati volumi di “bridging liquid”, mantenendo l’agitazione costante di 600 rpm per altri 60 min. In Tabella 9 sono stati riportati i tipi e i volumi dei solventi utilizzati.

Tabella 9. Solventi per la preparazione di agglomerati sferici della TA α Cd.

Metodo	Good solvent (volume, mL)	Poor solvent (volume, mL)	Bridging liquid (volume, mL)
SA	acetone (4,4)	H ₂ O (100)	CH ₂ Cl ₂ (4,8)
SA	EtOH (10,8)	H ₂ O (100)	CH ₂ Cl ₂ (4,8)
SA	MeOH (4,8)	H ₂ O (100)	CH ₂ Cl ₂ (4,8)

Le sospensioni così ottenute vengono quindi poste in stufa a 60 °C per almeno 2 giorni fino ad ottenere il totale allontanamento del solvente.

In Figura 51 sono riportate le curve DSC della TA α Cd commerciale (a) e del preparato per SA utilizzando il sistema di solventi EtOH/H₂O/CH₂Cl₂ (b).

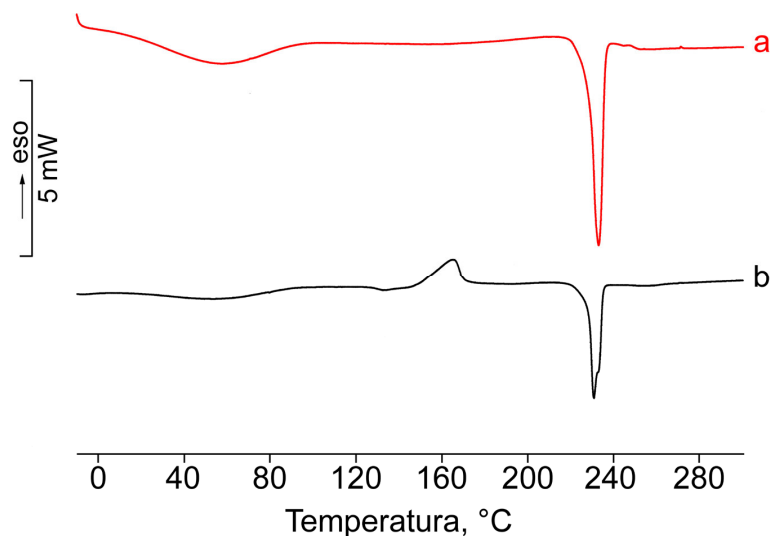


Figura 51. Curve DSC della TA α Cd commerciale (a) e di quella ottenuta per SA utilizzando il sistema di solventi EtOH/H₂O/CH₂Cl₂ (b).

Il prodotto commerciale mostra, come già descritto in precedenza (vedi pag. 49), un comportamento termico caratteristico di una sostanza cristallina idrata che si disidrata in una forma anidra a p_f $231,0 \pm 0,3$ °C ($\Delta H_{fus} = 43 \pm 3$ J g⁻¹). Il campione ottenuto per SA mostra invece, dopo una prima endoterma allargata di disidratazione, un effetto esotermico a circa 165 °C, corrispondente ad una ricristallizzazione del campione, seguito da un'endoterma di fusione a temperatura di $231,17 \pm 1,23$ °C ($\Delta H_{fus} = 45 \pm 1$ J g⁻¹). La cristallizzazione sferica comporta quindi un'amorfizzazione della TA α Cd che, per effetto del riscaldamento in DSC, ricristallizza nella stessa forma solida presente nel prodotto commerciale.

Un comportamento simile è stato osservato anche per i campioni ottenuti con la tecnica della SA utilizzando i sistemi di solventi acetone/H₂O/CH₂Cl₂ e MeOH/H₂O/CH₂Cl₂ e pertanto le rispettive curve termiche non vengono riportate.

In Figura 52 vengono presentate le fotografie al microscopio ottico di un campione di TA α Cd commerciale e di uno di TA α Cd ottenuta per SA utilizzando il sistema di solventi EtOH/H₂O/CH₂Cl₂ (Figura 52).

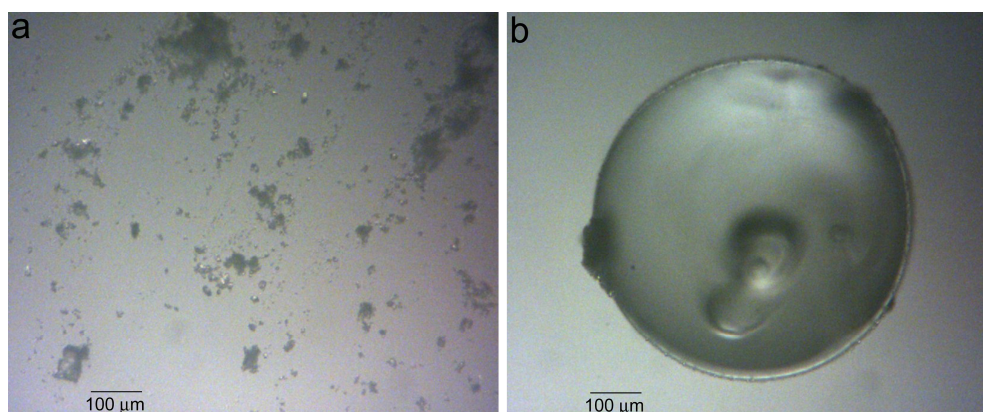


Figura 52. Fotografie registrate al microscopio ottico della TA α Cd commerciale (a) e di quella ottenuta per SA con sistema di solventi EtOH/H₂O/CH₂Cl₂ (b).

Il campione di TA α Cd commerciale si presenta come polvere cristallina costituita da cristalli molto piccoli, di dimensioni dell'ordine di qualche μm, mentre quello ottenuto per SA presenta forma sferica, superficie liscia e regolare e dimensioni

molto maggiori (circa 600 μm) essendo costituito dall'aggregazione delle particelle più piccole di $\text{TA}\alpha\text{Cd}$.

Le fotografie registrate all'HSM del prodotto ottenuto per SA con il sistema di solventi $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (Figura 53) confermano i dati termici. Infatti il campione, che a temperatura ambiente si presenta amorfo, per effetto del riscaldamento a circa 165 °C cristallizza in una forma anidra che poi fonde a circa 236 °C e quindi imbrunisce e decompone a circa 300 °C.

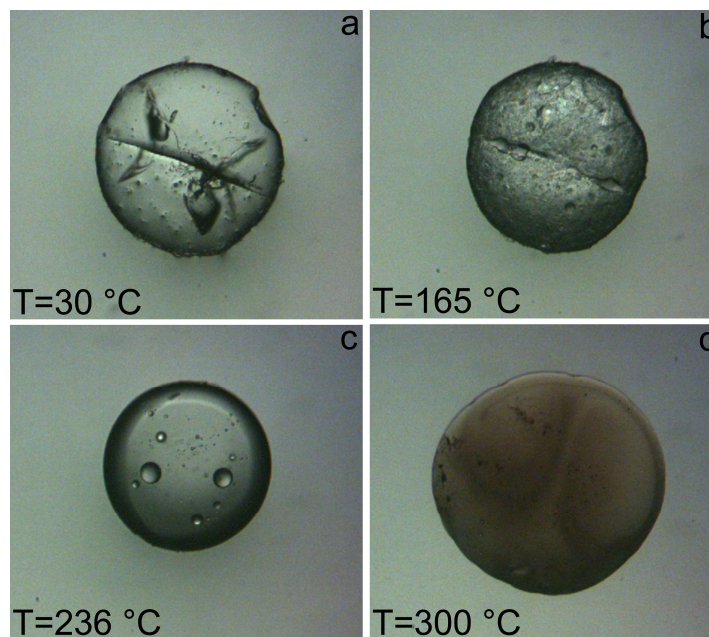


Figura 53. Fotografie registrate all'HSM della $\text{TA}\alpha\text{Cd}$ ottenuta per SA con il sistema di solventi $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ a 30 °C (a), a 165 °C (b), a 236 °C (c) e a 300 °C (d).

Utilizzando gli altri sistemi di solventi, $\text{acetone}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ e $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, gli agglomerati sferici risultavano più irregolari e più scuri.

$\text{TA}\beta\text{Cd}$

Anche per la $\text{TA}\beta\text{Cd}$ è stata applicata la tecnica della SA già descritta per la $\text{TA}\alpha\text{Cd}$ e la tecnica della TE già impiegata per i due antibiotici. Sperimentalmente si è operato sciogliendo 250 mg di $\text{TA}\beta\text{Cd}$ in un opportuno

volume di “good solvent” mantenuto a temperatura ambiente e aggiungendo a tale soluzione un adeguato volume di “bridging liquid”. La soluzione così ottenuta è stata poi aggiunta goccia a goccia ad un determinato volume di “poor solvent” a temperatura ambiente, mantenendo un’agitazione magnetica costante di 600 rpm per 30 min. In Tabella 10 sono stati riportati i tipi e i volumi dei solventi utilizzati per entrambe le tecniche.

Tabella 10. Solventi per la preparazione di agglomerati sferici della TA β Cd.

Metodo	Good solvent (volume, mL)	Poor solvent (volume, mL)	Bridging liquid (volume, mL)
SA	acetone (7,5)	H ₂ O (100)	CH ₂ Cl ₂ (4,8)
SA	EtOH (12,5)	H ₂ O (100)	CH ₂ Cl ₂ (4,8)
SA	MeOH (16,8)	H ₂ O (100)	CH ₂ Cl ₂ (4,8)
SA	EtOH/acetone 1:1 (v/v) (15)	H ₂ O (200)	CH ₂ Cl ₂ (4,8)
SA	EtOH/acetone 1:1 (v/v) (15)	H ₂ O (200)	CHCl ₃ (2,4)
TE	acetone (15) + CHCl ₃ (2,2)	H ₂ O (200)	–

Le sospensioni così ottenute vengono quindi poste in stufa a 60 °C per almeno 2 giorni fino al totale allontanamento del solvente.

In Figura 54 sono riportate le curve DSC della TA β Cd commerciale, del campione ottenuto per TE e di quelli ottenuti per SA utilizzando i sistemi di solventi EtOH-acetone/H₂O/CH₂Cl₂ ed acetone/H₂O/CH₂Cl₂.

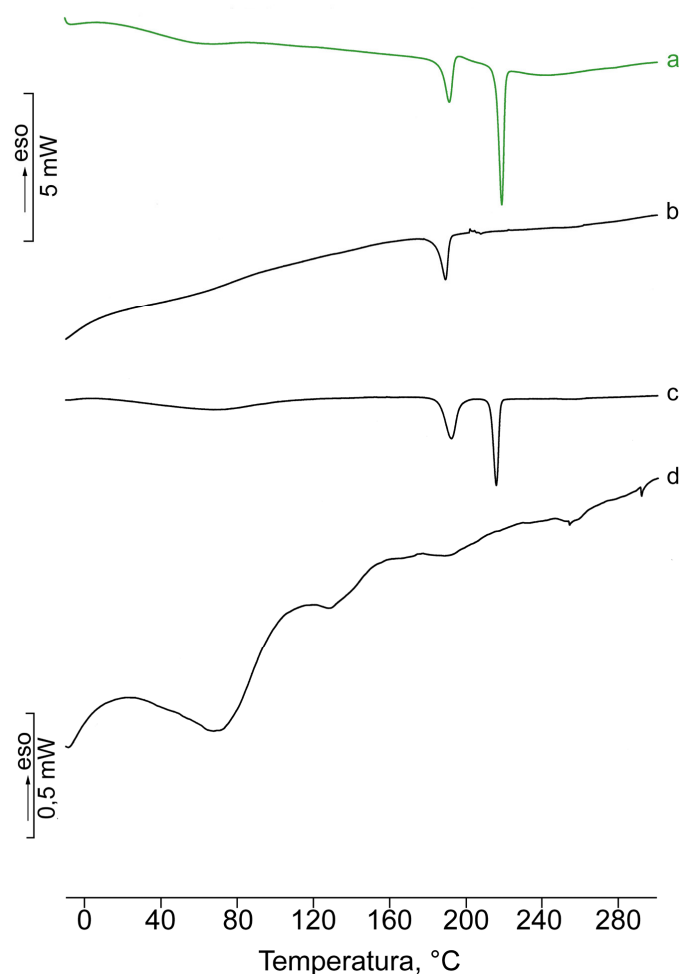


Figura 54. Curve DSC della TA β Cd commerciale (a), di quella ottenuta per TE (b) e per SA utilizzando i sistemi di solventi EtOH-acetone/H₂O/CH₂Cl₂ (c) ed acetone/H₂O/CH₂Cl₂ (d).

Il comportamento termico della TA β Cd commerciale (Figura 54a) già descritto in precedenza (vedi pag. 54) è tipico di un solvato cristallino che si desolvata in una forma anidra cristallina ($T_{\text{fus,I}} = 196 \text{ }^\circ\text{C}$; $\Delta H_{\text{fus,I}} = 25 \pm 1 \text{ J g}^{-1}$) dal cui fuso ricristallizza una modificazione polimorfa a punto di fusione ed entalpia di fusione maggiori ($T_{\text{fus,II}} = 223 \text{ }^\circ\text{C}$; $\Delta H_{\text{fus,II}} = 41 \pm 2 \text{ J g}^{-1}$). Con la tecnica della TE è stata invece ottenuta la modificazione a punto di fusione più basso (Figura 54b), mentre con la tecnica della SA utilizzando il sistema di solventi acetone/H₂O/CH₂Cl₂ il campione risulta amorfo (Figura 54d). Con la SA

utilizzando il sistema di solventi EtOH-acetone/H₂O/CH₂Cl₂ (Figura 54c) i campioni isolati mostrano i picchi di fusione di entrambi i polimorfi presenti nella TAβCd commerciale.

Il comportamento in DSC dei campioni isolati con i sistemi di solventi EtOH/H₂O/CH₂Cl₂ e MeOH/H₂O/CH₂Cl₂ è del tutto simile a quello del campione ottenuto con il sistema di solventi acetone/H₂O/CH₂Cl₂ (curve termiche non riportate).

In Figura 55 sono riportate le fotografie ottenute al microscopio ottico di un campione di TAβCd commerciale e di uno ottenuto con il metodo della SA con il sistema di solventi MeOH/H₂O/CH₂Cl₂ (Figura 55).

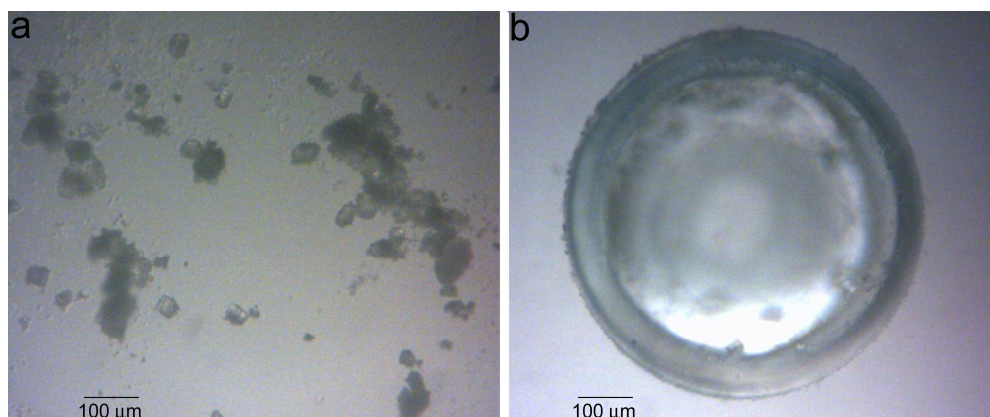


Figura 55. Fotografie registrate al microscopio ottico della TAβCd commerciale (a) e della TAβCd ottenuta per SA con il sistema di solventi MeOH/H₂O/CH₂Cl₂ (b).

Come per la TAαCd, anche in questo caso il campione di TAβCd commerciale è costituito da piccoli cristalli di circa 50 μm di diametro che per effetto della SA si aggregano formando un prodotto di forma sferica piuttosto regolare delle dimensioni di circa 700 μm di diametro.

Anche i campioni ottenuti dalle tecniche di TE e SA che utilizzano altri sistemi di solventi presentavano la stessa morfologia (immagini non riportate).

All'analisi HSM del campione ottenuto per SA con EtOH-acetone/H₂O/CH₂Cl₂ come sistema di solventi si registra solo la fusione della forma bassofondente a circa 192 °C e la successiva decomposizione del campione a circa 300 °C (Figura

56). Si può dedurre che in queste condizioni sperimentali non si inneschi la cristallizzazione dal fuso del polimorfo a punto di fusione maggiore.

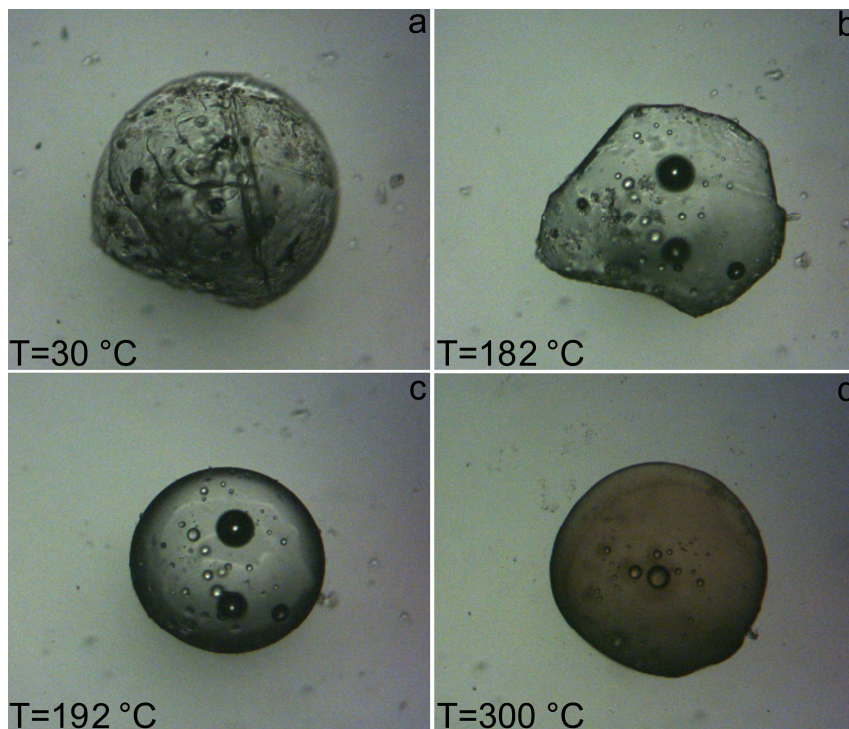


Figura 56. Fotografie registrate all'HSM della $TA\beta Cd$ ottenuta per SA con il sistema di solventi EtOH-acetone/ H_2O/CH_2Cl_2 a 30 °C (a), a 182 °C (b), a 192 °C (c) e a 300 °C.

$TA\gamma Cd$

Per la $TA\gamma Cd$ è stata utilizzata la tecnica della SA operando come per la $TA\alpha Cd$ e impiegando i sistemi di solventi riportati in Tabella 11.

Tabella 11. Solventi per la preparazione di agglomerati sferici della $TA\gamma Cd$.

Metodo	Good solvent (volume, mL)	Poor solvent (volume, mL)	Bridging liquid (volume, mL)
SA	acetone (1,4)	H_2O (100)	CH_2Cl_2 (4,8)
SA	EtOH (25)	H_2O (100)	CH_2Cl_2 (4,8)
SA	MeOH (18)	H_2O (100)	CH_2Cl_2 (4,8)
SA	EtOH/acetone 1:1 v/v (15)	H_2O (200)	$CHCl_3$ (2,4)

I campioni dopo totale allontanamento del solvente tenendoli in stufa a circa 60 °C per almeno 2 giorni sono stati caratterizzati dal punto di vista termooanalitico. In Figura 57 sono riportate le curve DSC della TA γ Cd commerciale e del campione ottenuto con la tecnica della SA utilizzando il sistema di solventi acetone/H₂O/CH₂Cl₂.

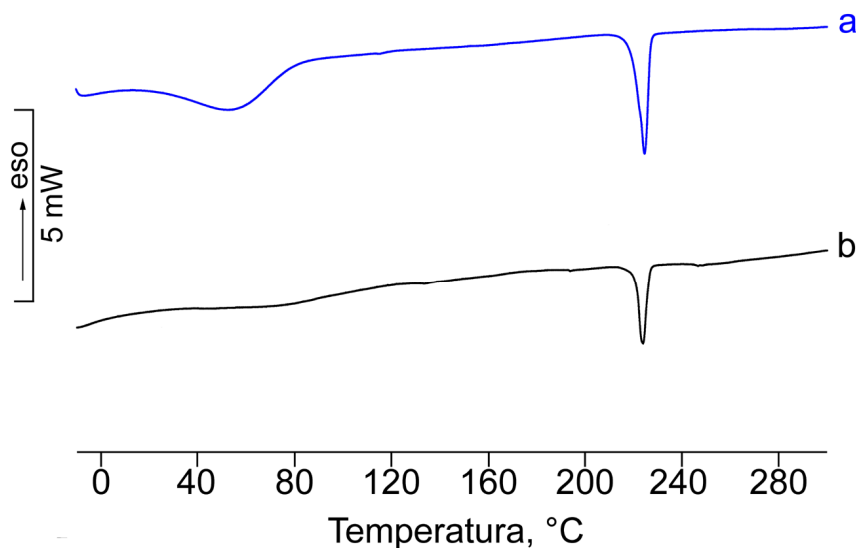


Figura 57. Curve DSC della TA γ Cd commerciale (a) e di quella ottenuta con la tecnica della SA utilizzando il sistema di solventi acetone/H₂O/CH₂Cl₂ (b).

Il comportamento termico della TA γ Cd commerciale, come già descritto in precedenza (vedi pag. 60), è tipico di un idrato che al riscaldamento si trasforma in un anidro cristallino che presenta punto di fusione a circa 225 °C e $\Delta H_{\text{fus}} = 25 \pm 3 \text{ J g}^{-1}$ (curva a). Il campione ottenuto per SA con il sistema di solventi acetone/H₂O/CH₂Cl₂ non mostra sostanziali differenze rispetto al prodotto commerciale (curva b).

Confrontando la morfologia dei campioni isolati, sono stati ottenuti agglomerati di cristalli sferici solo per il prodotto da SA con il sistema di solventi acetone/H₂O/CH₂Cl₂. Con le altre associazioni di solventi sono stati ottenuti cristalli sferici più irregolari e di colore molto scuro. In Figura 58 sono riportate le

fotografie di un campione di TA γ Cd commerciale e ottenuta per SA con il sistema di solventi acetone/H₂O/CH₂Cl₂.

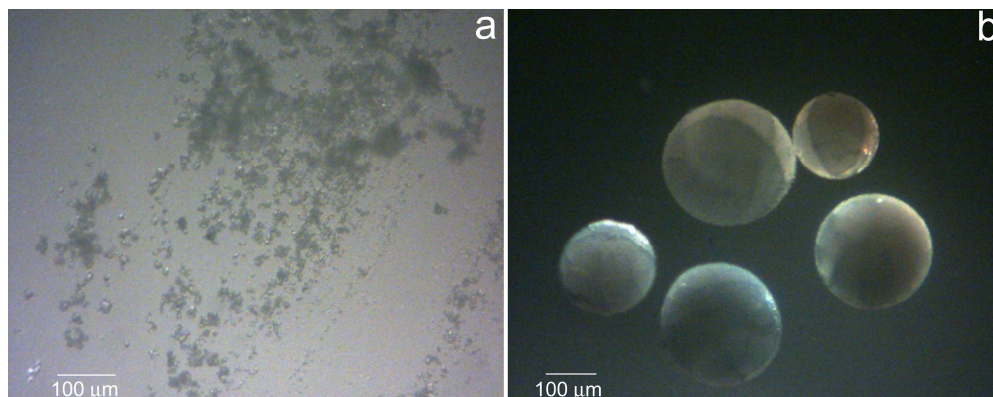


Figura 58. Fotografie registrate al microscopio ottico della TA γ Cd commerciale (a) e della TA γ Cd ottenuta per SA con il sistema di solventi acetone/H₂O/CH₂Cl₂ (b).

