POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili

Tesi di Laurea Magistrale

Solubilità dell'idrocortisone in anidride carbonica supercritica con etanolo come co-solvente



Relatori

prof. Luigi Manna

prof. Mauro Banchero

Candidato

Jessica Ferranti

A chi manca da tanto, a chi c'è da poco e a chi sta per arrivare.

Indice

Introduzione	i
1. Fluidi Supercritici	1
1.1 Introduzione ai fluidi supercritici	1
1.2 Proprietà dell'anidride carbonica supercritica	3
1.3 Solubilità di solidi in fluidi supercritici	3
1.3.1 Diagrammi di fase	3
1.3.1.1 Diagrammi di fase binari di tipo I	3
1.3.1.2 Diagrammi di fase solido-fluido supercritico	5
1.3.2 Equilibri di fase solido-fluido supercritico	8
1.3.3 Effetto della pressione e della temperatura sulla solubilità	9
1.3.4 Effetto del co-solvente sulla solubilità	11
1.4 Misure di solubilità	11
1.4.1 Metodo statico	11
1.4.2 Metodo dinamico	13
1.5 Modelli matematici per la solubilità di solidi in anidride carbonica supercritic	<i>a</i> 14
1.5.1 Modelli a composizione costante densità-temperatura	14
1.5.2 Modelli a composizione costante densità-temperatura-pressione	17
1.5.3 Modelli a composizione costante temperatura-pressione	20
1.5.4 Modelli a composizione costante densità-pressione	20
1.5.5 Modelli empirici in presenza di co-solventi	20
2. Farmaci poco solubili in acqua	23
2.1 Aspetti generali della somministrazione di farmaci	23
2.2 Sistema di Classificazione Biofarmaceutico (BCS)	24
2.2.1 Principi cortisonici	26
2.3 Strategie per l'aumento della solubilità di farmaci poco solubili in acqua	27
2.3.1 Microsospensioni e Nanosospensioni	28
2.3.2 Amorfismo e Cristallinità	29
2.4 Processi con fluidi supercritici nella realtà industriale farmaceutica	29
2.4.1 Processi con SCF come solvente	30
2.4.1.1 Rapid Expansion of Supercritical Solutions (RESS)	30
2.4.1.2 Rapid Expansion of Supercritical Solution into a Liquid Solvent (RE	
2.4.1.3 Rapid Expansion from Supercritical to Aqueous Solution (RESAS)	
2.4.1.4 Particle formation from Gas Satured Solution (PGSS)	
2.4.2 Processi con SCF come anti-solvente	

2.4.2.1 Gaseous Anti-Solvent (GAS)	33
2.4.2.2 Supercritical Antisolvent (SAS)	
2.4.2.3 Supercritical Fluid Extraction of Emulsion (SFEE)	
2.4.3 Processi con SCF come agente nebulizzante	
2.4.3.1 Carbon dioxide Assisted Nebulization with Bubble Dryer (CAN-BD)	35
2.4.3.2 Supercritical Fluid-Assisted Atomization (SAA)	36
3. Materiali e Metodi	37
3.1 Idrocortisone	37
3.2 Metodi Sperimentali	38
3.2.1 Funzionamento dell'apparecchiatura	38
3.2.2 Condizioni operative	39
3.2.3 Descrizione dei componenti	39
3.2.4 Descrizione della procedura eseguita	43
3.2.4.1 Operazioni preliminari	43
3.2.4.2 Messa in marcia del sistema	44
3.2.4.3 Esecuzione delle prove	45
3.2.4.4 Messa in arresto del sistema	46
3.3 Analisi chimica dei campioni	47
3.3.1 Spettroscopia UV	47
4. Interpretazione dei Risultati	51
4.1 Solubilità misurata dell'idrocortisone	51
4.2 Analisi dei dati sperimentali	59
4.2.1 Regressione dei dati sperimentali	59
4.2.2 Confronto dei modelli	61
4.2.3 Effetto delle variabili termodinamiche	67
4.2.3.1 Effetto della pressione e della temperatura	68
4.2.3.1 Effetto della composizione dell'alimentazione	70
4.3 Confronto con i dati di letteratura	71
Conclusione	73
Appendice	75
Bibliografia	
Ringraziamenti	107

Introduzione

Negli ultimi decenni, i fluidi supercritici si stanno affermando come una valida alternativa ai processi utilizzanti solventi organici, nocivi sia per l'ambiente che per la salute dell'uomo. Esempi di tali processi sono quelli estrattivi, di micronizzazione e di impregnazione che trovano applicazione in ambito alimentare, naturale e farmaceutico per il trattamento di prodotti termolabili.

In particolare, nell'industria farmaceutica l'attenzione è rivolta allo sviluppo di nuovi farmaci che mostrano, però, una solubilità bassa in ambiente acquoso. La solubilità è strettamente connessa al concetto di biodisponibilità, intesa come percentuale di farmaco somministrato che giunge al circolo ematico ed espleta la sua azione curativa. La dissoluzione di tali farmaci nel tratto gastro-intestinale può essere, quindi, favorita dall'aumento della superficie specifica tra solido e biofluido tramite, ad esempio, riduzione della dimensione delle particelle. I processi meccanici di comminuzione non sono adatti perché danneggerebbero il prodotto e per questo motivo sono da preferirsi processi di micronizzazione tramite l'ausilio dei fluidi supercritici come anti-solventi al fine di produrre particelle dell'ordine dei micro o dei nanometri.

La solubilità del solido è, allora, un parametro fondamentale per la fattibilità e lo sviluppo di questi processi e il suo andamento non è sempre prevedibile tramite l'utilizzo di equazioni termodinamiche che richiedono l'utilizzo di dati non disponibili o difficili da stimare.

Lo scopo di questa tesi è ottenere delle misure di solubilità dell'idrocortisone in anidride carbonica supercritica con etanolo come modificante. L'utilizzo del solvente organico è giustificato perché l'anidride carbonica è un solvente poco polare e non adatto a solubilizzare farmaci di natura polare.

Il seguente lavoro di tesi è suddiviso in quattro capitoli: nel primo capitolo sono riportate le caratteristiche generali dei fluidi supercritici, una breve trattazione dei diagrammi di fase, le metodologie disponibili per l'esecuzione di misure di solubilità e, infine, i modelli di natura empirica applicati durante l'elaborazione dei dati.

Il secondo capitolo tratta dei farmaci poco solubili in acqua descrivendo il processo di somministrazione per via orale, il sistema di classificazione farmaceutica (BCS) e l'appartenenza dei principi cortisonici alla II classe, concludendo con una breve trattazione delle strategie per aumentare la solubilità e i processi utilizzati nella realtà industriale farmaceutica.

Nel terzo capitolo si riporta in dettaglio la descrizione delle apparecchiature e della procedura eseguita in laboratorio per l'ottenimento dei dati di solubilità del principio attivo.

Nell'ultimo capitolo sono presentati e analizzati i dati ottenuti durante la sperimentazione. Questi dati vengono regrediti tramite l'uso di modelli empirici che correlano la solubilità del solido alla densità della miscela, alla temperatura e alla pressione. La funzione obiettivo della regressione è la minimizzazione della deviazione relativa assoluta media e determinare così i parametri delle correlazioni tramite il software MATLAB della suite MathWorks[®].

1. Fluidi Supercritici

1.1 Introduzione ai fluidi supercritici

Un fluido al di sopra delle condizioni critiche di temperatura e pressione si definisce supercritico ed è paragonabile contemporaneamente ad un liquido espanso e ad un gas compresso. Le proprietà chimico-fisiche di un composto, allora, sono strettamente connesse alle condizioni a cui è sottoposto, come è possibile notare dal diagramma di fase di un componente puro mostrato in figura 1.1:

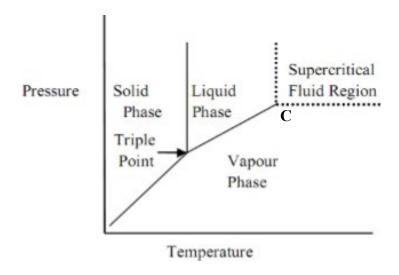


Figura 1.1: Diagramma di fase per un componente puro.

L'esistenza della regione supercritica deriva dalla crescita limitata della curva di vaporizzazione che si estende dal punto triplo (coesistenza dei tre stati della materia) fino a raggiungere il punto critico C in cui l'equilibrio liquido-vapore non sussiste ulteriormente [1]: in questa zona, le diverse combinazioni di pressione e temperatura modificano il potere solvente del composto. Nel caso in cui il composto puro sia anidride carbonica, dalla figura 1.2, è possibile visualizzare la transizione allo stato supercritico in cui non si ha più una netta distinzione della fase gassosa e liquida evidente nel primo fotogramma, incrementando pressione e temperatura.

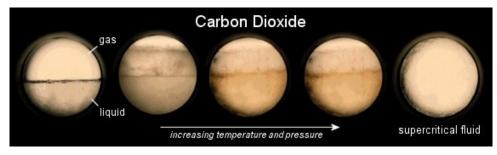


Figura 1.2: Transizione del biossido di carbonio allo stato supercritico, NASA (2003).

Oggi, i fluidi supercritici (SCF) vengono impiegati principalmente nel campo dell'estrazione di principi farmaceutici e naturali in sostituzione ai solventi organici al fine di ottenere processi con un minore impatto ambientale [2], ma la prima vera applicazione industriale risale al 1943 in cui i fluidi supercritici vennero impiegati per la rimozione della componente asfaltenica dal greggio.

Tuttavia, tali processi estrattivi si avvalgono dalle proprietà che rendono i fluidi supercritici interessanti e sono riportate schematicamente in tabella 1.1:

Tabella 1.1: Principali proprietà per lo stato gassoso, liquido e supercritico.

Densità, g/ml	Diffusività, cm²/s	Viscosità, g/cm³s
10-3	10-1	10-4
1	10 ⁻⁶	10-2
0,2-0,8	10-3	10 ⁻⁴
	1	10 ⁻³ 10 ⁻¹ 1 10 ⁻⁶

I fluidi supercritici, quindi, sono caratterizzati da valori di densità analoghi ai liquidi e coefficienti di viscosità simili ai gas, mentre la diffusività risulta essere intermedia tra lo stato liquido e quello gassoso.

In tabella 1.2, si riportano alcuni dei solventi possibili da usare allo stato supercritico: si evince che gli idrocarburi, oltre ad essere infiammabili, tossici e non adatti alle applicazioni farmaceutiche, hanno valori critici più alti.

Tabella 1.2: Proprietà critiche di alcuni composti.

Composto	T _c , K	Pc, bar
Acqua	647,6	22,1
Anidride carbonica	304,3	7,4
Benzene	562,2	4,9
Etano	305,6	4,9
Etilene	282,5	5,1
Metanolo	513,7	7,9

1.2 Proprietà dell'anidride carbonica supercritica

L'anidride carbonica allo stato supercritico (SC-CO₂) è spesso utilizzata in processi di estrazione data la sua natura non infiammabile, atossica, inerte e per il suo basso costo. Tra i vantaggi che derivano dalla scelta di usare questo composto vi sono, inoltre, una forte permeabilità che riduce il tempo di estrazione e la capacità di diffondere attraverso matrici d'interesse con maggiore facilità data la minore dimensione molecolare rispetto alla maggioranza dei solventi organici. Inoltre, le condizioni critiche modeste di temperatura e pressione ($T_c = 31,1$ °C; $P_c = 72$ bar) sono adatte a trattare prodotti termolabili come quelli appartenenti alle categorie già citate nel paragrafo 1.1.

Tale aspetto, quindi, contribuisce all'affermazione delle tecnologie che utilizzano la SC-CO₂ nei processi di estrazione in supercritico e che vengono definite "green" per i motivi elencati.

L'anidride carbonica è per sua natura un solvente poco polare affine ai composti lipofili come epossidi, esteri o eteri in un range di pressione non troppo esteso [3]. La maggior parte dei farmaci sono però composti organici polari per cui la SC-CO₂ non può essere considerata un solvente opportuno. Allora, la solubilità di tali sostanze può essere notevolmente incrementata attraverso l'uso di alcuni co-solventi come alcoli e idrocarburi a catena corta, esempi sono metanolo, etanolo, n-esano e acetone [4].

1.3 Solubilità di solidi in fluidi supercritici

La solubilità di solidi in fluidi supercritici è un parametro fondamentale per la fattibilità e lo sviluppo del processo, la sua determinazione richiede spesso tempo e denaro: valori bassi di solubilità sono richiesti in processi in cui il fluido supercritico si comporta da antisolvente, mentre alti valori di solubilità sono necessari in processi di estrazione in cui il fluido si comporta da solvente, come sarà chiaro nel capitolo successivo di questa tesi.

1.3.1 Diagrammi di fase

Al fine di ottimizzare un processo che sfrutta le proprietà dei fluidi supercritici, diversi parametri devono essere presi in considerazione ma è chiaro che, tra gli studi preventivi necessari, il passo fondamentale risiede nella conoscenza del diagramma di fase del sistema d'interesse.

Scott e van Konynenburg (1968) hanno dimostrato che l'equazione di stato di van der Waals, se applicata a miscele, è in grado di predire qualitativamente un buon numero di diagrammi osservati in laboratorio [5]: da qui, il raggruppamento in 5 categorie principali.

Tuttavia, il sistema fluido supercritico-modificante di questo lavoro di tesi, rientra a far parte nei diagrammi binari di tipo I e, per questo motivo, una breve trattazione viene riportata di seguito.

1.3.1.1 Diagrammi di fase binari di tipo I

Una miscela, caratterizzata da due composti con un ingombro sterico e parametri critici di medesimo ordine di grandezza, esibisce un diagramma di fase appartenente a questa tipologia. Nel diagramma P-T in figura 1.3, è possibile evidenziare la presenza di una curva

critica che si estende dal punto critico del composto più volatile a quello meno volatile ($T_{c1} < T_{c2}$).



Figura 1.3: Diagramma P-T per un sistema binario di tipo I.

Consideriamo inizialmente di lavorare a T₁ costante e a pressione crescente, ciò equivale a tracciare una retta verticale, sul diagramma P-T, intersecante le curve di tensione di vapore dei due composti puri. Sul diagramma P-x raffigurato in figura 1.4 (a), allora, si riporta la tradizionale curva liquido-vapore risultante i cui punti estremi indicano i valori di tensione di vapore dei componenti della miscela.

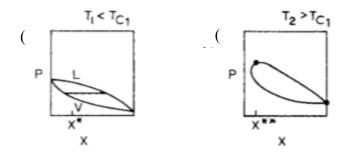


Figura 1.4: Diagrammi P-x per un sistema binario di tipo I a $T_1 \le T_{c1}$ (a) ed a $T_2 \le T_{c1}$ (b).

Successivamente, si eseguono delle prove a T₂ maggiore della temperatura critica del composto più volatile ma minore della temperatura critica del composto pesante.

In questo secondo caso la forma del diagramma P-x è riportata nella figura 1.4 (b): incrementando il valore di pressione, la nuova isoterma interseca solo la curva di vaporizzazione del componente più pesante e, quindi, sarà riportato solo un valore di tensione di vapore sul diagramma P-x. Il punto contraddistinto come x** è il punto critico della miscela, per valori di pressioni maggiori si ha la fase supercritica.

A valori di temperatura maggiori ma inferiori a T_{c2}, il comportamento riscontrato dal sistema è analogo a quest'ultimo caso ma con la differenza che la forma della curva si assottiglia e si sposta a valori di pressione più alta.

Se, infine, la temperatura risulta maggiore di quella critica del composto pesante, allora, il sistema è caratterizzato dall'assenza della zona bifasica poiché entrambi i componenti della miscela sono allo stato supercritico [6].

Il limite di visualizzare il comportamento del sistema mediante i diagrammi P-T è l'assenza di informazioni relative alla composizione e alla densità, allora, si fa uso di diagrammi tridimensionali P-T-x con x frazione molare del componente pesante: il diagramma P-T-x è la somma di tanti diagrammi P-x a temperatura costante e viene riportato in figura 1.5.

Dalla rappresentazione, inoltre, è possibile definire la curva critica come il luogo dei punti critici delle curve di miscibilità per ogni condizione di temperatura.

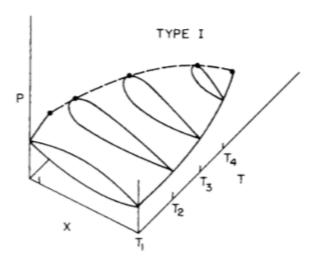


Figura 1.5: Diagramma P-T-x per un sistema binario di tipo I.

Infine, in figura 1.6 a titolo di esempio, viene mostrata la curva bifasica di un sistema anidride carbonica-etanolo ottenuta per un valore di temperatura pari a 373,2 K [7].

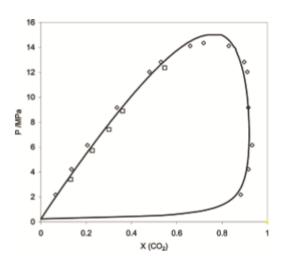


Figura 1.6: Diagramma P-x a T=373,2 K per un sistema binario CO₂-EtOH di tipo I.

Per una miscela con concentrazione inferiore a circa il 15% molare di modificante ad alte pressioni si rientra nella zona monofasica supercritica, all'interno della quale vengono condotte le prove sperimentali riportate in questa tesi.

1.3.1.2 Diagrammi di fase solido-fluido supercritico

Un'altra tipologia importante e attinente di questi diagrammi è rappresentata dal binomio solido-fluido supercritico, in cui il solido sarà il composto pesante e il fluido quello leggero.

In letteratura è possibile distinguere due tipologie di diagrammi P-T per i sistemi d'interesse [6].

Il primo è mostrato in figura 1.7 e si definiscono le curve EM, MH e MN rispettivamente come le curve di sublimazione, di vaporizzazione e di fusione del solido.

Invece, la curva CD rappresenta la curva di tensione di vapore del fluido supercritico. Da questa analisi, risulta abbastanza semplice definire i punti D e H come i punti critici dei composti puri, la cui unione individua la curva critica [6].

Analizzando attentamente il diagramma P-T si rileva, inoltre, la presenza della curva solido-liquido-vapore (SLV line) che ha inizio alla temperatura di fusione del solido e termina ad un valore inferiore a quello critico del composto più volatile.

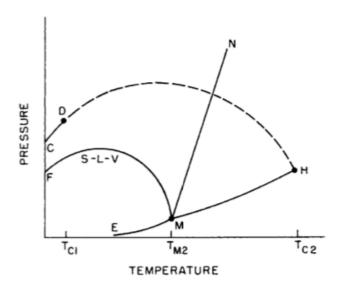


Figura 1.7: Diagramma P-T per il sistema binario solido-SCF.

Tramite la curva SLV si introduce il concetto di "depressione del punto di fusione" di un solido che si manifesta all'aumentare della pressione in sistemi binari come β -sitosterol-CO2 o naftalene-CO2 [8]. Tale abbassamento di temperatura è legato alla solubilità del fluido supercritico nella fase liquida che si sta formando dal solido.

Tuttavia, ciò che differisce questo diagramma P-T dal successivo, mostrato in figura 1.8, è l'andamento della curva SLV: il ramo della curva a valori bassi di temperatura interseca la curva tratteggiata in lower critical end point (LCEP) mentre il ramo della curva a valori alti di temperatura incontra la curva critica in upper critical end point (UCEP).

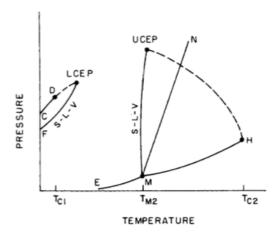


Figura 1.8: Diagramma P-T per il sistema binario solido-SCF.

Questo secondo caso si realizza in sistemi i cui componenti differiscono notevolmente in struttura e dimensione.

In generale, la conoscenza della SLV line permette di progettare in maniera opportuna i processi di micronizzazione di solidi ad alto valore aggiunto: ad esempio se tale curva esibisce un minimo di temperatura è il valore minimo che può essere raggiunto nella conduzione del processo.

È utile ricordare che, per definizione, LCEP e UCEP sono dei punti in cui la fase vapore e la fase liquida si uniscono in una sola fase critica in presenza della fase solida non critica. Infine, il diagramma P-T-x per i sistemi con SLV line continua è mostrato in figura 1.9 ma la sua costruzione viene omessa in quanto basata su procedure e considerazioni analoghe a quelle già descritte per il sistema binario di tipo I.

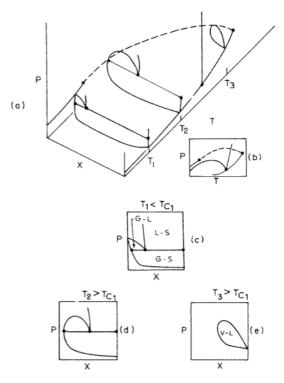


Figura 1.9: Diagramma P-T-x (a), P-T (b) e P-x (c) (d) (e) per i sistemi binari solido-SCF.

1.3.2 Equilibri di fase solido-fluido supercritico

La solubilità di un solido non volatile in un fluido supercritico può essere determinata da un punto di vista termodinamico uguagliando f_i^{SCF} e f_i^{S} , rispettivamente la fugacità del solido nella fase supercritica e la fugacità del soluto nella fase solida:

$$f_i^{SCF} = f_i^S \tag{1.1}$$

Il primo termine dell'equazione può essere espresso con la formulazione 1.2 in cui compare la frazione y_i di soluto nel fluido, ϕ_i^{SCF} il coefficiente di fugacità del fluido supercritico e la pressione operativa P.

$$f_i^{SCF}(T, P, y_i) = y_i \phi_i^{SCF} P \tag{1.2}$$

Per quanto riguarda il secondo termine, invece, il solido viene modellato come una fase pura (apice OS), soprattutto se il solido è cristallino.

$$f_i^{OS}(T, P) = P_i^{SAT}(T)\phi_i^{SAT}(T)\exp\left\{\frac{1}{RT}\int_{P_i^{SAT}}^{P}\nu_i^{OS} dP\right\}$$
 (1.3)

A secondo membro nell'equazione sopra riportata definiamo: P_i^{SAT} pressione di saturazione del solido puro, ϕ_i^{SAT} coefficiente di fugacità del solido a temperatura T e pressione P_i^{SAT} , R costante dei gas, v_i^{OS} volume molare del solido mentre il termine esponenziale è un termine correttivo introdotto da Poynting [9].

Tuttavia, l'equazione viene semplificata assumendo il volume molare del solido indipendente dalla pressione per la sua incomprimibilità e un coefficiente di fugacità unitario poiché la pressione di saturazione di un solido cristallino è inferiore a 1 bar.

$$f_i^{SAT}(T, P) = P_i^{SAT}(T) \exp\left\{\frac{(P - P_i^{SAT})\nu_i^{OS}}{RT}\right\}$$
 (1.4)

Successivamente, dall'uguaglianza delle espressioni 1.2 e 1.4 si ricava l'equazione 1.5, in cui il termine di solubilità è messo in evidenza:

$$y_i = \frac{P_i^{SAT} \exp\left\{\frac{\left(P - P_i^{SAT}\right)\nu_i^{OS}}{RT}\right\}}{\phi_i^{SCF} P} \tag{1.5}$$

A temperatura costante, è stato osservato che la solubilità del solido nella fase supercritica aumenta con la pressione, ma a pressioni molto alte, in cui le forze repulsive delle molecole vincono quelle attrattive, la solubilità diminuisce. Tale comportamento viene spiegato attraverso ϕ_i^{SCF} indice della differenza tra il comportamento reale e ideale in cui le molecole non interagiscono: ϕ_i^{SCF} diminuisce e, quindi, la solubilità aumenta se le molecole di soluto e solvente sono vicine.

Il coefficiente di fugacità del solido nella fase supercritica è espresso dalla relazione:

$$RT \ln \phi_i^{SCF} = \int_{\infty}^{\nu} \left[\left(\frac{\partial P}{\partial n_2} \right)_{T,\nu,n_1} - \frac{RT}{\nu} \right] d\nu - RT \ln \frac{P\nu}{RT}$$
 (1.6)

in cui appaiono n_1 , n_2 il numero di moli rispettivamente del fluido e del solido e ν il volume molare della miscela.