Il campione risulta costituito da sfere di forma regolare e con un diametro medio di circa 200 μ m formate dall'aggregazione dei cristalli pi \dot{u} piccoli (pochi μ m) che costituiscono il campione di TA γ Cd commerciale.

Le fotografie registrate all'HSM sul prodotto ottenuto per SA con lo stesso sistema di solventi (Figura 59) confermano i dati DSC. Il campione, infatti, per effetto del riscaldamento, fonde a circa 230 $^{\circ}$ C e quindi imbrunisce e si decompone a circa 300 $^{\circ}$ C.

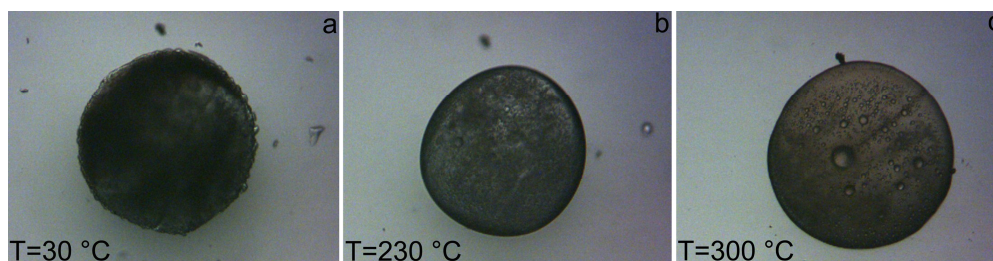


Figura 59. Fotografie registrate all'HSM della TA γ Cd ottenuta per SA con il sistema di solventi acetone/H₂O/CH₂Cl₂ a 30 $^{\circ}$ C (a), a 230 $^{\circ}$ C (b) e a 300 $^{\circ}$ C (c).

Si può concludere che l'applicazione delle tecniche della SA e della TE non ha dato buoni risultati per i principi attivi mentre per tutte e tre le TACds ha permesso di ottenere agglomerati sferici. Si è quindi voluto estendere entrambe le tecniche alla preparazione di sistemi binari farmaco-carrier ben sapendo dalla letteratura della difficoltà di ottenere con questi metodi agglomerati sferici di associazioni di due composti. Per la co-cristallizzazione di due componenti si ricorre in genere a un'altra tecnica, la "crystal-co-agglomeration" (CCA), una modificazione della cristallizzazione sferica che permette di ottenere la cristallizzazione e la contemporanea formazione di agglomerati sferici di un farmaco in miscela con un carrier o con un altro farmaco [44,45].

Pertanto abbiamo applicato unitamente alle tecniche di SA e TE opportunamente modificate, la tecnica della CCA ai sistemi VCM·HCl-TA α Cd, VCM·HCl-TA β Cd e VCM·HCl-TA γ Cd.

VCM·HCl-TAαCd

Sperimentalmente si è operato modificando leggermente le tecniche già descritte della SA e della TE in modo da poterle adattare all'impiego di due sostanze. In particolare 250 mg di TAαCd sono stati sciolti nel “good solvent”, mentre 250 mg di VCM·HCl (cioè un quantitativo tale da ottenere un rapporto equiponderale con la TAαCd) sono stati precedentemente sciolti nella soluzione di “poor solvent” alla quale viene aggiunta goccia a goccia la soluzione di “good solvent” contenente il carrier. Il “bridging liquid” viene aggiunto, come già descritto, nella fase finale nel caso della SA o direttamente al “good solvent” nel caso della TE.

Diversa invece la tecnica della CCA in cui 250 mg di TAαCd sono stati sciolti in diclorometano (DCM) che funge tanto da “good solvent” quanto da “bridging liquid”, lavorando sotto ghiaccio per evitare l'evaporazione del solvente molto volatile. Quindi sono stati uniformemente dispersi nella soluzione ottenuta i 250 mg di VCM·HCl mantenendo l'agitazione del sistema a 300 rpm per alcuni minuti. Alla sospensione è stato poi aggiunto il “poor solvent” costituito da una soluzione acquosa all'1% in peso di alcool polivinilico (PVA), mantenendo un'agitazione di 800 rpm per 30 min. In Tabella 12 sono riportati tipi e volumi di solventi utilizzati.

Tabella12. Solventi per la preparazione di agglomerati sferici del sistema VCM·HCl-TAαCd.

Metodo	Good solvent (volume, mL)	Poor solvent (volume, mL)	Bridging liquid (volume, mL)
SA	acetone (2,8)	H ₂ O (100)	CH ₂ Cl ₂ (4,8)
SA	EtOH(14)	H ₂ O (100)	CH ₂ Cl ₂ (4,8)
SA	EtOH/acetone 1:1 v/v (4,2)	H ₂ O (100)	CH ₂ Cl ₂ (4,8)
TE	EtOH/acetone 1:1 v/v (5) + CH ₂ Cl ₂ (2,2)	H ₂ O (100)	-
CCA	CH ₂ Cl ₂ (1,5)	H ₂ O + 1% PVA (6)	-

In Figura 60 sono riportate le fotografie registrate al microscopio ottico dei campioni ottenuti da TE e da CCA (Figura 60).

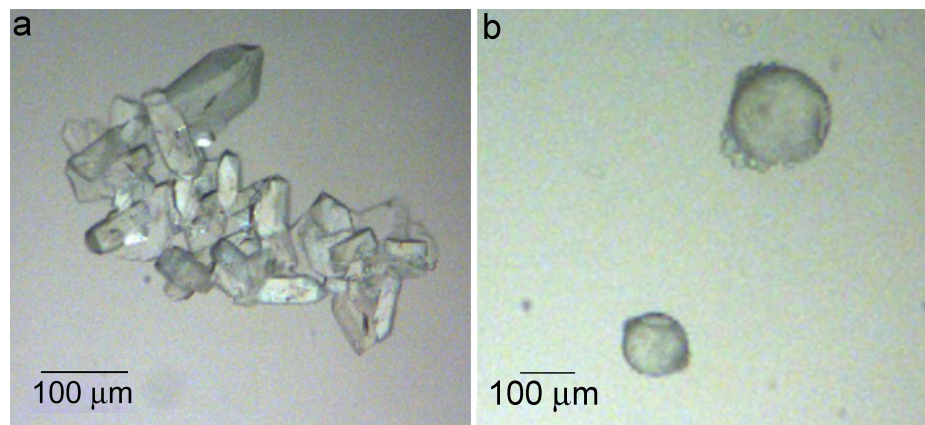


Figura 60. Fotografie registrate al microscopio ottico del sistema VCM·HCl-TA α Cd ottenuto da TE (a) e da CCA (b).

Purtroppo le tecniche classiche di SA e TE non hanno dato esito positivo in termini di ottenimento di agglomerati sferici, per quanto nel preparato da TE si può vedere che i cristalli si sono aggregati in un agglomerato di forma non sferica (Figura 60a). Il prodotto ottenuto da CCA presenta invece la caratteristica forma di agglomerato sferico, anche se di dimensioni piuttosto ridotte (Figura 60b).

I campioni così ottenuti sono stati sottoposti ad analisi DSC per verificare la natura degli agglomerati e in Figura 61 sono riportate le curve DSC della VCM·HCl commerciale, della TA α Cd commerciale, della loro miscela fisica in rapporto 1:1 (p/p) e dei prodotti ottenuti da TE e da CCA.

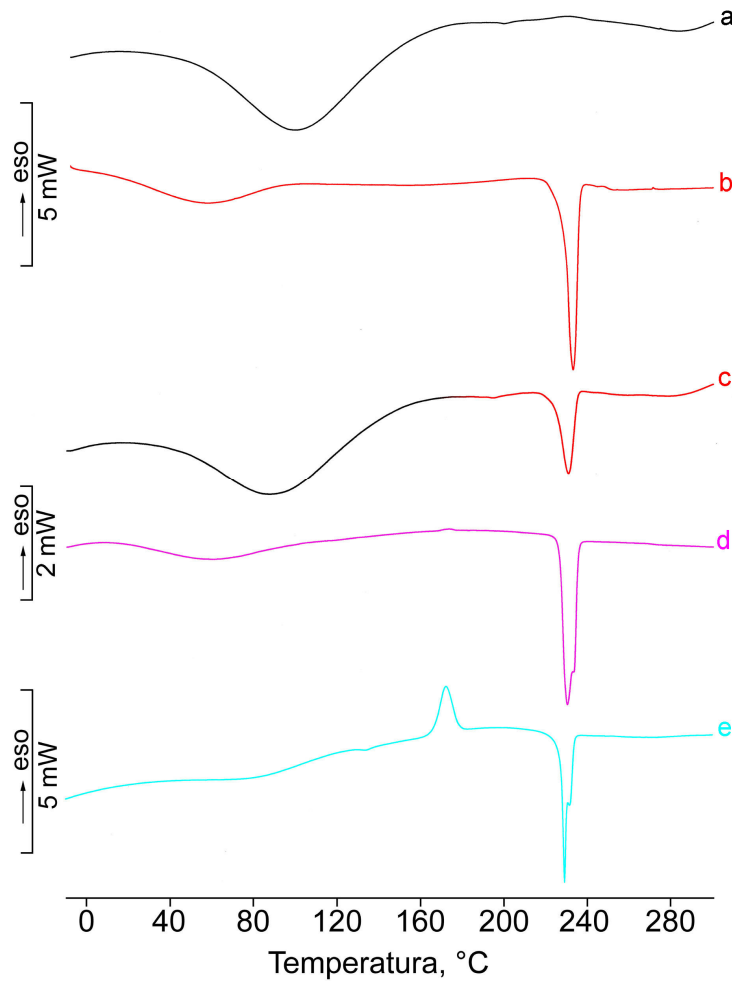


Figura 61. Curve DSC della VCM·HCl (a), della TA α Cd (b), della miscela fisica VCM·HCl-TA α Cd 1:1 (p/p) (c), del prodotto ottenuto da TE (d) e di quello ottenuto da CCA (e).

La curva DSC della VCM·HCl (Figura 61a) mostra il profilo tipico delle sostanze amorphe con un unico effetto endotermico di disidratazione molto allargato tra circa 40 e 170 °C. La curva della TA α Cd (Figura 61b) invece presenta un comportamento termico caratteristico di un idrato cristallino che presenta un primo effetto endotermico di disidratazione seguito dal picco di fusione a circa 231 °C.

Mentre la miscela fisica dei due componenti mostra un tracciato DSC corrispondente alla somma pesata degli effetti termici caratteristici del farmaco e

del carrier (Figura 61c), le curve DSC dei prodotti ottenuti da TE (Figura 61d) e CCA (Figura 61e) presentano, la prima un profilo molto simile a quello della TA α Cd commerciale e la seconda un netto effetto esotermico a circa 172 °C seguito dal picco endotermico di fusione. Questo effetto indica che vi è stata un'amorfezzazione del carrier che durante il riscaldamento in DSC in corrispondenza di questa esoterma ricristallizza. Nel prodotto ottenuto da TE e ancor più in quello ottenuto da CCA, si nota inoltre una doppia fusione della TA α Cd, evidente dalla spalla a circa 233 °C, che può essere attribuita alla presenza di due fasi solide del carrier a punti di fusione molto vicini, una preesistente e caratteristica del prodotto commerciale e l'altra formatasi nel processo di agglomerazione.

Dai profili DSC sembra quindi che gli agglomerati siano costituiti dalla sola TA α Cd. Per verificare questo dato gli stessi campioni sono stati sottoposti ad analisi FT-IR e in Figura 62 sono riportati gli spettri della VCM:HCl commerciale, della TA α Cd commerciale, della loro miscela fisica in rapporto 1:1 (p/p) e del prodotto ottenuto da CCA.

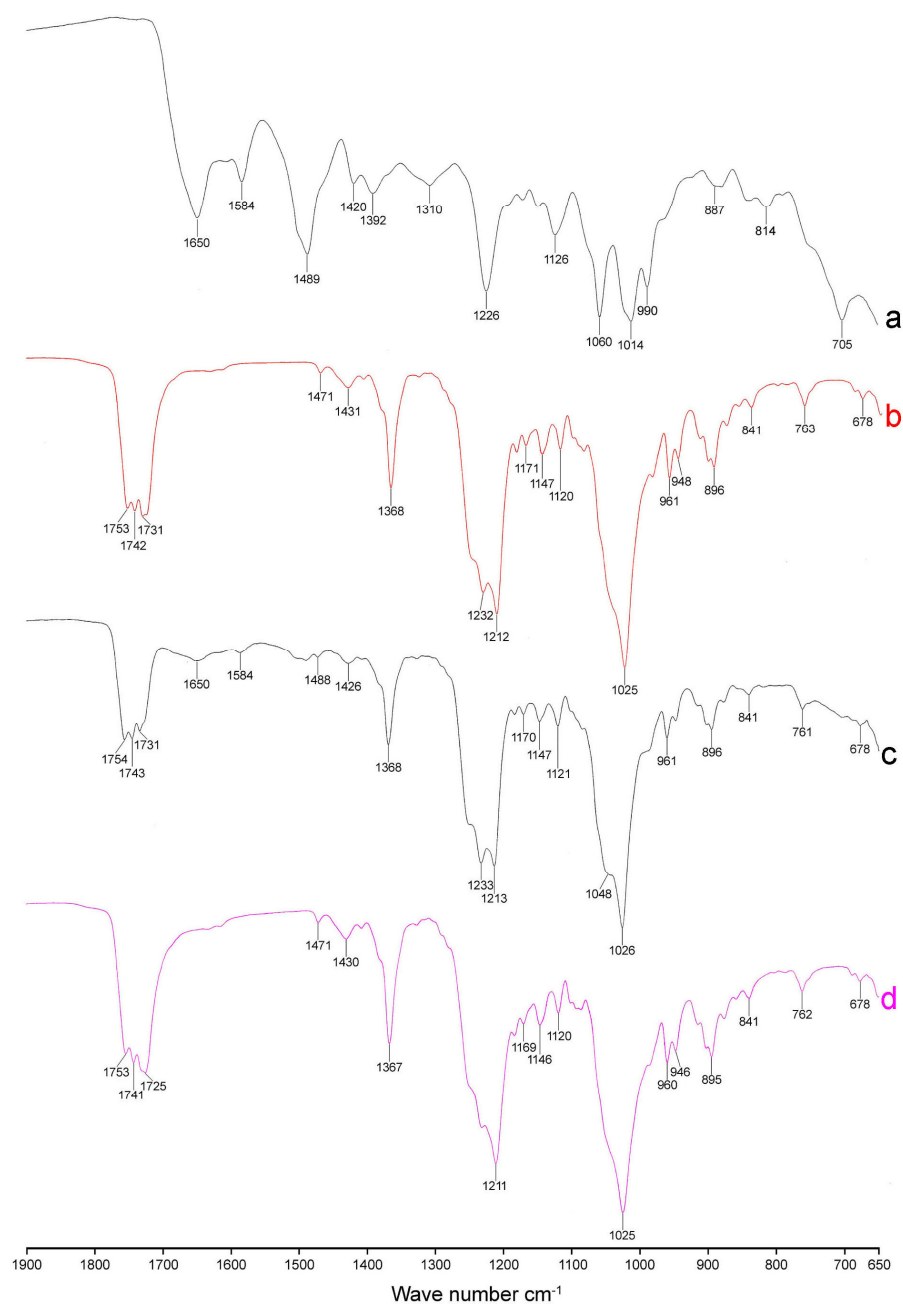


Figura 62. Spettri FT-IR della VCM-HCl (a), della TA α Cd (b), della miscela fisica VCM-HCl-TA α Cd 1:1 (p/p) (c) e del prodotto ottenuto da CCA (d).

Mentre il profilo della miscela fisica dei due componenti (Figura 62c) presenta i picchi caratteristici di entrambe le sostanze, lo spettro FT-IR del prodotto da CCA

(Figura 62d), che è coincidente con quello del prodotto da TE (non riportato) è sovrapponibile a quello della sola TA α Cd (Figura 62b). La presenza dell'altra fase solida cristallizzata nel processo di agglomerazione non è rilevabile dallo spettro FT-IR.

VCM·HCl-TA β Cd

Anche per il sistema VCM·HCl-TA β Cd sono state utilizzate le tecniche della SA, della TE e della CCA già descritte per il sistema VCM·HCl-TA α Cd. In Tabella 13 sono riportati i tipi e i volumi dei solventi impiegati.

Tabella 13. Solventi per la preparazione di agglomerati sferici del sistema VCM·HCl-TA β Cd.

Metodo	Good solvent (volume, mL)	Poor solvent (volume, mL)	Bridging liquid (volume, mL)
SA	acetone (7,5)	H ₂ O (100)	CH ₂ Cl ₂ (4,8)
SA	EtOH(7,5)	H ₂ O (100)	CH ₂ Cl ₂ (4,8)
SA	EtOH/acetone 1:1 v/v (7,5)	H ₂ O (100)	CH ₂ Cl ₂ (4,8)
TE	EtOH/acetone 1:1 v/v (5) + CH ₂ Cl ₂ (2,2)	H ₂ O (100)	-
CCA	CH ₂ Cl ₂ (3)	H ₂ O + 1% PVA (6)	-

In Figura 63 sono riportate le fotografie registrate al microscopio ottico dei campioni ottenuti da SA con sistema di solventi EtOH-acetone/H₂O/CH₂Cl₂ da TE e da CCA.



Figura 63 Fotografie registrate al microscopio ottico del sistema VCM·HCl-TA β Cd ottenuto da SA con sistema di solventi EtOH-acetone/H₂O/CH₂Cl₂ (a), da TE (b) e da CCA (c).

In questo caso, a differenza del sistema VCM·HCl-TA α Cd, anche le tecniche classiche di SA con il sistema di solventi EtOH-acetone/H₂O/CH₂Cl₂ (Figura 63a) e di TE (Figura 63b) hanno condotto ad agglomerati sferici. Inoltre il prodotto da CCA si presenta in sferette di forma regolare e di dimensioni piuttosto piccole (Figura 63c).

I campioni sono stati sottoposti ad analisi DSC per verificare la natura degli agglomerati e in Figura 64 sono riportate le relative curve della VCM·HCl commerciale, della TA β Cd commerciale, della loro miscela fisica in rapporto 1:1 (p/p) e dei prodotti ottenuti da SA con sistema di solventi EtOH-acetone/H₂O/CH₂Cl₂, da TE e da CCA.

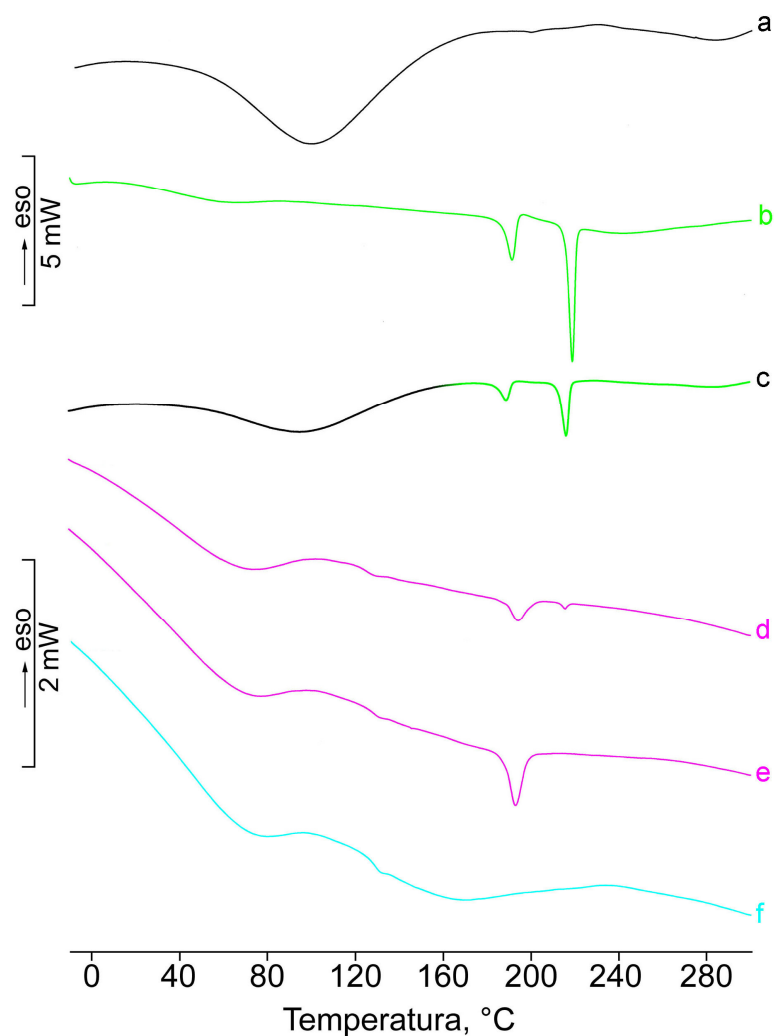


Figura 64. Curve DSC della VCM·HCl (a), della TAβCd (b), della miscela fisica VCM·HCl-TAβCd 1:1 (p/p) (c), del prodotto ottenuto da SA con sistema di solventi EtOH-acetone/H₂O/CH₂Cl₂ (d), da TE (e) e da CCA (f).

Il profilo DSC della miscela fisica della VCM·HCl-TAβCd (Figura 64c) è, come nel caso precedente del sistema VCM·HCl-TAαCd, la somma pesata degli effetti termici caratteristici del farmaco amorfo (Figura 64a) e della TAβCd (Figura 64b) come solvato cristallino che si desolvata in una forma anidra cristallina ($T_{\text{fus,I}} = 196 \text{ }^\circ\text{C}$; $\Delta H_{\text{fus,I}} = 25 \pm 1 \text{ J g}^{-1}$) dal cui fuso ricristallizza una modificazione polimorfa a punto di fusione ed entalpia di fusione maggiori ($T_{\text{fus,II}} = 223 \text{ }^\circ\text{C}$; $\Delta H_{\text{fus,II}} = 41 \pm 2 \text{ J g}^{-1}$).

I tracciati DSC dei prodotti ottenuti da SA, TE e CCA presentano invece tre profili diversi. Nel primo caso (Figura 64d) si riconoscono gli effetti endotermici attribuibili alle due modificazioni polimorfe della TA β Cd anche se è preponderante quello della forma bassofondente, nel caso della TE (Figura 64e) è evidente invece solo l'endoterma di fusione della forma polimorfa bassofondente, mentre nel caso del prodotto da CCA (Figura 64f) il campione è totalmente amorfo. Per stabilire la presenza o meno di VCM·HCl in questi preparati, sono stati registrati gli spettri FT-IR (Figura 65).

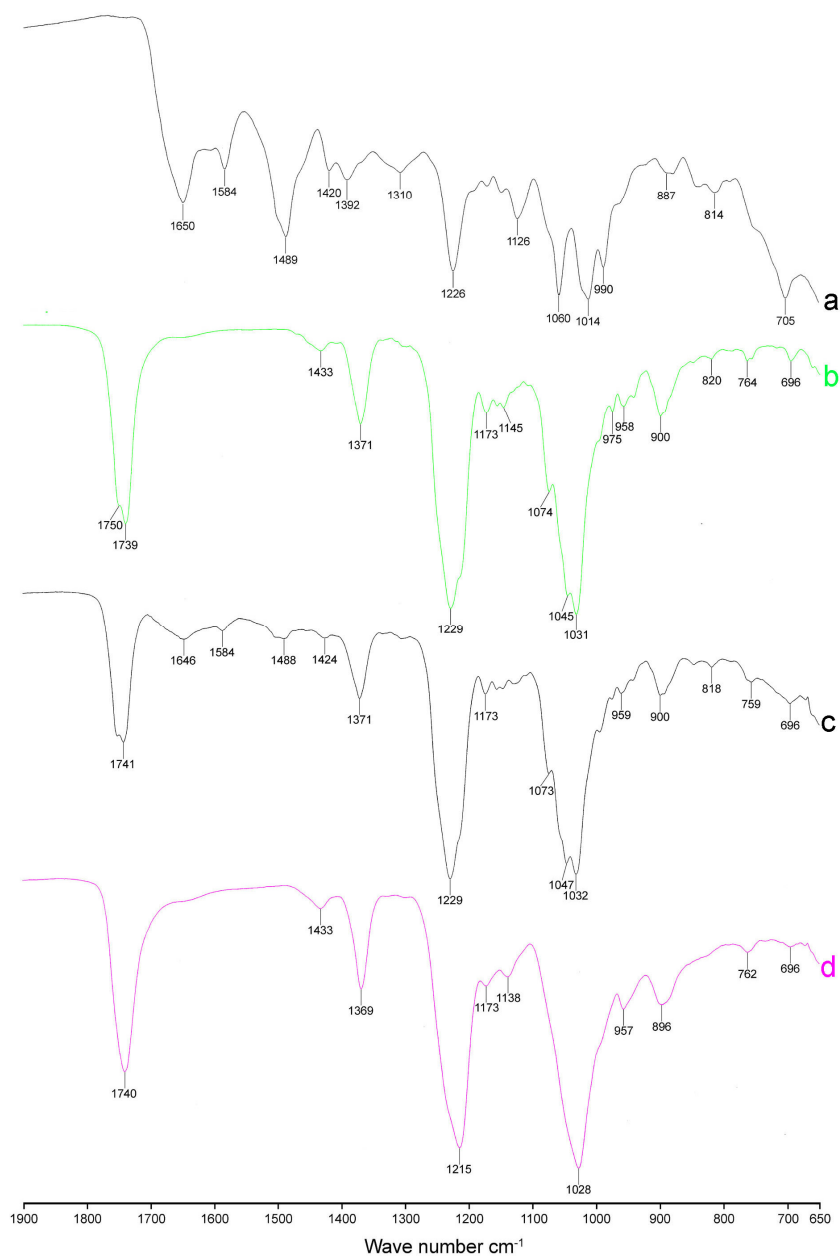


Figura 65. Spettri FT-IR della VCM-HCl (a), della TA β Cd (b), della miscela fisica VCM-HCl-TA β Cd 1:1 (p/p) (c) e del prodotto ottenuto da SA con sistema di solventi EtOH-acetone/H₂O/CH₂Cl₂ (d).

Lo spettro della miscela fisica dei due componenti (Figura 65c) presenta i picchi caratteristici di entrambe le sostanze, mentre quello del prodotto da SA (Figura

65d), che è coincidente con quello dei prodotti da TE e da CCA (non riportati), è praticamente sovrapponibile a quello della sola TA β Cd (Figura 65b).

VCM·HCl-TA γ Cd

Le stesse tecniche di SA, TE e CCA sono state applicate anche al sistema VCM·HCl-TA γ Cd e in Tabella 14 sono riportati i tipi e i volumi dei solventi impiegati.

Tabella 14. Solventi per la preparazione di agglomerati sferici del sistema VCM·HCl-TA γ Cd.

Metodo	Good solvent (volume, mL)	Poor solvent (volume, mL)	Bridging liquid (volume, mL)
SA	acetone (3)	H ₂ O (100)	CH ₂ Cl ₂ (4,8)
SA	EtOH(33)	H ₂ O (100)	CH ₂ Cl ₂ (4,8)
SA	EtOH/acetone 1:1 v/v (4)	H ₂ O (100)	CH ₂ Cl ₂ (4,8)
TE	EtOH/acetone 1:1 v/v (5) + CH ₂ Cl ₂ (2,2)	H ₂ O (100)	-
CCA	CH ₂ Cl ₂ (3)	H ₂ O + 1% PVA (6)	-

In Figura 66 sono riportate le fotografie registrate al microscopio ottico dei campioni ottenuti da SA con sistema di solventi EtOH/H₂O/CH₂Cl₂ e da CCA.

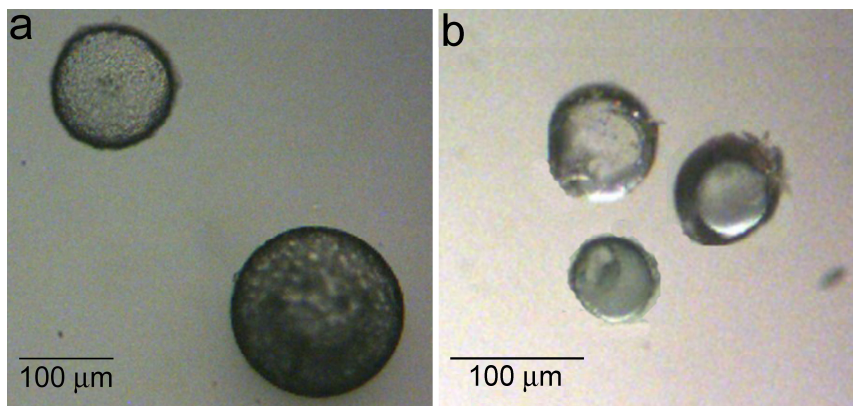


Figura 66 Fotografie registrate al microscopio ottico del sistema VCM·HCl-TA γ Cd ottenuto da SA con sistema di solventi EtOH/H₂O/CH₂Cl₂ (a) e di quello ottenuto da CCA (b).

Le tecniche che ci hanno condotto ad agglomerati sferici sono state la SA con sistema di solventi EtOH/H₂O/CH₂Cl₂ e la CCA. A differenza però dei sistemi VCM·HCl-TA α Cd e VCM·HCl-TA β Cd, gli agglomerati sferici del sistema VCM·HCl-TA γ Cd ottenuti da SA sono di dimensioni più piccole (Figura 66a) e paragonabili a quelle del prodotto ottenuto da CCA (Figura 66b).

Allo scopo di accertare la natura e la composizione dei vari campioni, essi sono stati analizzati in DSC e in Figura 67 sono riportate le relative curve della VCM·HCl commerciale, della TA γ Cd commerciale, della loro miscela fisica in rapporto 1:1 (p/p) e dei prodotti ottenuti da SA con sistema di solventi EtOH/H₂O/CH₂Cl₂ e da CCA.

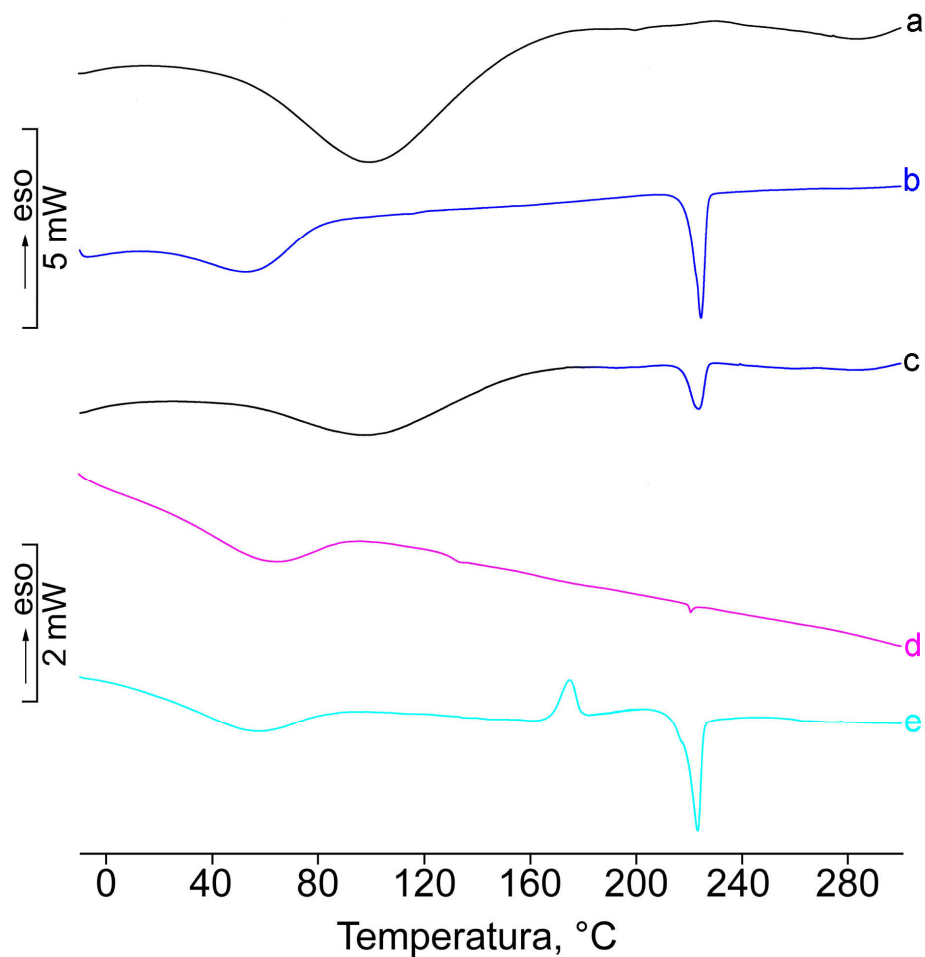


Figura 67. Curve DSC della VCM·HCl (a), della TA γ Cd (b), della miscela fisica VCM·HCl-TA γ Cd 1:1 (p/p) (c), del prodotto ottenuto da SA con sistema di solventi EtOH/H₂O/CH₂Cl₂ (d) e di quello ottenuto da CCA (e).

Il profilo DSC della miscela fisica della VCM·HCl-TA γ Cd (Figura 67c) mostra, come nei casi precedenti dei sistemi VCM·HCl-TA α Cd e VCM·HCl-TA β Cd, la somma pesata degli effetti termici caratteristici del farmaco amorfo (Figura 67a) e della TA γ Cd (Figura 67b) come idrato che al riscaldamento si trasforma in un anidro cristallino con punto di fusione a circa 230 °C.

Il prodotto ottenuto da SA presenta un profilo caratteristico di un amorfo, se si eccettua il picco appena accennato a circa 230 °C caratteristico della TA γ Cd (Figura 67d), mentre il prodotto da CCA mostra un netto effetto esotermico a circa 174 °C che precede l'endoterma di fusione del carrier. Questo tracciato

indica che il preparato di natura amorfa durante il riscaldamento in DSC ricristallizza nella stessa forma solida presente nel preparato commerciale.

Per accertare la natura e la composizione dei preparati, sono stati registrati i rispettivi spettri FT-IR riportati in Figura 68.

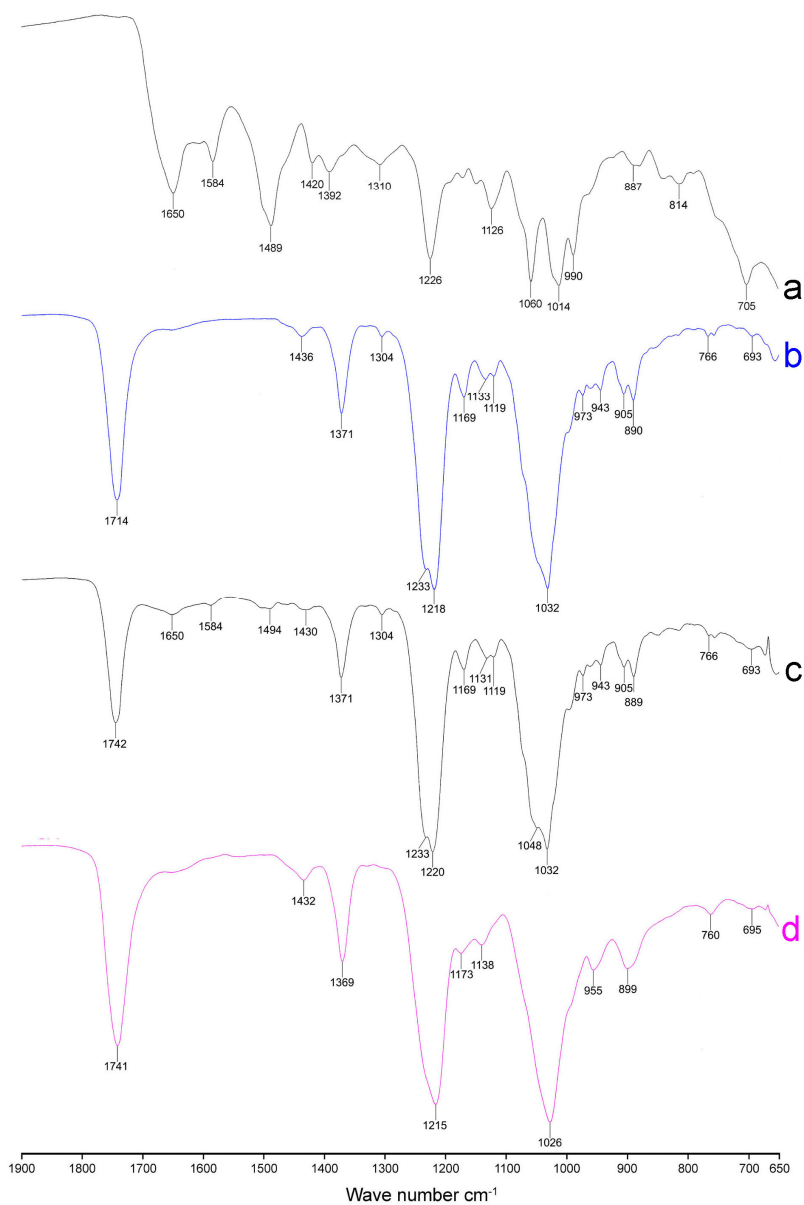


Figura 68. Spettri FT-IR della VCM-HCl (a), della TA γ Cd (b), della miscela fisica VCM-HCl-TA γ Cd 1:1 (p/p) (c) e del prodotto ottenuto da SA con sistema di solventi EtOH/H₂O/CH₂Cl₂ (d).

Lo spettro della miscela fisica dei due componenti (Figura 68c) presenta i picchi caratteristici di entrambe le sostanze, mentre quello del prodotto da SA (Figura 68d), che è coincidente con quello del prodotto da CCA (non riportato), è praticamente sovrapponibile a quello della sola TA γ Cd (Figura 68b). Si può quindi concludere che, anche in questo caso, gli agglomerati sferici isolati sono composti di solo carrier o per lo meno contengono il farmaco in proporzione non rilevabile dall'IR.

Caratterizzazione dello stato solido amorfo

VCM·HCl e TCP

La VCM·HCl e la TCP sono sostanze di natura intrinsecamente amorfa come risulta dalle curve DSC e TG dei campioni commerciali che mostrano il tracciato tipico di un amorfo con acqua di assorbimento superficiale (Figura 69).

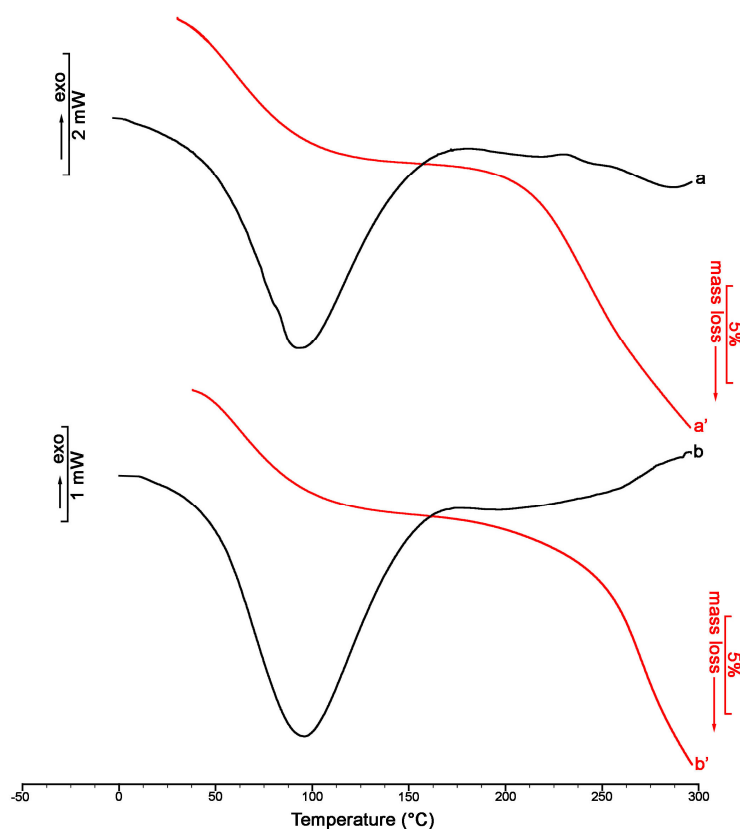


Figura 69. Curve DSC (nero) e TG (rosso) della VCM·HCl (a,a') e della TCP (b,b')

Dopo un primo effetto endotermico allargato tra circa 10 e 175 °C dovuto alla cessione di acqua, associato ad una perdita di massa in TG pari a circa il 7,5% per la VCM·HCl (Figura 69a,a') e il 6,6% per la TCP (Figura 69b,b'), si ha la decomposizione termica del composto anidro senza un effetto endotermico indicativo della fusione.

Nel profilo DSC dei due antibiotici non sono nemmeno evidenti effetti termici attribuibili ad una “glass transition” che, come è noto, si presenta come deflessione endotermica della linea di base. Considerata la presenza di acqua che funge da plasticizzante spostando la temperatura di transizione vetrosa verso valori più bassi, l’analisi DSC è stata condotta in un campo di temperatura più ampio partendo da -70 °C fino a 300 °C (Figura 70).

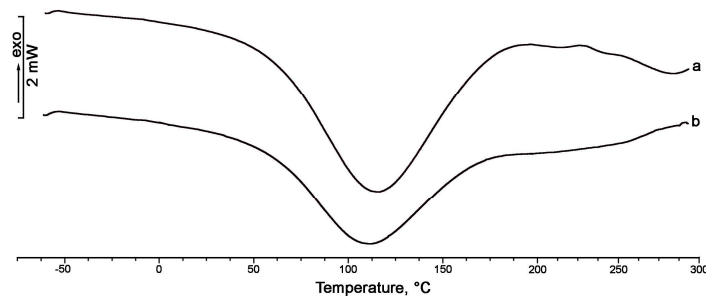


Figura 70. Curve DSC della VCM·HCl (a) e della TCP (b) da -70 °C a 300 °C.

Anche a temperatura molto inferiore a quelle di disidratazione non si registrano effetti termici attribuibili alla “glass transition”.

D’altra parte, l’ampia endoterma di disidratazione potrebbe mascherare la “glass transition”, e così la VCM·HCl e la TCP sono state analizzate con la DSC a modulazione di temperatura (MDSC), una tecnica che permette di separare il flusso di calore totale (che coincide con una curva DSC standard) nelle sue componenti di capacità termica (reversibile) e cinetica (non reversibile). In Figura 71 sono riportate le curve ottenute dall’analisi MDSC della VCM·HCl.

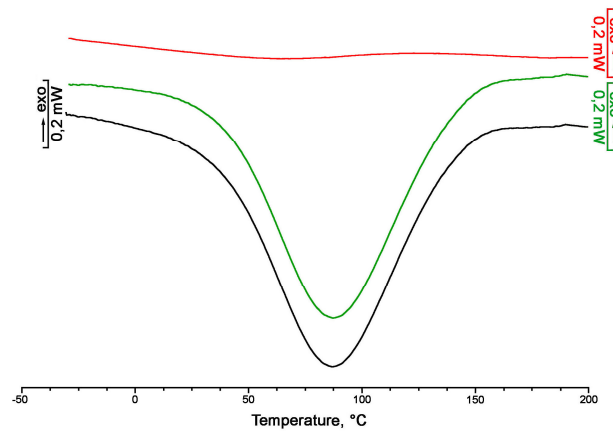


Figura 71. Curva del flusso di calore totale (nera), reversibile (rossa) e non reversibile (verde) della VCM·HCl.

Nella curva nera che rappresenta il flusso di calore totale è evidente il picco endotermico allargato dovuto alla disidratazione della VCM·HCl che, essendo un fenomeno termico non reversibile, si ritrova anche nella curva verde che rappresenta appunto la componente cinetica del flusso di calore totale. La curva rossa che rappresenta la capacità termica e rivela le risposte reversibili come la “glass transition”, si presenta invece praticamente piatta, escludendo così la presenza di tale fenomeno termico per la VCM·HCl. Un comportamento analogo è stato registrato per la TCP (profilo MDSC non riportato).

TA α Cd

La TA α Cd amorfa è stata isolata ricristallizzando il prodotto commerciale da acetato di etile (AcOEt), come pure per coevaporazione (COEV) e per kneading (KN) utilizzando come solvente una miscela di acetone e acqua in rapporto 1:1 (v/v) poi allontanato per irraggiamento con microonde. In Figura 72 sono riportate le curve DSC della TA α Cd commerciale e del prodotto ottenuto per cristallizzazione da AcOEt.

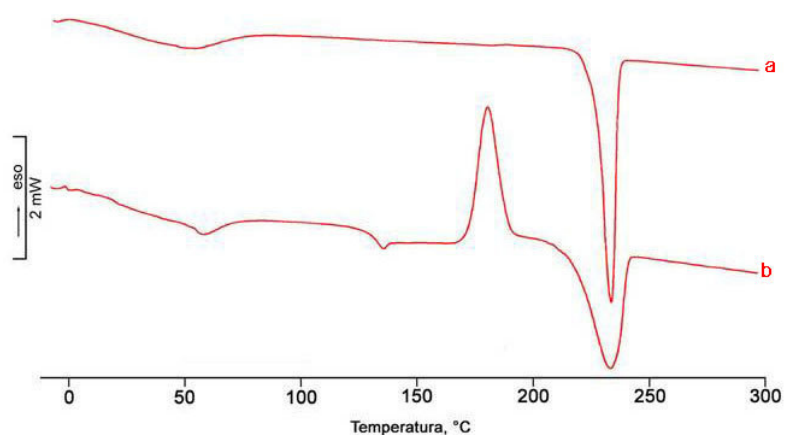


Figura 72. Curve DSC della TA α Cd commerciale (a) e del prodotto ottenuto per cristallizzazione da AcOEt (b).

Mentre il prodotto commerciale presenta un comportamento termico caratteristico di una sostanza cristallina idrata che si disidrata in una forma anidra a $p_f 233 \pm 0,8$ °C ($\Delta H_{fus} = 45 \pm 3$ J g⁻¹) (Figura 72a), il profilo del prodotto ottenuto per cristallizzazione da AcOEt indica che tale trattamento ha portato ad amorfizzazione del campione. Dopo la perdita di solvente iniziale, è evidente una “glass transition” a circa 130 °C associata alla “enthalpic recovery” rivelata dallo spostamento esotermico della linea di base dopo la deflessione. Si osserva quindi un marcato effetto esotermico di ricristallizzazione a circa 170 °C seguito dalla fusione dei cristalli ottenuti (Figura 72b).

Un comportamento simile è stato registrato anche per i preparati di TA α Cd isolati per coevaporazione e per kneading (curve DSC non riportate).

Tutti i campioni preparati sono stati analizzati con la MDSC allo scopo di separare la curva del flusso di calore totale nelle due componenti reversibile e non reversibile e di differenziare in questo modo la “glass transition” dalla “enthalpic recovery” ad essa associata. In Figura 73 sono riportate le tre curve risultanti dall’analisi MDSC della TA α Cd cristallizzata da AcOEt.