La risoluzione del termine integrale richiede però l'uso di un'equazione di stato (EOS). Molti modelli sono attualmente disponibili (Statistical Associating Fluid Theory, Perturbed Lennard-Jones Chain Equation, ecc..) ma nella seguente trattazione viene riportata la Peng-Robinson (PR EOS) utilizzata ampiamente per modellare soluti polari e non polari in fluidi

allo stato supercritico e presenta l'ulteriore vantaggio di essere matematicamente semplice da manipolare [10].

$$P = \frac{RT}{\nu - b} - \frac{a}{\nu(\nu + b) + b(\nu - b)} \tag{1.7}$$

Allora, l'espressione risultante è:

$$\ln \phi_i^{SCF} = \frac{b_i}{b} \left(\frac{P\nu}{RT} - 1 \right) - \ln \left[\frac{P(\nu - b)}{RT} \right] - \frac{a}{2\sqrt{2}bRT} \left[\frac{2\sum_j y_i a_{ij}}{a} - \frac{b_i}{b} \right] \ln \left[\frac{\nu + (1 + \sqrt{2})b}{\nu + (1 - \sqrt{2})b} \right] \tag{1.8}$$

I parametri *a* e *b* vengono stimati con le regole di miscelazione e di combinazione allo scopo di migliorare la coerenza tra i dati ottenuti mediante equazioni di stato e quelli sperimentali.

Un esempio di tali relazioni è stato riportato nell'espressione 1.9 e rappresentano un caso particolare delle regole proposte da van der Waals.

$$a = \sum_{i} \sum_{j} y_i y_j a_{ij} \qquad b = \sum_{i} y_i b_i \qquad a_{ij} = \sqrt{a_i a_j} (1 - k_{ij})$$

$$(1.9)$$

In aggiunta, è importante ricordare che i parametri a e b dei componenti puri sono funzione dei parametri critici, della tensione di vapore saturo e del fattore acentrico. Tali proprietà devono essere determinate e usate come dati di ingresso al modello. Nel caso in cui i dati non possono essere ottenuti sperimentalmente, l'utilizzo di metodi dei contributi di gruppo è una valida alternativa per stimarli, conferendo, però, all'equazione di stato un carattere semi-empirico.

1.3.3 Effetto della pressione e della temperatura sulla solubilità

Come dimostrato in molti studi, la solubilità di un solido in fluidi supercritici è funzione della pressione e della temperatura.

È risaputo, inoltre, che incrementando la pressione anche la solubilità del solido aumenta ad una data temperatura.

L'effetto della temperatura, invece, si esplica attraverso due fenomeni legati alla tensione di sublimazione del solido e la densità del sistema. In generale, elevati valori di questi parametri conducono all'aumento di solubilità ma tali aspetti sono opposti: a temperature maggiori la tensione di sublimazione del soluto aumenta rendendo il principio attivo più solubile ma la densità della soluzione diminuisce simultaneamente e, quindi, il potere solvente della miscela [10].

Questi due fattori conducono all'instaurarsi del punto di cross-over alla pressione di circa 150 bar per il sistema riportato in figura 1.10.

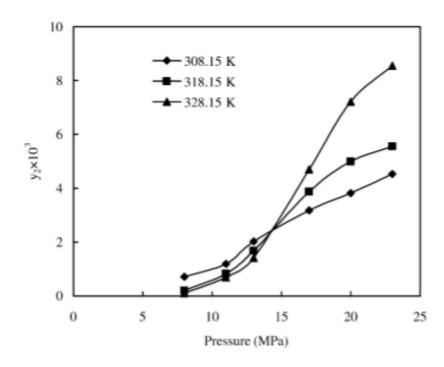


Figura 1.10: Effetto della pressione sulla solubilità dell'acido benzoico in SC-CO₂ con etilacetato ed etanolo.

Tuttavia, la solubilità di un soluto non aumenta in maniera indefinita con la pressione ma giunge un valore per cui la solubilità rimane costante, poiché le forze repulsive tra le molecole vincono su quelle attrattive. Quindi, in figura 1.11, è mostrato l'andamento della solubilità dell'idrocortisone in SC-CO₂ con etanolo come modificante investigato in laboratorio alla temperatura di 55°C e in un campo di pressione che si estende tra 130 bar e 330 bar.

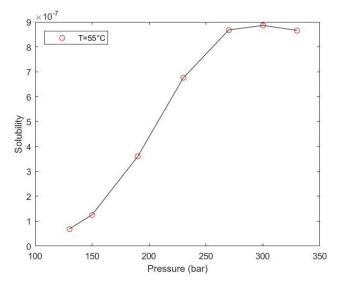


Figura 1.11: Andamento della solubilità dell'idrocortisone in SC-CO₂+EtOH in funzione della densità a 328,15 K.

1.3.4 Effetto del co-solvente sulla solubilità

L'idea di utilizzare co-solventi, anche detti modificanti, per accrescere la solubilità di prodotti ad alto valore aggiunto in SC-CO2 ha ricevuto attenzione per diversi anni ma ben pochi sono gli studi reperibili in letteratura.

Sperimentalmente è stato osservato che un modificante esplica la sua azione di incremento nei confronti della solubilità e della selettività del soluto in anidride carbonica supercritica attraverso un maggior numero di interazioni tra molecole di co-solvente e quelle di solvente e, più in dettaglio, all'instaurarsi di legami idrogeno per composti solubili in acqua.

Alcuni ricercatori, hanno affermato che la molecola di co-solvente si "estende" attorno al soluto e ciò comporta anche l'elaborazione di un modello basato sull'assunzione che la composizione locale in prossimità del soluto sia diversa da quella nel cuore della soluzione per tenere conto anche del suo effetto [11].

Oltre ai co-solventi liquidi, citati nel paragrafo 1.2 e ampliamente utilizzati in ambito industriale, è possibile trovare anche esempi di tipo solido come il mentolo. In quest'ultimo caso, il vantaggio principale nell'adoperarlo è la possibilità di allontanamento dalla soluzione tramite un processo di sublimazione [4].

Per comparare e quantificare l'effetto del co-solvente è stato introdotto il parametro R_{CE}, definito come il rapporto tra la solubilità in presenza e in assenza del modificante [12].

In generale, vengono riportate di seguito le 3 casistiche possibili:

- R_{CE} > 1 a tutte le pressioni e decresce all'aumentare di quest'ultima;
- R_{CE} < 1 il modificante assume il ruolo di anti-solvente;
- $R_{CE} = 1$ indica l'assenza del co-solvente nel processo d'interesse.

1.4 Misure di solubilità

I principali metodi che permettono di ottenere una misura della solubilità del soluto in anidride carbonica supercritica sono due:

- Metodo statico:
- Metodo dinamico.

1.4.1 Metodo statico

Nel metodo statico, la cella di equilibrio, contenente il solido da solubilizzare, è posta all'interno di un ambiente a temperatura costante e in pressione con la fase supercritica fino al raggiungimento delle condizioni di saturazione.

A seconda della tipologia di reattore usato, si hanno due differenti tecniche:

- Analitica;
- Gravimetrica

Nel primo metodo, quello analitico, si adopera una cella a volume costante in cui il soluto è in equilibrio con la fase supercritica.

In figura 1.12 viene riportato lo schema del processo.

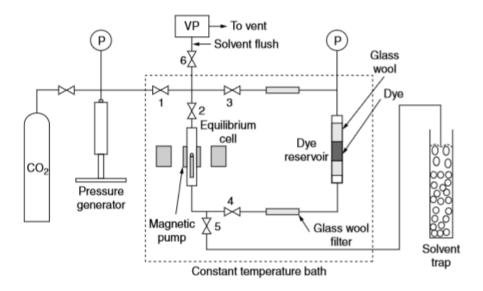


Figura 1.12: Schema per l'esecuzione di misure di solubilità con un metodo analitico.

La pompa magnetica ha lo scopo di garantire il continuo contatto intimo tra soluto e solvente attraverso il ricircolo di quest'ultimo al fine di ridurre notevolmente il tempo necessario al raggiungimento delle condizioni di equilibrio.

Successivamente, un campione della soluzione viene prelevato attraverso la valvola contrassegnata dal numero 5 e inviata in trappola, come in figura, oppure ad un cromatografo (HPLC) per l'analisi in continuo [13].

Nel metodo gravimetrico, diversamente da quanto esposto fino ad adesso, l'autoclave è caratterizzato al suo interno dalla presenza di fialette che contengono una quantità nota del composto da solubilizzare.

In figura 1.13 è riportato il particolare dell'interno dell'autoclave in esame.

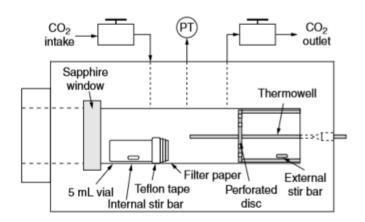


Figura 1.13: Particolare della cella di equilibrio utilizzata per il metodo gravimetrico.

Il coperchio della fiala è tale da essere permeato dal fluido ma non può essere attraversato dalle particelle di soluto in fase solida, solo quando il principio attivo risulta disciolto nella fase supercritica viene trascinato fuori. Si attende un tempo necessario affinché la concentrazione nel cuore della fase fluida risulta essere pari a quella all'interno della fiala.

Infine, l'autoclave viene depressurizzata alla pressione atmosferica e la quantità di composto finale all'interno della fiala viene pesata.

Tuttavia, tale tecnica presenta lo svantaggio principale di essere adoperata solo per quei composti con una solubilità maggiore di 10⁻³ molare, che adsorbono una quantità trascurabile di solvente e non fondono quando processati.

1.4.2 Metodo dinamico

Lo schema, in figura 1.14, permette di descrivere il processo per le misure di solubilità in dinamico, riprodotto all'interno del laboratorio di Fluidi Supercritici, dipartimento di Scienze e Tecnologie Applicate (DISAT), Politecnico di Torino.

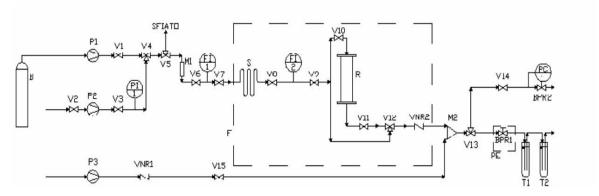


Figura 1.14: Schema per l'esecuzione di misure di solubilità con un metodo dinamico.

All'interno dell'autoclave è posto il soluto che viene estratto alla pressione e alla temperatura di interesse.

Diversamente dal metodo statico, in dinamico la cella viene continuamente attraversata dalla fase supercritica costituita dal solo solvente o dalla miscela solvente-cosolvente in percentuali opportune.

Successivamente, la soluzione viene fatta espandere alla pressione atmosferica tramite una valvola micrometrica riscaldata ed il principio attivo precipita in trappole di un solvente organico in cui il soluto è solubile [13]

La misura di solubilità finale può essere condotta attraverso analisi spettroscopiche o gravimetriche.

I vantaggi di questo processo risiedono nella semplicità di condurre l'operazione e la velocità del raggiungimento delle condizioni di equilibrio garantendo la raccolta di numerosi dati in un tempo ragionevole. Viceversa, gli svantaggi riguardano principalmente la facilità di occlusione della valvola riduttrice per la rapida espansione della miscela con formazione di ghiaccio secco e/o per la precipitazione di soluto con perdita del fattore riproducibilità nelle misure data la minore quantità di principio attivo che giunge in trappola.

Per una descrizione più dettagliata della procedura si rimanda al capitolo 3 di questa tesi.

1.5 Modelli matematici per la solubilità di solidi in anidride carbonica supercritica

La modellazione matematica dei dati permette di predire la solubilità di un solido alla pressione e alla temperatura d'interesse attraverso l'utilizzo di poche misure sperimentali allo scopo di velocizzare la fase successiva di sviluppo del processo [14].

La modellazione matematica, inoltre, include tre categorie principali:

- un singolo soluto nel fluido supercritico;
- più soluti nel fluido supercritico;
- un singolo soluto in una miscela supercritica o un fluido supercritico con un solvente organico.

Se consideriamo il caso di un soluto nel fluido supercritico, anidride carbonica nello specifico, i modelli vengono ulteriormente suddivisi in modelli di tipo teorici o semi-empirici e modelli empirici [14].

I primi, come già accennato nel paragrafo 1.3.2, richiedono procedure onerose dal punto di vista computazionale e i valori delle proprietà chimico-fisiche del solido, non sempre facili da reperire, influenzano sulla qualità della predizione della solubilità [15]. Ad esempio, per solidi ad alto peso molecolare, la tensione di vapore gioca un ruolo importante nella congruenza tra la solubilità teorica e quella misurata: è possibile trovare articoli che comparano la solubilità determinata utilizzando la tensione di vapore dalla letteratura e dalle equazioni di stato, mostrando che quest'ultime garantiscono una maggiore coerenza tra i dati [16].

La seconda classe di modelli, invece, è una valida alternativa a quanto esposto e, per la maggior parte di essi, non è richiesta la conoscenza delle proprietà del solido ma, di contro, la loro applicazione è limitata al campo di temperatura e pressione dei dati sperimentali ed includono dei parametri che devono essere ricalcolati per ogni soluto facendo emergere così la loro natura empirica [17]. Tali modelli, inoltre, sono incentrati sulla minimizzazione dell'errore tramite il metodo dei minimi quadrati per determinare i coefficienti del modello e correlano la solubilità con la densità del fluido supercritico, la temperatura e la pressione a cui sono condotte le analisi.

In generale, il numero di parametri varia da 3 a 10 e le relazioni proposte non sono solo di tipo esponenziale ma, in alcuni casi, è possibile riscontrarne di tipo non lineare più complicate tra le variabili già definite.

Nel capitolo 4 di questo lavoro di tesi, sono state adoperate diverse correlazioni empiriche, riportate di seguito e suddivise in modelli a composizione costante, utilizzate in letteratura per la solubilità di un soluto in anidride carbonica supercritica, e modelli che tengono conto della presenza di co-solventi.

In tutte le espressioni elencate, la pressione è espressa in bar, la temperatura in K, la densità in kg/m^3 , la solubilità y_2 e la quantità di modificante y_3 in frazione molare.

1.5.1 Modelli a composizione costante densità-temperatura

Modello di Chrastil

Supponiamo il caso ideale in cui una molecola di soluto A interagisce con k molecole di solvente B per formare un complesso solvatato AB_k in equilibrio con il sistema [18]:

$$A + kB \leftrightarrow AB_k$$
 (1.10)

Da cui:

$$K = \frac{[AB_k]}{[A][B]^k} \tag{1.11}$$

Utilizzando i logaritmi, l'equazione 1.11 può essere riscritta come:

$$\ln K + \ln[A] + k \ln[B] = \ln[AB_k] \tag{1.12}$$

Tramite l'uso dell'equazione di Clausius-Clayperon è possibile esprimere la concentrazione molare di soluto in funzione del calore di vaporizzazione e di una costante:

$$\ln[A] = \frac{\Delta H_{vap}}{RT} + q_v \tag{1.13}$$

Analogamente, la costante di equilibrio è dipendente dal calore di solvatazione:

$$K = \frac{\Delta H_{solv}}{RT} + q_s \tag{1.14}$$

Assumendo [A] \ll [AB_k] e combinando la 1.13 e 1.14 con 1.12 si ottiene:

$$\frac{\Delta H}{RT} + q + k \ln[B] = \ln[AB_k] \tag{1.15}$$

in cui ΔH rappresenta il calore totale di reazione.

Il passo successivo necessario per giungere all'equazione d'interesse è trasformare le concentrazioni molari in massiche, utilizzando opportunamente i pesi molecolari.

Si ottiene l'espressione di seguito riportata:

$$\frac{\Delta H}{RT} + q + k \ln \rho - k \ln M_B = \ln y_i - \ln(M_A + k M_B)$$
 (1.16)

Anche nota come:

$$y_2 = \rho^{b_1} \exp\left(b_2 + \frac{b_3}{T}\right) \tag{1.17}$$

con y_2 solubilità del solido nella fase fluida, b_1 è il numero di associazione e rappresenta il numero medio di molecole di anidride carbonica nel complesso solvatato, il coefficiente b_2 è funzione del numero di associazione, peso molecolare del soluto e del fluido supercritico e, infine, b_3 è funzione dell'entalpia di vaporizzazione e di solvatazione.

Le limitazioni di questo modello, in conclusione, sono legate ad una finestra operativa di temperatura e pressione non molto estesa e ad una concentrazione di soluto compresa tra 100-200 g/L [19].

Modello di Adachi e Lu

Una volta ottenuti un elevato numero di dati sperimentali, nuovi modelli sono stati proposti da diversi autori per superare gli svantaggi di quello proposto, nel 1982, da Chrastil e allo scopo di incrementare la qualità della correlazione [17].

Il contributo apportato da Adachi e Lu, solo un anno più tardi (1983), è esprimere il numero di associazione attraverso un polinomio di secondo grado della densità del fluido supercritico.

$$y_2 = \rho^{(b_1 + b_2 \rho + b_3 \rho^2)} \exp\left(b_4 + \frac{b_5}{T}\right)$$
 (1.18)

con b_1 , b_2 , b_3 , b_4 e b_5 coefficienti da determinare tramite la regressione dei dati sperimentali.

Modello di del Valle e Aguilera

Contemporaneamente al modello precedente, del Valle e Aguilera proposero una modifica all'equazione di Chrastil aggiungendo il reciproco del quadrato della temperatura per tenere conto che l'entalpia di sublimazione cambia con la temperatura [17].

$$y_2 = \rho^{b_1} \exp\left(b_2 + \frac{b_3}{T} + \frac{b_4}{T^2}\right) \tag{1.19}$$

con b_1 , b_2 , b_3 e b_4 coefficienti da determinare tramite la regressione dei dati sperimentali.

Modello di Sparks

Sparks e collaboratori, proposero due modelli, rispettivamente a cinque e a sei parametri, come combinazione delle osservazioni di Adachi-Lu e del Valle-Aguilera, esprimendo sia l'effetto della densità sul numero di associazione con un polinomio di primo o di secondo grado e quello della temperatura sull'entalpia di sublimazione [18].

$$y_2 = \rho^{(b_1 + b_2 \rho)} \exp\left(b_3 + \frac{b_4}{T} + \frac{b_5}{T^2}\right) \tag{1.20}$$

$$y_2 = \rho^{(b_1 + b_2 \rho + b_3 \rho^2)} \exp\left(b_4 + \frac{b_5}{T} + \frac{b_6}{T^2}\right)$$
(1.21)

Modello di Sung e Shim

Gli autori di questa correlazione, proposero una modifica dell'equazione di Chrastil considerando l'effetto della temperatura sulla solubilità poiché avevano osservato che, in un diagramma lny₂-lnp, la pendenza delle isoterme diminuiva con l'aumento della temperatura [19].

$$y_2 = \rho^{(b_1 + \frac{b_2}{T})} \exp\left(b_3 + \frac{b_4}{T}\right)$$
 (1.22)

Il modello prevede la determinazione di 4 coefficienti tramite la regressione dei dati ottenuti in laboratorio.

Modello di Bian

Tale modello a cinque parametri, avanzato nel 2016, deriva dall'esistenza di relazioni lineari, in condizioni isoterme, tra il lny₂-lnρ, lny₂-ρ/T e lny₂-ρlnρ [17]:

$$y_2 = \rho^{(b_1 + b_2 \rho)} \exp\left(b_3 + \left(\frac{b_4 + b_5 \rho}{T}\right)\right)$$
 (1.23)

Modello di Kumar e Johnston

Gli autori di questo modello osservarono che a seconda del sistema analizzato è possibile un andamento lineare sia tra il lny₂-lnρ che tra il lny₂-ρ, indicando una modifica al modello di Chrastil [15]:

$$y_2 = \exp\left(b_1 \rho + b_2 + \frac{b_3}{T}\right) \tag{1.24}$$

in cui b_1 , b_2 e b_3 sono determinati attraverso la regressione.

Analogamente al modello di Chrastil (1982), il coefficiente b_3 è usato per determinare il calore totale di reazione [23].

Modello di Garlapati e Madras

I modelli riportati sono stati proposti a distanza di un anno e sono caratterizzati da tre e cinque parametri rispettivamente, entrambi derivati da una dipendenza lineare tra $lny_2-ln\rho T$: la solubilità del soluto in anidride carbonica supercritica è espressa in termini di densità e temperatura [20].

$$y_2 = (\rho T)^{b_1} \exp\left(b_2 + \frac{b_3}{T}\right)$$
 (1.25)

Modello di Amooey

L'autore propose il modello a nove parametri, riportato nell'equazione 1.26, una volta verificata la buona congruenza tra i dati sperimentali e quelli teorici a seguito di un'analisi su 31 farmaci differenti in anidride carbonica supercritica: la nuova correlazione mostrava un AARD% (deviazione relativa assoluta media) di 6.65%, circa la metà rispetto al modello di Chrastil [22].

$$y_2 = \left(b_1 + \frac{b_2}{\rho} + \frac{b_3}{\rho^2}\right) + b_4 \ln T + b_5 \ln \left(\frac{T^2}{1 + \frac{b_6}{\rho} + b_7 \ln T + b_8 \ln T^2 + b_9 \ln T^3}\right)$$
(1.26)

Modello di Si-Moussa

Recentemente, gli autori hanno avanzato il modello dell'espressione 1.27, come modifica della correlazione di Jouyban, sostituendo la densità della fase supercritica alla pressione [17]:

$$y_2 = \rho^{b_1} \exp\left(b_2 + b_3 \rho + b_4 \rho^2 + b_5 \rho T + \frac{b_6 T}{\rho}\right)$$
 (1.27)

in cui b_1 - b_6 sono i coefficienti della correlazione determinati tramite la regressione dei dati sperimentali.

1.5.2 Modelli a composizione costante densità-temperatura-pressione

Modello di Bartle

Il modello proposto nel 1991 da Bartle e collaboratori si basa sulla dipendenza lineare tra il logaritmo del fattore di amplificazione, definito come il rapporto tra la pressione e la tensione di sublimazione del solido, e la densità del solvente supercritico:

$$ln E = k_0 + k_1 \rho \tag{1.28}$$

con k_0 e k_1 determinati dalla regressione dei dati sperimentali.

Tuttavia, l'equazione così scritta poteva essere utilizzata solo se si avevano a disposizione i valori di tensione di sublimazione del solido, per questo motivo gli autori introdussero la pressione di riferimento P_{ref} e la densità riferimento ρ_{ref} , pari a 1 bar e 700 kg/m³ rispettivamente.

Dalla definizione di fattore di amplificazione e tensione di sublimazione del solido, è stato ricavato il seguente modello empirico [23]:

$$\ln \frac{yP}{P_{ref}} = c_0 + c_1 (\rho - \rho_{ref}) + \frac{c_2}{T}$$
 (1.29)

anche in questo caso i coefficienti che appaiono nell'equazione sono ricavati dalla regressione dei dati di solubilità e, in particolare, c_2 può essere utilizzato per stimare direttamente il calore di vaporizzazione con la seguente formula:

$$\Delta H_{vap} = -c_2 R \tag{1.30}$$

in cui R è la costante universale dei gas.

Il modello utilizzato nella fase di elaborazione dei dati è riscritto in forma esponenziale:

$$y_2 = \exp\left(b_1 \rho + b_2 + \frac{b_3}{TP}\right) \tag{1.31}$$

Modello di Ch e Madras

Sulla base dell'associazione chimica tra le molecole di soluto e quelle dell'anidride carbonica supercritica, un nuovo modello a quattro parametri è stato introdotto nel 2010 dopo aver verificato una buona corrispondenza trai dati di solubilità calcolati e quelli sperimentali attraverso lo studio di 54 farmaci di natura diversa [24]:

$$y_2 = \exp\left(b_1 \rho + b_2 + \frac{b_3}{TP^{b_4 - 1}}\right) \tag{1.32}$$

Modello di Hezave e Lashkarbolooki

Il modello 1.33 si basa sulla dipendenza lineare osservata tra il lny_2 - ρ e tra lny_2 -T, che in forma esponenziale diventa:

$$y_2 = \exp\left(b_1 \rho + b_2 + \frac{b_3}{TP} + b_4 T\right) \tag{1.33}$$

Modello di Mendez-Santiago e Teja

La correlazione riportata nell'equazione 1.34, divenne subito popolare dopo la pubblicazione per la sua accuratezza e semplicità ed è, inoltre, basata sulla teoria delle soluzioni a diluizione infinita [25]:

$$T\ln\left(\frac{y_2P}{p_2^{sub}}\right) = A + C\rho \tag{1.34}$$

in cui T è la temperatura, P è la pressione, P_2^{sub} è la tensione di sublimazione del solido alla temperatura T e, infine, A e C sono costanti indipendenti dalla temperatura.

Tuttavia, poiché non si dispone sempre delle tensioni di sublimazione del solido allora l'equazione 1.34 è combinata con una relazione di tipo Clausis-Clayperon per la tensione di sublimazione ottenendo, in forma esponenziale, la seguente espressione:

$$y_2 = \exp\left(b_1 + \left(\frac{b_2 + b_3 \rho}{TP}\right)\right) \tag{1.35}$$

 b_1 , b_2 e b_3 rappresentano i parametri del modello.

Modello di Hozahabr

L'autore del modello, attraverso l'aggiunta di un parametro, elaborò la correlazione di Mendez-Santiago e Teja, formulando una espressione lineare tra il lny₂-p in un certo campo di pressione e temperatura [20]:

$$\ln(y_2) = e_1 + \frac{e_2}{r} + \frac{e_3\rho}{r} - e_4 \ln P \tag{1.36}$$

In forma esponenziale:

$$y_2 = \exp\left(b_1 + \frac{(b_2 + b_3 \rho)}{TP^{b_4 - 1}}\right) \tag{1.37}$$

con b_1, b_2, b_3 e b_4 determinati dalla regressione dei dati sperimentali.

Modello di Jafari Nadjad

Contemporaneamente alla correlazione di Garlapati e Madras, Jafari Nadjad e collaboratori, pubblicarono un modello a quattro parametri per predire la solubilità del solido nel fluido supercritico. L'espressione 1.38 nasce dall'osservazione della dipendenza lineare tra lny₂-lnp e quella di tipo non lineare tra il logaritmo della frazione molare di soluto con la pressione e la temperatura [26]:

$$\ln(y_2) = a_1 + a_2 P^2 + a_3 T^2 + a_4 \ln \rho \tag{1.38}$$

La suddetta equazione, in forma esponenziale diventa:

$$y_2 = \rho^{b_1} \exp(b_2 + b_3 T^2 + b_4 P) \tag{1.39}$$

Modello di Khansay

Nel 2014, Khansay e collaboratori hanno proposto il seguente modello empirico a cinque parametri [20]:

$$y_2 = \rho^{(b_1 + b_2 P)} \exp\left(b_3 + \frac{b_4 P^2}{T} + b_5 P\right)$$
 (1.40)

Modello di Jouyban

La correlazione proposta da Jouyban e collaboratori è caratterizzata da una dipendenza lineare tra lny_2 -lnp in un certo campo di pressione e temperatura, e di tipo non lineare tra il logaritmo della solubilità e la pressione in condizioni isotermiche e tra il logaritmo di y_2 e la temperatura a pressione costante [21] [27]:

$$\ln y_2 = m_1 + m_2 P + m_3 P^2 + m_4 P T + m_5 \frac{T}{P} + m_6 \ln \rho$$
 (1.41)

In forma esponenziale:

$$y_2 = \rho^{b_1} \exp\left(b_2 + b_3 P + b_4 P^2 + b_5 T P + b_6 \frac{T}{P}\right)$$
 (1.42)

Modello di Keshmiri

Sulla base dell'ipotesi di Jouyban, Keshmiri e collaboratori proposero una nuova correlazione a cinque parametri, in cui l'effetto della pressione e della temperatura si distribuisce diversamente [17]:

$$y_2 = \rho^{(b_1 + \frac{b_2}{T})} \exp\left(b_3 + \frac{b_4}{T} + b_5 P^2\right)$$
 (1.43)

1.5.3 Modelli a composizione costante temperatura-pressione

Modello di Yu

La solubilità del soluto, in questo famiglia di modelli, è espressa come una funzione della temperatura e della pressione. In letteratura, la seguente correlazione è spesso data in forma implicita [15]:

$$y_2 = b_1 + b_2 T + b_3 T^2 + b_4 P + b_5 P^2 + b_6 T P (1 - y_2)$$
(1.44)

Mettendo in evidenza la frazione molare di soluto, si ottiene:

$$y_2 = \frac{b_1 + b_2 T + b_3 T^2 + b_4 P + b_5 P^2 + b_6 T P}{1 + b_6 T P} \tag{1.45}$$

con b_1 , b_2 , b_3 , b_4 , b_5 e b_6 i parametri del modello determinati dalla regressione dei dati sperimentali.

Modello di Gordillo

Gordillo e collaboratori pubblicarono un modello empirico a sei parametri per calcolare la solubilità di un solido in un fluido supercritico e mostrava un grado di accuratezza maggiore nel caso della penicillina G rispetto ai rinomati modelli di Chrastil, Yu e del Valle-Aguilera [14]:

$$y_2 = \exp(b_1 + b_2T + b_3T^2 + b_4P + b_5P^2 + b_6TP)$$
 (1.46)

1.5.4 Modelli a composizione costante densità-pressione

Modello di Haghbakhsh

In questo modello proposto nel 2013, la solubilità del soluto nel fluido supercritico è espressa in termini di densità e pressione, mentre l'effetto della temperatura è intrinseco con la densità allo scopo di semplificare la correlazione [28]:

$$y_2 = b_1 + b_2 \rho + b_3 \rho^2 + b_4 \rho^3 + b_5 P + b_6 P^2 + b_7 P^3 + b_8 \rho P + b_9 \rho^2 P + b_{10} \rho P^2$$
 (1.47)

in cui b_1 - b_{10} sono i coefficienti determinabili tramite la regressione dei dati di solubilità.

Il modello è stato verificato, per 31 composti differenti, un intervallo di temperatura compreso tra 308-523 K e di pressione tra 75 bar e 468 bar.

1.5.5 Modelli empirici in presenza di co-solventi

Modello di Garlapati e Madras

Oltre all'equazione 1.24, gli autori proposero anche delle modifiche per includere l'effetto di incremento della solubilità dovuta al modificante:

$$\ln y_2 = b_1 \ln(\rho_1 T) + b_2 \ln(y_3 T) + b_3 \ln T + \frac{b_4}{T} + b_5$$
(1.48)

$$\ln y_2 = b_1 + b_2 \ln \rho_1 + b_3 \rho_1 + b_4 \ln T + b_5 \ln y_3 + b_6 \ln(y_3 \rho_1 T) \tag{1.49}$$

in cui ρ_1 rappresenta la densità del fluido supercritico puro.

L'accuratezza di quest'ultima espressione è stata verificata su 18 sistemi ternari (solido-fluido supercritico-modificante) con una frazione molare y_3 minore del 5%, in un intervallo di temperatura tra 313 K e 333 K e di pressione tra 100 bar e 300 bar [29].

Modello di Jouyban

Nella correlazione seguente, Jouyban propose una dipendenza lineare tra il logaritmo della solubilità e la frazione molare di co-solvente:

$$\ln y_2 = b_1 + b_2 y_3 + b_3 \rho_1 + b_4 P^2 + b_5 PT + b_6 \frac{T}{P} + b_7 \ln \rho_1$$
 (1.50)

in cui b_1 - b_7 sono i sette parametri del metodo determinati dalla regressione dei dati sperimentali.

Diversamente dal modello precedente, la consistenza di questa relazione è stata verificata in un campo di temperatura analogo ma in una finestra operativa di pressione compresa tra 100 bar e 200 bar [29].

Modello di Mendez-Santiago e Teja

La correlazione modificata di Mendez-Santiago e Teja è una delle più utilizzate per calcolare la solubilità di un solido in anidride carbonica supercritica con co-solvente [30]:

$$T\ln\left(\frac{y_2P}{P_{ref}}\right) = b_1 + b_2\rho' + b_3T + b_4y_3 \tag{1.51}$$

in cui b_1 - b_4 sono i coefficienti del modello, P_{ref} è la pressione di riferimento e pari a 1 bar e, infine, ρ' è la densità della miscela in kg/m³.

Modello RedMa5 e RedMa7

Questi modelli, rispettivamente a cinque e a sette parametri, sono stati proposti da Reddy e Madras recentemente basandosi sull'esistenza di un complesso solvatato tra soluto e il fluido supercritico con modificante.

$$\ln y_2 = \ln y_3 + (b_1 - 1) \ln \left(\frac{P}{P_{ref}}\right) + \frac{b_2 + b_3 y_3}{T} + b_4 \rho_1 + b_5 \tag{1.52}$$

$$\ln y_2 = (b_1 + b_2 - 1) \ln \left(\frac{P}{P_{ref}}\right) + b_2 \ln y_3 + \frac{b_3 + b_4 \rho_1 + b_5 y_3}{T} + b_6 \rho_1 + b_7$$
 (1.53)

in cui P_{ref} è la pressione di riferimento pari a 1 bar e ρ_1 rappresenta la densità del fluido supercritico puro [31].

2. Farmaci poco solubili in acqua

2.1 Aspetti generali della somministrazione di farmaci

Un farmaco è una sostanza in grado di produrre, sull'uomo o sull'animale, un effetto profilattico o curativo. In aggiunta, un farmaco nella forma farmaceutica in cui viene distribuito, è costituito da uno o più principi attivi (Active Pharmaceutical Ingredient, API), responsabili dell'effetto medico desiderato, e da eccipienti che ne permettono e semplificano la somministrazione.

Tuttavia, quest'ultimo è il primo stadio che il medicinale deve superare prima di espletare la sua azione e può avvenire attraverso diverse vie di somministrazione, le più comuni sono:

- Vie enterali;
- Vie parentali;
- Via inalatoria:
- Via transcutanea.

Le vie enterali si distinguono a loro volta in:

- Via orale;
- Via rettale;
- Via buccale.

Per completezza, le vie parentali si classificano, invece, a seconda del livello a cui il principio attivo viene iniettato nella pelle e le si preferiscono in situazioni di emergenza data la loro elevata efficacia (intradermica, sottocutanea, endovenosa ed intramuscolare).

Tra le vie enterali, la via orale è la più naturale che esista oltre ad essere la più versatile, infatti, farmaci di tipo solido (compresse) o di tipo liquido (sciroppi) possono essere ingeriti facilmente senza un particolare addestramento del paziente¹. È stato stimato, in aggiunta, che in Europa e negli Stati Uniti 1'84% dei farmaci sono somministrati per via orale [32].

Una volta che il farmaco è stato ingerito, dovrà prima disintegrarsi per liberare il principio attivo che verrà assorbito successivamente.

Nella fase di dissoluzione, si osserva la presenza di uno strato di diffusione esterno sulla superficie delle particelle, il cui spessore è funzione di parametri idrodinamici. L'equazione 2.1 descrive la velocità di dissoluzione ed è stata introdotta da Noyes-Whitney:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{DS}{h_D}(C_S - C) \tag{2.1}$$

in cui M è la quantità di principio attivo disciolto nel tempo t, D è il coefficiente di diffusione del farmaco, S è l'area superficiale della particella solida, h_D è lo spessore dello strato di diffusione e, infine, $(C_S - C)$ rappresenta la differenza di concentrazione del principio agli estremi dello strato di diffusione. Comunque, tale espressione, anche se esprime bene ciò che accade *in vitro*, non trova grande applicabilità *in vivo* poiché alcuni parametri variano in funzione dello stato fisiologico del tratto gastrointestinale [32].

¹ https://www.my-personaltrainer.it/farmacologia/assorbimento-farmaci-12.html

Il processo di dissoluzione è, allora, strettamente connesso al grado di dissoluzione del farmaco (circa l'80% per farmaci somministrati oralmente) attraverso la sua solubilità nel biofluido.

A questo punto avviene l'assorbimento vero e proprio che coincide con l'inizio della fase farmacocinetica, descrivibile brevemente tramite l'acronimo ADME (Assorbimento, Distribuzione, Metabolismo, Escrezione).

Nella fase di assorbimento, il principio solubilizzato ormai nei fluidi gastrointestinali deve attraversare delle membrane cellulari prima di raggiungere il circolo ematico ed il cammino più diffuso, per farmaci somministrati oralmente, è la diffusione passiva [32]. Affinché il processo avvenga, è importante ricordare che le molecole devono essere contemporaneamente lipofile e idrofile: infatti, la natura lipofila consente l'attraversamento del doppio strato fosfolipidico delle membrane, mentre l'idrofilia ne permette la residenza nel liquido intracellulare.

La prima legge di Fick permette di descrivere il trasporto passivo tramite l'equazione 2.2:

$$J = \frac{DK_{rip}}{e}S(C_1 - C_2) \tag{2.2}$$

in cui K_{rip} è un coefficiente di ripartizione che tiene conto del carattere lipofilo e idrofilo della molecola: a parità di condizioni, più la molecola è lipofila più è alta la velocità di diffusione.

Il processo di assorbimento di un principio attivo è intimamente legato al concetto di biodisponibilità, intesa come percentuale di farmaco somministrato che giunge al circolo sanguigno. Una bassa solubilità è spesso indice di una scarsa biodisponibilità che viene incrementata aumentando il dosaggio del farmaco con lo sviluppo di complicazioni non banali per il paziente [33].

Nella successiva fase di distribuzione, il farmaco si ripartisce dal sangue ai diversi organi in relazione alle proprie caratteristiche chimico-fisiche e alla vascolarizzazione degli organi: il medicinale raggiunge più facilmente le zone perfuse dal sangue.

Nella fase di metabolismo, anche detta di biotrasformazione, avvengono reazioni chimiche il quale scopo è di ottenere principalmente dei composti idrofili al fine di semplificare il loro successivo allontanamento. Le reazioni metaboliche avvengono in due fasi: nella prima la sostanza è sottoposta a reazioni di ossidazione, riduzione e idrolisi allo scopo di renderla più polare e, nella seconda fase avvengono delle reazioni di coniugazione in cui alla molecola se ne attacca un'altra fortemente polare². Infine, nella fase finale di escrezione, il farmaco giunge al termine della sua vita e viene espulso dall'organismo tramite la sudorazione, i reni, il fegato e i polmoni.

2.2 Sistema di Classificazione Biofarmaceutico (BCS)

Nel paragrafo precedente sono stati evidenziati le tappe principali del viaggio del farmaco nell'organismo umano, in questo si identificheranno, invece, le classi principali. A tal proposito, nel 1995, venne proposta da Amidon la Biopharmaceutical Classification Sistem

.

² http://www.adrianomartinelli.it/Fondamenti/Probito 7.pdf

(BCS) ovvero una classificazione dei principi attivi farmaceutici in 4 classi attraverso il valore di solubilità e di permeabilità, schematizzata in figura 2.1.

Si afferma che un principio attivo è caratterizzato da un'alta solubilità quando il dosaggio massimo del farmaco è solubile in 250 ml di acqua ad una temperatura di 37±1°C e con un pH compreso tra 1 e 6,8. Analogamente, una sostanza è definita con alta permeabilità quando il 90% del farmaco somministrato viene assorbito. Infine, se in un lasso di tempo di 30 minuti, 1'85% del farmaco è stato disciolto allora viene rilasciato facilmente [33].

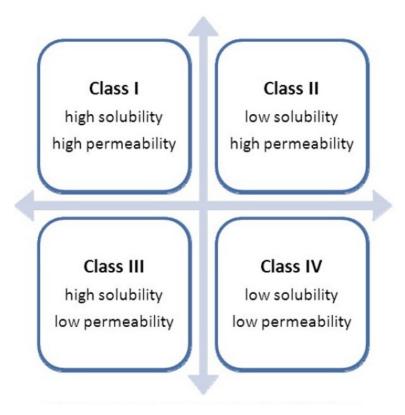


Figura 2.1: Schema della classificazione dei principi attivi farmaceutici BCS.

I composti appartenenti alla classe I sono simultaneamente molto solubili e molto permeabili e, pertanto, vengono assorbiti velocemente dall'organismo.

I composti di classe II sono caratterizzati da una bassa solubilità ed un'alta permeabilità e ne risulta che l'assorbimento del farmaco è limitato dalla sua dissoluzione: un piccolo incremento nella velocità di dissoluzione si evolve in un incremento della sua biodisponibilità. Contrariamente a questi, i composti di classe III manifestano un'alta solubilità ed una bassa permeabilità.

I composti di classe IV, diversamente da quelli di classe II, sono poco solubili e poco permeabili e la loro applicazione, quindi, non è indicata previa studi ulteriori [34].

L'ente governativo americano Food and Drug Administration (FDA), in conclusione, suggerisce³ l'utilizzo del sistema biofarmaceutico per sviluppare nuovi processi mediante i

-

³ https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070246.pdf

concetti di biodisponibilità e bioequivalenza riducendo, così, il numero di esperimenti *in vivo* e velocizzando il processo di ottenimento e di distribuzione del farmaco [35].

2.2.1 Principi cortisonici

Il farmaco investigato in questa tesi appartiene alla famiglia dei corticoidi, ormoni steroidei, che in base alla loro funzione fisiologica si distinguono in:

- Glucocorticoidi;
- Mineralcorticoidi.

I primi svolgono una funzione importante nel metabolismo del glucosio ed i secondi sono attivi nel bilanciamento dei sali minerali e nel sistema cardiovascolare. Nonostante tali composti hanno dei compiti differenti, sono molto simili dal punto di vista chimico [36].

La struttura chimica di tali steroidi è composta da un nucleo ciclopentanoperidrofenantrenico a 4 anelli, identificati con le lettere A, B, C e D, come riportato in figura 2.2 [37].

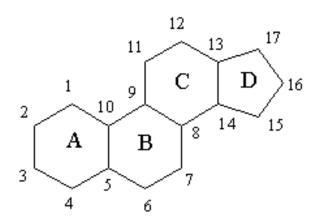


Figura 2.2: Struttura di composti steroidei.

Il primo ormone ad essere investigato fu il cortisone per la sua azione immunosoppressiva ma più tardi, venne studiato l'idrocortisone, anche denominato cortisolo, che mostrava una glicoattività del 25% superiore rispetto al suo predecessore. Tale aspetto accentuò l'interesse di trasformare chimicamente gli ormoni naturali per ottenere sostanze più attive: processi di deidrogenazione nell'anello A del cortisone e dell'idrocortisone sono stati condotti per ottenere rispettivamente prednisone e prednisolone [37].

In figura 2.3 si osservano le formule di struttura dei composti appena citati.

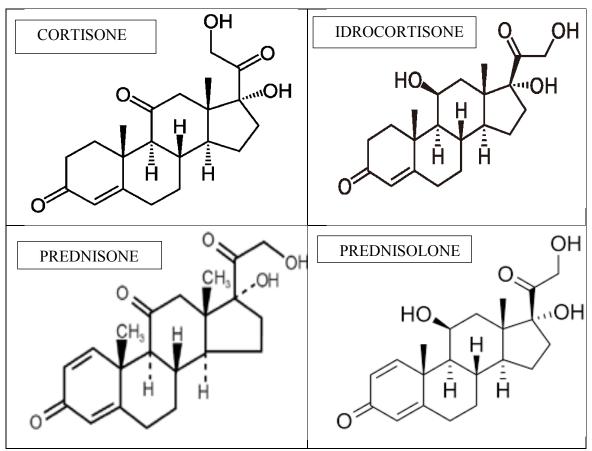


Figura 2.3: Formule di struttura di cortisone, idrocortisone, prednisone e predinisolone.

Tali composti sono tutti scarsamente solubili in acqua mentre presentano una affinità maggiori per i solventi di natura organica. Si può, dunque, affermare che sono sostanze appartenenti alla classe II del sistema di classificazione BCS.

2.3 Strategie per l'aumento della solubilità di farmaci poco solubili in acqua

In ambito medico, la scarsa solubilità dei farmaci poco solubili in acqua ne limita la loro applicazione. Diversi studi sono stati effettuati per ovviare a tale inconveniente e l'aggiunta di un gruppo polare nella struttura del composto o la modifica della struttura chimica, sono alcuni esempi delle tecniche che hanno fornito un maggior riscontro positivo [33].

Come già anticipato, la biodisponibilità di un farmaco appartenente alla classe II nel sistema BCS è strettamente connessa alla lenta dissoluzione del farmaco nel tratto gastrointestinale e, ricordando l'equazione 2.1, la velocità di dissoluzione è funzione del coefficiente di diffusione, dello spessore dello strato esterno di diffusione, della solubilità del farmaco ma anche della superficie totale esposta.

Alcuni esempi di tecniche comunemente utilizzate per incrementare la biodisponibilità e, quindi, la solubilità, sono discusse nei paragrafi a seguire.

2.3.1 Microsospensioni e Nanosospensioni

Il principio su cui si basano queste tecniche è l'aumento della velocità di dissoluzione in maniera proporzionale alla superficie del farmaco esposta, ottenibile con una riduzione delle dimensioni delle particelle del farmaco stesso. È stato osservato, inoltre, che l'incremento della velocità di dissoluzione è anche funzione della riduzione dello spessore dello strato esterno di diffusione formatosi attorno alle particelle di dimensione ridotta [33].

Attraverso le tecniche tradizionali di macinazione è possibile ottenere particelle di dimensione inferiore all'unità di micrometro ma, in questo caso, fenomeni di aggregazione potrebbero condurre nuovamente alla diminuzione della superficie esposta. Da qui, la necessità di utilizzare le particelle in sospensione in presenza di tensioattivi che agiscono da stabilizzanti. Tale stabilizzazione può avvenire per via sterica o elettrostatica tramite il rispettivo assorbimento di polimeri o particelle cariche sulla superficie del farmaco: gli eccipienti più utilizzati sono il polivinilpirrolidone (PVP K30), l'idrossipropilcellulosa (HPC) e il glicole polietilenico (PEG) [38].

In figura 2.4 è riportato lo schema di processo per la macinazione ad umido.

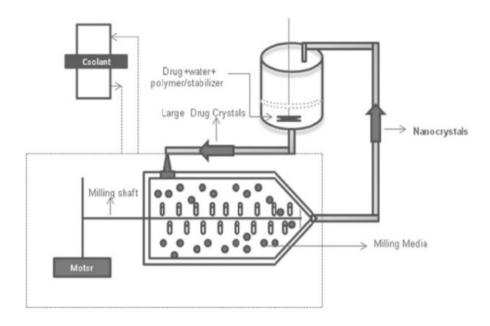


Figura 2.4: Schema di processo per la produzione di micro e nanosospensioni.

Nella macinazione ad umido la soluzione acquosa, contenente il principio attivo e gli eccipienti, viene pompata da un serbatoio miscelato all'interno del mulino, in cui si generano delle intense forze di taglio che determinano la riduzione del soluto in micro e nanoparticelle. La temperatura di esercizio è inferiore ai 35 °C attraverso l'uso un liquido refrigerante, in genere acqua, inviato all'interno della camicia dell'apparecchiatura al fine di smaltire il calore in eccesso prodotto dalla macinazione, che altrimenti provocherebbe un'alterazione di tipo chimico sul farmaco. In conclusione, la soluzione caratterizzata da particelle di dimensione minore della luce del vaglio, viene inviata al serbatoio di partenza e nuovamente ricircolata al mulino allo scopo di ottenere una distribuzione omogenea [38].

Durante l'operazione di macinazione, si raggiunge una dimensione limite delle particelle oltre cui non è possibile procedere oltre. Se l'operazione perdura si ha un continuo trasferimento di energia dal macinatore al farmaco che porta alla formazione di difetti nei

cristalli. Questo fenomeno può svilupparsi sulla superficie o su tutto il cristallo producendo strutture amorfe [39].