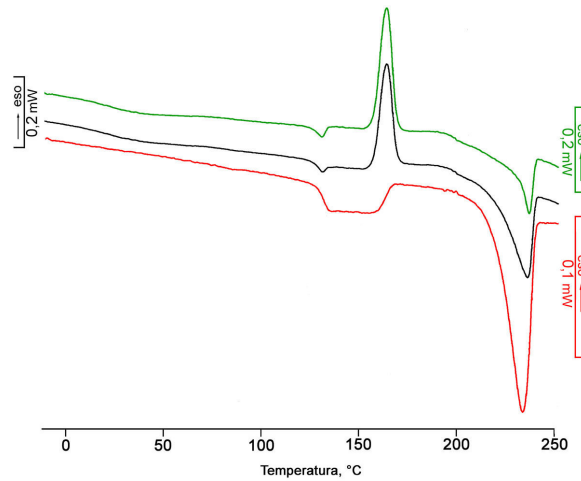


Figura 73. Curva del flusso di calore totale (nera), reversibile (rossa) e non reversibile (verde) della TA α Cd cristallizzata da AcOEt.

Mentre la curva nera del flusso di calore totale coincide con il profilo termico dell’analisi DSC standard, sulla curva rossa che rappresenta la capacità termica (risposta reversibile) è evidente a circa 130 °C la presenza della deflessione endotermica caratteristica di una “glass transition” da cui è possibile ricavare il valore di temperatura di “midpoint” e variazione di capacità termica ΔC_p . Sulla curva verde, invece, che indica la componente cinetica, si possono individuare il picco endotermico della “enthalpic recovery” (e ricavare dalla sua integrazione il valore di variazione di entalpia, ΔH_{rec}) e il successivo picco esotermico di ricristallizzazione.

Le curve MDSC dei preparati di TA α Cd per coevaporazione e per kneading sono molto simili a quelle del campione da AcOEt e non vengono riportate.

In Tabella 15 sono riportati i valori di temperatura di “midpoint”, di ΔC_p e di ΔH_{rec} caratteristici della “glass transition” e i valori di temperatura di onset e di

variazione di entalpia (ΔH_{cris}) associati al picco esotermico di ricristallizzazione per i campioni di TA α Cd ottenuti con i diversi metodi di preparazione.

Tabella 15. Valori di temperatura di “midpoint”, ΔC_p , ΔH_{rec} , temperatura di onset e ΔH_{cris} di ciascuna TA α Cd ottenuta con i diversi metodi di preparazione.

	“midpoint” (°C)	ΔC_p (J/g °C)	ΔH_{rec} (J/g)	Onset crist. (°C)	ΔH_{cris} (J/g)
TAαCd x AcOEt	131	0,25	1,80	157	28,89
TAαCd COEV	132	0,22	0,94	147	11,78
TAαCd KN	133	0,05	0,21	148	0,80

La TA α Cd allo stato amorfo presenta quindi una “glass transition” a circa 132 °C, alla quale corrispondono valori di ΔC_p che vanno da 0,05 a 0,28 J/g °C e valori di ΔH_{rec} compresi tra 0,21 e 1,80 J/g. Questi valori sono correlabili al grado di amorfizzazione del campione ottenuto con i diversi trattamenti. Infatti, a valori più bassi di ΔH_{cris} , indicativi di un minor grado di amorfizzazione del campione, corrispondono valori di ΔC_p e di ΔH_{rec} più bassi, come è ben evidente nel prodotto di kneading.

VCM·HCl-TA α Cd

Le miscele fisiche della VCM·HCl con TA α Cd ai rapporti in peso farmaco-carrier 1:1 e 1:3 sono state trattate con le stesse tecniche di coevaporazione e di kneading applicate al singolo carrier. In Figura 74 sono riportate le curve DSC della VCM·HCl, della TA α Cd, della loro miscela fisica in rapporto 1:3 (p/p) e dei preparati ottenuti per coevaporazione e per kneading della miscela stessa.

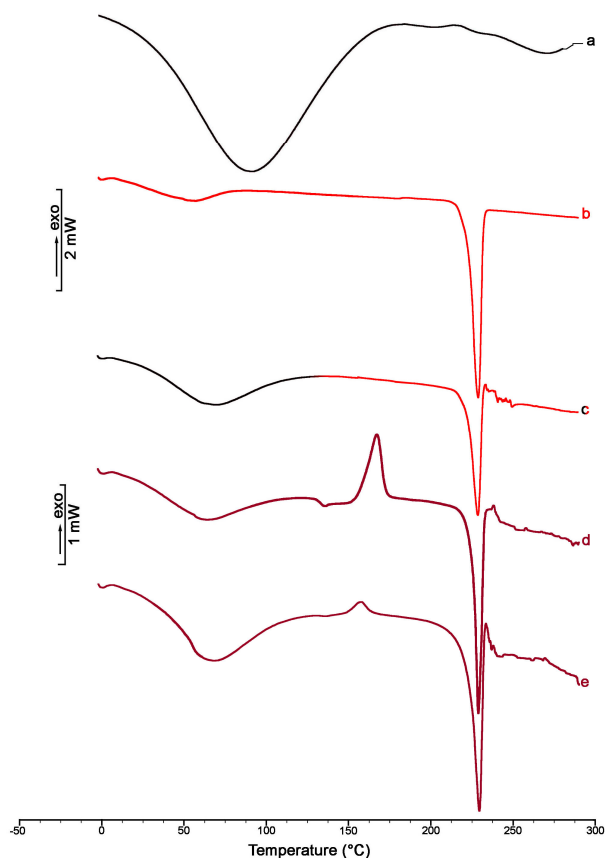


Figura 74. Curve DSC della VCM·HCl (a), della TA α Cd (b), della loro miscela fisica in rapporto 1:3 (p/p) tal quale (c) e dopo coevaporazione (d) o kneading (e).

La curva DSC della miscela fisica VCM·HCl-TA α Cd rivela un tracciato corrispondente alla somma pesata degli effetti termici caratteristici del principio attivo (endoterma di desolvatazione con un picco allargato tra 10 e 130 °C) e del carrier (endoterma corrispondente alla fusione) e nessun fenomeno termico attribuibile a una “glass transition” (Figura 74c).

Per coevaporazione o per kneading della miscela, invece, si ha amorfizzazione del carrier rivelata nel profilo DSC dall’effetto termico a circa 130 °C (appena accennato nel prodotto di kneading) tipico di una “glass transition” associata ad “enthalpic recovery”. Successivamente si registra un picco esotermico di ricristallizzazione a circa 160 °C, più marcato nel preparato per coevaporazione (curva 74d) che in quello per kneading (curva 74e).

Un comportamento termico molto simile è stato registrato per il sistema VCM·HCl-TA α Cd 1:1 (p/p) (curve non riportate).

I sistemi VCM·HCl-TA α Cd nei due rapporti in peso contenenti il carrier amorfo dopo i trattamenti di coevaporazione e di kneading sono stati analizzati con la MDSC allo scopo di separare la “glass transition” dalla “enthalpic recovery” e calcolare in modo più accurato i rispettivi parametri termici.

In Figura 75 sono riportate le curve MDSC del sistema VCM·HCl-TA α Cd 1:3 (p/p) ottenuto per coevaporazione.

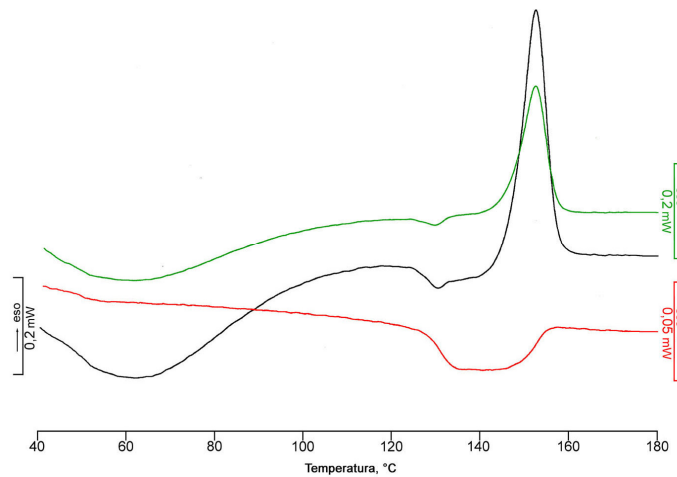


Figura 75. Curva del flusso di calore totale (nera), reversibile (rossa) e non reversibile (verde) del sistema VCM·HCl-TA α Cd 1:3 (p/p) ottenuto per coevaporazione.

Mentre la curva nera del flusso di calore totale coincide con la curva DSC standard, nella curva rossa del flusso di calore reversibile è evidente a circa 130 °C la deflessione endotermica caratteristica della “glass transition” e nella curva verde del flusso di calore non reversibile l’effetto endotermico della “enthalpic recovery” seguito da quello esotermico associato alla cristallizzazione dell’amorfo.

Un comportamento termico simile è stato osservato anche nel sistema VCM·HCl-TA α Cd 1:1 (p/p) ottenuto per coevaporazione e nei sistemi VCM·HCl-TA α Cd 1:1 e 1:3 (p/p) ottenuti per kneading (curve termiche non riportate).

In Tabella 16 sono riportati i valori di temperatura di “midpoint”, di ΔC_p e di ΔH_{rec} caratteristici della “glass transition” e i valori di temperatura di onset e variazione di entalpia (ΔH_{crist}) associati al picco esotermico di ricristallizzazione per ciascun sistema VCM·HCl-TA α Cd 1:1 e 1:3 (p/p) ottenuto con i due diversi metodi di preparazione.

Tabella 16. Valori di temperatura di “midpoint”, ΔC_p , ΔH_{rec} , temperatura di onset e ΔH_{crist} dei sistemi VCM·HCl-TA α Cd 1:1 e 1:3 (p/p) ottenuti per coevaporazione e kneading.

VCM·HCl-TAαCd	“midpoint” (°C)	ΔC_p (J/g °C)	ΔH_{rec} (J/g)	Onset crist. (°C)	ΔH_{crist} (J/g)
1:1 (p/p) COEV	131	0,12	0,58	145	24,42
1:3 (p/p) COEV	131	0,22	1,18	146	26,64
1:1 (p/p) KN	131	0,08	0,24	142	11,61
1:3 (p/p) KN	130	0,05	0,08	141	2,92

I sistemi della VCM·HCl con TA α Cd amorfa presentano il “midpoint” della “glass transition” a circa 131 °C, corrispondente a quello della sola TA α Cd. Di conseguenza, considerato che nessun effetto termico di questo tipo era stato riscontrato per la sola VCM·HCl, la “glass transition” dei sistemi è attribuibile esclusivamente al carrier.

I valori di ΔC_p , compresi tra 0,05 e 0,22 J/g °C, e quelli di ΔH_{rec} , compresi tra 0,08 e 1,18 J/g, sono direttamente proporzionali al valore di ΔH_{crist} come per la sola TA α Cd. Questi dati sono un indice del grado di amorfizzazione del campione che, come nel caso del carrier da solo, è maggiore per i prodotti di coevaporazione che per quelli di kneading.

I sistemi della VCM·HCl con TA α Cd nei rapporti in peso farmaco-carrier 1:1 e 1:3, come semplice miscela fisica e come prodotti ottenuti per coevaporazione e per kneading, sono stati fatti “invecchiare” per 3 mesi in contenitori chiusi di

vetro ambrato nell'atmosfera di laboratorio (22-23 °C, 45-50% UR). Quindi sono stati effettuati i test di rilascio del farmaco da tali sistemi determinando la velocità di dissoluzione intrinseca (IDR) e i risultati sono stati confrontati con quelli dei rispettivi campioni appena preparati (freschi) ottenuti in precedenti lavori [3].

In Tabella 17 sono riportati i valori di IDR delle tre combinazioni saggiate (campioni invecchiati) con quelli dei rispettivi campioni freschi (per comodità di confronto). Ciascun dato è la media di almeno tre determinazioni (coefficiente di variazione $\leq 3\%$ per i campioni invecchiati e $\leq 6\%$ per i campioni freschi).

Tabella 17. IDR dei sistemi binari invecchiati e freschi VCM·HCl-TA α Cd.

		IDR (mg cm ⁻² min ⁻¹)			
		p/p	MF _i / MF _f	COEV _i / COEV _f	KN _i / KN _f
VCM·HCl-TA α Cd	1:1	0,261 / 0,239	0,242 / 0,228	0,256 / 0,229	
	1:3	0,134 / 0,125	0,132 / 0,102	0,119 / 0,089	

i: campioni invecchiati; f: campioni freschi

Le differenze tra i due gruppi di dati sono state valutate mediante analisi della varianza (ANOVA) considerando statisticamente significativo $p < 0,05$.

La differenza dei valori di IDR dei campioni invecchiati rispetto a quelli precedentemente determinati sui preparati freschi non è risultata significativa nel caso delle miscele fisiche in entrambi i rapporti in peso e del prodotto ottenuto per coevaporazione nel rapporto in peso farmaco-carrier 1:1. Nel caso invece del prodotto ottenuto per coevaporazione nel rapporto in peso farmaco-carrier 1:3 e dei prodotti ottenuti per kneading in entrambi i rapporti in peso, la differenza dei valori di IDR tra campioni invecchiati e freschi è risultata significativa rispettivamente a $p < 0,001$ e $p < 0,01$.

Per quanto concerne i campioni invecchiati si nota che l'effetto del rallentamento del rilascio della VCM·HCl, che da sola presenta un valore di IDR pari a

$0,729 \text{ mg cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$, si manifesta anche nelle miscele fisiche e in misura direttamente proporzionale alla quantità di carrier presente (Figura 76).

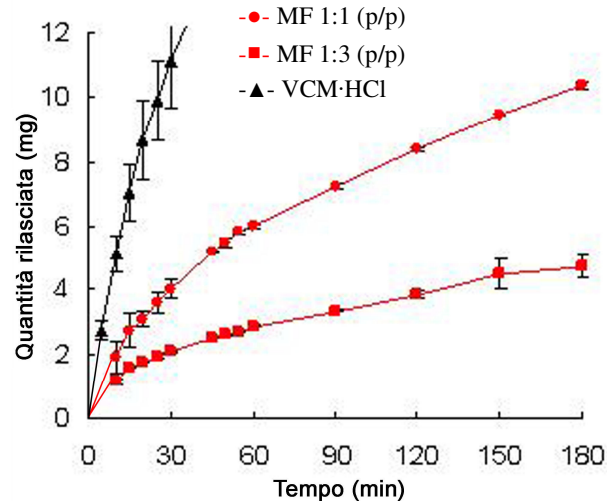


Figura 76. Profili IDR della VCM·HCl (▲) e delle miscele fisiche VCM·HCl-TA α Cd 1:1 (p/p) (●) e 1:3 (p/p) (■).

In Figura 77 sono messi a confronto i profili IDR della miscela fisica con quelli dei preparati ottenuti per coevaporazione e per kneading ai due diversi rapporti in peso considerati, dai quali si può rilevare come il trattamento con microonde sia della soluzione sia dell'impasto molle porti a preparati con proprietà di rallentamento del rilascio del farmaco paragonabili a quelle osservate per la miscela fisica tal quale, fatta eccezione per il rapporto in peso farmaco-carrier 1:3, dove il rilascio del farmaco dal prodotto ottenuto per kneading subisce un maggior rallentamento rispetto alla miscela fisica.

Per quanto riguarda l'effetto del metodo di preparazione sull'IDR, è risultata, infatti, statisticamente significativa ($p < 0,05$) solo la differenza tra miscela fisica e prodotto di kneading al rapporto in peso farmaco-carrier 1:3.

Probabilmente il processo di impasto e il successivo irraggiamento con microonde inducono una maggiore aggregazione particellare tra VCM·HCl e TA α Cd e quindi un più completo trasferimento del carattere idrofobo del carrier all'antibiotico con conseguente ulteriore diminuzione della sua solubilità in acqua.

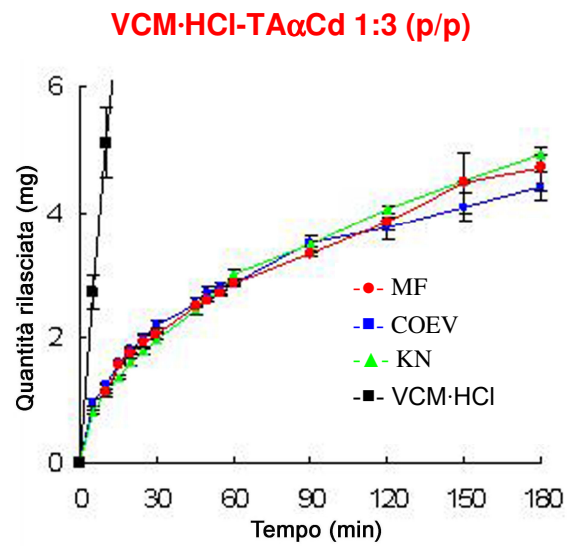
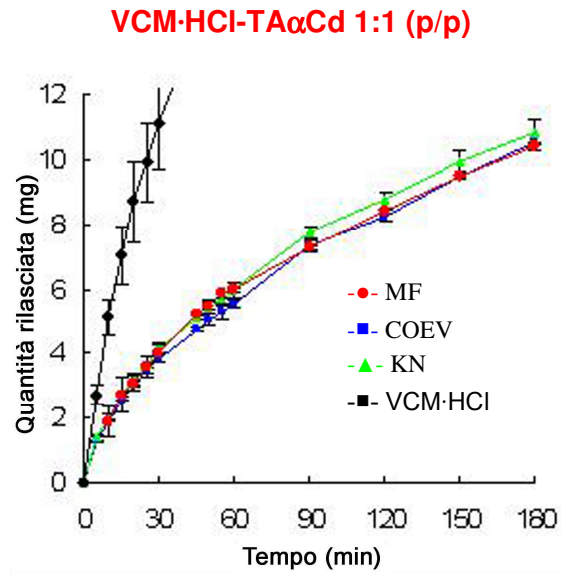


Figura 77. Profili IDR dei sistemi binari VCM·HCl-TA α Cd (rapporti in peso indicati in Figura) come miscele fisiche (MF), come coevaporati (COEV) e come prodotti di kneading (KN).

TCP-TA α Cd

Come per i sistemi contenenti VCM·HCl, le miscele fisiche della TCP con TA α Cd preparate nei due diversi rapporti in peso farmaco-carrier 1:1 e 1:3 sono state trattate con le stesse tecniche di coevaporazione e di kneading utilizzate per il singolo carrier. In Figura 78 sono riportate le curve DSC della TCP, della TA α Cd, della loro miscela fisica in rapporto 1:3 (p/p) e dei preparati ottenuti per coevaporazione e per kneading della stessa miscela.

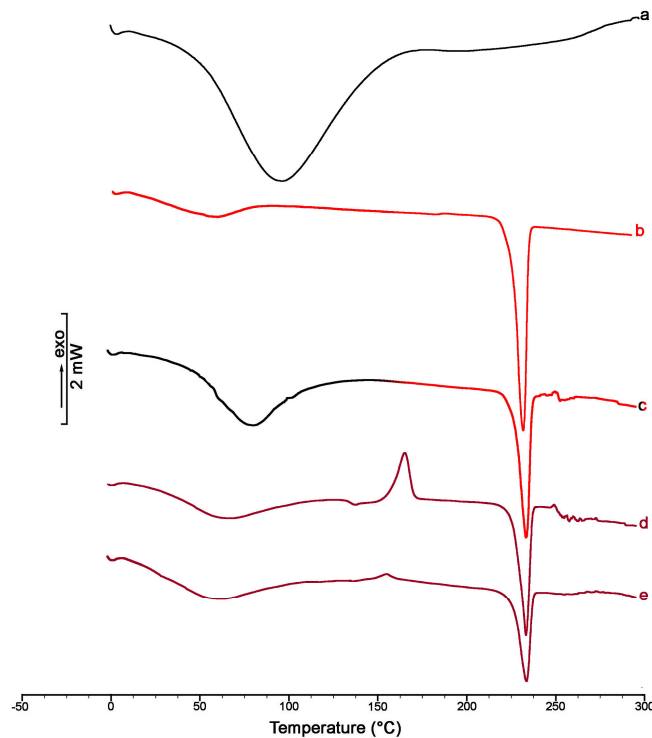


Figura 78. Curve DSC della TCP (a), della TA α Cd (b), della loro miscela fisica in rapporto 1:3 (p/p) tal quale (c) e dopo coevaporazione (d) o kneading (e).

Analogamente a quella del sistema contenente VCM·HCl, la curva DSC della miscela fisica TCP-TA α Cd rivela un tracciato corrispondente alla somma pesata degli effetti termici caratteristici del principio attivo e del carrier senza alcun evento termico attribuibile a una “glass transition” (Figura 78c).

Per coevaporazione e per kneading della miscela si ha amorfizzazione del carrier rivelata nel profilo DSC dall'effetto termico a circa 130 °C (appena accennato nel preparato per kneading) tipico di una “glass transition” associata ad “enthalpic recovery”. Successivamente si registra un picco esotermico di ricristallizzazione a circa 160 °C, più marcato nel preparato per coevaporazione (Figura 78d) che in quello per kneading (Figura 78e).

Un comportamento termico simile è stato registrato anche per il sistema TCP-TA α Cd 1:1 (p/p) (curve termiche non riportate).

In Figura 79 sono presentate le curve risultanti dall'analisi MDSC del sistema TCP-TA α Cd 1:3 (p/p) ottenuto per coevaporazione.

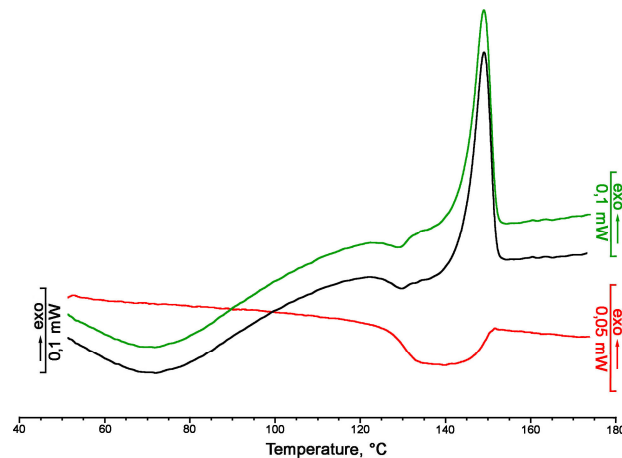


Figura 79. Curva del flusso di calore totale (nera), reversibile (rossa) e non reversibile (verde) del sistema TCP-TA α Cd 1:3 (p/p) ottenuto per coevaporazione.

Essendo l'effetto termico di “glass transition” attribuibile al solo carrier, il profilo MDSC del sistema TCP-TA α Cd è analogo a quello registrato per lo stesso sistema contenete VCM·HCl. Nella curva rossa del flusso di calore reversibile è evidente a circa 130 °C la deflessione endotermica caratteristica della “glass transition” e nella curva verde del flusso di calore non reversibile si possono individuare la “enthalpic recovery” e il picco esotermico di cristallizzazione dell'amorfo.

Un comportamento simile è stato registrato per il sistema TCP-TA α Cd 1:1 (p/p) ottenuto per coevaporazione e per i sistemi TCP-TA α Cd 1:1 e 1:3 (p/p) ottenuti per kneading (curve termiche non riportate).

In Tabella 18 sono riuniti i valori di temperatura di “midpoint”, di ΔC_p e di ΔH_{rec} caratteristici della “glass transition” e i valori di temperatura di onset e variazione di entalpia (ΔH_{crist}) associati al picco esotermico di ricristallizzazione per ciascun sistema TCP-TA α Cd 1:1 e 1:3 (p/p) ottenuto con i due diversi metodi di preparazione.

Tabella 18. Valori di temperatura di “midpoint”, ΔC_p , ΔH_{rec} , temperatura di onset e ΔH_{crist} dei sistemi TCP-TA α Cd 1:1 e 1:3 (p/p) ottenuti per coevaporazione e kneading.

TCP-TAαCd	“midpoint” (°C)	ΔC_p (J/g °C)	ΔH_{rec} (J/g)	Onset crist. (°C)	ΔH_{crist} (J/g)
1:1 (p/p) COEV	129	0,12	0,61	143	21,64
1:3 (p/p) COEV	130	0,16	0,80	144	23,12
1:1 (p/p) KN	128	0,04	-	138	1,80
1:3 (p/p) KN	129	0,05	-	138	1,18

Come per i sistemi contenenti VCM·HCl, la “glass transition” dei sistemi della TCP con TA α Cd allo stato amorfo, attribuibile al solo carrier, presenta una temperatura di “midpoint” a circa 130 °C corrispondente alla temperatura di “midpoint” della singola TA α Cd.