2.3.2 Amorfismo e Cristallinità

Della seconda metà del secolo scorso, la velocità di dissoluzione è stata correlata anche alla morfologia del medicinale.

Nella sua forma cristallina, il farmaco può presentare diverse strutture polimorfiche, ovvero reticoli differenti ma con la medesima composizione chimica, conducendo ad una varietà di proprietà chimico-fisiche del composto: temperatura di fusione, densità, stabilità e solubilità ne sono esempi [33]. Inoltre, in alcuni studi è stato dimostrato che un polimorfo metastabile è più biodisponibile di uno stabile termodinamicamente ma è necessario, difatti, monitorare l'evoluzione del processo affinché la solubilità del farmaco non vari dopo la somministrazione orale [40].

Un'altra tecnica emergente è la co-cristallizzazione definita come "un sistema multicomponente stechiometrico caratterizzato da interazioni non covalenti, in cui tutti i componenti, in condizione di temperatura e pressione ambiente, sono allo stato solido" [41]. In altre parole, il nuovo medicinale è composto dal principio attivo e da una o più molecole, definite co-agenti, inerti e non tossiche nei confronti dell'uomo. Esistono, infatti, delle liste redatte dal Dipartimento Americano della Salute e dei Servizi Umani (HHS) che forniscono valori di tolleranza e limitazioni per ogni additivo: ad esempio, nell'industria farmaceutica è molto utilizzato il composto Aerosil 200 [41].

Seppure il meccanismo di formazione dei co-cristalli è lontano dall'essere ben compreso, è stato dimostrato un incremento della velocità di dissoluzione, tra 4-20 volte, rispetto alla forma cristallina semplice [41].

Tuttavia, dispersioni binarie amorfe (acronimo ASD) di composti poco solubili in acqua sono state identificate come un'altra possibile via per incrementarne la dissoluzione, la solubilità e, quindi, la biodisponibilità. Tale formulazione permette, inoltre, di ottenere una grande varietà di strutture adatte alla somministrazione orale (ad esempio compresse, capsule e polveri) utilizzando tecniche di liofilizzazione, essiccazione a spruzzo o tramite, ancora, l'utilizzo dei fluidi supercritici [33] [42]. I difetti sono, però, termodinamicamente instabili conducendo a delle inter-conversioni del farmaco verso strutture più stabili e meno solubili in acqua, limitando, così, l'impiego in campo farmaceutico [39]. Infine, *in vitro* e *in vivo*, gli studi condotti hanno dimostrato che l'incremento del parametro d'interesse risulta essere anche di 100 volte superiore del rispettivo valore in forma cristallina [33].

2.4 Processi con fluidi supercritici nella realtà industriale farmaceutica

La produzione di materiali in scala micro e nanometrica, negli ultimi anni, ha attirato grande attenzione in diversi ambiti e nuove tecniche sono state realizzate sfruttanti miscele in condizioni supercritiche [43]. Infatti, le tecniche tradizionali di micronizzazione non consentono il controllo del diametro delle particelle ottenendo così una distribuzione eterogenea e non idonea.

In figura 2.5, si riporta brevemente una lista delle principali tecniche di micronizzazione e la relativa dimensione delle particelle prodotte [44].

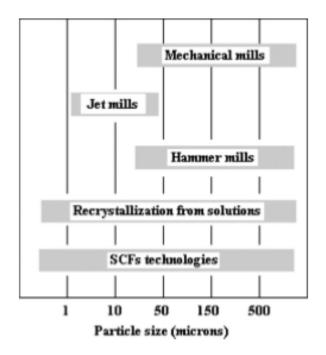


Figura 2.5: Diversi tecniche di micronizzazione dei farmaci e relativa finestra di applicabilità.

In aggiunta, per i farmaci, i processi di separazione con fluidi supercritici garantiscono la necessità fisiologica di solventi inerti e una sensibilità alla temperatura adatti all'ambito alimentare, biochimico e farmaceutico [45].

I principali processi industriali utilizzano il ruolo del fluido supercritico (SCF) nel sistema d'interesse come fattore discriminante e si classificano in:

- Processi con SCF come solvente;
- Processi con SCF come anti-solvente:
- Processi con SCF come agente nebulizzante.

2.4.1 Processi con SCF come solvente

I processi descritti in questo paragrafo sono accomunati dall'utilizzo dell'anidride carbonica supercritica come solvente in cui il farmaco è disciolto.

È bene ricordare che la maggioranza dei farmaci sono composti polari e, quindi, poco affini al fluido supercritico più impiegato nei processi di estrazione, rappresentando l'ostacolo più grande da superare per lo sviluppo di processi industriali a basso costo e flessibili.

2.4.1.1 Rapid Expansion of Supercritical Solutions (RESS)

Il più noto dei processi appartenenti a questa categoria è quello di espansione rapida della soluzione supercritica, anche definito Supercritical Fluid Nucleation (SFN), in cui il solido è disciolto nel fluido supercritico.

In figura 2.6 viene riportato lo schema del processo che consta di due momenti chiave: inizialmente, l'anidride carbonica supercritica (SC-CO₂) viene pompata all'interno di un reattore, contenente il principio attivo e, le condizioni di saturazione vengono raggiunte.

Allora, la soluzione risultante viene depressurizzata attraverso un ugello riscaldato in una camera a bassa pressione in cui avviene la precipitazione del solido su un filtro.

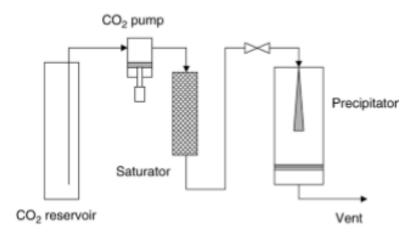


Figura 2.6: Schema di un processo RESS.

La densità e il potere solvente della miscela decrescono drasticamente quando la miscela è espansa dalle condizioni operative a quelle di pressione ambiente in cui l'anidride carbonica è allo stato gassoso.

Comunque, nello svolgimento della fase di espansione, è buona norma verificare che tale cammino non intersechi la curva di sublimazione sul diagramma di fase della CO₂, poiché si formerebbero delle goccioline di liquido influenzanti la morfologia finale delle particelle [46].

Sebbene la facilità di esecuzione dell'operazione sia notevole, il limite più stringente è la bassa solubilità dei principi attivi in SC-CO₂ che condiziona lo sviluppo del processo su larga scala. Allora, dei modificanti possono essere adoperati ma con l'inconveniente di trovare tracce di liquido organico nelle particelle prodotte.

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

Nel corso degli anni, diverse modifiche sono state proposte per il processo RESS e il processo RESOL è fra le più interessanti poiché permette di ottenere particelle dell'ordine dei 100 nm contro i 50 nm del processo originario.

In questo caso, la soluzione supercritica viene nebulizzata in un liquido tramite un ugello e la produzione di particelle fini avviene dall'azione combinata dell'espansione e del raffreddamento della soluzione a seguito del contatto con il liquido. Tuttavia, se il mezzo liquido è caratterizzato anche dalla presenza di altri composti, possono avvenire delle reazioni chimiche vere e proprie: nanoparticelle di CdS o PbS sono esempi di prodotti ottenibili e difficili da recuperare [43].

2.4.1.3 Rapid Expansion from Supercritical to Aqueous Solution (RESAS)

Un'altra modifica del processo descritto nel paragrafo 2.4.1.1 è il processo RESAS, in cui il prodotto dell'espansione termina in una soluzione acquosa contenente degli stabilizzanti, in genere tensioattivi non ionici, per minimizzare l'aggregazione delle particelle dopo la loro nucleazione.

Dal punto di vista operativo, l'ugello è immerso nella soluzione acquosa per 1 cm della sua lunghezza totale e, inoltre, dell'azoto molecolare è inviato dall'alto per minimizzare la formazione di schiuma a causa dell'espansione rapida del biossido di carbonio [47].

Come già anticipato, la bassa solubilità dei farmaci in SC-CO₂ è l'aspetto più limitante dei suddetti processi ma si aggiunge l'instabilità temporale delle particelle in ambiente acquoso per il processo RESAS.

2.4.1.4 Particle formation from Gas Satured Solution (PGSS)

Il processo PGSS, mostrato in figura 2.7, prevede che l'anidride carbonica supercritica sia disciolta in un solido fuso e, successivamente, la soluzione satura viene espansa a pressione atmosferica. Tale espansione comporta l'evaporazione della SC-CO₂ che produce a sua volta un raffreddamento intenso della soluzione per il fenomeno Joule-Thomson.

A differenza dei processi di precipitazione menzionati in questo paragrafo, il vantaggio principale è che il solido non deve essere solubile nell'anidride carbonica supercritica e, quindi, la possibilità di sviluppare processi a basso costo per una grande varietà di sostanze.

Il processo è stato anche utilizzato per produrre materiali compositi a partire da sospensioni di diversi polimeri fusi [46].

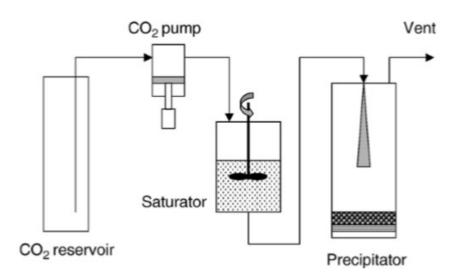


Figura 2.7: Schema di un processo PGSS.

2.4.2 Processi con SCF come anti-solvente

Contrariamente a quanto riportato nel paragrafo precedente, il fluido supercritico esercita il ruolo di anti-solvente se il farmaco non è solubile nella fase supercritica ma è miscibile con il solvente organico. Tale aspetto permette di superare i confini imposti dai processi di precipitazione di solidi scarsamente solubili in SCF.

2.4.2.1 Gaseous Anti-Solvent (GAS)

Nel processo discontinuo GAS, mostrato in figura 2.8, la CO₂ stoccata allo stato liquido in bombole, viene prelevata e inviata alla pressione desiderata ad un precipitatore contenente già la soluzione del soluto trattato.

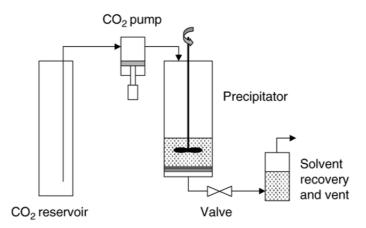


Figura 2.8: Schema di un processo GAS.

Allora, essendo la diffusività del fluido supercritico più alta di quella di un liquido, la diffusione del primo nel solvente organico produce una super-saturazione più veloce del soluto disciolto nel liquido e quindi la sua precipitazione [48].

L'espansione volumetrica, causata dalla dissoluzione della SC-CO₂ nella soluzione iniziale, è un parametro importante per selezionare le condizioni ottimali a cui fare avvenire il processo in quanto l'abbassamento di densità è in genere proporzionale alla diminuzione del potere solvente della soluzione. L'espansione volumetrica è il rapporto tra l'incremento di volume e il volume iniziale della soluzione, come mostrato nell'espressione 2.3.

$$\frac{\Delta V}{V} = \frac{V(T, P) - V_0(T, P_0)}{V_0(T, P_0)} \tag{2.3}$$

Tuttavia, De la Fuente et al. stabilirono che tale equazione non permetteva di discriminare il comportamento di diversi solventi organici con lo stesso fluido supercritico e modificarono tale equazione utilizzando la variazione del volume molare parziale del solvente, ottenendo l'espressione 2.4 [47]:

$$\frac{\Delta \nu}{\nu} = \frac{\nu(T, P) - \nu_0(T, P_0)}{\nu_0(T, P_0)} \tag{2.4}$$

È stato riscontrato, in seguito, che il valore minimo del suddetto parametro corrisponde al massimo livello di super-saturazione ottenibile [44]. Infine, una volta depressurizzato il precipitatore e rimosso il solvente organico, le particelle prodotte vengono essiccate flussando continuamente CO₂ prima di essere raccolte e analizzate.

Gli svantaggi del processo discontinuo GAS risiedono in una capacità limitata del vessel, nella possibilità di trovare tracce di solvente organico nelle particelle prodotte e una distribuzione plurimodale finale della loro dimensione dovuta alla mancanza di controllo del trasferimento di materia.

2.4.2.2 Supercritical Antisolvent (SAS)

Il processo SAS si differenzia principalmente dal GAS per la sua natura continua e lo schema del processo è quello mostrato in figura 2.8: inizialmente, la SC-CO₂ è inviata al precipitatore fin tanto che le condizioni di pressione e portata non raggiungono lo stato stazionario. La soluzione di soluto, allora, è inviata al precipitatore tramite un capillare e quando i due fluidi entrano in contatto avviene la cristallizzazione e la micronizzazione del principio attivo [49].

Tale processo trova la sua origine nell'avvenimento simultaneo di due fenomeni: il fluido penetra nelle goccioline di liquido, dove si comporta come anti-solvente, mentre il solvente organico evapora e la precipitazione avviene [48].

Le proprietà delle particelle prodotte, in questo caso, sono fortemente influenzate dalle variabili operative del processo quali pressione, temperatura, tipologia di solvente organico, concentrazione di soluto e portata dell'anti-solvente. Manipolando, poi, queste variabili si possono ottenere particelle amorfe o cristalline [50].

Successivamente, diversi processi sono stati brevettati e differiscono per la modalità di alimentazione dei fluidi. Ad esempio, il processo Concentric Tube Antisolvent Reactor (CTAR) utilizza un reattore tubolare per la produzione di particelle ma il loro recupero diventa ancora più problematico dato che il diametro del reattore è inferiore a 2,50 cm. Oppure, il processo Aerosol Solvent Extraction System (ASES) in cui la soluzione con il solido disciolto viene atomizzata e spruzzata nel fluido supercritico per aumentare il trasferimento di materia, in quanto più le goccioline sono piccole maggiore è il trasferimento di materia rispetto a goccioline di dimensioni maggiori [51]. Infine, la problematica di incrementare il trasferimento di massa è stata superata anche attraverso l'inserimento di una superficie vibrante all'interno del precipitatore e il processo prende il nome di Supercritical Anti-Solvent with Enhanced Mass Transfer (SAS-EM) [47].

2.4.2.3 Supercritical Fluid Extraction of Emulsion (SFEE)

Il processo mostrato in figura 2.9, tratta l'estrazione tramite fluidi supercritici da una emulsione. Nella prima fase del processo, l'emulsione è ottenuta a pressione ambiente: il soluto disciolto in un solvente organico produce un'emulsione quando nel sistema è aggiunta anche acqua caratterizzata dalla presenza di tensioattivi, il cui compito è stabilizzare la soluzione finale. A questo punto, l'emulsione olio in acqua (o/w) è inviata, tramite un ugello atomizzatore, in una camera di estrazione ad alta pressione in cui incontra in controcorrente l'anidride carbonica supercritica. Poiché la selettività della SC-CO₂ è nei confronti del solvente organico, la miscela viene depressurizzata attraverso una valvola micrometrica riscaldata per separare i due fluidi. Sul fondo del reattore, invece, si ha la sospensione di particelle in acqua che vengono recuperate attraverso tecniche di filtrazione o centrifugazione [52].

Il processo SFEE combina l'efficienza dell'estrazione con i fluidi supercritici e l'abilità delle emulsioni nell'ottenere nanoparticelle. Infatti, i vantaggi principali di adoperare questo processo risiedono nell'ottenimento di particelle caratterizzate dall'assenza del solvente organico, svantaggio delle metodiche tradizionali di estrazione da emulsione, e particelle di dimensione omogenea e dell'ordine dei 100 nm [44].

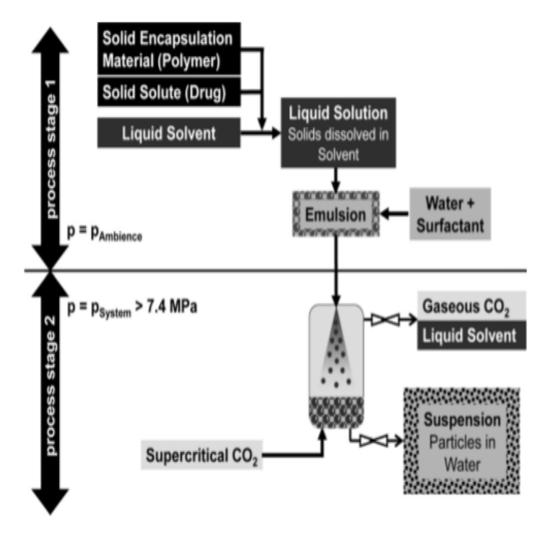


Figura 2.9: Schema di un processo SFEE.

2.4.3 Processi con SCF come agente nebulizzante

I fluidi supercritici vengono utilizzati anche per assistere la nebulizzazione della soluzione della sostanza processata. Carbon dioxide Assisted Nebulization with Bubble Dryer (CAN-BD) e Supercritical Fluid-Assisted Atomization (SAA) sono basati su tale principio.

2.4.3.1 Carbon dioxide Assisted Nebulization with Bubble Dryer (CAN-BD)

Il processo CAN-BD è stato utilizzato per micronizzare principi attivi a valori di 1-3 μ m, compatibile con il rilascio del farmaco idrofilo per via polmonare [53].

La semplicità del processo è mostrata in figura 2.10: la soluzione organica o acquosa contenente il soluto viene miscelata continuamente con l'anidride carbonica supercritica in un restrittore a T riscaldato alla temperatura di 50 °C per evitarne l'occlusione. L'emulsione così formata è, poi, espansa a pressione atmosferica all'interno di una camera di essiccamento. L'espansione della soluzione produce un aerosol e le micro-bolle sono facilmente essiccate con azoto molecole alimentato alla camera. A questo punto, le particelle solide sono raccolte in un filtro di carta di porosità inferiore all'unità di micrometro.

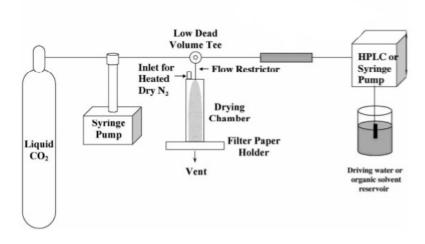


Figura 2.10: Schema di un processo CAN-BD.

Le variabili manipolabili influenzati il processo sono la portata di alimentazione della soluzione, la concentrazione del solido nella soluzione iniziale, diametro del restrittore, temperatura e tempo di residenza delle micro-bolle nella camera di essiccamento [51].

2.4.3.2 Supercritical Fluid-Assisted Atomization (SAA)

Analogamente al processo CAN-BD, il processo SAA può essere applicato sia alle soluzioni acquose sia a quelle organiche di soluto.

Una volta che la soluzione è a contatto con il fluido supercritico viene atomizzata e inviata al precipitatore in cui è alimentato a sua volta dell'azoto molecolare per favorire l'evaporazione del solvente dalle gocce e, quindi, la seguente super-saturazione e precipitazione del soluto.

Allora, nel SAA si hanno due fasi di atomizzazione: la prima di tipo pneumatico dovuta al passaggio della soluzione nell'ugello e, la seconda, dovuta al rilascio della CO₂ dalle gocce primarie. A questo proposito, la concentrazione dell'anidride carbonica supercritica deve essere tale da raggiungere un ottimo tra l'effetto di anti-solvente che la CO₂ manifesterebbe se la sua concentrazione fosse troppo elevata e, viceversa, la mancata atomizzazione secondaria se la concentrazione fosse troppo bassa [54].

3. Materiali e Metodi

3.1 Idrocortisone

Figura 3.1: Formula di struttura dell'idrocortisone.

L'idrocortisone, anche detto cortisolo, appartiene alla famiglia dei glucocorticoidi, ormoni steroidei prodotti nella zona fascicolata della corticale del surrene e la sua formula di struttura è presentata in figura 3.1.

La sua funzione principale nel corpo è quella di promuovere la gluconeogenesi, processi antinfiammatori e, inoltre, contrastare disturbi della pelle e reazioni allergiche. I suoi risvolti negativi, invece, sono legati ad un aumento della pressione sanguigna e al malfunzionamento del sistema riproduttivo e del fegato [55].

L'assunzione del suddetto principio attivo può avvenire per via topica, orale o tramite iniezione previa supervisione medica. Ad esempio, l'idrocortisone trova ampio impiego in pazienti che presentano insufficienza surrenale; alcuni studi hanno dimostrato che un elevato dosaggio del farmaco è associato ad una diminuzione della qualità della vita. Tuttavia, a causa della mancanza di parametri affidabili, è difficile determinare un dosaggio ottimale che simuli la naturale secrezione circadiana del cortisolo prescrivendo così cure sovra o sotto stimate con conseguenze croniche sulla salute e il benessere dell'individuo [56].

Il farmaco utilizzato in laboratorio è stato acquistato dall'azienda Sigma-Aldrich con una purezza non inferiore al 98%. Il suo aspetto è quello di una polvere cristallina bianca inodore che risulta insolubile in acqua e scarsamente solubile in etanolo, altre caratteristiche chimico fisiche sono state riportate in tabella 3.1.

Tabella 3.1: Caratteristiche del farmaco.

Nome IUPAC	Numero CAS	Formula Chimica	Peso Molecolare, g/mol	Temperatura di Fusione, °C
11β,17α,21-triidrossipregn-4- en-3,20-dione	50-23-7	$C_{21}H_{30}O_5$	362,47	214

3.2 Metodi Sperimentali

3.2.1 Funzionamento dell'apparecchiatura

Le misure di solubilità del solido nella miscela supercritica effettuate in laboratorio sono di tipo dinamico: in figura 3.2 è mostrato lo schema del processo.

Brevemente, l'anidride carbonica, stoccata allo stato liquido all'interno della bombola, viene prelevata e compressa tramite una pompa volumetrica raggiungendo celermente il valore di pressione operativa. Contemporaneamente, il valore di temperatura (maggiore di quello critico) viene raggiunto più lentamente e mantenuto costante tramite l'ausilio di una stufa, all'interno della quale è posta la cella di equilibrio, contenente il solido da solubilizzare. L'etanolo, prelevato da un piccolo serbatoio, viene pompato nella zona di miscelazione dei flussi prima dell'ingresso in stufa. Raggiunte le condizioni di temperatura e pressione, l'autoclave è inserito in linea tramite una valvola a tre vie e la miscela inizia a saturarsi richiedendo un lasso di tempo compreso tra 50 e 70 min.

Una volta che le condizioni di saturazione sono state raggiunte, la soluzione attraversa poi la sezione di depressurizzazione caratterizzata dalla presenza di una valvola micrometrica regolatrice di pressione: la sezione di passaggio viene variata in modo automatico al fine di mantenere a monte il valore di pressione impostato. Lo scopo di tale valvola è, inoltre, quella di operare l'espansione della soluzione dalle condizioni di pressione di lavoro a quella atmosferica, in cui il biossido di carbonio si trova allo stato gassoso. La valvola è normalmente riscaldata ad una temperatura di 45 °C per fondere il ghiaccio secco che si può formare a seguito della rapida espansione della soluzione per effetto Joule-Thomson. Infine, la soluzione uscente dal restrittore è inviata in una trappola di etanolo, solvente in cui il farmaco è solubile, e l'anidride carbonica è scaricata in atmosfera: il solido raccolto in provetta viene analizzato quantitativamente tramite tecniche spettroscopiche.

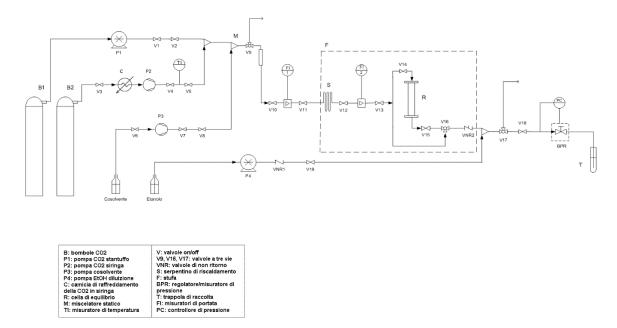


Figura 3.2: Schema del processo utilizzato in laboratorio per effettuare le analisi di solubilità.

3.2.2 Condizioni operative

La portata massica totale della miscela supercritica con cui si è deciso di effettuare le prove di laboratorio è pari a 0.6 g al minuto, scelto come ottimo tra un valore basso di portata, tale da consentire un tempo di permanenza adeguato al raggiungimento delle condizioni di saturazione in un unico passaggio all'interno dell'autoclave, e un errore di lettura accettabile della grandezza dovuto ai misuratori.

Per quanto riguarda, invece, la scelta di promuovere la solubilità tramite l'uso di un cosolvente, è stato già accennato nel capitolo 1 di questo lavoro di tesi che un quantitativo di etanolo inferiore al 15% ad alte pressioni e alla temperatura di 100 °C garantisce l'esistenza di un flusso monofasico nel sistema: ogni isoterma di solubilità è stata condotta, allora, al 2%, al 3% e al 4% molare di modificante.

Le isoterme condotte, ad una temperatura crescente tra 45 °C e 100 °C, sono caratterizzate tutte da cinque punti di pressione compresi in un intervallo tra 130 bar e 270 bar; a loro volta, sono stati eseguiti tre campionamenti successivi di 20 minuti circa per ogni punto di pressione, ottenendo complessivamente 180 misure di solubilità dell'idrocortisone nella miscela anidride carbonica supercritica-etanolo. Infine, dal volume della cella e dalla portata volumetrica della miscela, è stato stimato un tempo di permanenza di circa 60 minuti, momento in cui inizia il primo campionamento.

Il grafico, in figura 3.3, riporta l'evoluzione della solubilità del principio attivo alla temperatura di 100 °C, alla pressione di 150 bar e con una frazione molare di modificante pari a 0,04: la frazione molare di farmaco tra il secondo e il terzo campionamento si mantiene praticamente costante, indice che le condizioni di saturazione sono state raggiunte.

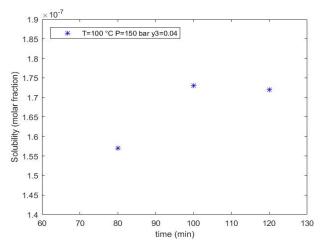


Figura 3.3: Evoluzione della solubilità dell'idrocortisone nella miscela anidride carbonica supercritica-etanolo.

3.2.3 Descrizione dei componenti

In questo paragrafo si riporta una descrizione accurata dei principali costituenti del sistema mostrato già in figura 3.1.

<u>Bombole B1 e B2</u>: l'anidride carbonica è stoccata allo stato liquido in bombole alla pressione di circa 57 bar, pari alla tensione di vapore del composto alla temperatura di 298.15 K.

<u>Cella di equilibrio R</u>: è un reattore dal volume di 45 cm³ circa, progettato per resistere a pressioni inferiori a 700 bar. L'autoclave è posto all'interno della stufa affinché siano costanti le condizioni di temperatura e pressioni della miscela supercritica attraversante la cella stessa. Inoltre, il principio attivo è disposto su delle sferette di vetro, il cui scopo è quello di aumentare la superficie di scambio tra il solido e la miscela e, infine, evitare la formazione di percorsi preferenziali. Alle due estremità del riempimento, si aggiunge uno strato finale di lana di vetro per impaccare il letto e limitare il trascinamento del solido con il flusso uscente.

<u>Pompa P1</u>: è una pompa volumetrica a stantuffo, prodotta dall'azienda Scientific System, Inc., ed utilizzata per fluidi supercritici in un campo operativo di pressione fino a 690 bar. La pompa opera in controllo di portata e la massima portata volumetrica erogata in un minuto è di 24 ml, con un'accuratezza del ±5%. Inoltre, la P1 è caratterizzata da un sistema di raffreddamento che viene attivato circa 20 minuti prima per raggiungere livelli di temperatura accettabili per il successivo pompaggio del fluido supercritico.

Pompe P2 e P3: sono pompe volumetriche a siringa utilizzate per l'anidride carbonica e l'etanolo rispettivamente, utilizzabili fino alla pressione di 690 bar e alla temperatura di 200 °C. La prima viene adoperata in fase di campionamento poiché più accurata della pompa P1 a stantuffo ma presenta lo svantaggio di avere un volume finito della siringa. Tale volume è di 103 ml se il cilindro della siringa viene raffreddato tramite un bagno di glicole etilenico C alla temperatura di 14 °C: abbassando la temperatura anche il volume specifico dell'anidre carbonica diminuisce. La pompa P2 è, invece, la pompa dell'etanolo utilizzata per le misure di solubilità con la miscela supercritica. Infine, entrambe le pompe appartengono alla serie 100DM prodotte dall'azienda inglese Teledyne Isco e sono raffigurate in figura 3.4.





Figura 3.4: Pompe P1, P2 e P3 del laboratorio di Fluidi Supercritici (DISAT), Politecnico di Torino.

<u>Pompa P4</u>: è una pompa volumetrica ad azione pneumatica per liquidi, mostrata in figura 3.5, utilizzata nell'ultimo tratto della linea a valle della valvola di non ritorno VNR2, localizzata a sua volta all'esterno della stufa F. Il suo scopo è inviare una piccola quantità di liquido, etanolo nel caso in esame, al fine di eliminare tracce di solido nella linea e nel restrittore a seguito della rapida espansione. Infine, nelle prove condotte in laboratorio, la portata di diluizione è stata variata tra 0.1 ml/min e 0.2 ml/min.



Figura 3.5: Pompa P4 del laboratorio di Fluidi Supercritici (DISAT), Politecnico di Torino.

<u>Stufa F</u>: all'interno della stufa è posta la cella di equilibrio per mantenere costante il valore di temperatura prevista per la prova. Tale apparecchiatura, prodotta dalla società tedesca Memmert GmbH + Co., è in grado di lavorare in un campo compreso tra 20 °C e 250 °C. Le prove, tuttavia, sono state eseguite fino ad un massimo di 100 °C.

In figura 3.6 è mostrato l'interno della stufa utilizzata nel laboratorio di Fluidi Supercritici.



Figura 3.6: Stufa al cui interno è posto la cella di equilibrio del laboratorio di Fluidi Supercritici (DISAT), Politecnico di Torino.

<u>Tubazioni e valvole</u>: le tubazioni, di acciaio inossidabile e di diametro nominale pari a 1/16", sono state testate per lavorare fino alla pressione di 690 bar come gli altri costituenti del sistema di laboratorio in esame. Per un opportuno accoppiamento, anche le valvole sono caratterizzate dal medesimo diametro nominale e campo di pressione. Le valvole V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8, V10, V11, V12, V13, V14, V15 e V18 sono valvole di tipo on/off mentre le valvole V9, V16 e V17 sono delle valvole anch'esse on/off a tre vie. La valvola di spurgo V9 ha una duplice funzione: permette l'allontanamento dell'umidità presente in linea in fase di avvio ed una depressurizzazione rapida nel caso di sovrappressione improvvisa del sistema. Le valvole contrassegnate come VNR1 e VNR2 sono di non ritorno e consentono il passaggio del fluido in un solo verso.

<u>Back Pressure Regulator (BPR)</u>: è un dispositivo di contropressione caratterizzato da una valvola micrometrica a spillo il cui obiettivo è regolare e mantenere costante la pressione del sistema a monte di sé stessa. Prodotta da Thar Technologies, Inc., è in grado di lavorare fino a 680 bar e tale valvola è, inoltre, internamente riscaldata alla temperatura massima di 45 °C per sciogliere il ghiaccio secco che potrebbe formarsi in seguito alla rapida espansione del biossido di carbonio.

<u>Misuratori di portata FI1 e FI2</u>: i due flussimetri sono collocati rispettivamente prima dell'ingresso in stufa F e all'interno di essa dopo un tratto di tubazione di circa 10 m. Tali misuratori sfruttano la forza di Coriolis per stimare continuamente la portata, la densità e anche la temperatura della miscela. In figura 3.7 vengono raffigurati i suddetti misuratori.



Figura 3.7: Misuratori di portata FI1e FI2 rispettivamente del laboratorio di Fluidi Supercritici (DISAT), Politecnico di Torino.

3.2.4 Descrizione della procedura eseguita

Attraverso la procedura descritta in dettaglio di seguito, è stato possibile effettuare le misure di solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica costituita da anidride carbonica e etanolo in diverse percentuali.

3.2.4.1 Operazioni preliminari

Preparazione dell'autoclave

Una volta accertati che la cella sia pulita e asciutta, al suo interno viene disperso un quantitativo di circa 1 g su delle sferette di vetro di diametro variabile. Successivamente, la cella è completata con un ulteriore strato di lana di vetro in prossimità della chiusura prima di essere serrata manualmente ed inserita all'interno della stufa.

Preparazione delle trappole

All'inizio della fase di sperimentazione, le trappole impiegate in laboratorio erano caratterizzate solo da una quantità di etanolo di circa 10 g. In questo modo, però, il battente di liquido risultante non era tale da scongiurare che parte del solido fosse trascinato via con l'anidride carbonica che si espande a pressione atmosferica. Allora, le trappole sono state modificate aggiungendo circa 20 g di sferette di vetro di diametro variabile allo scopo di renderle più efficienti, come mostrato in figura 3.8. La conferma di quanto affermato si ottiene anche da una maggiore riproducibilità dei dati.

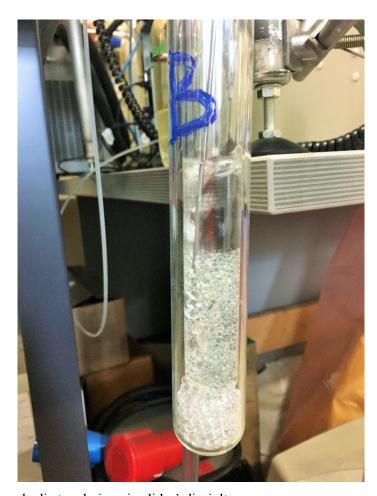


Figura 3.8: Trappola di etanolo in cui solido è disciolto.

Spurgo del sistema

In fase di accensione del sistema, dopo aver aperto le bombole B1 B2 e acceso le apparecchiature, è buona norma effettuare lo spurgo dell'umidità atmosferica della linea tramite la leggera apertura della valvola a tre vie V9 assieme a V1 eV2. L'operazione dura circa 15 minuti e al termine tutte e tre le valvole vengono richiuse.

Riempimento delle pompe P2 e P3

Durante questo periodo, prima dell'avvio vero e proprio del sistema, è condotto anche il riempimento delle siringhe delle pompe rispettivamente dalla bombola B2 e da un piccolo serbatoio di etanolo. In entrambi i casi, l'operazione avviene tramite l'apertura delle valvole di aspirazione in cui fluisce una portata volumetrica massima di 25 ml/min. Infine, solo la valvola V6 viene richiusa mentre la V3 rimane aperta affinché le condizioni di equilibrio termiche non sono state raggiunte.

3.2.4.2 Messa in marcia del sistema

Pressurizzazione del sistema

Dopo aver impostato la stufa F al valore desiderato di temperatura, l'operazione successiva è la pressurizzazione dell'intera linea escludendo l'autoclave R tramite l'apertura della valvola a tre vie V16 e la chiusura di V14 e V15.

Successivamente, tramite il telecomando del BPR, si attiva il controllore e si imposta il valore di pressione operativo: la pompa P1, ormai raffreddata, viene avviata con una portata di 3,5 ml/min per velocizzare tale fase e, poi, ridotta a valori inferiori ad 1 ml/min.

La valvola micrometrica, a differenza di una valvola riduttrice di pressione, regola la pressione a monte variando la posizione dell'ago: aperture maggiori corrispondo a valori di pressione minore.

Contemporaneamente, la pompa P1 segnerà un valore di pressione leggermente più alto rispetto al valore indicato dal BPR a causa delle perdite di carico della linea. Se tali perdite sono elevate, allora, bisogna interrompere la prova ed eseguire un flussaggio spinto della linea al fine di eliminare gli eventuali depositi di farmaco.

Tale fase termina quando le condizioni operative di temperatura e pressione sono state raggiunte.

<u>Inserimento del co-solvente</u>

L'intera campagna di prove è stata condotta utilizzando etanolo come modificante al fine di studiarne l'influenza sulla solubilità dell'idrocortisone rispetto al caso più semplice con sola CO₂ supercritica. La pompa P3 viene, dapprima, pressurizzata al valore della pressione in linea tramite la chiusura delle valvole di aspirazione V6 (chiusa dopo la fase di riempimento della siringa) e di mandata V7.

Successivamente, la pompa P3 è impostata in controllo di portata e le valvole V7 e V8 vengono aperte per consentire la miscelazione in M dei due fluidi.

Taratura dei Flussimetri

Per ogni prova giornaliera eseguita in laboratorio si è reso necessario effettuare la calibrazione dei misuratori FI1 e FI2 allo scopo di visualizzare nei terminali di uscita il corretto valore di portata, densità e temperatura.

Le pompe P1 e P3 vengono momentaneamente arrestate e le valvole V10, V11, V12 e V13 chiuse.

In seguito, le due operazioni di calibrazione vengono effettuate separatamente per i due flussimetri. A questo punto, le pompe vengono avviate e le valvole nuovamente aperte.

Adescamento e avviamento della pompa P3

Prima che la pompa P3 venga avviata, deve essere opportunamente adescata evitando così bolle di aria o anidride carbonica all'interno della linea. Una volta avviata, il suo inserimento avviene tramite l'apertura della valvola V19 ad un valore di pressione di poco superiore a quello di esercizio.

Come già accennato nel paragrafo 3.2.1, l'obiettivo di inviare etanolo nel tratto finale del sistema è evitare la deposizione di soluto: la portata impostata, dunque, è funzione della solubilità predetta del solido e varia tra 0,1 ml/min e 0,2 ml/min.

Pressurizzazione della cella R

Una volta raggiunte le condizioni operative di temperatura e pressione, è necessario inserire la cella di equilibrio R nel circuito poiché risulta ancora esclusa dalla valvola aperta V16. La fase di pressurizzazione viene condotta aprendo V15 e mantenendo aperta V16 al fine di riempire l'autoclave della miscela supercritica dal basso. Dopo un lasso di tempo di svariati minuti, il valore di pressione indicato nel terminale del BPR si è riportato a quello operativo: a questo punto, in ordine, si chiudono le valvole V15 e V16 e le valvole V14 e V15 vengono aperte.

Si attende ulteriormente qualche minuto affinché il sistema si riporti in condizioni stazionarie di pressione.

3.2.4.3 Esecuzione delle prove

Transitorio con pompa P1

A causa della limitata capacità della pompa P3, il transitorio viene suddiviso in 2: una prima parte operante con la pompa a stantuffo P1 ed una seconda con la pompa a siringa P3.

Dopo aver regolato manualmente la portata volumetrica della pompa P1 ad un valore prossimo allo 0,6 g/min desiderato, si attende circa 15 minuti prima di scambiare le due pompe.

La finalità di questa fase è far fluire nella cella R una portata la cui composizione è tanto più simile a quella inviata tramite l'utilizzo delle due pompe a siringa P2 e P3, al fine di ridurre il tempo richiesto per il raggiungimento delle condizioni di equilibrio.

Transitorio con pompa P2

Inizialmente, la pompa P2 deve essere pressurizzata al medesimo valore di pressione della linea tramite la chiusura delle valvole di aspirazione V3 e di mandata V4, analogamente a quanto riportato per la pompa P3 nella fase di inserimento del co-solvente in linea. Successivamente, viene impostato il valore di portata volumetrico opportuno e la pompa P2 lavorerà in controllo di portata.

Una volta inserita la pompa P2 in linea tramite l'apertura ordinata della valvola V5 e poi V4, la pompa P1 viene disattivata e le valvole V1 e V2 vengono chiuse.

In questo secondo caso, il transitorio ha una durata di 40 minuti ed è pari a metà del tempo di saturazione stimato per la cella R.

Campionamento

Per ogni punto di pressione costituente l'isoterma, sono stati effettuati 3 campionamenti successivi della durata di 20 o 25 minuti per solubilità estremamente basse. Ad ogni campionamento è, inoltre, associata la quantità di soluzione fluita in grammi, utile per determinare la solubilità del principio attivo nella miscela supercritica.

La provetta verrà pesata e analizzata allo spettrofotometro per determinare la concentrazione di solido.

Nuove condizioni operative

Una volta terminato anche l'ultimo campionamento, si arresta la pompa P2 e si avvia la pompa P1 con conseguente apertura delle valvole V1 e V2 e chiusura delle valvole V4 e V5.

Attraverso il terminale della valvola micrometrica si imposta il valore di pressione successivo, in genere maggiore del precedente, e nella pompa P3 viene inserito il nuovo valore stimato di portata volumetrica.

Durante la fase di pressurizzazione della linea alla nuova condizione, la siringa della pompa P2 viene depressurizzata al valore di pressione di bombola ed effettuato un ulteriore ciclo di riempimento della siringa, già descritto nel paragrafo 3.2.3.2.

3.2.4.4 Messa in arresto del sistema

Una volta terminate le condizioni di temperatura e pressione da investigare, si ritorna ad utilizzare la pompa P1 per operare la fase di arresto del sistema. A causa della durata complessiva della prova, circa 15 ore, non si riesce a testare più di 3 valori di pressione per volta e, quindi, l'isoterma viene ultimata in due giornate consecutive.

Nel primo caso, la messa in ferma dell'impianto è più veloce: si procede, innanzitutto, all'isolamento dell'autoclave R tramite la chiusura delle valvole V14 e V15 e l'apertura della V16 a tre vie. In questo modo, il vessel R rimane pressurizzato all'ultimo valore di pressione a cui è stata condotta la prova del giorno e facilita la sua fase di inserimento, descritta nel paragrafo 3.2.3.2, del giorno seguente poiché la differenza di pressione da ristabilire risulta minore rispetto al caso in cui l'autoclave sia a pressione atmosferica.

Successivamente, si è scelto di far fluire per circa 20 minuti ancora la miscela supercritica in modo da solubilizzare eventuali tracce di farmaco e ripulire così la linea per non alterare le prove del giorno seguente.

Nella fase finale, allora, le pompe attive vengono disattivate, le valvole della linea e le bombole vengono chiuse.

Nel caso in cui, invece, sia necessario rigenerare il quantitativo di farmaco nella cella di equilibrio o testare un farmaco differente, il sistema deve essere completamente depressurizzato fino alle condizioni atmosferiche per poter estrarre in sicurezza la cella R dalla stufa F. Allora, la depressurizzazione attraverso il regolatore BPR viene condotta, con le pompe attive, in maniera graduale per evitare la rapida espansione del biossido di carbonio, fino al raggiungimento della pressione di bombola. Le bombole vengono chiuse, le pompe isolate e si continua con la depressurizzazione fino ad arrivare alla condizione di pressione atmosferica.

Lavaggio ultimo tratto della linea

Al termine di ogni prova è buona norma effettuare il lavaggio dell'ultimo tratto di tubazione del sistema per rimuovere eventuali tracce di farmaco che falserebbero le prove seguenti e per facilitare l'accensione del sistema che altrimenti risulterebbe difficoltosa per via delle perdite di carico non trascurabili.

Attraverso il regolatore di pressione BPR, a controllo disattivato, si procede con una prima pressurizzazione del tratto d'interesse a valvola chiusa tramite la pompa P4. A questo punto, la pulizia viene effettuata variando la sezione di passaggio diverse volte definendo la posizione dello spillo della valvola. Come riferimento per un buon lavaggio è stato utilizzato il raggiungimento di 90 bar di pressione con un'apertura di 1000 (1/6 del totale) ad una portata di 0,02 ml/min.

3.3 Analisi chimica dei campioni

In chimica analitica, come già accennato nel capitolo 1 di questa tesi, una tecnica comunemente utilizzata per effettuare analisi di tipo quantitativo del soluto in trappola è la spettroscopia UV che presenta il principale vantaggio di richiedere poche manipolazioni del campione, oltre ad essere poco dispendiosa in termini di tempo.

3.3.1 Spettroscopia UV

Il principio su cui si basa questa tecnica è l'assorbimento di fotoni con energia $h\nu$ (h è la costante di Planck pari a $6,626*10^{-34}$ Js) che determina la transizione della molecola dallo stato fondamentale a quello eccitato.

L'assorbimento A si definisce in funzione dell'intensità I del fascio di luce che attraversa il materiale:

$$A = -\log\frac{I}{I_0} \tag{3.1}$$

In cui I_0 e I rappresentano rispettivamente l'intensità della radiazione entrante ed uscente.

Dunque, la capacità del campione di assorbire la radiazione elettromagnetica viene registrata dallo spettro di assorbimento riportante in ascissa la lunghezza d'onda λ , espressa in nm, e in ordinata l'assorbanza A.

La legge di Lambert-Beer esprime che tale assorbimento è proporzionale alla concentrazione dell'analita *C*:

$$A = \varepsilon b C \tag{3.2}$$

Con ε il coefficiente di estinzione molare (M⁻¹cm⁻¹) b il cammino ottico (cm).

Il cammino ottico è lo spessore della soluzione attraversata dalla radiazione cioè la profondità della cuvetta analitica in quarzo e pari a 1 cm.

In laboratorio si dispone di uno spettrofotometro Perkin Elmer Lambda25, figura 3.9, con cui si analizzano le soluzioni finali allo scopo di determinare la solubilità dell'idrocortisone alle diverse condizioni operative del processo, nel campo di investigazione dell'ultravioletto (200-400 nm).



Figura 3.9: Spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 25.

Tuttavia, nella prima fase di avvio dello strumento è necessario definire il "bianco", ovvero una cella identica a quella del campione ma caratterizzata dalla sola presenza del solvente in cui l'analita è disciolto. Questo passaggio è fondamentale perché il solvente può dar origine a delle anomalie che alterano i risultati, allora, la misura finale è riferita al bianco in modo da ottenere risultati migliori.

Il solvente utilizzato è l'etanolo e l'idrocortisone mostra un picco di assorbimento alla lunghezza d'onda di circa 242 nm come mostrato in figura 3.10.

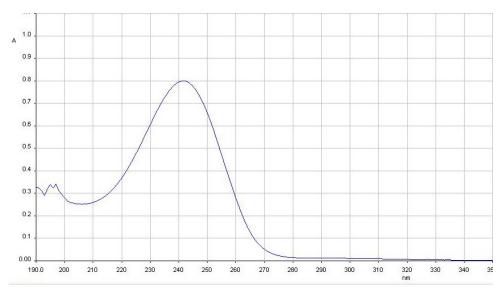


Figura 3.10: Spettro di assorbimento dell'idrocortisone in etanolo che mostra il picco a 241.6 nm.

Attraverso la costruzione di una retta di taratura per il farmaco in esame è stato possibile definire il coefficiente angolare che correla l'assorbanza alla concentrazione del soluto in trappola.

La retta di taratura è stata ottenuta a partire da una soluzione madre a titolo noto (200ppm), utilizzata come base per preparare altre soluzioni a concentrazioni inferiori tramite delle diluizioni successive.

Tale retta, riportata in figura 3.11, presenta la linearità tra 3 ppm e 22 ppm ed è stata realizzata tramite la tecnica dei minimi quadrati sui dati sperimentali:

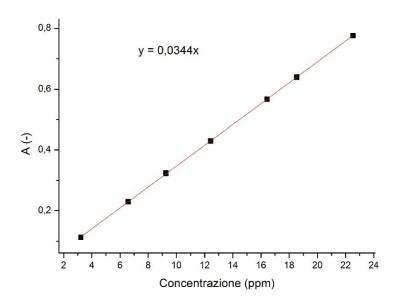


Figura 3.11: Retta di taratura per il sistema idrocortisone-etanolo.

4. Interpretazione dei Risultati

4.1 Solubilità misurata dell'idrocortisone

Nella tabella 4.1, si riportano le misure di solubilità dell'idrocortisone nella miscela anidride carbonica supercritica-etanolo, ottenute per le prove condotte alla temperatura di 45°C, 55°C, 75°C e 100°C con una frazione molare di modificante del 2%, 3% e 4% a diversi valori di pressione.