Anche per quanto riguarda i valori di ΔC_p e di ΔH_{rec} dei sistemi TCP-TA α Cd, i risultati sono analoghi a quelli del sistema VCM·HCl-TA α Cd, ovvero direttamente proporzionali al valore di ΔH_{crist} che è indice del grado di amorfizzazione del carrier. In questo caso, anzi, il trattamento di kneading sembra produrre un’amorfizzazione del campione inferiore a quella ottenuta per gli stessi sistemi contenenti VCM·HCl, tanto che si registrano valori di variazione di capacità termica molto bassi e nessun valore di “enthalpic recovery” misurabile.

Anche per i sistemi della TCP con TA α Cd nei due rapporti in peso farmaco-carrier 1:1 e 1:3, sia come semplice miscela fisica che come prodotti ottenuti per coevaporazione e per kneading, sono stati valutati i profili di rilascio del farmaco in termini di velocità di dissoluzione intrinseca (IDR) dopo invecchiamento nelle condizioni già riportate per i sistemi a base di VCM·HCl (3 mesi in contenitori chiusi di vetro ambrato nell'atmosfera di laboratorio a 22-23 °C, 45-50% UR).

In Tabella 19 sono riportati i valori di IDR ottenuti per le tre combinazioni saggiate (preparati invecchiati) e ciascun dato è la media di almeno tre determinazioni (coefficiente di variazione $\leq 6\%$). Accanto a questi sono riportati, per comodità di confronto, i valori di IDR dei rispettivi campioni appena preparati (freschi) (vedi pagina 50).

Tabella 19. IDR dei sistemi binari invecchiati e freschi TCP-TA α Cd.

		IDR (mg cm ⁻² min ⁻¹)		
	p/p	MF _i / MF _f	COEV _i / COEV _f	KN _i / KN _f
TCP-TA α Cd	1:1	0,733 / 0,518	0,653 / 0,512	0,447 / 0,378
	1:3	0,373 / 0,176	0,181 / 0,164	0,175 / 0,142

i: campioni invecchiati; f: campioni freschi

La differenza dei valori di IDR dei campioni invecchiati e freschi, valutata mediante analisi della varianza (ANOVA), è risultata non significativa ($p < 0,05$) solo per il prodotto di coevaporazione nel rapporto in peso farmaco-carrier 1:3 e per il prodotto di kneading nel rapporto in peso farmaco-carrier 1:1. Per gli altri campioni invece la differenza dei valori di IDR è risultata significativa a valori di p compresi tra $p < 0,01$ e $p < 0,001$.

Anche qui, per quanto riguarda i campioni invecchiati, l'effetto rallentante sul rilascio della TCP, che da sola presenta un valore di IDR pari a 2,229 mg cm⁻²

min^{-1} , si manifesta già nelle miscele fisiche e in misura direttamente proporzionale alla quantità di carrier presente (Figura 80).

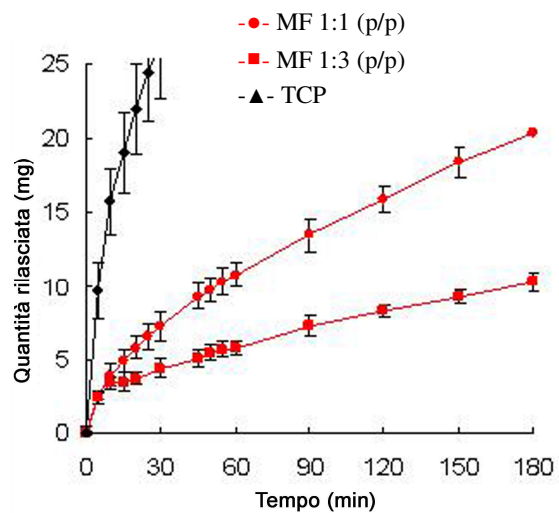


Figura 80. Profili IDR della TCP (▲) e delle miscele fisiche TCP-TA α Cd 1:1 (p/p) (●) e 1:3 (p/p) (■).

In Figura 81 sono messi a confronto i profili IDR della miscela fisica con quelli dei preparati ottenuti per coevaporazione e per kneading ai due rapporti in peso considerati.

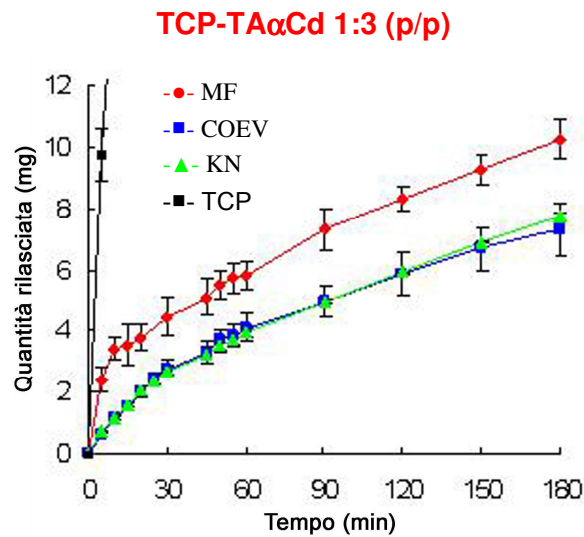
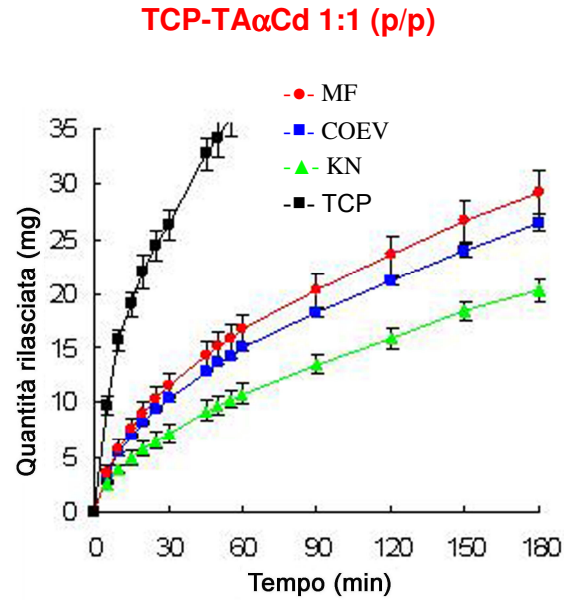


Figura 81. Profili IDR dei sistemi binari TCP-TA α Cd (rapporti in peso indicati in Figura) come miscele fisiche (MF), come coevaporati (COEV) e come prodotti di kneading (KN).

A parità di composizione, per i coevaporati e specialmente per i prodotti di kneading, in particolare al rapporto in peso 1:3, si osserva un distinto rallentamento del rilascio del principio attivo rispetto alle miscele fisiche.

Si può ritenere che il processo di impasto e il successivo irraggiamento con microonde inducano una maggiore aggregazione particellare tra TCP e TA α Cd e quindi un più completo trasferimento del carattere idrofobo del carrier all'antibiotico con conseguente ulteriore diminuzione della sua idrofilia.

TA β Cd

Anche in questo caso la TA β Cd amorfa è stata ottenuta per ricristallizzazione da AcOEt e anche da una miscela di acetone e acqua in rapporto 1:1 (v/v) come pure per coevaporazione (COEV) e per kneading (KN) utilizzando come solvente una miscela di acetone e acqua in rapporto 1:1 (v/v) poi allontanato per irraggiamento con microonde. In Figura 82 sono riportate le curve DSC della TA β Cd commerciale, dei prodotti ottenuti per cristallizzazione da AcOEt e da Ac/H₂O 1:1 (v/v) e del prodotto ottenuto per kneading.

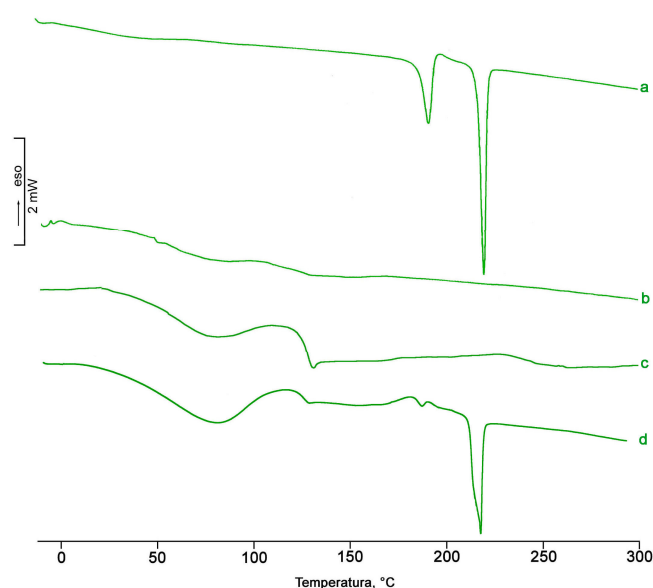


Figura 82. Curve DSC della TA β Cd commerciale (a), del prodotto ottenuto per cristallizzazione da AcOEt (b) e da Ac/H₂O 1:1 (v/v) (c) e del prodotto ottenuto per kneading (d).

La TA β Cd (Figura 82a) mostra un comportamento tipico di un solvato cristallino che si desolvata (perdita di massa in TG $0,3\pm 0,1\%$) in una forma anidra cristallina ($T_{\text{fus,I}} = 190,2\pm 1,8$ °C, $\Delta H_{\text{fus,I}} = 14\pm 1$ J g⁻¹) dal cui fuso ricristallizza una modificazione polimorfa caratterizzata da temperatura ed entalpia di fusione maggiori ($T_{\text{fus,II}} = 218,2\pm 0,8$ °C, $\Delta H_{\text{fus,II}} = 25\pm 1$ J g⁻¹). In base alla regola del

calore di fusione [28] le due modificazioni polimorfe sono tra di loro in relazione di monotropia.

La scomparsa di entrambi i picchi di fusione nella curva DSC del prodotto ottenuto per cristallizzazione da AcOEt e da Ac/H₂O 1:1 (v/v) (Figure 82b,c), dimostra la completa amorfizzazione della TAβCd che come tale è caratterizzata da una “glass transition” a circa 130 °C (Figura 82c), meno evidente nel prodotto di cristallizzazione da AcOEt (Figura 82b).

Mentre il prodotto di coevaporazione ha un profilo DSC (non riportato) molto simile a quello del prodotto di cristallizzazione da Ac/H₂O 1:1 (v/v), il comportamento termico del prodotto di kneading è diverso. Questo procedimento amorfizza solo parzialmente il campione che, dopo la “glass transition” a circa 130 °C, presenta i picchi di fusione delle due forme polimorfe rispettivamente con $\Delta H_{\text{fus,I}} = 0,33 \pm 0,12 \text{ J g}^{-1}$ e $\Delta H_{\text{fus,II}} = 12,35 \pm 1,51 \text{ J g}^{-1}$ (Figura 82d).

Per uno studio più accurato della “glass transition” tutti i campioni isolati sono stati saggiati con la MDSC.

In Figura 83 sono riportate le curve MDSC della TAβCd cristallizzata da AcOEt.

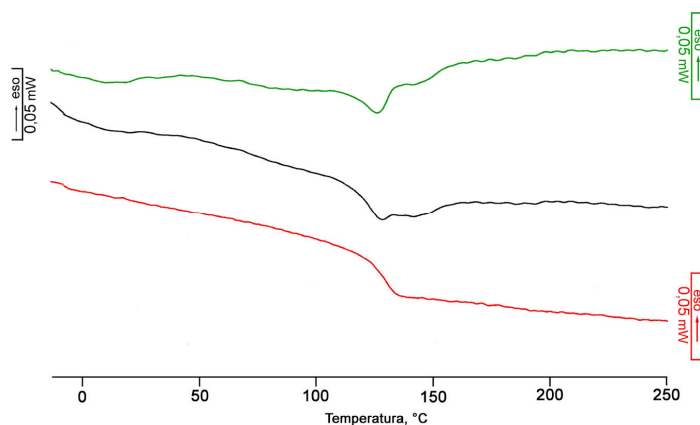


Figura 83. Curva del flusso di calore totale (nera), reversibile (rossa) e non reversibile (verde) della TAβCd cristallizzata da AcOEt.

É ben evidente il picco endotermico della “enthalpic recovery” (curva verde) associata alla “glass transition”, la cui deflessione endotermica “pulita” si vede nella curva rossa.

Nella curva del flusso di calore non reversibile non è presente alcun picco esotermico a dimostrazione del fatto che il campione resta amorfo nelle condizioni di scansione.

Un comportamento termico simile (curve MDSC non riportate) è stato registrato per i prodotti di cristallizzazione da Ac/H₂O 1:1 (v/v) e per quelli ottenuti con le tecniche di coevaporazione e di kneading.

I valori di temperatura di “midpoint”, di ΔC_p e di ΔH_{rec} caratteristici della “glass transition” dei campioni saggiati sono riportati in Tabella 20.

Tabella 20. Valori di temperatura di “midpoint”, ΔC_p e ΔH_{rec} , di ciascuna TA β Cd ottenuta con i diversi metodi di preparazione.

	“midpoint” (°C)	ΔC_p (J/g °C)	ΔH_{rec} (J/g)	Onset crist. (°C)	ΔH_{crist} (J/g)
TAβCd x AcOEt	128	0,17	0,44	-	-
TAβCd x Ac/H₂O 1:1 v/v	128	0,23	0,98	-	-
TAβCd COEV	130	0,28	2,53	-	-
TAβCd KN	130	0,25	1,40	-	-

VCM·HCl-TA β Cd

Le miscele fisiche della VCM·HCl con TA β Cd preparate nei rapporti in peso farmaco-carrier 1:1 e 1:3 sono state trattate con le stesse tecniche di coevaporazione e di kneading utilizzate per il singolo carrier. In Figura 84 sono riportate le curve DSC della VCM·HCl, della TA β Cd, della loro miscela fisica in rapporto 1:3 (p/p) e dei preparati ottenuti per coevaporazione e per kneading della miscela stessa.

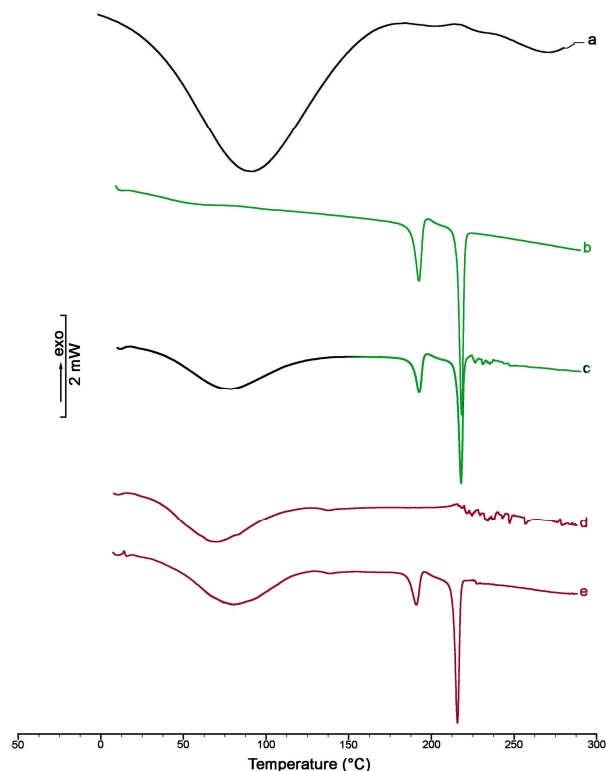


Figura 84. Curve DSC della VCM·HCl (a), della TAβCd (b), della loro miscela fisica in rapporto 1:3 (p/p) tal quale (c) e dopo coevaporazione (d) o kneading (e).

Mentre la curva DSC della miscela fisica VCM·HCl-TAβCd rivela un tracciato corrispondente alla somma pesata degli effetti termici caratteristici del principio attivo e del carrier (Figura 84c), il profilo termico del prodotto di coevaporazione dimostra, dall'assenza delle endoterme di fusione, la completa amorfizzazione della TAβCd che presenta una "glass transition" appena accennata a circa 130 °C (Figura 84d).

Il processo di kneading, come nel caso del carrier da solo, amorfizza solo in parte il campione che presenta, infatti, oltre alla "glass transition" a circa 130 °C, i picchi di fusione delle due forme polimorfe con entalpie di fusione rispettivamente $\Delta H_{\text{fus,I}} = 0,46 \pm 0,31 \text{ J g}^{-1}$ e $\Delta H_{\text{fus,II}} = 11,60 \pm 0,92 \text{ J g}^{-1}$ (Figura 84e). Un comportamento termico simile (curve non riportate) è stato registrato per il sistema VCM·HCl-TAβCd 1:1 (p/p).

In tutti i sistemi VCM·HCl-TAβCd nei quali il carrier ha subito amorfizzazione per coevaporazione e per kneading è quindi evidente una “glass transition” che all’analisi DSC tradizionale si rivela però come effetto piuttosto debole, specialmente nei prodotti di kneading dove si ha amorfizzazione parziale.

Tutti i campioni sono stati analizzati con la MDSC allo scopo di mettere meglio in evidenza la “glass transition” e di verificare e valutare l’eventuale presenza di “enthalpic recovery”.

In Figura 85 sono riportate le curve all’analisi MDSC del sistema VCM·HCl-TAβCd 1:3 (p/p) ottenuto per coevaporazione.

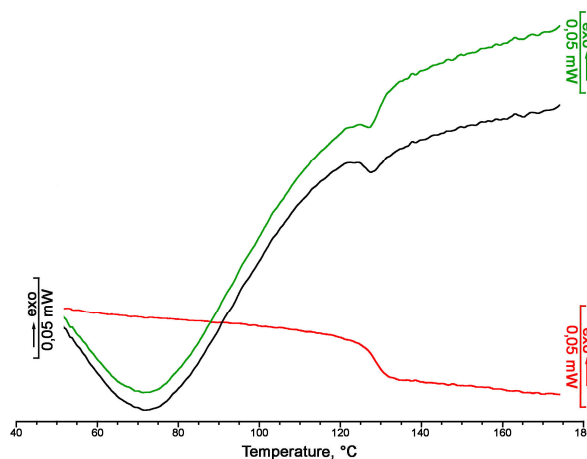


Figura 85. Curva del flusso di calore totale (nera), reversibile (rossa) e non reversibile (verde) del sistema VCM·HCl-TAβCd 1:3 (p/p) ottenuto per coevaporazione.

Nella curva rossa del flusso di calore reversibile è ben evidente a circa 130 °C la deflessione endotermica caratteristica della “glass transition”, mentre nella curva verde del flusso di calore non reversibile si può notare il picco endotermico della “enthalpic recovery”, che però non è seguito da ricristallizzazione del campione come nel caso del singolo carrier.

Un comportamento termico simile è stato registrato per il sistema VCM·HCl-TAβCd 1:1 (p/p) ottenuto per coevaporazione e per i sistemi VCM·HCl-TAβCd 1:1 e 1:3 (p/p) ottenuti per kneading (curve termiche non riportate).

In Tabella 21 sono presentati i valori di temperatura di “midpoint”, di ΔC_p e di ΔH_{rec} caratteristici della “glass transition” per ciascun sistema VCM·HCl-TA β Cd 1:1 e 1:3 (p/p) ottenuto con i due metodi di preparazione.

Tabella 21. Valori di temperatura di “midpoint”, ΔC_p e ΔH_{rec} , dei sistemi VCM·HCl-TA β Cd 1:1 e 1:3 (p/p) ottenuti per coevaporazione e kneading.

VCM·HCl-TAβCd	“midpoint” (°C)	ΔC_p (J/g °C)	ΔH_{rec} (J/g)	Onset crist. (°C)	ΔH_{crist} (J/g)
1:1 (p/p) COEV	129	0,07	0,37	-	-
1:3 (p/p) COEV	128	0,13	0,68	-	-
1:1 (p/p) KN	129	0,10	0,30	-	-
1:3 (p/p) KN	128	0,03	-	-	-

I sistemi della VCM·HCl con TA β Cd amorfa presentano una temperatura di “midpoint” della “glass transition” a circa 129 °C, corrispondente al punto di “midpoint” della singola TA β Cd. Come nel caso dei sistemi della VCM·HCl con TA α Cd, la “glass transition” è attribuibile al solo carrier.

Come per il carrier da solo, anche nei sistemi VCM·HCl-TA β Cd si verifica l’amorfizzazione della TA β Cd per coevaporazione e per kneading e non si osserva ricristallizzazione nelle condizioni di scansione. I valori di variazione di capacità termica e di “enthalpic recovery” del carrier nelle combinazioni con il farmaco tendono a diminuire, in misura più spiccata nel preparato di kneading.

Come i sistemi VCM·HCl-TA α Cd, anche tutte le combinazioni della VCM·HCl con TA β Cd sono state saggiate per la velocità di dissoluzione intrinseca (IDR) dopo invecchiamento nelle stesse condizioni e per lo stesso periodo di tempo (3 mesi in contenitore chiuso di vetro ambrato a 22-23 °C, 45-50% UR). In Tabella 22 sono riportati i valori di IDR delle tre combinazioni saggiate (campioni invecchiati) con quelli dei rispettivi campioni appena preparati (freschi) ottenuti in

precedenti lavori [3] (per comodità di confronto). Ciascun dato è la media di almeno tre determinazioni (coefficiente di variazione $\leq 9\%$ per i campioni invecchiati e $\leq 7\%$ per i campioni freschi).

Tabella 22. IDR dei sistemi binari invecchiati e freschi VCM·HCl-TA β Cd.

	IDR ($\text{mg cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$)			
	p/p	MF _i / MF _f	COEV _i / COEV _f	KN _i / KN _f
VCM·HCl-TA β Cd	1:1	0,216 / 0,204	0,221 / 0,210	0,225 / 0,217
	1:3	0,089 / 0,071	0,107 / 0,114	0,099 / 0,080

i: campioni invecchiati; f: campioni freschi

Con l'analisi della varianza (ANOVA) considerando statisticamente significativo $p < 0,05$, è stato verificato che la differenza dei valori di IDR dei campioni invecchiati rispetto a quelli precedentemente determinati sui preparati freschi non è risultata in nessun caso significativa.

Anche in questo caso, nei sistemi invecchiati, per un determinato metodo di preparazione del campione, l'effetto ritardante sul rilascio del farmaco è più marcato alla maggior frazione di massa di carrier.

In Figura 86 i profili IDR delle miscele fisiche VCM·HCl-TA β Cd ai due diversi rapporti in peso, 1:1 e 1:3, sono confrontati con quello della VCM·HCl da sola.

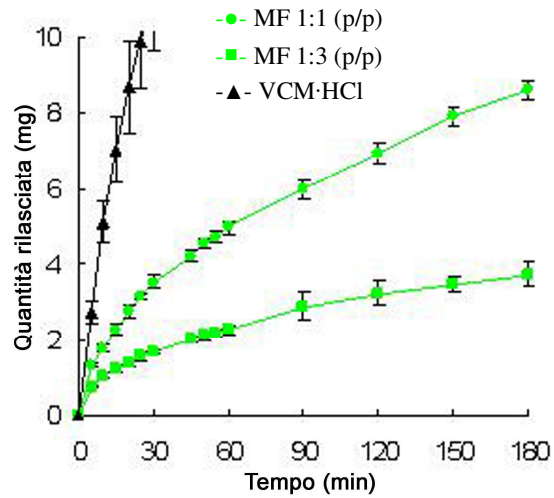


Figura 86. Profili IDR della VCM-HCl (\blacktriangle) e delle miscele fisiche VCM-HCl-TA β Cd 1:1 (p/p) (\bullet) e 1:3 (p/p) (\blacksquare).

In Figura 87 sono riportati i profili IDR della miscela fisica e dei prodotti di coevaporazione e di kneading ai due rapporti in peso considerati.