Tabella 4.1: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica.

Temperatura, °C	Pressione, bar	у3	ρ, kg/m³	y 2
45	130	0,02	702,2	1,37E-07
	130	0,02	702,6	1,25E-07
	130	0,02	702,3	1,22E-07
	150	0,02	744,5	2,05E-07
	150	0,02	744,3	2,29E-07
	150	0,02	744,6	1,97E-07
	190	0,02	799,7	3,36E-07
	190	0,02	800,1	3,45E-07
	190	0,02	800,4	3,57E-07
	230	0,02	837,6	3,56E-07
	230	0,02	837,5	4,27E-07
	230	0,02	837,7	4,54E-07
	270	0,02	867,3	4,83E-07
	270	0,02	867,4	5,29E-07
	270	0,02	867,4	5,98E-07
55	130	0,02	588,7	1,03E-07

	130	0,02	588,4	6,88E-08
	150	0,02	662,4	1,69E-07
	150	0,02	662,1	1,49E-07
	150	0,02	662,0	1,26E-07
	190	0,02	740,3	3,08E-07
	190	0,02	740,1	3,98E-07
	190	0,02	740,2	3,60E-07
	230	0,02	788,4	6,68E-07
	230	0,02	789,0	6,59E-07
	230	0,02	788,9	6,75E-07
	270	0,02	824,3	6,13E-07
	270	0,02	824,2	7,21E-07
	270	0,02	824,4	8,68E-07
75	130	0,02	373,7	1,78E-08
	130	0,02	373,9	1,17E-08
	150	0,02	471,6	3,96E-08
	150	0,02	471,9	7,95E-08
	190	0,02	608,4	2,16E-07
	190	0,02	608,1	2,30E-07
	190	0,02	608,2	3,11E-07
	230	0,02	684,6	5,52E-07
	230	0,02	684,5	5,29E-07
	230	0,02	684,4	5,30E-07
	270	0,02	735,1	7,30E-07

	270	0,02	734,9	7,60E-07
	270	0,02	734,8	8,49E-07
100	130	0,02	264,3	6,44E-09
	130	0,02	263,1	5,37E-09
	150	0,02	327,1	4,94E-08
	150	0,02	327,5	6,12E-08
	190	0,02	453,9	2,03E-07
	190	0,02	453,8	1,92E-07
	190	0,02	454,3	2,13E-07
	230	0,02	551,7	6,23E-07
	230	0,02	550,5	6,36E-07
	230	0,02	551,3	5,99E-07
	270	0,02	619,4	1,18E-06
	270	0,02	619,5	1,14E-06
	270	0,02	619,4	1,16E-06
45	130	0,03	715,2	7,40E-07
	130	0,03	716,2	7,33E-07
	130	0,03	715,9	6,83E-07
	150	0,03	753,6	7,12E-07
	150	0,03	754,0	7,74E-07
	150	0,03	753,5	7,51E-07
	190	0,03	804,7	9,06E-07
	190	0,03	804,1	1,10E-06
	190	0,03	805,0	1,17E-06

	230	0,03	841,3	1,01E-06
	230	0,03	840,9	1,25E-06
	230	0,03	840,8	1,33E-06
	270	0,03	869,1	1,17E-06
	270	0,03	868,7	1,59E-06
	270	0,03	868,8	1,77E-06
55	130	0,03	614,4	4,24E-07
	130	0,03	614,9	3,85E-07
	130	0,03	613,0	3,14E-07
	150	0,03	676,7	5,48E-07
	150	0,03	677,3	5,96E-07
	150	0,03	677,1	5,14E-07
	190	0,03	748,2	7,46E-07
	190	0,03	747,9	8,97E-07
	190	0,03	748,1	1,04E-06
	230	0,03	793,6	1,26E-06
	230	0,03	793,4	1,35E-06
	230	0,03	793,4	1,49E-06
	270	0,03	827,6	1,79E-06
	270	0,03	827,7	1,78E-06
	270	0,03	827,7	1,83E-06
75	130	0,03	390,7	1,03E-07
	130	0,03	389	1,01E-07
	130	0,03	390,2	8,29E-08

	1.50	0.02	400.5	1.005.05
	150	0,03	492,5	1,98E-07
	150	0,03	492,2	2,17E-07
	150	0,03	493,1	2,32E-07
	190	0,03	621,3	6,61E-07
	190	0,03	619,2	6,98E-07
	190	0,03	620,4	7,92E-07
	230	0,03	691,8	1,13E-06
	230	0,03	691,8	1,21E-06
	230	0,03	691,7	1,29E-06
	270	0,03	740,3	1,78E-06
	270	0,03	739,3	1,91E-06
	270	0,03	740,2	1,96E-06
100	130	0,03	269,5	6,49E-08
	130	0,03	265,2	7,35E-08
	130	0,03	266,5	5,35E-08
	150	0,03	333,1	1,14E-07
	150	0,03	334,1	1,05E-07
	150	0,03	333,2	1,20E-07
	190	0,03	465,2	3,80E-07
	190	0,03	467,3	4,39E-07
	190	0,03	466,2	4,72E-07
	230	0,03	561,5	1,31E-06
	230	0,03	560,7	1,37E-06
	230	0,03	559,9	1,43E-06

	270	0,03	627,7	2,45E-06
	270	0,03	627,4	2,50E-06
	270	0,03	627,1	2,59E-06
45	130	0,04	720,8	1,03E-06
	130	0,04	720,6	9,99E-07
	130	0,04	721,4	9,73E-07
	150	0,04	756,7	1,23E-06
	150	0,04	757,4	1,22E-06
	150	0,04	757,5	1,20E-06
	190	0,04	806,4	1,90E-06
	190	0,04	806,9	2,02E-06
	190	0,04	806,8	1,98E-06
	230	0,04	841,9	1,77E-06
	230	0,04	841,8	2,09E-06
	230	0,04	841,8	2,17E-06
	270	0,04	869,8	2,48E-06
	270	0,04	869,3	3,15E-06
	270	0,04	869,5	3,35E-06
55	130	0,04	621,6	4,80E-07
	130	0,04	621,4	5,05E-07
	130	0,04	622,1	5,44E-07
	150	0,04	683,1	7,20E-07
	150	0,04	682,6	7,61E-07
	150	0,04	683,4	7,33E-07

	190	0,04	751,5	1,16E-06
	190	0,04	752,2	1,32E-06
	190	0,04	751,7	1,45E-06
	230	0,04	795,6	1,83E-06
	230	0,04	796,2	2,04E-06
	230	0,04	795,9	2,18E-06
	270	0,04	828,7	2,55E-06
	270	0,04	828,8	2,98E-06
	270	0,04	828,7	2,94E-06
75	130	0,04	398,8	2,66E-07
	130	0,04	399,5	1,70E-07
	130	0,04	399,4	1,35E-07
	150	0,04	504,1	4,19E-07
	150	0,04	503,7	3,89E-07
	150	0,04	503,2	3,42E-07
	190	0,04	626,7	1,00E-06
	190	0,04	627,0	1,03E-06
	190	0,04	625,5	1,01E-06
	230	0,04	696,4	1,86E-06
	230	0,04	696,3	2,02E-06
	230	0,04	695,8	2,04E-06
	270	0,04	742,8	2,73E-06
	270	0,04	743,1	2,93E-06
	270	0,04	742,8	2,98E-06

100	130	0,04	276,1	7,26E-08
	130	0,04	275,2	1,16E-07
	130	0,04	275,2	6,73E-08
	150	0,04	341,1	1,57E-07
	150	0,04	342,6	1,73E-07
	150	0,04	345,8	1,71E-07
	190	0,04	472,3	7,66E-07
	190	0,04	472,6	6,90E-07
	190	0,04	472,9	6,94E-07
	230	0,04	565,2	1,60E-06
	230	0,04	565,7	1,77E-06
	230	0,04	564,2	1,75E-06
	270	0,04	631,2	3,02E-06
	270	0,04	630,8	3,24E-06
	270	0,04	631,6	3,35E-06

Dai dati in tabella, ordinati prima per frazione molare crescente di modificante e poi in ordine di temperatura, si evince che la solubilità dell'idrocortisone nella miscela è al massimo dell'ordine di 10^{-6} , riscontrabile a $y_3=0.03$ e $y_3=0.04$, e il minimo è di 10^{-9} in corrispondenza di una miscela caratterizzata da un quantitativo di etanolo pari al $y_3=0.02$.

I dati riportati sono tutti quelli raccolti durante la sperimentazione, ma nell'elaborazione dei dati ne sono stati eliminati sette al fine di minimizzare la funzione obiettivo della regressione, poiché deviavano molto rispetto all'andamento generale, come sarà riportato nel paragrafo 4.2. Inoltre, dall'analisi dei tre campionamenti condotti allo scopo di verificare il raggiungimento delle condizioni di saturazione, emerge che l'incremento medio tra i primi due campionamenti è del 13,73% mentre del 8,8% tra il secondo e il terzo. Questi dati permettono di affermare che il tempo necessario al raggiungimento della saturazione è molto prossimo al tempo di permanenza stimato di 60 minuti.

4.2 Analisi dei dati sperimentali

4.2.1 Regressione dei dati sperimentali

Le misure di solubilità ottenute in laboratorio sono state regredite tramite l'uso dei modelli empirici presentati già nel primo capitolo di questa tesi.

La risoluzione delle correlazioni, che implicano la non linearità tra le variabili densità, temperatura e pressione con la solubilità del principio attivo, avviene tramite l'uso del software MATLAB[®], appartenente alla suite MathWorks[®], ricercando il minimo della deviazione relativa assoluta media (funzione obiettivo) espressa come:

$$AARD\% = \frac{100}{N-z} \sum_{i=1}^{N} \frac{|y_2^{exp} - y_2^{cal}|}{y_2^{exp}}$$
(4.1)

in cui N è il numero dei dati sperimentali, z rappresenta il numero dei parametri del modello, y_2^{exp} è la solubilità sperimentale e, infine, y_2^{eal} è la solubilità stimata dal modello.

In tabella 4.2, per ogni modello si riporta, oltre al numero di parametri, il valore di AARD% a frazione molare crescente di co-solvente.

Tabella 4.2: Tabella di confronto dei diversi modelli attraverso la deviazione relativa assoluta media.

Modello	AARD%			Parametri
_	$y_3 = 0.02$	$y_3 = 0.03$	$y_3 = 0.04$	
Chrastil (1982)	16,98	16,42	15,82	3
Adachi and Lu (1983)	16,07	13,10	11,13	5
del Valle and Aguilera (1983)	14,40	12,39	11,27	4
Sparks (2008a)	14,50	11,10	9,04	5
Sparks (2008b)	16,42	13,35	11,34	6
Sung and Shim (1999)	15,72	13,77	11,36	4

Bian et al. (2016)	13,61	13,12	10,99	5
Kumar and Johnston (1988)	27,11	14,91	14,12	3
Garlapati and Madras (2009)	16,81	16,24	15,51	3
Amooey (2014)	13,87	11,50	10,66	9
Si-Moussa (2017)	15,16	12,31	10,40	6
Bartle et al. (1991)	22,11	11,99	12,81	3
Ch and Madras (2010)	21,07	12,35	13,03	4
Hezave and Lashkarbolooki (2013)	18,89	12,17	12,13	4
Mendez- Santiago and Teja (1999)	27,32	15,21	14,65	3
Hozhabr et al. (2014)	26,97	14,66	13,77	4
Jafari Nadjad et al. (2010)	14,65	13,03	10,57	4
Khansay et al. (2014)	25,31	20,25	18,48	5
Jouyban et al. (2002)	15,14	12,77	10,73	6
Keshmiri et al. (2014)	15,08	13,89	10,66	5

Yu et al. (1994)	20,75	17,35	14,42	6
Gordillo et al. (1999)	21,21	14,86	12,00	6
Haghbakhsh et al. (2013)	13,48	9,48	7,83	10

Si può osservare che, in generale, i valori di AARD% diminuiscono all'aumentare del quantitativo di etanolo nella miscela supercritica, questo è dovuto alla maggiore riproducibilità delle misure di solubilità nel caso di y_3 =0.04. I valori di solubilità compresi tra 10^{-7} e 10^{-6} corrispondono ad un quantitativo di farmaco facilmente determinabile tramite le tecniche spettroscopiche, viceversa, per valori di solubilità dell'ordine tra 10^{-9} e 10^{-8} , le misure quantitative sono affette da un'imprecisione maggiore a causa della sensibilità dello strumento.

In appendice, invece, sono riportati i coefficienti e gli andamenti di solubilità dei dati sperimentali per ogni modello presentato.

4.2.2 Confronto dei modelli

Il modello che presenta il valore minore di deviazione per tutte le concentrazioni di etanolo sperimentate è quello proposto nel 2013 da Haghbaksh e collaboratori, ma di contro è caratterizzato da un numero di parametri pari a 10: un numero elevato di coefficienti richiede, infatti, un maggiore numero di dati sperimentali affinché essi siano più precisi, oltre ad un maggiore costo computazionale della regressione. Allora, i modelli di Bian et al. (2016), di Sparks et al. (2008a) e Jafari Nadjad et al. (2010), sono esempi di un giusto compromesso tra la deviazione relativa e il numero di parametri ricercati. La correlazione che si comporta peggio, invece, è quella di Khansay et al. (2014) appartenente alla famiglia dei modelli empirici, in cui la solubilità è espressa in dipendenza da densità, temperatura e pressione.

Confrontando le varie correlazioni si evince che, ad esempio, Chrastil (1982) e del Valle and Aguilera (1983) si differiscono per la presenza di un termine aggiuntivo che tiene conto della dipendenza tra l'entalpia di sublimazione e la temperatura [17], aspetto non trascurabile che si riflette difatti in una maggiore precisione del secondo modello (15,82% contro 11,27 a y₃=0,04).

I coefficienti dei modelli Adachi and Lu (1983) e Sparks et al. (2008b) sono i medesimi per tutte le frazioni molari di modificante investigate, tranne per il termine aggiuntivo nella correlazione di Sparks dell'ordine di 10⁻¹³, che risulta trascurabile all'interno dell'esponenziale.

Analizzando l'andamento dei coefficienti in funzione della percentuale molare di etanolo si osserva che, per Sparks et al. (2008a), il parametro b_1 descresce, i parametri b_2 e b_3 aumentano e i parametri b_4 e b_5 rimangono pressoché costanti. Tale evidenza può essere utile per suggerire una modifica della correlazione assumendo in un'unica costante i termini della temperatura. Inoltre, i coefficienti b_1 - b_3 mostrano una dipendenza di tipo quadratico con la frazione di co-solvente y_3 .

Come già anticipato nel capitolo 1, i parametri delle correlazioni possono essere utilizzati per stimare le variabili termodinamiche: ad esempio, il calore di solvatazione può essere determinato dalla differenza tra l'entalpia di reazione e quella di sublimazione. Più precisamente, i coefficienti b_3 dei modelli Chrastil (1982) e Kumar and Johnston (1988) sono legati al ΔH_{rea} , mentre il medesimo parametro dell'equazione di Bartle et al. (1991) al ΔH_{sub} . In tabella 4.3 si riportano i risultati di tali osservazioni.

Tabella 4.3: Entalpia di reazione, sublimazione e solvatazione dell'idrocortisone nella miscela supercritica.

	ΔH _{rea} , kJ/mol		ΔH _{sub} , kJ/mol	ΔH _{sol} , kJ/mol
	Chrastil (1982)	Kumar and Johnston (1988)		
y ₃ =0,02	-520,46	-53,90	70,88	-124,28
y ₃ =0,03	-319,59	-37,10	52,02	-89,12
y ₃ =0,04	-298,47	-37,35	52,34	-89,69

Si evidenzia che l'entalpia di reazione differisce fra i due modelli di un ordine di grandezza, quindi, il calcolo dell'entalpia di solvatazione avviene tramite l'utilizzo della seconda colonna poiché il modello risulta caratterizzato da una deviazione minore.

Quasi tutti i modelli, inoltre, non descrivono bene il comportamento della solubilità del principio attivo ad alta temperatura e pressione per una frazione di modificante del 3% molare: tali valori teorici risultano sottostimati e un confronto grafico viene mostrato in figura 4.1 tra i modelli con deviazione relativa assoluta media minore.

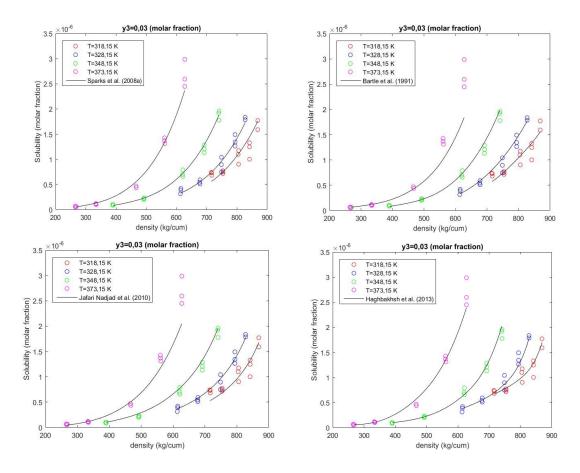


Figura 4.1: Confronto tra i modelli per la solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica al 3% molare.

Alternativamente il confronto tra i modelli proposti e i dati della sperimentazione, può avvenire tramite l'ausilio dei diagrammi di parità in cui in ascissa si riportano i dati misurati e in ordinata quelli teorici: se vi è un buon accordo tra teoria e realtà, i dati si distribuiscono lungo una retta di equazione y = x utilizzata come riferimento.

In figura 4.2 e 4.3, sono mostrati i suddetti grafici per una temperatura di 100 °C e 55 °C al 3% molare: per entrambe le temperature si evince che i dati calcolati a bassa solubilità sono sovrastimati diversamente da quelli ad alta pressione.

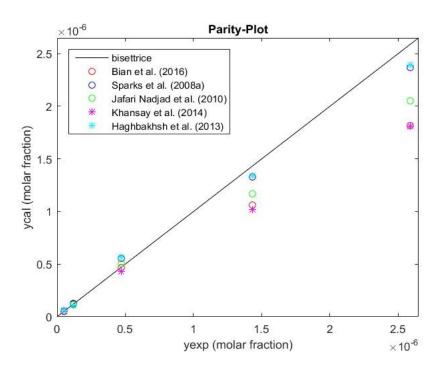


Figura 4.2: Diagramma di parità per il confronto dei dati sperimentali a 100 °C al 3% molare di modificante rispetto ad alcuni modelli proposti.

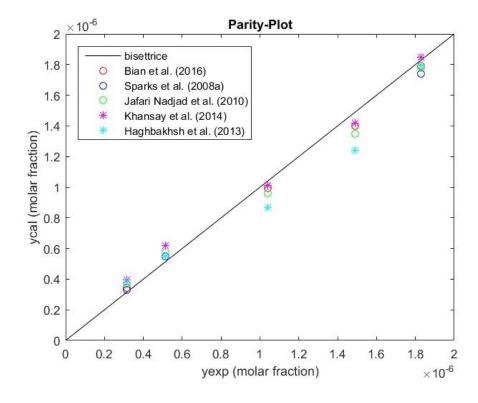


Figura 4.3: Diagramma di parità per il confronto dei dati sperimentali a 55 °C al 3% molare di modificante rispetto ad alcuni modelli proposti.

In figura 4.4, invece, sono mostrati i diagrammi di interesse per le tre concentrazioni di etanolo sperimentate attraverso l'utilizzo del modello di Haghbakhsh et al. (2013).

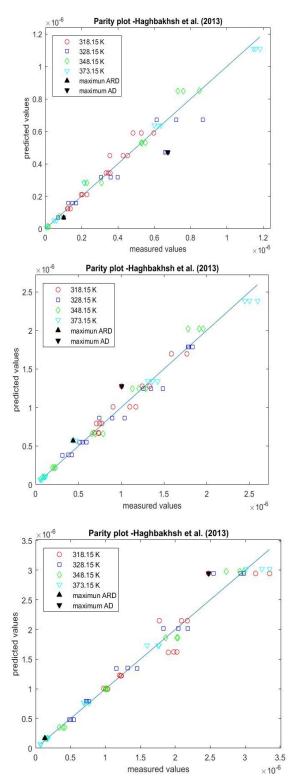


Figura 4.4: Diagramma di parità dei dati sperimentali e teorici ricavi con il modello di Haghabkhsh et al. (2013) a $y_3=0.02$ (a), $y_3=0.03$ (b) e $y_3=0.04$ (c).

In figura 4.4 (a) e 4.4 (b), si osserva uno scostamento uniforme di tutti i dati dalla bisettrice, invece, in figura 4.4 (c) per i punti di pressione più alti si rileva una maggiore deviazione tra i dati teorici e quelli sperimentali di solubilità, a cui appartiene anche il punto con uno scostamento assoluto maggiore (AD) indicato dal triangolo con il vertice rivolto verso il basso.

Un altro strumento molto utilizzato nell'industria chimica è il diagramma dei residui, ottenuti come differenza tra il valore sperimentale e quello calcolato dalla regressione, allo scopo di definire la bontà di un modello. In un diagramma di questo tipo si riporta in ascissa il valore di solubilità del farmaco misurato in laboratorio e in ordinata i residui: la mancanza di un andamento ben definito e, quindi, di una distribuzione dei valori in maniera casuale sotto e sopra lo zero è indice della verifica dell'ipotesi del modello.⁴

I diagrammi di dispersione di figura 4.5 riportano i residui assoluti per il modello di Haghbakhsh et al. (2013) al crescere della frazione molare di modificante: la deviazione assoluta aumenta con la solubilità dell'idrocortisone.

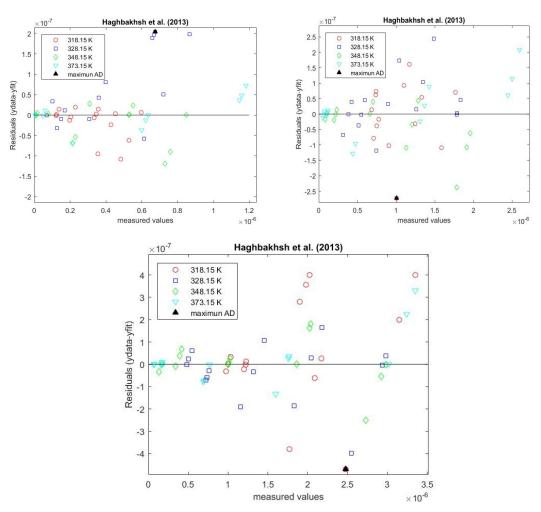
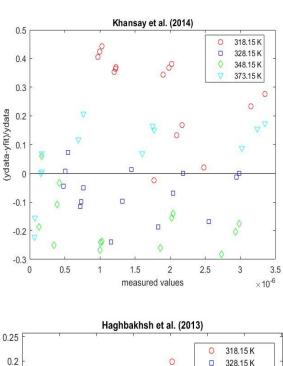


Figura 4.5: Diagramma dei residui assoluti per il modello di Haghbakhsh et al. (2013) a $y_3=0.02$ (a), $y_3=0.03$ (b) e $y_3=0.04$ (c).

.

⁴ http://dssm.unipa.it/chiodi/oldsite/corso_on_line/Statistica3/Lezioni/8settimana/Lezione/node4.html

In figura 4.6, sono mostrati i diagrammi dei residui relativi per il modello peggiore e migliore in termini di AARD%: per Khansay et al. (2014) i dati, evidenziabili per temperatura, si ripartiscono in maniera omogenea al di sopra e al di sotto dell'asse orizzontale, mentre per la correlazione di Haghbakhsh et al. (2013) si ottiene una vera e propria nuvola di dati.



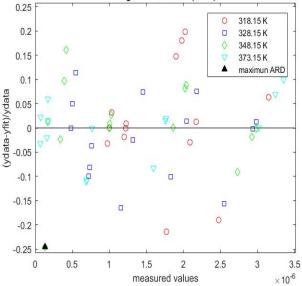


Figura 4.6: Diagramma dei residui relativi per il modello di Khansay et al. (2014) e Haghbakhsh et al. (2013) a $y_3=0.04$.

4.2.3 Effetto delle variabili termodinamiche

Nella ragione supercritica, il potere solvente del fluido può essere manipolato variando le condizioni di pressione e temperatura. In questo paragrafo si riporta, oltre l'effetto delle variabili appena citate, anche l'azione promotrice del solvente nei confronti della solubilità dell'idrocortisone

4.2.3.1 Effetto della pressione e della temperatura

L'effetto della pressione è stato studiato in una finestra operativa compresa tra 130 bar e 270 bar attraverso cinque punti. In generale, la solubilità del farmaco aumenta con la pressione, a parità di condizioni isotermiche, per la promozione di interazioni soluto-solvente ed è stato verificato per tutte le composizioni.

In figura 4.7, sono riportati i diagrammi che mostrano l'andamento della solubilità in funzione della temperatura, espressa in °C, per le varie composizioni di alimentazione allo scopo di visualizzare chiaramente l'efficacia della pressione.

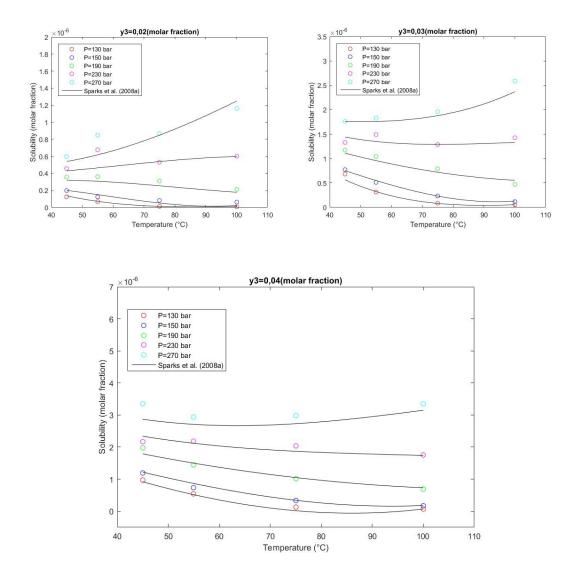


Figura 4.7: Effetto della pressione sulla solubilità dell'idrocortisone a diverse composizioni.

Per tutte le composizioni analizzate, a valori di pressione uguale ed inferiori a 230 bar, le isobare mostrano un andamento decrescente con l'aumento della temperatura poiché, in questo caso, la solubilità è funzione principalmente della densità della miscela supercritica che diminuisce. Invece, l'isobara a 270 bar, è caratterizzata da un andamento crescente con la variabile temperatura perché, contrariamente a prima, prevale l'effetto di incremento

della tensione di sublimazione del soluto sulla solubilità. Allora, la variazione dell'evoluzione delle isobare è indice dell'esistenza del "cross-over point" [10] come si evincerà in seguito.

L'effetto della temperatura è dato dal connubio di due fenomeni, come spiegato già nel paragrafo 1.3.3 che conduce all'instaurarsi del suddetto punto di "cross-over" maggiormente visibile nei diagrammi di figura 4.8, in cui si riporta la solubilità del farmaco in funzione della pressione, espressa in bar, per le tre composizioni studiate in fase sperimentale.

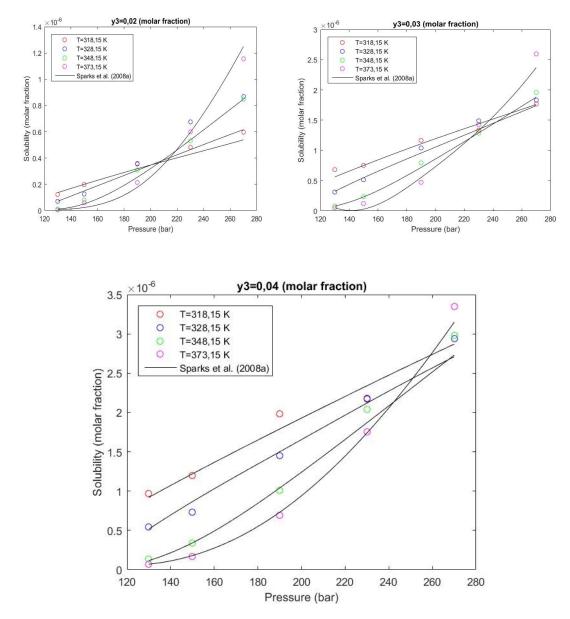


Figura 4.8: Effetto della temperatura sulla solubilità dell'idrocortisone a composizione diversa.

Si può affermare che il punto di cross-over avviene intorno al valore di pressione di 210 bar, 230 bar e oltre 270 bar rispettivamente: incrementando di un centesimo il quantitativo di etanolo in miscela, tale punto si sposta a valori di pressione più alta.

4.2.3.1 Effetto della composizione dell'alimentazione

La maggior parte dei farmaci sono composti polari e poco affini all'anidride carbonica supercritica, quindi, per aumentare la solubilità, la metodica più semplice è quella di aggiungere in miscela un modificante idrofilo quale, come illustrato, etanolo.

In laboratorio sono state condotte delle prove con una percentuale crescente di etanolo, allo scopo di osservare qualitativamente e quantitativamente il suo effetto nei confronti della solubilità.

In figura 4.9 sono stati riportati graficamente i risultati ottenuti, diagrammando la solubilità in funzione della densità della miscela supercritica, espressa in kg/m³.

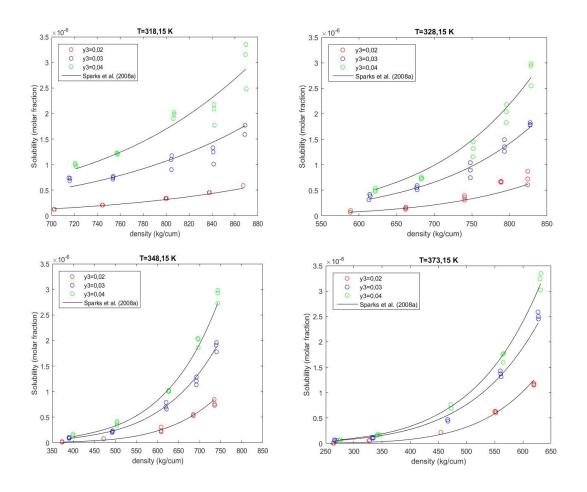


Figura 4.9: Effetto della composizione sulla solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica alle diverse temperature investigate.

Innanzitutto, la solubilità del farmaco aumenta al crescere della percentuale di etanolo in miscela e, a parità di temperatura, aumenta anche con la pressione. L'effetto del modificante sul potere solvente della miscela si osserva soprattutto a temperature più basse: al valore di 45 °C e alla pressione di 150 bar ad esempio, l'incremento di solubilità è di circa 6 volte se si usa un quantitativo doppio di etanolo. Invece, alla temperatura di 100°C, per la medesima condizione di pressione, l'incremento è dimezzato. Infine, si nota che aumentando la percentuale di co-solvente, l'andamento positivo della solubilità è via via più marcato e, alla temperatura massima investigata, sono state ottenute delle curve molto più ripide.

4.3 Confronto con i dati di letteratura

Dalla letteratura è stato possibile reperire i dati di solubilità dell'idrocortisone in sola anidride carbonica supercritica [13] alla temperatura di 35°C, 55°C e 100°C per valori di pressione molto vicini a quelli studiati in laboratorio. In assenza di modificante, i valori di solubilità del farmaco variano da un ordine minimo di 10⁻⁹ ad un ordine massimo di 10⁻⁷, similmente a quelli ottenuti durante la sperimentazione.

In figura 4.10, sono state diagrammate le stime di solubilità in assenza e in presenza di co-solvente a diverse percentuali molari per la temperatura di 55 °C: qualitativamente si osserva che i dati al 3% e al 4% molare sono superiori, come ci si aspetterebbe per l'instaurarsi dei legami ad idrogeno, dai dati reperiti, mentre al 2% i dati sono inspiegabilmente inferiori.

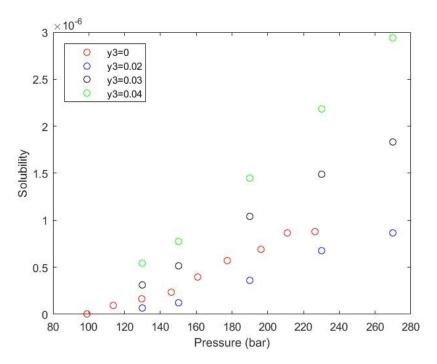


Figura 4.10: Solubilità dell'idrocortisone senza e con modificante a diverse percentuali alla temperatura di 55°C.

Analogamente, in figura 4.11, sono stati diagrammati i dati di solubilità in assenza e in presenza di modificante a diverse percentuali molari ma alla temperatura di 100°C.

Anche in questo caso, i dati di solubilità dell'idrocortisone in anidride carbonica supercritica sono più alti di quelli osservati con l'etanolo come co-solvente fino al valore di pressione pari a 190 bar. Invece, a pressione pari a 230 bar e 270 bar i dati di solubilità sono più alti di quelli di letteratura tranne per i relativi dati al 2% molare di modificante.

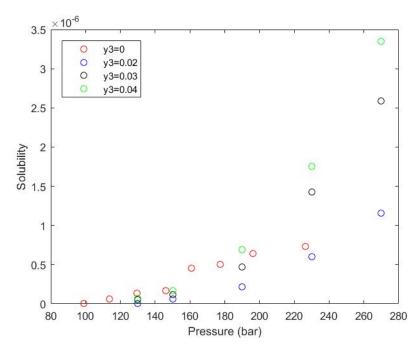


Figura 4.11: Solubilità dell'idrocortisone senza e con modificante a diverse percentuali alla temperatura di 100°C.

I dati di letteratura non permettono di spiegare l'andamento di solubilità del soluto, che dovrebbe essere già superiore con una frazione di etanolo del 2% molare in anidride carbonica rispetto a quelli stimati in sua assenza. Il sistema con cui sono stati investigati i dati di letteratura, ha fornito probabilmente dei valori sovrastimati di solubilità, ma nulla di più si può affermare sulla metodica con cui sono state condotte le prove al fine di giustificare le incongruenze sopra esposte.

Conclusione

Lo scopo di questo lavoro di tesi è l'ottenimento di misure di solubilità dell'idrocortisone, ormone glucocorticoide, in anidride carbonica supercritica con etanolo come modificante. L'utilizzo del co-solvente è giustificato dalla natura organica polare dei farmaci, per cui l'anidride carbonica non risulta essere da solo un solvente opportuno poiché poco polare.

La campagna condotta prevede di mostrare l'effetto promotore sulla solubilità da parte dell'etanolo e tre diverse concentrazioni molari sono state sperimentate, pari a 0,02, 0,03 e 0,04. Per ogni frazione di modificante sono state eseguite quattro isoterme alla temperatura di 45 °C, 55 °C, 75 °C e 100 °C in un intervallo di pressione compreso tra 130 bar e 270 bar. L'evoluzione della solubilità è, poi, studiata per ogni condizione di pressione attraverso tre campionamenti consecutivi, della durata di 20 minuti ciascuno, al fine di monitorare il raggiungimento della condizione di saturazione.

Le misure di solubilità sono state condotte in dinamico, tramite il flussaggio continuo della cella di equilibrio contenente il soluto da solubilizzare, disperso su un riempimento di sferette di vetro di diametro differente al fine di aumentare la superficie di scambio tra la miscela supercritica e il farmaco.

Al termine della sperimentazione, i dati sono stati regrediti tramite l'uso di modelli empirici i cui parametri sono stati determinati dalla minimizzazione della funzione obiettivo, nel caso in esame, della deviazione relativa assoluta media (AARD%). Per tutte le concentrazioni di etanolo investigate, il modello migliore risulta essere Haghbakhsh et al. (2013) a 10 parametri ma, tuttavia, un elevato numero di coefficienti richiede anche un numero di dati più elevato, oltre ad un maggiore costo computazionale della regressione. I modelli di Bian et al. (2016), di Sparks et al. (2008a) e Jafari Nadjad et al. (2010), sono esempi di un giusto compromesso tra la deviazione relativa e il numero di parametri ricercati. La correlazione che si comporta peggio, invece, è quella di Khansay et al. (2014) appartenente alla famiglia dei modelli empirici, in cui la solubilità è espressa in dipendenza da densità, temperatura e pressione.

I parametri possono, inoltre, essere impiegati allo scopo di stimare delle variabili termodinamiche come nel caso dell'entalpia di solvatazione, calcolata sottraendo all'entalpia di reazione quella di sublimazione. Per l'entalpia di sublimazione si è usata la correlazione di Bartle et al. (1991) e per l'entalpia di reazione Kumar and Johnston (1988), alternativamente alla prima correlazione di Chrastil (1982), poiché caratterizzata da un valore di deviazione relativa minore.

I dati di equilibrio raccolti in questo lavoro di tesi possono essere adoperati per lo sviluppo di nuove correlazioni e per lo studio della fattibilità di un processo in cui la conoscenza della solubilità del soluto risulta essere un parametro fondamentale.

Appendice

In appendice si riportano i coefficienti dei modelli utilizzati per la regressione dei dati e i relativi andamenti della solubilità rispetto ai dati ottenuti sperimentalmente.

Modello: Chrastil (1982)

$$y_2 = \rho^{b_1} \exp\left(b_2 + \frac{b_3}{T}\right)$$

Tabella A.1: Coefficienti di regressione del modello investigato.

y 3	b 1	b 2	b 3
0,02	6,124	-36,240	-6,260*10 ⁴
0,03	4,590	-32,445	$-3,844*10^4$
0,04	4,634	-33,071	-3,590*10 ⁴

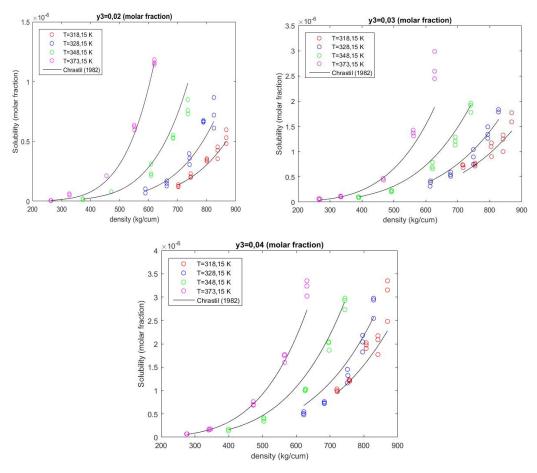


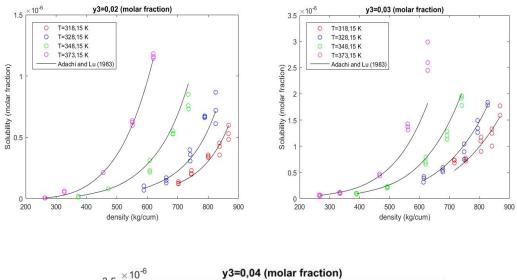
Figura A.1: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

Modello: Adachi and Lu (1983)

$$y_2 = \rho^{(b_1 + b_2 \rho + b_3 \rho^2)} \exp\left(b_4 + \frac{b_5}{T}\right)$$

Tabella A.2: Coefficienti di regressione del modello investigato.

y 3	b ₁	b ₂	b 3	b ₄	b 5
0,02	12,624	-0,004	2,116*10-6	-67,137	-6,379*10 ³
0,03	-0,366	0,002	-7,278*10 ⁻⁷	6,126	-4,178*10 ³
0,04	5,816	-0,001	9,905*10 ⁻⁷	-35,899	$-4,372*10^3$



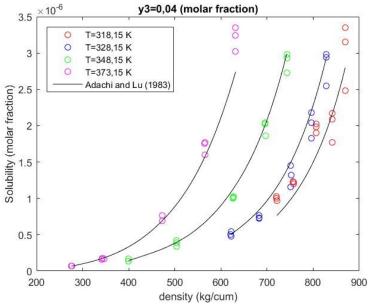


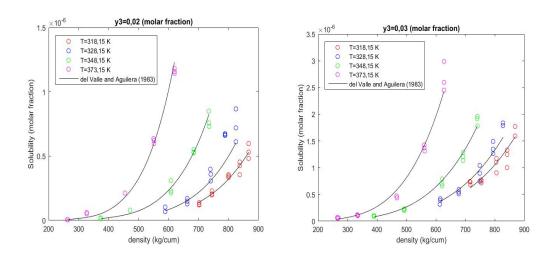
Figura A.2: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

Modello:del Valle and Aguilera (1983)

$$y_2 = \rho^{b_1} \exp\left(b_2 + \frac{b_3}{T} + \frac{b_4}{T^2}\right)$$

Tabella A.3: Coefficienti di regressione del modello investigato.

<u>y</u> 3	b 1	b 2	b ₃	b 4
0,02	6,208	3,038	-3,370*10 ⁴	4,699*10 ⁶
0,03	4,836	12807	$-3,563*10^4$	$5,374*10^6$
0,04	4,831	7,094	$-3,194*10^4$	$4,826*10^6$



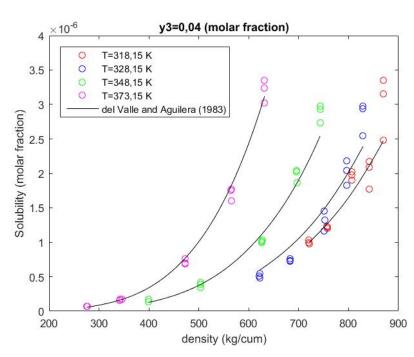


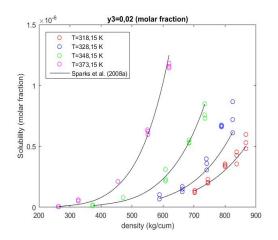
Figura A.3: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

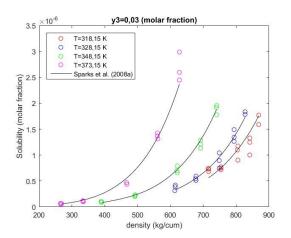
Modello: Sparks et al. (2008a)

$$y_2 = \rho^{(b_1 + b_2 \rho)} \exp\left(b_3 + \frac{b_4}{T} + \frac{b_5}{T^2}\right)$$

Tabella A.4: Coefficienti di regressione del modello investigato.

y 3	b 1	b 2	b 3	b ₄	b 5
0,02	5,903	9,420*10 ⁻⁵	2,157	-3,186*10 ⁴	4,357*10 ⁶
0,03	3,011	4,756*10 ⁻⁴	16,879	$-3,140*10^4$	$4,594*10^6$
0,04	3,047	5,006*10 ⁻⁴	15,274	$-3,067*10^4$	$4,535*10^6$





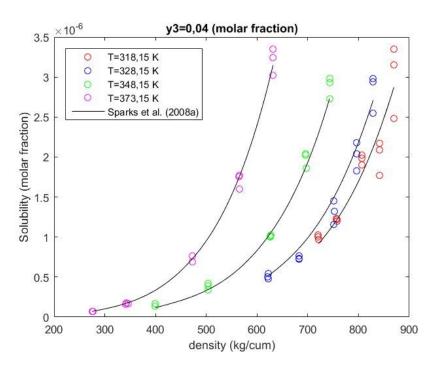


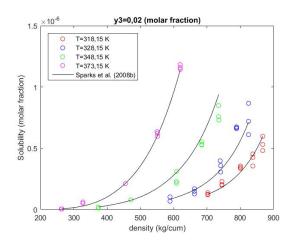
Figura A.4: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

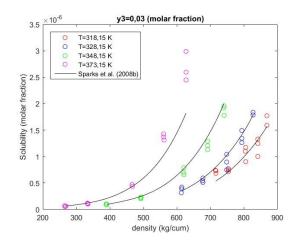
Modello: Sparks et al. (2008b)

$$y_2 = \rho^{(b_1 + b_2 \rho + b_3 \rho^2)} \exp\left(b_4 + \frac{b_5}{T} + \frac{b_6}{T^2}\right)$$

Tabella A.5: Coefficienti di regressione del modello investigato.

y 3	b 1	b ₂	b 3	b ₄	b 5	b ₆
0,02	12,624	-0,004	2,116*10 ⁻⁶	-67,137	-6,379*10 ³	10-7
0,03	-0,366	0,002	-7,278*10 ⁻⁷	-6,126	$-4,178*10^3$	10 ⁻⁷
0,04	5,816	-0,001	9,905*10 ⁻⁷	-35,899	$-4,372*10^3$	10-7





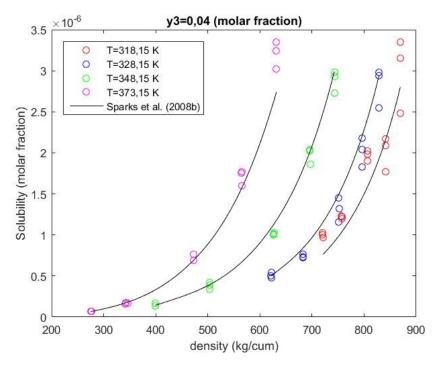


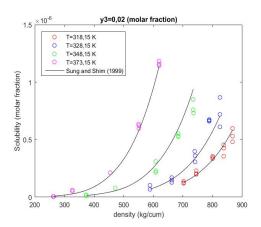
Figura A.5: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

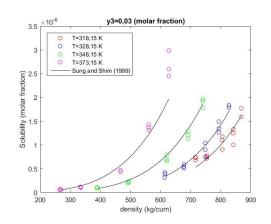
Modello: Sung and Shim (1999)

$$y_2 = \rho^{(b_1 + \frac{b_2}{T})} \exp\left(b_3 + \frac{b_4}{T}\right)$$

Tabella A.6: Coefficienti di regressione del modello investigato.