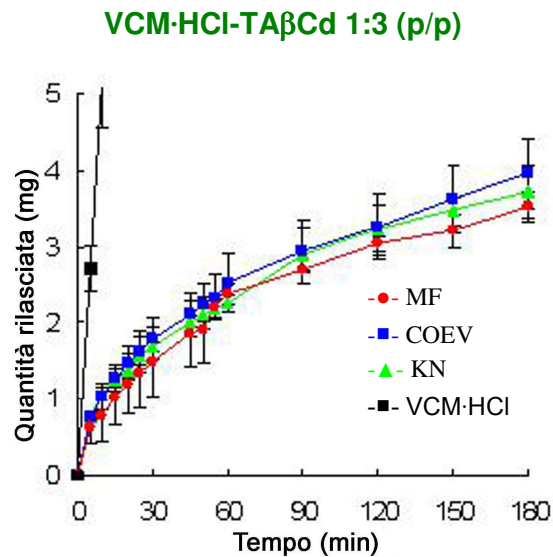
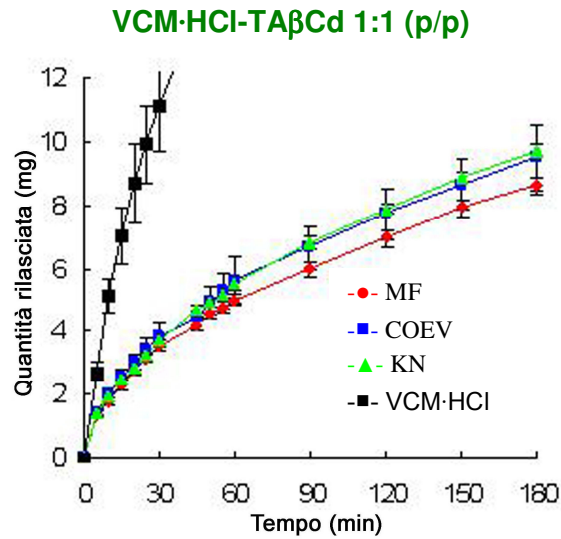


Figura 87. Profili IDR dei sistemi binari VCM·HCl-TAβCd (rapporti in peso indicati in Figura) come miscele fisiche (MF), come coevaporati (COEV) e come prodotti di kneading (KN).

I profili di rilascio mostrano come il trattamento della miscela fisica porti a preparati con proprietà di rallentamento del rilascio del farmaco paragonabili a quelle della miscela fisica tal quale (differenza tra i valori di IDR non significativa a $p < 0,05$).

Si può ipotizzare quindi che la TA β Cd sia in grado di indurre un buon rallentamento del rilascio del farmaco già per semplice miscelazione fisica con il farmaco stesso per il suo maggior carattere idrofobo rispetto alla TA α Cd.

TCP-TA β Cd

Come per i sistemi contenenti VCM·HCl, le miscele fisiche della TCP con TA β Cd preparate nei rapporti in peso farmaco-carrier 1:1 e 1:3 sono state trattate con le stesse tecniche di coevaporazione e di kneading utilizzate per il singolo carrier. In Figura 88 sono riportate le curve DSC della TCP, della TA β Cd, della loro miscela fisica in rapporto 1:3 (p/p) e dei preparati ottenuti per coevaporazione e per kneading della miscela stessa.

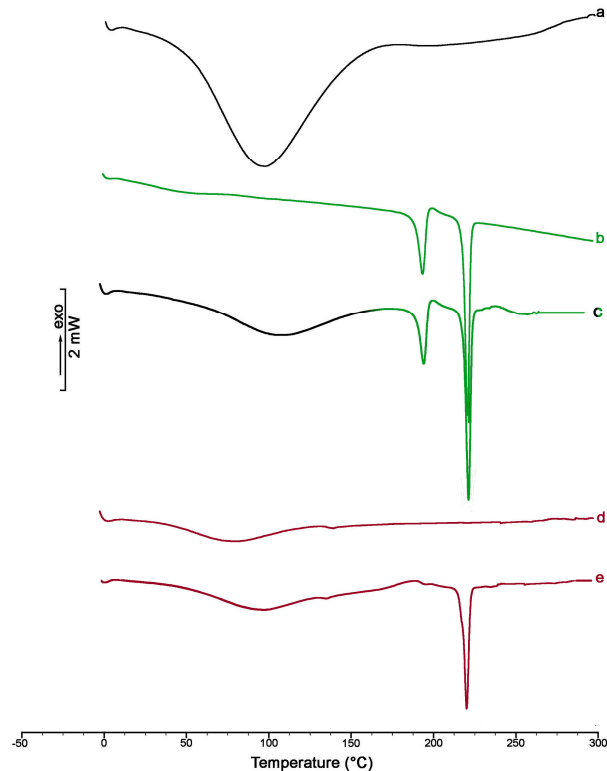


Figura 88. Curve DSC della TCP (a), della TA β Cd (b), della loro miscela fisica in rapporto 1:3 (p/p) tal quale (c) e dopo coevaporazione (d) o kneading (e).

Come nel caso del sistema con VCM·HCl, la curva DSC della miscela fisica TCP-TAβCd presenta un tracciato corrispondente alla somma pesata degli effetti termici caratteristici del principio attivo e del carrier (Figura 88c).

La scomparsa di entrambi i picchi di fusione nella curva DSC del prodotto ottenuto per coevaporazione dimostra la completa amorfizzazione della TAβCd caratterizzata da una “glass transition” appena accennata a circa 130 °C (Figura 88d). Il trattamento di kneading, invece, proprio come nel caso del solo carrier, amorfizza solo parzialmente la TAβCd che presenta sempre una “glass transition” a circa 130 °C, seguita dalla cristallizzazione del polimorfo della TAβCd con punto di fusione più alto.

Un comportamento termico simile è stato osservato per il sistema TCP-TAβCd 1:1 (p/p) (curve non riportate).

In Figura 89 sono riportate le curve MDSC del sistema TCP-TAβCd 1:3 (p/p) ottenuto per coevaporazione.

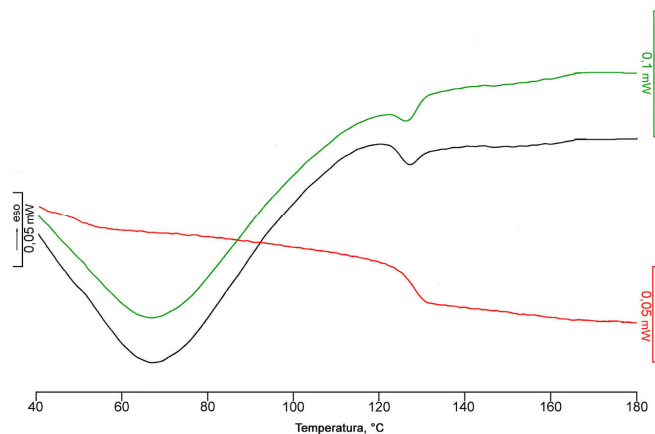


Figura 89. Curva del flusso di calore totale (nera), reversibile (rossa) e non reversibile (verde) del sistema TCP-TAβCd 1:3 (p/p) ottenuto per coevaporazione.

Il profilo MDSC del sistema TCP-TAβCd è analogo a quello del sistema a base di VCM·HCl e la deflessione endotermica nella curva rossa del flusso di calore reversibile a circa 130 °C è caratteristica della “glass transition” della TAβCd. Nella curva verde del flusso di calore non reversibile si può individuare il picco

endotermico della “enthalpic recovery” senza successiva ricristallizzazione del campione.

Un comportamento termico analogo è stato registrato per il sistema TCP-TA β Cd 1:1 (p/p) ottenuto per coevaporazione e per i sistemi TCP-TA β Cd 1:1 e 1:3 (p/p) ottenuti per kneading (curve non riportate).

In Tabella 23 sono riportati i valori di temperatura di “midpoint”, di ΔC_p e di ΔH_{rec} caratteristici della “glass transition” per ciascun sistema TCP-TA β Cd 1:1 e 1:3 (p/p) ottenuto con i due diversi metodi di preparazione.

Tabella 23. Valori di temperatura di “midpoint”, ΔC_p e ΔH_{rec} dei sistemi TCP-TA β Cd 1:1 e 1:3 (p/p) ottenuti per coevaporazione e kneading.

TCP-TAβCd	“midpoint” (°C)	ΔC_p (J/g °C)	ΔH_{rec} (J/g)	Onset crist. (°C)	ΔH_{crist} (J/g)
1:1 (p/p) COEV	127	0,12	0,38	-	-
1:3 (p/p) COEV	128	0,15	0,70	-	-
1:1 (p/p) KN	127	0,06	-	-	-
1:3 (p/p) KN	128	0,12	0,51	-	-

I sistemi della TCP con TA β Cd, come già quelli della VCM·HCl con lo stesso carrier, allo stato amorfo presentano una temperatura di “midpoint” della “glass transition” a circa 128 °C, corrispondente al punto di “midpoint” della sola TA β Cd.

Come per il sistema VCM·HCl-TA β Cd, anche i sistemi TCP-TA β Cd amorfizzano per coevaporazione e per kneading senza ricristallizzare nelle condizioni di scansione. I parametri di variazione di capacità termica e di “enthalpic recovery” tendono a diminuire rispetto a quelli caratteristici del singolo carrier e in misura più spiccata nei preparati per kneading.

I sistemi della TCP con TA β Cd nei rapporti in peso farmaco-carrier 1:1 e 1:3 come semplice miscela fisica e come prodotti di coevaporazione e di kneading sono stati sottoposti ai test di velocità di dissoluzione intrinseca (IDR) dopo invecchiamento nelle stesse condizioni dei sistemi con VCM·HCl (3 mesi in contenitori chiusi di vetro ambrato a 22-23 °C, 45-50% UR).

In Tabella 24 sono riportati i valori di IDR ottenuti per le tre combinazioni saggiate (preparati invecchiati) e ciascun dato è la media di almeno tre determinazioni (coefficiente di variazione $\leq 2\%$). Accanto a questi sono riportati, per comodità di confronto, i valori di IDR dei rispettivi campioni appena preparati (freschi) (vedi pagina 56).

Tabella 24. IDR dei sistemi binari invecchiati e freschi TCP-TA β Cd.

		IDR (mg cm ⁻² min ⁻¹)			
		p/p	MF _i / MF _f	COEV _i / COEV _f	KN _i / KN _f
TCP-TA β Cd	1:1		0,361 / 0,349	0,631 / 0,826	0,720 / 0,502
	1:3		0,089 / 0,094	0,135 / 0,148	0,115 / 0,095

i: campioni invecchiati; f: campioni freschi

Dall'analisi della varianza (ANOVA) considerando statisticamente significativo $p < 0,05$, è emerso che la differenza dei valori di IDR dei campioni invecchiati e freschi è risultata in genere non significativa fatta eccezione per i prodotti ottenuti per coevaporazione ($p < 0,01$) e per kneading ($p < 0,001$) nel rapporto in peso farmaco-carrier 1:1.

Anche in questo caso, per quanto riguarda i sistemi invecchiati, a parità del tipo di preparato, l'effetto ritardante sul rilascio del farmaco è più marcato nel preparato contenente la maggior frazione di massa del carrier (Figura 90).

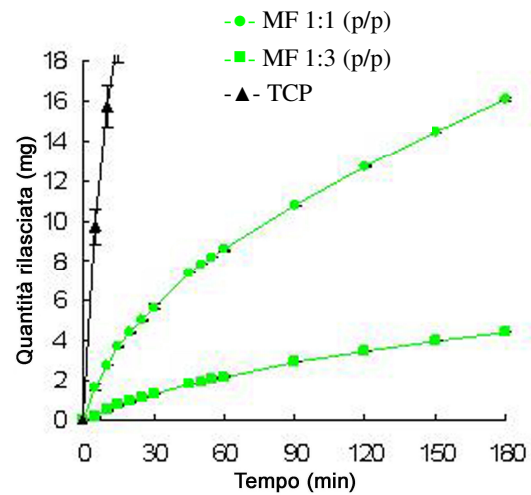


Figura 90. Profili IDR della TCP (▲) e delle miscele fisiche TCP-TA β Cd 1:1 (p/p) (●) e 1:3 (p/p) (■).

In Figura 91 sono messi a confronto i profili IDR delle miscele fisiche, dei coevaporati e dei prodotti di kneading per ciascuna composizione considerata.

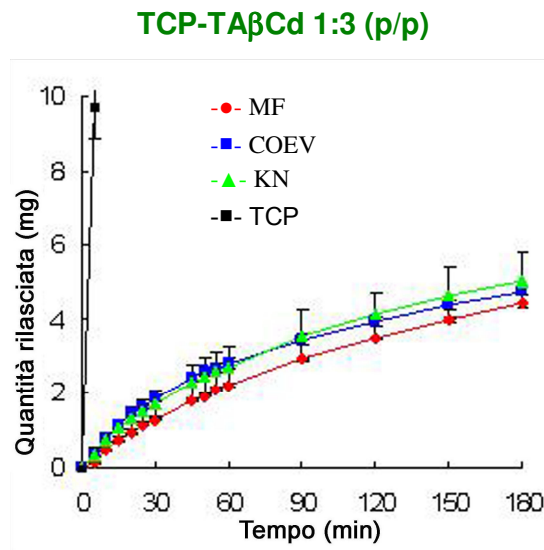
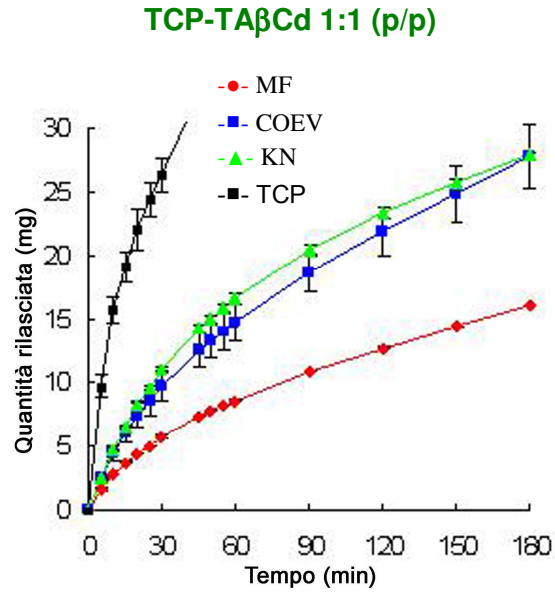


Figura 91. Profili IDR dei sistemi binari TCP-TA β Cd (rapporti in peso indicati in Figura) come miscele fisiche (MF), come coevaporati (COEV) e come prodotti di kneading (KN).

Confrontando i profili IDR dei sistemi TCP-TA β Cd nei diversi rapporti in peso si può rilevare come il trattamento della miscela porti a preparati con proprietà di rallentamento del rilascio del farmaco inferiori a quelle della miscela fisica e

dedurre quindi che la TA β Cd, carrier più idrofobo della TA α Cd, sia più efficiente nel ridurre il carattere idrofilo dell'antibiotico per semplice miscelazione fisica perchè in questa si formano aggregati tra il farmaco e il carrier molto stabili (ad es. per attrazione elettrostatica). Il trattamento della miscela, cioè la coevaporazione o lo kneading, determinano un'indebolimento di queste forze e quindi la tendenza alla disaggregazione degli aggregati.

TA γ Cd

La TA γ Cd amorfa si ottiene per ricristallizzazione da AcOEt, come pure con gli stessi trattamenti applicati agli altri singoli carrier. In Figura 92 sono riportate le curve DSC della TA γ Cd commerciale e dei prodotti di coevaporazione e di kneading.

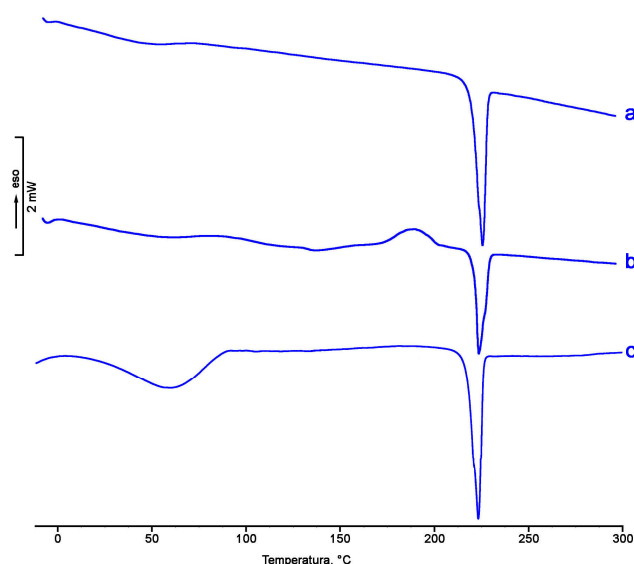


Figura 92. Curve DSC della TA γ Cd commerciale (a) e del prodotto ottenuto per coevaporazione (b) e per kneading (c).

La TA γ Cd commerciale mostra un profilo DSC tipico di un idrato cristallino (perdita di massa in TG $1,0\pm 0,1\%$) che, dopo disidratazione, presenta un effetto endotermico a $225,4\pm 0,5$ °C ($\Delta H_{\text{fus}} = 28,6\pm 0,2$ J g⁻¹) attribuibile alla fusione dell'anidro (Figura 92a). Il profilo DSC del prodotto di coevaporazione, che coincide con quello del prodotto di cristallizzazione da AcOEt (non riportato), indica che questi trattamenti determinano amorfizzazione del campione. Dopo un'iniziale perdita di solvente si presenta una "glass transition" appena accennata a circa 132 °C, seguita da un effetto esotermico di ricristallizzazione del campione nella TA γ Cd iniziale (Figura 92b).

Il trattamento di kneading invece non è in grado di amorfizzare il campione che presenta, dopo disidratazione, un picco di fusione con parametri di temperatura ed entalpia praticamente coincidenti con quelli della TA γ Cd commerciale (Figura 92c).

La TA γ Cd trattata per kneading non presenta una “glass transition” neanche all’analisi MDSC (curva non riportata), a differenza della TA γ Cd ottenuta per coevaporazione (Figura 93) e anche per ricristallizzazione da AcOEt (curva non riportata). Dalle curve MDSC è possibile rilevare la “glass transition” nella curva del flusso di calore reversibile (curva rossa) e la “enthalpic recovery” seguita dalla ricristallizzazione del campione nella curva del flusso di calore non reversibile (curva verde).

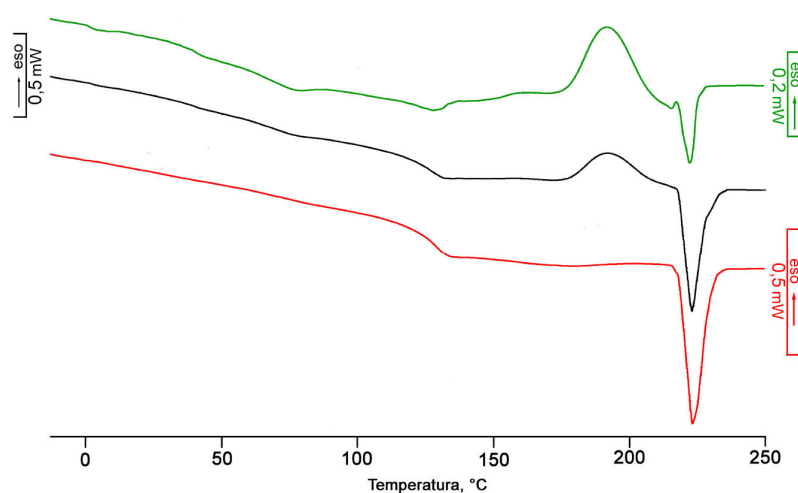


Figura 93. Curva del flusso di calore totale (nera), reversibile (rossa) e non reversibile (verde) della TA γ Cd ottenuta per coevaporazione.

In Tabella 25 sono riportati i valori di temperatura di “midpoint”, di ΔC_p e di ΔH_{rec} caratteristici della “glass transition” e i valori di temperatura di onset e di variazione di entalpia (ΔH_{crist}) associati all’effetto esotermico di ricristallizzazione per ciascuna TA γ Cd ottenuta con i diversi metodi di preparazione.

Tabella 25. Valori di temperatura di “midpoint”, ΔC_p , ΔH_{rec} , temperatura di onset e ΔH_{cris} di ciascuna TA γ Cd ottenuta con i diversi metodi di preparazione.

	“midpoint” (°C)	ΔC_p (J/g °C)	ΔH_{rec} (J/g)	Onset crist. (°C)	ΔH_{cris} (J/g)
TA γ Cd x AcOEt	133	0,25	0,32	172	18,62
TA γ Cd COEV	132	0,17	0,71	162	17,35
TA γ Cd KN	-	-	-	-	-

VCM·HCl-TA γ Cd

In Figura 94 sono riportate le curve DSC della VCM·HCl, della TA γ Cd, della loro miscela fisica in rapporto 1:3 (p/p) e dei rispettivi preparati per coevaporazione e per kneading.

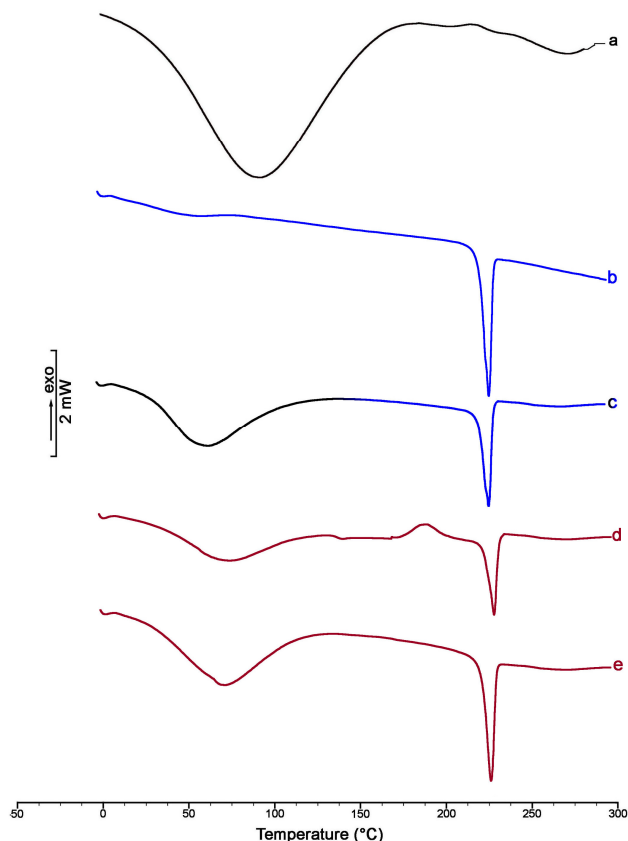


Figura 94. Curve DSC della VCM·HCl (a), della TA γ Cd (b), della loro miscela fisica in rapporto 1:3 (p/p) tal quale (c) e dopo coevaporazione (d) o kneading (e).

Mentre la curva DSC della miscela fisica VCM·HCl-TA γ Cd presenta un tracciato corrispondente alla somma pesata degli effetti termici caratteristici dei componenti (Figura 94c), quella del prodotto di coevaporazione mostra una “glass transition” a circa 132 °C seguita da un effetto esotermico di ricristallizzazione a circa 175 °C e da un’endoterma di fusione a circa 220 °C, a dimostrazione del passaggio allo stato amorfo del carrier per effetto del trattamento e della sua riconversione in cristallino nelle condizioni di scansione DSC (Figura 94d).

Il tracciato DSC del prodotto di kneading (Figura 94e), invece, non presenta effetti termici diversi da quelli caratteristici della semplice miscela fisica dei componenti, con valori di temperatura e di entalpia di fusione della TA γ Cd corrispondenti a quelli del prodotto commerciale. Analogamente a quanto

osservato per la sola TA γ Cd, anche in questo caso il trattamento di kneading della miscela non ha determinato nemmeno una parziale amorfizzazione del carrier.

Un comportamento termico simile è stato osservato anche per il sistema VCM·HCl-TA γ Cd 1:1 (p/p) (curve non riportate).

Tutti i sistemi VCM·HCl-TA γ Cd sono stati analizzati con la MDSC per mettere in evidenza eventuali transizioni vetrose molto deboli e per separare la “glass transition” dalla “enthalpic recovery” e calcolare i parametri termici caratteristici, nei casi in cui la transizione vetrosa era evidente anche nella DSC convenzionale.

In Figura 95 sono riportate le curve dell’analisi MDSC del sistema VCM·HCl-TA γ Cd 1:3 (p/p) ottenuto per coevaporazione della miscela che mettono in evidenza entrambi gli effetti termici.

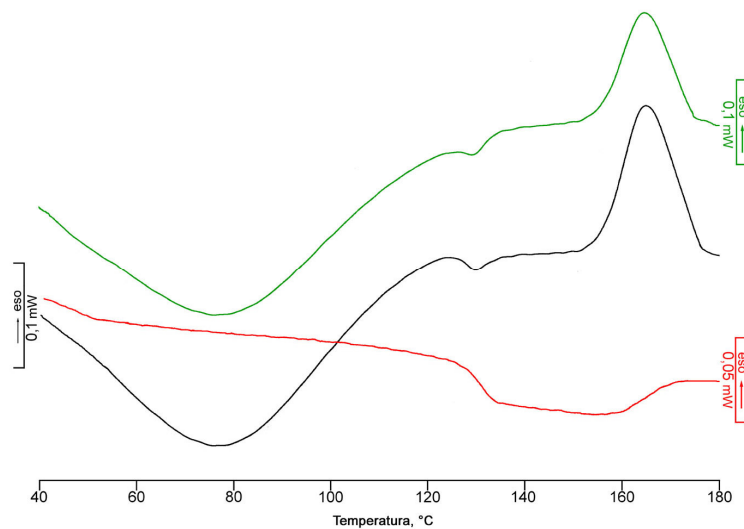


Figura 95. Curva del flusso di calore totale (nera), reversibile (rossa) e non reversibile (verde) del sistema VCM·HCl-TA γ Cd 1:3 (p/p) ottenuto per coevaporazione.

A parità di trattamento della miscela fisica, in quella nel rapporto VCM·HCl-TA γ Cd 1:1 (p/p) si forma solo una piccola porzione di carrier amorfo che presenta una “glass transition” con un bassissimo valore di ΔC_p non associato ad “enthalpic recovery” e nessun successivo effetto esotermico (Figura 96).

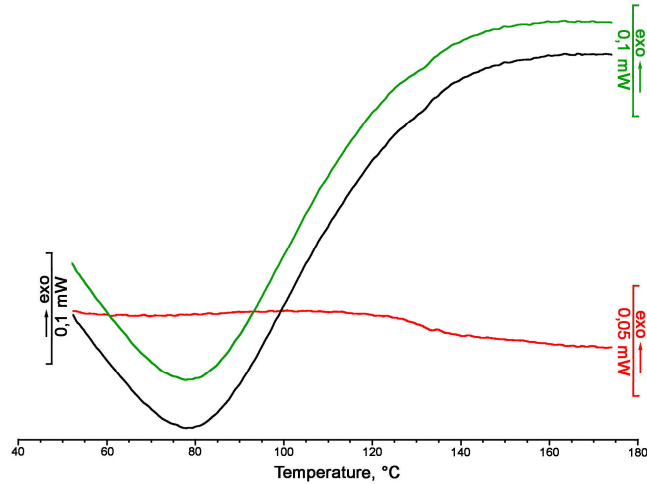


Figura 96. Curva del flusso di calore totale (nera), reversibile (rossa) e non reversibile (verde) del sistema VCM·HCl-TA γ Cd 1:1 (p/p) ottenuto per coevaporazione.

In Figura 97 è riportato il profilo MDSC del preparato VCM·HCl-TA γ Cd 1:3 (p/p) per kneading in cui la curva del flusso di calore reversibile (curva rossa) è piatta e quella del flusso di calore non reversibile (curva verde) non presenta nessuna esoterma di ricristallizzazione, a conferma che questo trattamento non modifica lo stato cristallino iniziale del carrier.

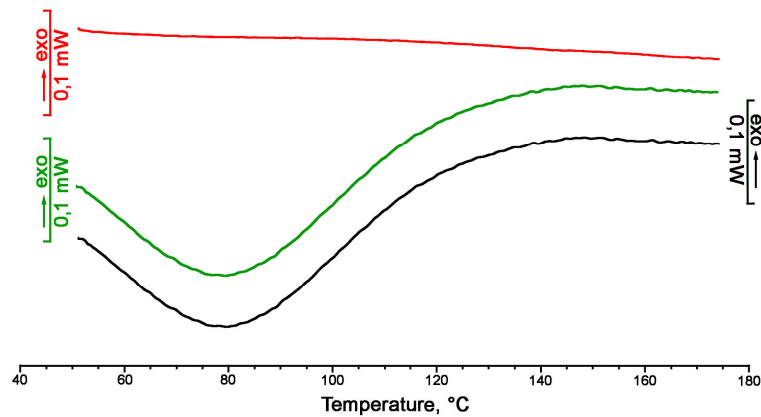


Figura 97. Curva del flusso di calore totale (nera), reversibile (rossa) e non reversibile (verde) del sistema VCM·HCl-TA γ Cd 1:3 (p/p) ottenuto per kneading.

Un comportamento termico analogo è stato registrato per il sistema VCM·HCl-TA γ Cd 1:1 (p/p) ottenuto per kneading (curve non riportate).

In Tabella 26 sono riportati i valori di temperatura di “midpoint”, di ΔC_p e di ΔH_{rec} caratteristici della “glass transition” e i valori di temperatura di onset e di variazione di entalpia (ΔH_{crist}) associati all’esoterma di ricristallizzazione per ciascun sistema VCM·HCl-TA γ Cd 1:1 e 1:3 (p/p) ottenuto per coevaporazione e per kneading.

Tabella 26. Valori di temperatura di “midpoint”, ΔC_p , ΔH_{rec} , temperatura di onset e ΔH_{crist} dei sistemi VCM·HCl-TA γ Cd 1:1 e 1:3 (p/p) ottenuti per coevaporazione e kneading.

VCM·HCl-TAγCd	“midpoint” (°C)	ΔC_p (J/g °C)	ΔH_{rec} (J/g)	Onset crist. (°C)	ΔH_{crist} (J/g)
1:1 (p/p) COEV	132	0,05	-	-	-
1:3 (p/p) COEV	132	0,14	0,50	157	11,04
1:1 (p/p) KN	-	-	-	-	-
1:3 (p/p) KN	-	-	-	-	-

La “glass transition”, la cui temperatura di “midpoint” corrisponde a quella del carrier da solo, è presente nei sistemi preparati per coevaporazione che è quindi l’unico trattamento in grado di amorfizzare il carrier. A parità di metodo di preparazione, nei sistemi a minor contenuto di TA γ Cd si forma solo una piccola porzione di carrier amorfo che non tende a ricristallizzare nelle condizioni di scansione e presenta una “glass transition” con valore di ΔC_p di soli 0,05 J/g °C non associata ad “enthalpic recovery”.

Anche tutte le combinazioni della VCM·HCl con TA γ Cd sono state saggiate per la velocità di dissoluzione intrinseca (IDR) dopo invecchiamento nelle stesse condizioni delle combinazioni con gli altri carrier (3 mesi in contenitori chiusi di vetro ambrato a 22-23 °C, 45-50% UR).

In Tabella 27 sono riportati i valori di IDR delle tre combinazioni saggiate (campioni invecchiati) con quelli dei rispettivi campioni appena preparati (freschi) ottenuti in precedenti lavori [3] (per comodità di confronto). Ciascun dato è la media di almeno tre determinazioni (coefficiente di variazione $\leq 5\%$ per i campioni invecchiati e $\leq 9\%$ per i campioni freschi).

Tabella 27. IDR dei sistemi binari invecchiati e freschi VCM-HCl-TA γ Cd.

		IDR ($\text{mg cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$)			
		p/p	MF _i / MF _f	COEV _i / COEV _f	KN _i / KN _f
VCM-HCl-TA γ Cd	1:1	0,177 / 0,174	0,226 / 0,217	0,230 / 0,223	
	1:3	0,075 / 0,062	0,117 / 0,132	0,109 / 0,117	

i: campioni invecchiati; f: campioni freschi

La differenza dei valori di IDR dei campioni invecchiati e freschi, valutata con l'analisi della varianza (ANOVA), non è risultata in nessun caso significativa ($p < 0,05$).

L'effetto ritardante sul rilascio della VCM-HCl nei preparati invecchiati è evidente tanto nelle miscele fisiche quanto nei preparati per coevaporazione e si manifesta in misura direttamente correlata alla frazione di massa del carrier. In Figura 98 sono riportati i profili IDR della VCM-HCl da sola e delle miscele fisiche VCM-HCl-TA γ Cd ai due rapporti in peso e in Figura 99 i profili dei rispettivi prodotti di coevaporazione e di kneading.

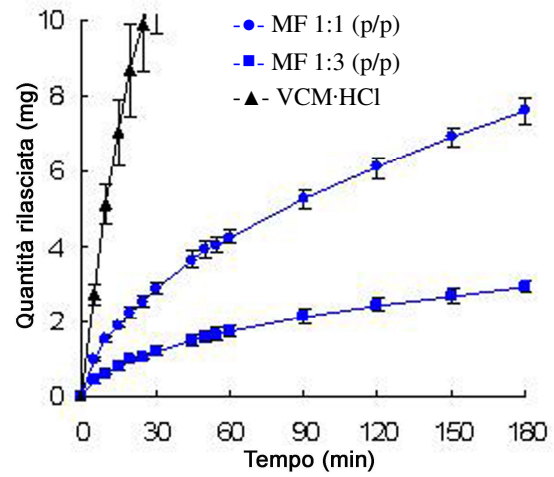


Figura 98. Profili IDR della VCM·HCl (▲) e delle miscele fisiche VCM·HCl-TA γ Cd 1:1 (p/p) (●) e 1:3 (p/p) (■).

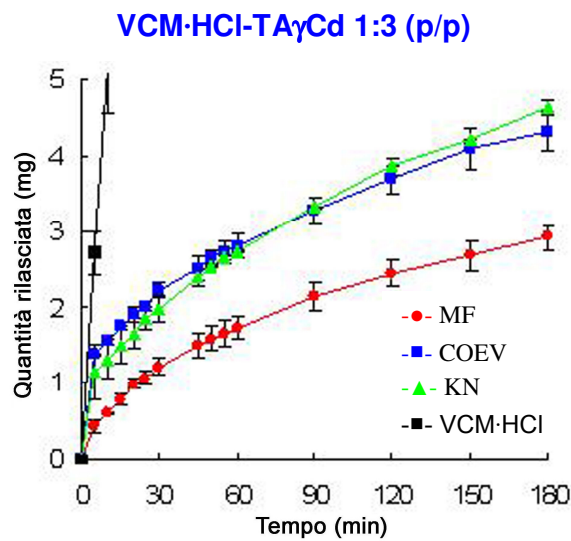
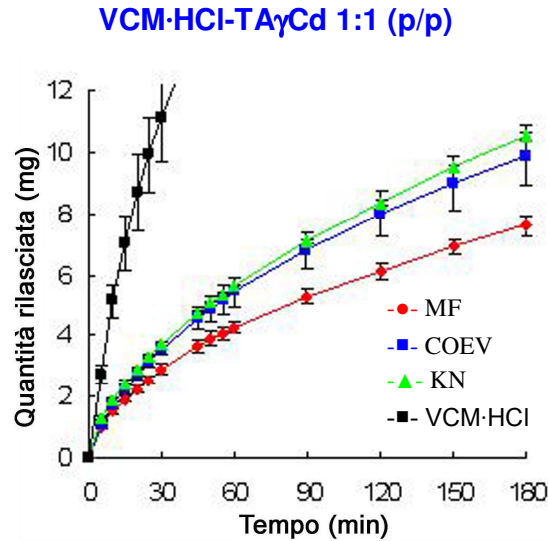


Figura 99. Profili IDR dei sistemi binari VCM-HCl-TA γ Cd (rapporti in peso indicati in Figura) come miscele fisiche (MF), come coevaporati (COEV) e come prodotti di kneading (KN).

A parità di quantità di TA γ Cd presente, la miscela fisica tal quale risulta sempre più efficiente della miscela trattata nel rallentare il rilascio della VCM-HCl.

Il meccanismo postulato per spiegare questo comportamento è lo stesso di quello prospettato per il sistema con TA β Cd (vedi pag. 146).

TCP-TA γ Cd

Come per i sistemi contenenti VCM·HCl, le miscele fisiche della TCP con TA γ Cd nei rapporti in peso 1:1 e 1:3 farmaco-carrier sono state trattate per coevaporazione e per kneading. In Figura 100 sono riportate le curve DSC della TCP, della TA γ Cd, della loro miscela fisica in rapporto 1:3 (p/p) e dei preparati di coevaporazione e di kneading della miscela stessa.

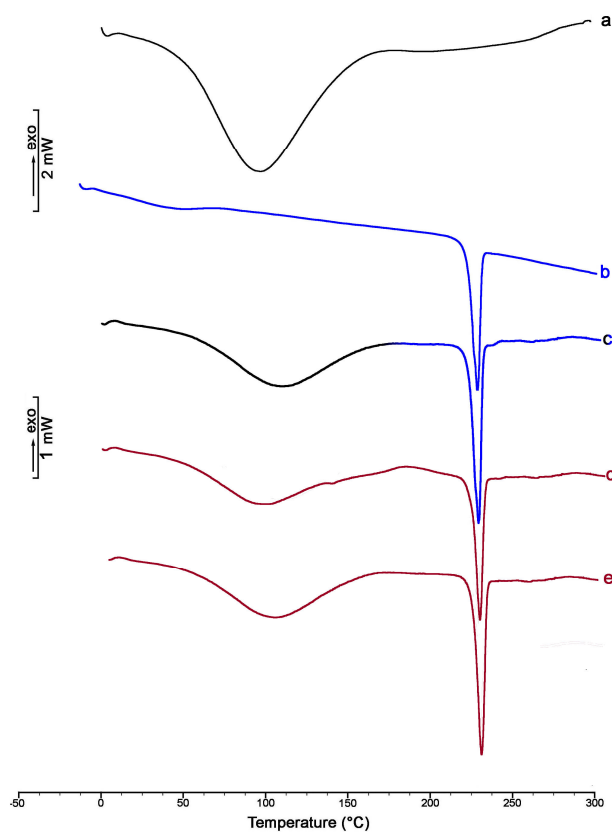


Figura 100. Curve DSC della TCP (a), della TA γ Cd (b), della loro miscela fisica in rapporto 1:3 (p/p) tal quale (c) e dopo coevaporazione (d) o kneading (e).

Analogamente al sistema contenente VCM·HCl, la curva DSC della miscela fisica TCP-TA γ Cd presenta un tracciato corrispondente alla somma pesata degli effetti termici dei componenti, senza effetti termici attribuibili a transizioni vetrose (Figura 100c). Nel profilo DSC del prodotto per coevaporazione, invece, la “glass

transition” è ben evidente a circa 132 °C con un successivo effetto esotermico a circa 175 °C, che dimostra la parziale amorfizzazione del carrier che si riconverte poi allo stato cristallino iniziale (Figura 100d).

Il trattamento di kneading non è invece in grado di produrre la benché minima amorfizzazione del carrier, come si vede dal tracciato DSC praticamente sovrapponibile a quello della miscela fisica (Figura 100e).

Un comportamento termico simile si registra anche per il sistema TCP-TA γ Cd 1:1 (p/p) (curve non riportate).

L’analisi MDSC di tutti i sistemi TCP-TA γ Cd ha messo in evidenza, come nei corrispondenti sistemi a base di VCM·HCl, una “glass transition” nella curva del flusso di calore reversibile (curva rossa) dei sistemi ottenuti per coevaporazione (Figure 101 e 102). A parità di metodo di preparazione, mentre il preparato TCP-TA γ Cd 1:3 (p/p) presenta nella curva di flusso di calore non reversibile (curva verde) anche un effetto endotermico di “enthalpic recovery” seguito da ricristallizzazione (Figura 101), nella curva del sistema 1:1 (p/p) non sono evidenti nè la “enthalpic recovery”, nè la ricristallizzazione del campione (Figura 102).

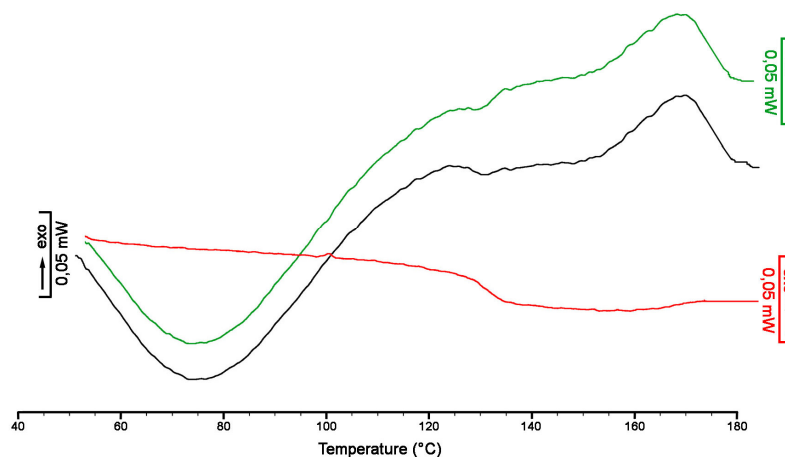


Figura 101. Curva del flusso di calore totale (nera), reversibile (rossa) e non reversibile (verde) del sistema TCP-TA γ Cd 1:3 (p/p) ottenuto per coevaporazione.

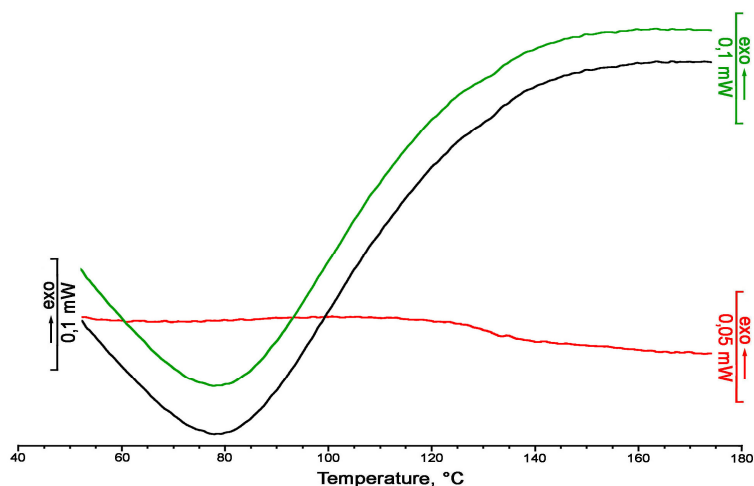


Figura 102. Curva del flusso di calore totale (nera), reversibile (rossa) e non reversibile (verde) del sistema TCP-TA γ Cd 1:1 (p/p) ottenuto per coevaporazione.

In modo analogo ai sistemi contenenti VCM·HCl, le curve del flusso di calore reversibile dell'analisi MDSC dei preparati per kneading della miscela TCP-TA γ Cd ai due rapporti in peso, presentano un andamento piatto (curve non riportate) a conferma che qui non si è verificata amorfizzazione del carrier.

I valori di temperatura di “midpoint”, di ΔC_p e di ΔH_{rec} caratteristici della “glass transition” e i valori di temperatura di onset e di variazione di entalpia (ΔH_{crist}) associati all'effetto esotermico di ricristallizzazione per ciascun sistema TCP-TA γ Cd sono riportati in Tabella 28.

Tabella 28. Valori di temperatura di “midpoint”, ΔC_p , ΔH_{rec} , temperatura di onset e ΔH_{crist} dei sistemi TCP-TA γ Cd 1:1 e 1:3 (p/p) ottenuti per coevaporazione e kneading.

TCP-TA γ Cd	“midpoint” (°C)	ΔC_p (J/g °C)	ΔH_{rec} (J/g)	Onset crist. (°C)	ΔH_{crist} (J/g)
1:1 (p/p) COEV	129	0,02	-	-	-
1:3 (p/p) COEV	130	0,10	0,29	157	5,33
1:1 (p/p) KN	-	-	-	-	-
1:3 (p/p) KN	-	-	-	-	-

La “glass transition”, con temperatura di “midpoint” corrispondente a quella del carrier da solo, è presente nei preparati per coevaporazione ma non per kneading, procedimento non in grado di amorfizzare il carrier. Nei coevaporati a minor contenuto di TA γ Cd si forma solo una piccola porzione di carrier amorfo la cui “glass transition” ha un valore di ΔC_p di soli 0,02 J/g °C, non è associata ad “enthalpic recovery” e non è seguita da riconversione allo stato cristallino.

In Tabella 29 sono riportati i valori di IDR dei sistemi della TCP con TA γ Cd nei rapporti in peso farmaco-carrier 1:1 e 1:3 come miscela fisica tal quale e trattata per coevaporazione e per kneading, dopo invecchiamento nelle stesse condizioni dei precedenti sistemi (3 mesi in contenitori chiusi di vetro ambrato a 22-23 °C, 45-50% UR) e ogni dato è la media di almeno tre determinazioni (coefficiente di variazione $\leq 7\%$). Accanto a questi sono riportati, per comodità di confronto, i valori di IDR dei rispettivi campioni appena preparati (freschi) (vedi pagina 61).

Tabella 29. IDR dei sistemi binari invecchiati e freschi TCP-TA γ Cd.

		IDR (mg cm ⁻² min ⁻¹)			
		p/p	MF _i / MF _f	COEV _i / COEV _f	KN _i / KN _f
TCP-TA γ Cd	1:1		0,308 / 0,298	0,621 / 0,512	0,576 / 0,496
	1:3		0,078 / 0,081	0,125 / 0,131	0,143 / 0,162

i: campioni invecchiati; f: campioni freschi

Dall’analisi della varianza (ANOVA) considerando statisticamente significativo $p < 0,05$, è emerso che la differenza dei valori di IDR dei campioni invecchiati e freschi è risultata in genere non significativa fatta eccezione per i prodotti di coevaporazione ($p < 0,01$) e di kneading ($p < 0,05$) dei sistemi nel rapporto in peso farmaco-carrier 1:1.

Come nei casi precedenti, l'effetto ritardante sul rilascio della TCP nei sistemi invecchiati si manifesta tanto nelle miscele fisiche quanto nei preparati di coevaporazione e di kneading in misura direttamente correlata alla proporzione di carrier presente.

In Figura 103 sono riportati i profili IDR della TCP da sola e delle miscele fisiche TCP-TA γ Cd nei due rapporti in peso, poi confrontati con i rispettivi prodotti di coevaporazione e di kneading (Figura 104).

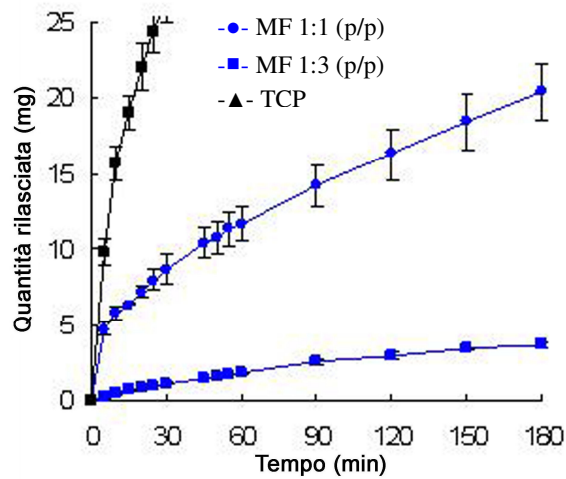


Figura 103. Profili IDR della TCP (\blacktriangle) e delle miscele fisiche TCP-TA γ Cd 1:1 (p/p) (\bullet) e 1:3 (p/p) (\blacksquare).

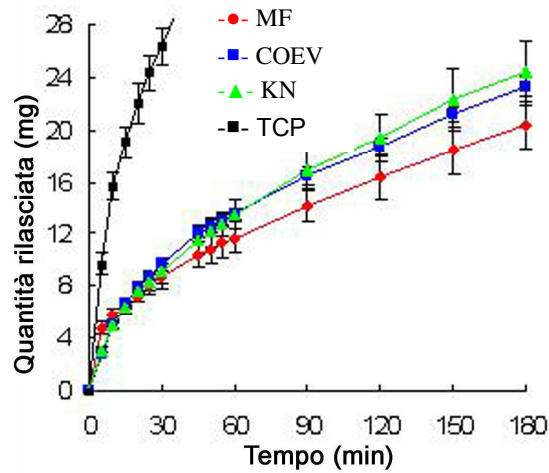
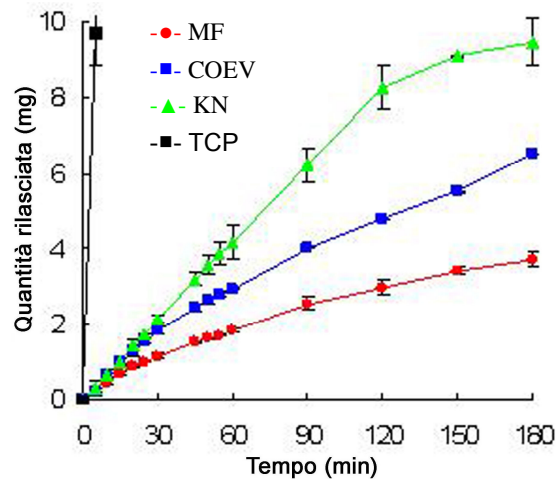
TCP-TA γ Cd 1:1 (p/p)TCP-TA γ Cd 1:3 (p/p)

Figura 104. Profili IDR dei sistemi binari TCP-TA γ Cd (rapporti in peso indicati in Figura) come miscele fisiche (MF), come coevaporati (COEV) e come prodotti di kneading (KN).

Ad ogni composizione saggiata, a parità di quantità di TA γ Cd presente, la miscela fisica si rivela sempre più efficiente nel rallentare il rilascio del farmaco rispetto ai preparati per coevaporazione e per kneading della miscela stessa. Anche in questo caso, in analogia con il sistema con la TA β Cd, le più spiccate proprietà

idrofobiche del carrier sono in grado di esercitare il maggior rallentamento del rilascio dell'antibiotico nella miscela fisica verosimilmente a causa della forte aggregazione particellare che si instaura qui, probabilmente per interazione elettrostatica.

Il trattamento della miscela fisica per coevaporazione e per kneading indebolisce o annulla queste interazioni, cosa che favorisce la disaggregazione degli aggregati e la conseguente più rapida cessione del farmaco al mezzo di dissoluzione.

Conclusioni

I tentativi sperimentali di isolare la TCP allo stato cristallino non hanno avuto successo in quanto la sostanza di partenza è amorfa e si mantiene tale anche dopo ricristallizzazione dai diversi solventi saggiati. L'approfondimento della caratterizzazione fisico-chimica della VCM·HCl ha portato invece all'ottenimento di un solvato cristallino che però, appena separato dalle acque madri, sfiorisce all'aria convertendosi in VCM·HCl amorfa.

La caratterizzazione fisico-chimica dei sistemi binari TCP-TACd ha permesso di identificare un'interazione allo stato solido tra farmaco e TA α Cd nei prodotti ottenuti per cristallizzazione evaporativa e da impasto molle, e tra farmaco e TA β Cd solo nei composti ottenuti per irraggiamento con microonde della soluzione idroacetonica della miscela fisica di partenza. Nelle stesse condizioni sperimentali non sono state invece rilevate interazioni allo stato solido tra TCP e TA γ Cd.

Le tre TACds saggiate si sono rivelate adatte allo scopo di rallentare la cessione *in vitro* della TCP dalle rispettive combinazioni solide.

La maggiore efficienza sotto questo aspetto è stata riscontrata per la TA γ Cd, il carrier con caratteristiche idrofobiche più spiccate, che già nella miscela fisica contenente la minor proporzione di farmaco permette di realizzare un rallentamento della cessione del farmaco in termini di riduzione del valore di IDR da 2,76 mg cm⁻² min⁻¹ per la TCP da sola a 0,081 mg cm⁻² min⁻¹ (circa 34 volte).

Il trattamento della miscela fisica con formazione di un coprecipitato o di un prodotto di kneading comporta una diminuzione dell'IDR solo nel caso del sistema con TA α Cd, il carrier con le caratteristiche idrofobiche meno spiccate tra i tre saggiati.

Tenendo conto dell'opportunità di utilizzo nelle formulazioni di combinazioni farmaco-carrier nel rapporto in peso 1:1 (che corrisponde circa a quello equimolare) e della convenienza di impiego della miscela fisica tale e quale evitando trattamenti della stessa, le combinazioni possibili per la messa a punto di sistemi a rilascio prolungato dell'antibiotico sono, in ordine di preferenza, TCP-TA γ Cd > TCP-TA β Cd > TCP-TA α Cd. La diminuzione dell'IDR del principio attivo risulta rispettivamente di 9,3, 7,9 e 5,3 volte quella della TCP da sola.

Lo studio fisico-chimico dei sistemi binari della VCM-HCl e della TCP con il CRG non ha messo in evidenza specifiche interazioni allo stato solido tra farmaco e polimero nelle miscele fisiche, dove il caratteristico effetto esotermico del polimero in DSC è semplicemente accompagnato dall'effetto endotermico di decomposizione del farmaco. Nei preparati per coevaporazione con microonde o in Rotavapor si osserva in DSC uno spostamento del picco dell'effetto esotermico del polimero verso temperature più elevate, fenomeno che può essere attribuito a un prodotto di interazione con il farmaco più stabile dal punto di vista termico. La maggiore efficienza nel rallentamento del rilascio *in vitro* del farmaco è stata riscontrata nelle miscele fisiche VCM-HCl-CRG e TCP-CRG, in particolare

quelle contenenti un eccesso di polimero, mentre i prodotti di kneading e di coevaporazione non si sono rivelati adatti a questo scopo.

Il CRG rallenta la cessione *in vitro* di entrambi gli antibiotici attraverso un meccanismo di gelificazione che prolunga il cammino che il farmaco deve percorrere per diffusione all'interno del gel.

La presenza della TA γ Cd non si è invece rivelata determinante ai fini del prolungamento del rilascio dei due antibiotici nei sistemi ternari farmaco-CRG-TA γ Cd 1:1:1 e 1:1:3 in peso.

Per quanto riguarda l'applicazione delle tecniche di cristallizzazione sferica tra cui la SA e la TE, non si è ottenuto esito positivo con nessuno dei principi attivi saggiati in quanto non solo non si è riusciti ad ottenere la precipitazione di un composto di natura cristallina (come del resto prevedibile per la loro natura amorfa), ma non si è nemmeno avuta l'aggregazione delle particelle in agglomerati sferici. Diverso il caso dei carrier TA α Cd, TA β Cd e TA γ Cd per i quali le stesse tecniche hanno condotto ad aggregati di cristalli sferici ben formati. Con modificazioni delle tecniche di SA e TE e in particolare con la CCA applicata a sistemi binari VCM·HCl-TACd, si è riusciti in alcuni casi ad ottenere degli agglomerati sferici che però si sono rivelati costituiti dalla sola TACd, vale a dire completamente privi di antibiotico.

La caratterizzazione dello stato solido amorfo utilizzando le tecniche di DSC e MDSC applicate ai principi attivi (di natura amorfa) e ai carrier (di natura cristallina) amorfizzati per coevaporazione, kneading e dissoluzione a caldo seguita da precipitazione da solventi, come pure alle miscele farmaco-carrier nei rapporti 1:1 e 1:3 (p/p) tal quali e trattate (coevaporate e kneaded), ha escluso effetti termici attribuibili a "glass transition" per i due antibiotici, rilevandola invece in ciascun carrier.

Oltre alla DSC classica è stata applicata la tecnica con modulazione della temperatura (MDSC) per una misura più accurata della "glass transition"

separandola dalla “enthalpic recovery” alla quale è spesso associata. Sono stati così ricavati i valori di temperatura di “midpoint”, ΔC_p e ΔH_{rec} per i singoli carrier e per le rispettive combinazioni binarie con i due antibiotici.

Per quanto concerne i sistemi valutati in termini di IDR dopo invecchiamento in condizioni controllate di temperatura e umidità relativa, il rallentamento del rilascio dei due farmaci è direttamente correlabile al grado di idrofobicità del carrier ($TA\gamma Cd > TA\beta Cd > TA\alpha Cd$) e alla sua frazione di massa nella combinazione con il farmaco ($0,75 > 0,50$). Il massimo rallentamento è stato riscontrato per le miscele fisiche farmaco-carrier contenenti $TA\beta Cd$ e $TA\gamma Cd$ nel rapporto in peso 1:3.

Il trattamento delle miscele fisiche per coevaporazione della rispettiva soluzione idroacetonica e per kneading comporta un ulteriore rallentamento del rilascio rispetto alla miscela non trattata solo nelle combinazioni con $TA\alpha Cd$.

Questo fenomeno può essere attribuito alla minor idrofobicità della $TA\alpha Cd$ rispetto agli omologhi superiori e alla più spiccata interazione di questo carrier con ciascun principio attivo indotta dal trattamento della miscela fisica.

Nel caso dei sistemi di ciascun antibiotico con $TA\beta Cd$ e $TA\gamma Cd$, invece, i trattamenti delle miscele fisiche comportano in ogni caso un rallentamento del rilascio del farmaco inferiore a quello della miscela fisica stessa.

Questo fenomeno può essere spiegato assumendo che nelle miscele fisiche di ciascun antibiotico con gli omologhi superiori della $TA\alpha Cd$, entrambi più spiccatamente idrofobi, si instaurino interazioni (probabilmente di natura elettrostatica) tra le particelle di farmaco e di carrier con formazione di aggregati o agglomerati fisicamente molto stabili. Queste interazioni possono diventare più deboli nelle miscele trattate e di conseguenza il farmaco è ceduto più facilmente al mezzo di dissoluzione. In ogni caso, il rallentamento della cessione dei principi attivi che può essere realizzato in termini di diminuzione dell'IDR dell'antibiotico da solo va da 3 a 10 volte per la $VCM \cdot HCl$ e da 3 a 28 volte per la TCP.

Dal confronto dei valori di IDR delle varie combinazioni farmaco-carrier appena preparate e dopo invecchiamento, si è potuto dimostrare l'assenza di variazioni

sostanziali dei profili di rilascio della VCM·HCl e che quindi la performance in termini di rallentamento di rilascio del farmaco non subisce sostanziali variazioni con l'invecchiamento. Diverso invece il caso delle combinazioni farmaco-carrier contenenti TCP nelle quali è stata riscontrata qualche variazione dei valori di IDR dei sistemi invecchiati rispetto a quelli freschi. La tendenza è l'aumento della IDR (quindi un rallentamento meno spiccato) con l'invecchiamento dei sistemi, fatta eccezione per la combinazione TCP-TAβCd ottenuta per coevaporazione nel rapporto in peso farmaco-carrier 1:1 nella quale l'IDR passa da 0,826 mg cm⁻² min⁻¹ (fresco) a 0,631 mg cm⁻² min⁻¹ (invecchiato).

Bibliografia

- [1] C. Castelli, F.A. Grassi, G. Mineo. Cementi ossei - attualità e prospettive. *Wichtig Editore*.
- [2] B. Magnan, D. Regis, R. Biscaglia, P. Bartolozzi. (2001). Preformed acrylic bone cement spacer loaded with antibiotics. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, vol. 72 (6), pp. 591-594.
- [3] L. Catenacci. Tesi di Dottorato di Ricerca in Biofarmaceutica-Farmacocinetica XVIII ciclo (2003-2005) dal titolo: "Formulazioni basate su ciclodestrine per il rilascio controllato sito-specifico della vancomicina".
- [4] M. Bornhof, M. Thommes, P. Kleinebudde. (2005). Preliminary Assessment of Carrageenan as Excipient for Extrusion/Spheronisation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 59, pp. 127-131.
- [5] F.J. Marshall. (1965). Structure studies on vancomycin. *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 8, pp. 18-22.
- [6] B.K. Hubbard, C.T. Walsh. (2003). Vancomycin assembly: nature's way. *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 42(7), pp. 730-765.

- [7] F. Van Bambeke, Y. Van Laethem, P. Courvalin, P.M. Tulkens. (2004). Glycopeptide antibiotics from conventional molecules to new derivatives. *Drugs*, vol. 64 (9), pp. 913-936.
- [8] B. Perichon, P. Courvalin. (2000). Update on vancomycin resistance. *IJCP Supplement*, vol. 115, pp. 88-93.
- [9] F.D. Daschner, A. Kropec. (1995). Glycopeptides in the treatment of staphylococcal infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 14, pp. S12-S17.
- [10] C. Coronelli, G.G. Gallo, B. Cavalleri. (1987). Teicoplanin: chemical, physico-chemical and biological aspects. *Il Farmaco Ed. Sc.*, vol. 42 fasc. 10, pp. 767-786.
- [11] K. H. Fromming, J. Szeli. (1994). Cyclodextrins in pharmacy. Kluwer Academic Publishers, London.
- [12] D. French, A. O. Oulley, J. A. Effenberg, M. A. Pougvie, M. Abdullah. (1965). Studies on the schardinger dextrans. XII. The molecular size and the structure of the delta-, epsilon-, zeta-, and eta-dextrans. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 111(1), pp. 153-160.
- [13] G. Bettinetti, M. Sorrenti. (2002). Thermal and structural characterization of cyclomaltononaose (δ -cyclodextrin), cyclomaltodecaose (ϵ -cyclodextrin) and cyclomaltotetradecaose (ι -cyclodextrin). *Thermochimica Acta*, vol. 385, pp. 63-71.
- [14] S. P. Jones, D. J. W. Grant, J. Hadgraft, G. Parr. (1984). Cyclodextrins in the pharmaceutical sciences. Part II: pharmaceutical, biological and analytical aspects and applications of cyclodextrins and its inclusion compounds. *Acta Pharmaceutical Technology*, vol. 30(4), pp. 263-277.
- [15] T. Loftsson, M. E. Brewster. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 85, pp. 1017-1025.
- [16] G. Bettinetti, U. Conte, L. Maggi, M. Rillosi, M. Setti. Solid state physicochemical characterisation of α -cyclodextrins, a possibile excipient in tablet

- technology. *Proceeding of 14th Pharmaceutical Technology Conference*. Barcelona 4-6 April 1995, 390.
- [17] K. Matsubara, T. Irie, K. Uekama. (1994). Controlled release of LHRH agonist buserelin acetate from injectable suspensions containing triacetylated cyclodextrins in a oil vehicle. *Journal of Controlled Release*, vol. 31, pp. 173-190.
- [18] V. R. Sinha, A. Nanda, R. Kumria. (2002). Cyclodextrins as Sustained-Release Carriers. *Pharmaceutical Technology*, pp. 36-46.
- [19] K. Uekama, H. Arima, T. Irie, K. Matsubara, T. Kuriki. (1999). Sustained release of buserelin acetate, a luteinizing hormone agonist, from an injectable oily preparation utilizing ethylated β -cyclodextrins. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 41, pp. 874-876.
- [20] K. Harata. (1988). X-ray structure of hexakis (2, 3, 6-tri-O-acetyl)- α -cyclodextrin. *Chemistry Letter* 589-590.
- [21] M. Añibarro, K. Gessler, I. Uson, G. M. Sheldrick, K. Uekama, F. Hirayama, Y. Abe, W. Saenger. (2001). Effect of peracylation of β -cyclodextrins on the molecular structure and on the formations of complexes: an X-ray study. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 123, pp. 11854-11862.
- [22] M. R. Caira, G. Bettinetti, M. Sorrenti, L. Catenacci, D. Cruickshank, K. Davies. (2007). Effect of peracetylation on the conformation of γ -cyclodextrin. *Chemical Communication*, vol. 12, pp. 1221-1223.
- [23] Farmacopea Ufficiale XI Ed.
- [24] V. K. Gupta, M. Hariharan, T. A. Wheatley, J. C. Price. (2001). Controlled release tablets from carrageenans: Effect of formulation, storage and dissolution factors. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 51, pp. 241-248.
- [25] K. M. Picker. (1999). Matrix tablets of carrageenan. II. Release behavior and effects of the added cations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 25(3), pp. 339-346.
- [26] M. C. Bonferoni, S. Rossi, F. Ferrari, M. Bertoni, G. R. Bolhuis, C. Caramella (1998). On the employment of lambda carrageenan in a matrix system.

III. Optimization of a lambda carrageenan. HPMC hydrophylic matrix. *Journal of Controlled Release*, vol. 51, pp. 231-239.

[27] M. C. Bonferoni, S. Rossi, F. Ferrari, G. Bettinetti, C. Caramella (2000). Characterization of a diltiazem-lambda carrageenan complex. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 200, pp. 207-216.

[28] G. Bettinetti, M. Sorrenti, L. Catenacci, F. Ferrari, S. Rossi. (2006). Polymorphism, pseudopolymorphism, and amorphism of peracetylated alpha-, beta-, gamma-cyclodextrins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 41 (4), pp. 1205-1211.

[29] F. Ferrari, S. Rossi, B. Bassi, M. Sorrenti, L. Catenacci, G.P. Bettinetti. Binary mixtures of vancomycin with amorphous and crystalline cyclodextrins for site-specific controlled release. *43° Simposio AFI 2003*, 11-13 giugno 2003.

[30] G.P. Bettinetti, M. Sorrenti, L. Catenacci, F. Ferrari, S. Rossi, M. Ghirardi, C. Caramella. Release of vancomycin from binary systems with amorphous and crystalline acetyl α -, β - and γ -cyclodextrins. *2003 Controlled Release Society 30th Annual Meeting Proceedings*.

[31] F. Ferrari, M. Sorrenti, S. Rossi, L. Catenacci, B. Bassi, C. Caramella, G.P. Bettinetti. Amorphous and crystalline cyclodextrins as carriers for site-specific controlled release of vancomycin. *Proceedings International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*, Nuremberg, 15-18 March 2004.

[32] G.P. Bettinetti, M. Sorrenti, L. Catenacci, S. Setti, F. Ferrari, S. Rossi, P. Carraro. Solid state properties of triacetyl α -, β - and γ -cyclodextrins and potential use for prolonged release of vancomycin. *Proceedings 12th International Cyclodextrin Symposium*, Montpellier, May 16-19 2004.

[33] F. Ferrari, S. Rossi, M. Sorrenti, B. Bassi, L. Catenacci, C. Dacarro, G.P. Bettinetti. Preparazione mediante spray drying di microsfele biodegradabili per la veicolazione di vancomicina e ciclodestrine idrofobiche. *44° Simposio AFI 2004*, 19-21 maggio 2004.

[34] F. Ferrari, S. Rossi, M. Sorrenti, L. Catenacci, C. Dacarro, P. Grisoli, G.P. Bettinetti. Preparation by spray drying of interaction products of vancomycin with

hydrophobic cyclodextrins. *2005 Controlled Release Society 32nd Annual Meeting & Exposition Transactions*.

[35] F. Ferrari, S. Rossi, G. Sandri, M.C. Bonferoni, M. Sorrenti, L. Catenacci, G.P. Bettinetti. Biodegradable alginate microspheres for prolonged release of vancomycin loaded on hydrophobic cyclodextrins. *2005 Controlled Release Society 32nd Annual Meeting & Exposition Transactions*.

[36] G.P. Bettinetti, M. Sorrenti, L. Catenacci, F. Ferrari, S. Rossi. Vancomycin-triacetyl cyclodextrin combinations for prolonged release of vancomycin. *15th International Symposium on Microencapsulation*, Parma (Italy), September 18-21, 2005.

[37] F. Ferrari, S. Rossi, G. Sandri, M.C. Bonferoni, M. Sorrenti, L. Catenacci, G.P. Bettinetti. Chitosan microspheres for prolonged release of vancomycin loaded onto a hydrophobic cyclodextrin. *15th International Symposium on Microencapsulation*, Parma (Italy), September 18-21, 2005.

[38] F. Giordano, R. Bettini. (2003). Process for preparation of inclusion compounds between a non-steroidal anti-inflammatory drug and betacyclodextrin by microwave treatment. International Patent. WO 03/053475 A1.

[39] J.I. Wells. Pharmaceutical preformulation. (1988). The physicochemical properties of drug substances. Ellis Horwood Limited Publisher, Chichester.

[40] Y. Kawashima, S.Y. Lin, M. Ogawa, T. Handa, H. Takenaka. (1985). Preparations of agglomerated crystals of polymorphic mixtures and a new complex of Indomethacin-Epirizole by the spherical crystallization technique. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 74 (11), pp. 1152-1156.

[41] Y. Kawashima, T. Niwa, H. Takeuchi, T. Hino, Y. Itoh, S. Furuyama. (1991). Characterization of polymorphs of tranilast anhydrate and tranilast monohydrate when crystallized by two solvent change spherical crystallization techniques. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 80 (5), pp.472-478.

[42] A.R. Paradkar, A.P. Pawar, J.K. Chordiya, V.B. Patil, A.R. Ketkar. (2002). Spherical crystallization of celecoxib. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 28 (10), pp. 1213-1220.

- [43] F. Yu-ling, C. Fu-de, Y. Ming-shi, J. Yu-bin. (2005). Preparation of enteric microsphere of oleanolic acid dihemiphthalate sodium by salting-out action using spherical crystallization technique. *Acta Pharmaceutica Sinica*, vol. 40 (1), pp. 267-273.
- [44] A.P. Pawar, A.R. Paradkar, S.S. Kadam, K.R. Mahadik. (2004). Crystallo-co-agglomeration: a novel technique to obtain ibuprofen-paracetamol agglomerates. *AAPS PharmSciTech*, vol. 5 (3) articolo 44, pp. 1-8.
- [45] A.P. Pawar, A. Paradkar, S. Kadam, K. Mahadik. (2004). Agglomeration of ibuprofen with talc by novel crystallo-co-agglomeration technique. *AAPS PharmSciTech*, vol. 5 (4) articolo 55, pp. 1-6.
- [46] D.Q.M. Craig, P.G. Royall, V.L. Kett, M.L. Hopton. (1999). The relevance of the amorphous state to pharmaceutical dosage forms: glassy drugs and freeze dried systems. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 179, pp. 179-207.
- [47] R. Surana, A. Pyne, M. Rani, R. Suryanarayanan. (2005). Measurement of enthalpic relaxation by differential scanning calorimetry – effect of experimental conditions. *Thermochimica Acta*, vol. 433, pp. 173-182.
- [48] M. Reading, A. Luget, R. Wilson. (1994). Modulated differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta*, vol. 238, pp. 295-307.
- [49] F. Parenti, B. Cavalleri, (1990). Novel glycopeptide antibiotics of the Dalbaheptide Group. *Drug of the future*, vol. 15(1), pp. 57-72.
- [50] K. Takács-Novák, B. Noszál, M. Tökés-Kövesdi, G. Szász. (1989). Acid-base properties and proton speciation of vancomycin. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 89, pp. 261-263.
- [51] K. Harata. (1998). X-ray structure of Hexakis(2,3,6-tri-acetyl)- α -cyclodextrin. *Chemistry Letters*, pp. 589-590.
- [52] M. Añibarro, K. Gessler, I. Usòn, G.M. Sheldrick, K. Uekama, F. Hirayama, Y. Abe, W. Saenger. (2001). Effect of peracylation of β -cyclodextrins on the molecular structure and on the formation of inclusion complexes: an X-ray study. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 123, pp.11854-11862.

*Google immagini del 18 Dicembre 2008.