<u>y</u> 3	b 1	b 2	b ₃	b 4
0,02	-2,314	$3,026*10^3$	19,108	-2,614*10 ⁴
0,03	-4,763	$3,350*10^3$	29,560	$-2,606*10^4$
0,04	-4,167	$3,224*10^3$	25,361	$-2,500*10^4$





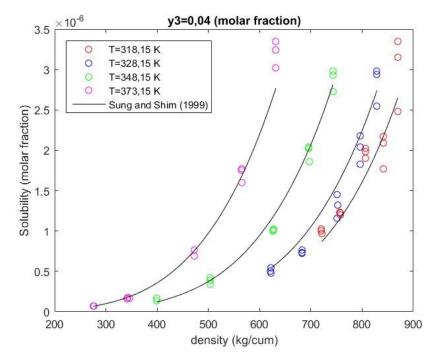


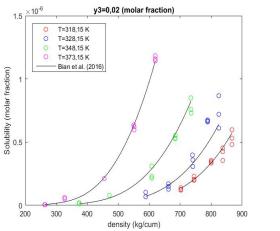
Figura A.6: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

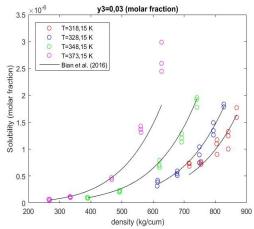
Modello: Bian et al. (2016)

$$y_2 = \rho^{(b_1 + b_2 \rho)} \exp\left(b_3 + \left(\frac{b_4 + b_5 \rho}{T}\right)\right)$$

Tabella A.7: Coefficienti di regressione del modello investigato.

y 3	b 1	b 2	bз	b ₄	b 5
0,02	7,051	-0,004	-25,545	-1,253*10 ⁴	9,587
0,03	2,590	1,149*10 ⁻⁴	-19,029	-4,890*10 ⁴	1,054
0,04	3,331	-0,001	-17,892	-6,910*10 ⁴	3,945





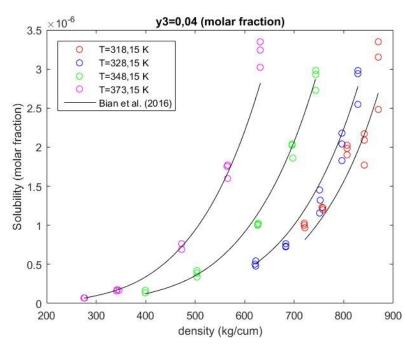


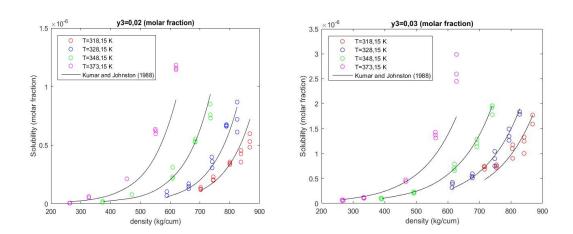
Figura A.7: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

Modello: Kumar and Johnston (1988)

$$y_2 = \exp\left(b_1 \rho + b_2 + \frac{b_3}{T}\right)$$

Tabella A.8: Coefficienti di regressione del modello investigato.

y 3	b 1	b 2	b ₃
0,02	0,011	-3,545	$-6,483*10^3$
0,03	0,009	-6,717	-4,462
0,04	0,009	-6,566	-4,492



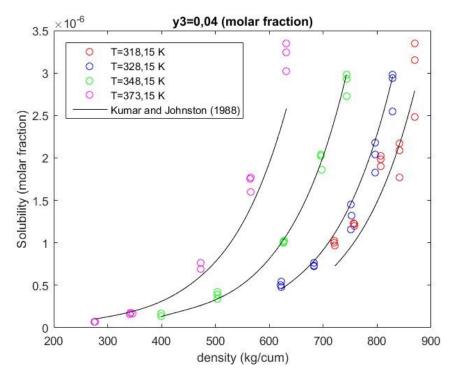


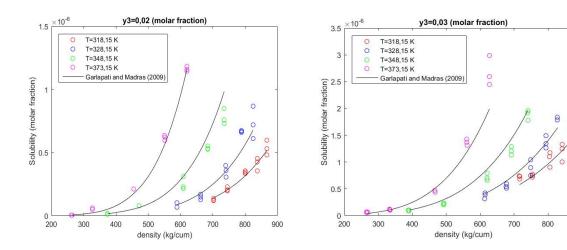
Figura A.8: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

Modello: Garlapati and Madras (2009)

$$y_2 = (\rho T)^{b_1} \exp\left(b_2 + \frac{b_3}{T}\right)$$

Tabella A.9: Coefficienti di regressione del modello investigato.

y 3	b 1	b 2	b 3
0,02	6,095	-78,065	-4,062*10 ³
0,03	4,621	-63,835	$-2,399*10^3$
0,04	4,671	-65,153	$-2,021*10^3$



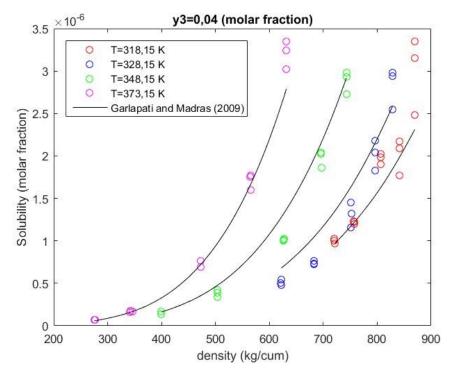


Figura A.9: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

900

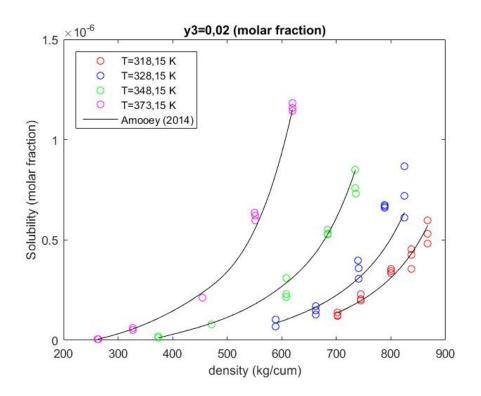
Modello: Amooey (2014)

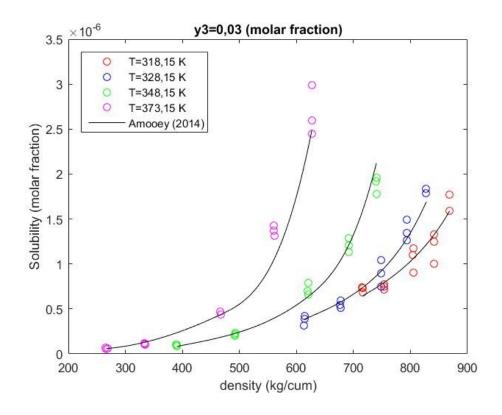
$$y_2 = \left(b_1 + \frac{b_2}{\rho} + \frac{b_3}{\rho^2}\right) + b_4 \ln T + b_5 \ln \left(\frac{T^2}{1 + \frac{b_6}{\rho} + b_7 \ln T + b_8 \ln T^2 + b_9 \ln T^3}\right)$$

Tabella A.10: Coefficienti di regressione del modello investigato.

y 3	b ₁	b ₂	b ₃	b ₄	b 5
0,02	0,070	-0,085	2,105	-0,025	0,002
0,03	0,609	-0,372	37,431	-0,209	0,018
0,04	3,330	-2,122	$1,511*10^2$	-1,149	0,099

y ₃	b ₆	b ₇	b 8	b 9
0,02	6,420*10 ⁵	-3,155*10 ⁴	1,101*10 ⁴	-9,636*10 ²
0,03	$1,413*10^6$	$-3,077*10^3$	$1,669*10^3$	$-2,040*10^2$
0,04	$5,308*10^6$	$-3,080*10^4$	$1,235*10^4$	$-1,239*10^3$





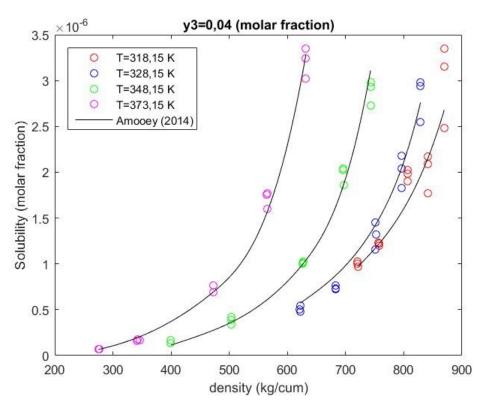


Figura A.10: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

Modello: Si-Moussa (2017)

$$y_2 = \rho^{b_1} \exp\left(b_2 + b_3 \rho + b_4 \rho^2 + b_5 \rho T + \frac{b_6 T}{\rho}\right)$$

Tabella A.11: Coefficienti di regressione del modello investigato.

y 3	b 1	b ₂	b ₃	b 4	b 5	b ₆
0,02	50,469	-2,944*10 ²	-0,126	4,115*10 ⁻⁵	4,384*10 ⁻⁵	14,359
0,03	24,794	$-1,610*10^2$	-0,048	1,198*10 ⁻⁵	3,031*10 ⁻⁵	10,570
0,04	26,747	$-1,651*10^2$	-0,068	2,216*10 ⁻⁵	3,677*10 ⁻⁵	8,460

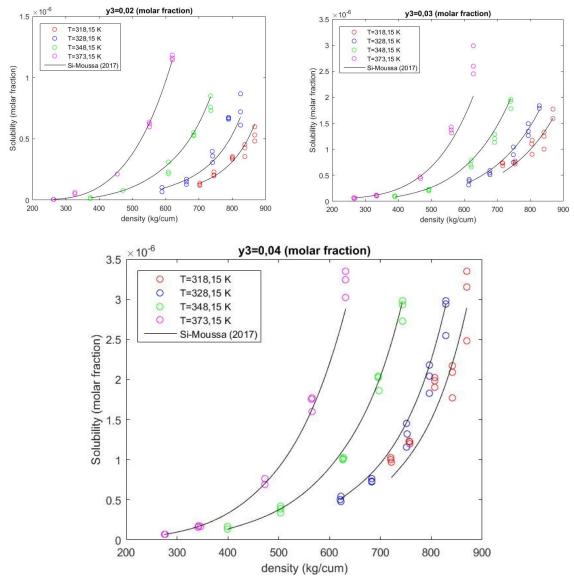


Figura A.11: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

Modello: Bartle et al. (1991)

$$y_2 = \exp\left(b_1 \rho + b_2 + \frac{b_3}{TP}\right)$$

Tabella A.12: Coefficienti di regressione del modello investigato.

y ₃	b 1	b ₂	b 3
0,02	0,014	5,894	$-8,525*10^3$
0,03	0,011	2,081	$-6,257*10^3$
0,04	0,012	2,325	$-6,295*10^3$

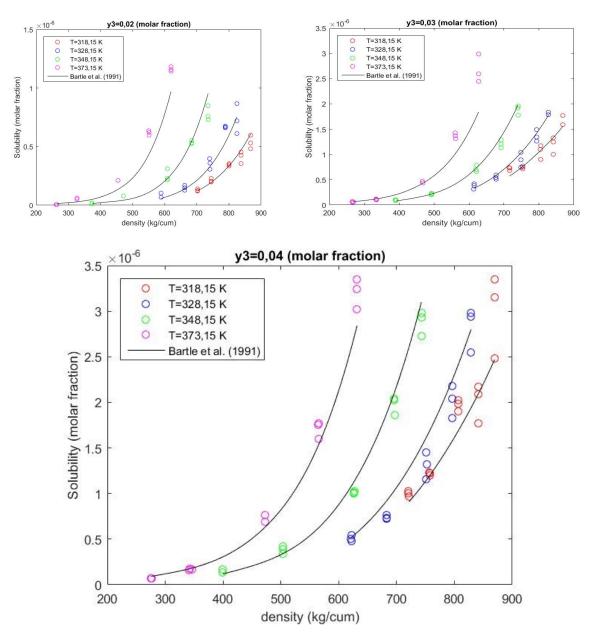


Figura A.12: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

Modello: Ch and Madras (2010)

$$y_2 = \exp\left(b_1 \rho + b_2 + \frac{b_3}{TP^{b_4 - 1}}\right)$$

Tabella A.13: Coefficienti di regressione del modello investigato.

<u>y</u> 3	b 1	b ₂	b 3	b 4	_
0,02	0,017	15,145	1,063*10 ⁴	2,921	_
0,03	0,011	3,361	$-6,584*10^3$	2,102	
0,04	0,012	2,689	$-6,402*10^3$	2,028	

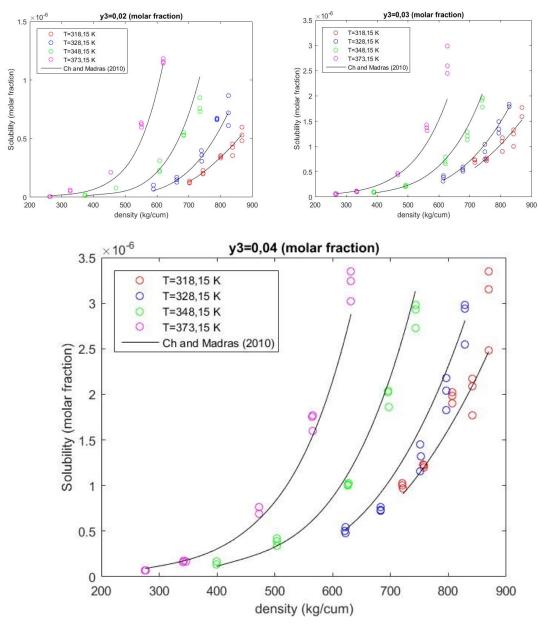


Figura A.13: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

Modello: Hezave and Lashborlooki (2013)

$$y_2 = \exp\left(b_1 + \frac{(b_2 + b_3 \rho)}{TP^{b_4 - 1}}\right)$$

Tabella A.14: Coefficienti di regressione del modello investigato.

y 3	b 1	b ₂	b ₃	b 4
0,02	-0,022	-67,039	$-6,937*10^3$	3,377*10 ⁻¹⁰
0,03	0,011	2,109	$-6,229*10^3$	-1,836*10 ⁻¹¹
0,04	0,011	2,159	$-6,075*10^3$	-1,256*10 ⁻¹⁰

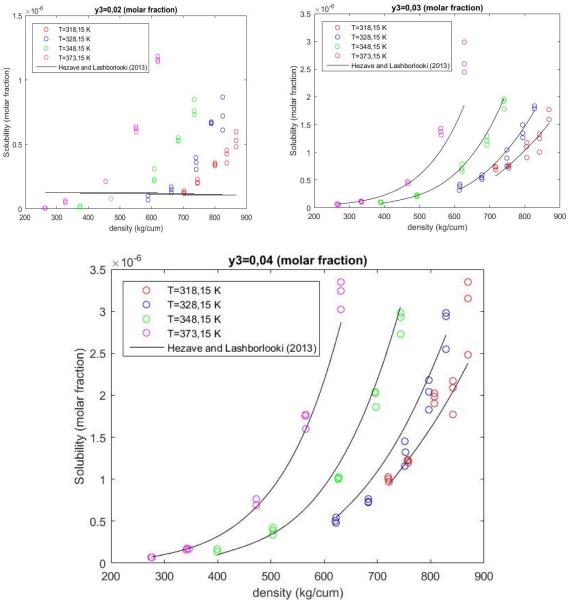


Figura A.14: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

Modello: Mendez-Santiago and Teja (1999)

$$y_2 = \exp\left(b_1 + \left(\frac{b_2 + b_3 \rho}{TP}\right)\right)$$

Tabella A.15: Coefficienti di regressione del modello investigato.

y 3	b 1	b 2	b 3
0,02	16,179	-1,208*10 ⁴	4,829
0,03	9,632	$-8,913*10^3$	3,927
0,04	10,282	$-9,080*10^3$	4,055

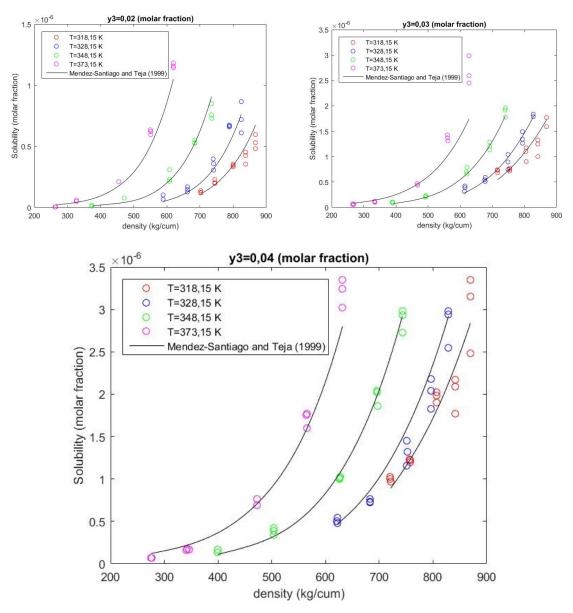


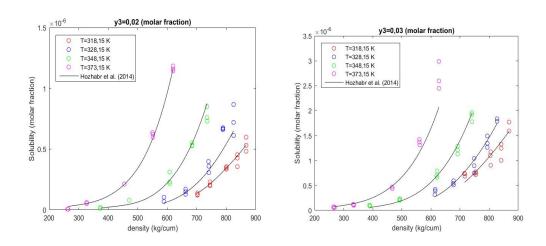
Figura A.15: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

Modello: Hozhabr et al. (2014)

$$y_2 = \exp\left(b_1 + \frac{(b_2 + b_3 \rho)}{TP^{b_4 - 1}}\right)$$

Tabella A.16: Coefficienti di regressione del modello investigato.

y 3	b 1	b 2	b 3	b ₄
0,02	26,947	-1,430*10 ⁴	5,488	3,038
0,03	18,550	-1,126*10 ⁴	4,715	2,679
0,04	16,236	$-1,061*10^4$	4,620	2,495



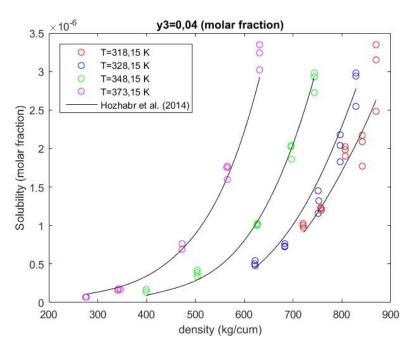
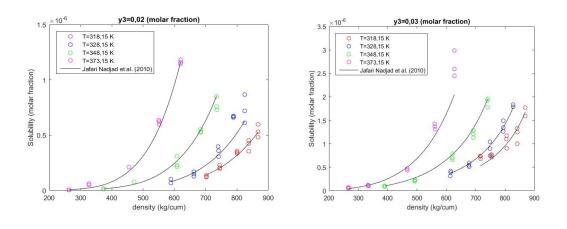


Figura A.16: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

$$y_2 = \rho^{b_1} \exp(b_2 + b_3 T^2 + b_4 P)$$

Tabella A.17: Coefficienti di regressione del modello investigato.

y 3	b ₁	b ₂	b ₃	b 4
0,02	6,068	-63,097	7,448*10 ⁻⁵	2,123*10 ⁻⁵
0,03	4,024	-45,280	3,983*10 ⁻⁵	0,003
0,04	3,955	-44,084	3,461*10 ⁻⁵	0,004



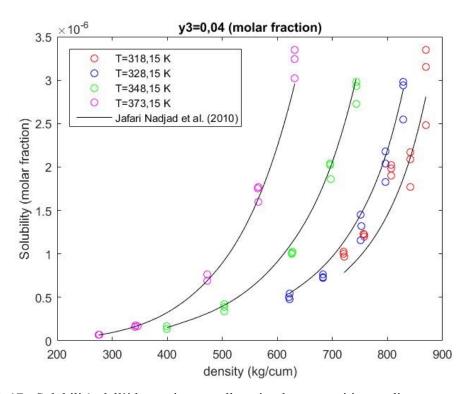


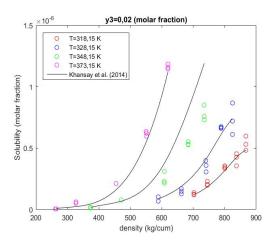
Figura A.17: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

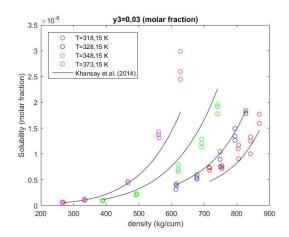
Modello: Khansay at al. (2014)

$$y_2 = \rho^{(b_1 + b_2 P)} \exp\left(b_3 + \frac{b_4 P^2}{T} + b_5 P\right)$$

Tabella A.18: Coefficienti di regressione del modello investigato.

y 3	b ₁	$\mathbf{b_2}$	b ₃	b ₄	b 5	
0,02	2,440	0,041	-1,032*10 ⁴	-0,017	-0,255	
0,03	1,309	0,033	$-7,320*10^3$	-0,006	-0,219	
0,04	0,803	0,033	$-6,459*10^3$	-0,009	-0,214	





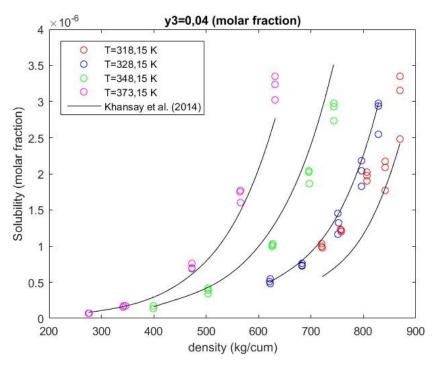


Figura A.18: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

Modello: Jouyban et al. (2002)

$$y_2 = \rho^{b_1} \exp\left(b_2 + b_3 P + b_4 P^2 + b_5 T P + b_6 \frac{T}{P}\right)$$

Tabella A.19: Coefficienti di regressione del modello investigato.

y 3	b 1	b ₂	b 3	b 4	b 5	b 6
0,02	3,509	-34,829	-0,054	-8,373*10 ⁻⁶	1,567*10 ⁻⁴	-1,382
0,03	3,799	-46,562	0,005	-4,637*10 ⁻⁵	9,179*10 ⁻⁵	1,493
0,04	2,733	-27,227	-0,048	3,769*10 ⁻⁵	8,666*10 ⁻⁵	-1,144

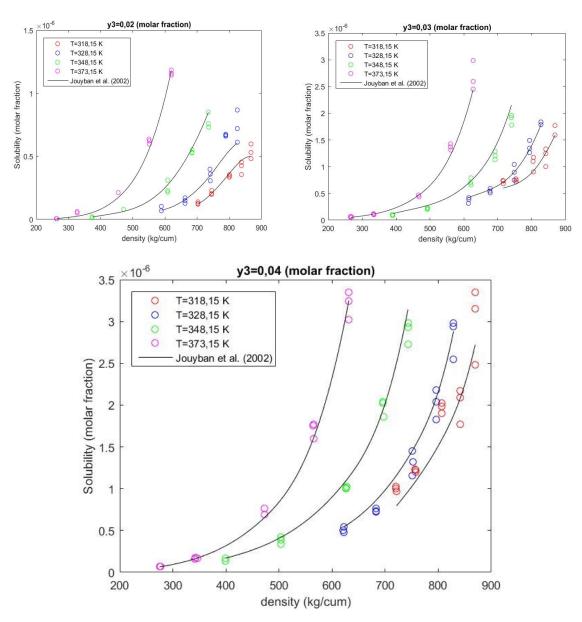


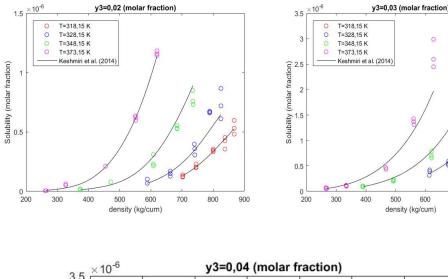
Figura A.19: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

Modello:Kashmiri et al. (2014)

$$y_2 = \rho^{\left(b_1 + \frac{b_2}{T}\right)} \exp\left(b_3 + \frac{b_4}{T} + b_5 P^2\right)$$

Tabella A.20: Coefficienti di regressione del modello investigato.

y 3	b 1	b ₂	b 3	b ₄	b ₅
0,02	-3,704	$3,676*10^3$	30,286	-3,101*10 ⁴	-5,130*10 ⁻⁶
0,03	-2,915	$2,605*10^3$	16,322	$-2,083*10^4$	2,261*10 ⁻⁶
0,04	-2,066	$2,311*10^3$	9,670	-1,845*10 ⁴	5,109*10 ⁻⁶



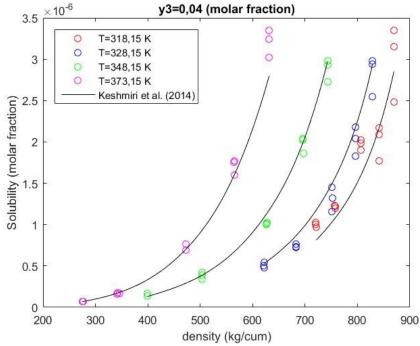


Figura A.20: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

700

800

Modello: Yu et al. (1994)

$$y_2 = \frac{b_1 + b_2 T + b_3 T^2 + b_4 P + b_5 P^2 + b_6 T P}{1 + b_6 T P}$$

Tabella A.21: Coefficienti di regressione del modello investigato.

уз	b 1	b ₂	b ₃	b 4	b 5	b 6
0,02	1,070*10 ⁻⁵	-5,450*10 ⁻⁸	6,731*10 ⁻¹¹	-1,605*10 ⁻⁸	1,633*10 ⁻¹¹	4,290*10 ⁻¹¹
0,03	4,688*10 ⁻⁵	-2,424*10 ⁻⁷	3,162*10 ⁻¹⁰	-4,741*10 ⁻⁸	6,801*10 ⁻¹¹	9,520*10 ⁻¹¹
0,04	5,802*10 ⁻⁵	-3,066*10 ⁻⁷	4,117*10 ⁻¹⁰	-3,517*10 ⁻⁸	9,689*10 ⁻¹¹	4,228*10 ⁻¹¹

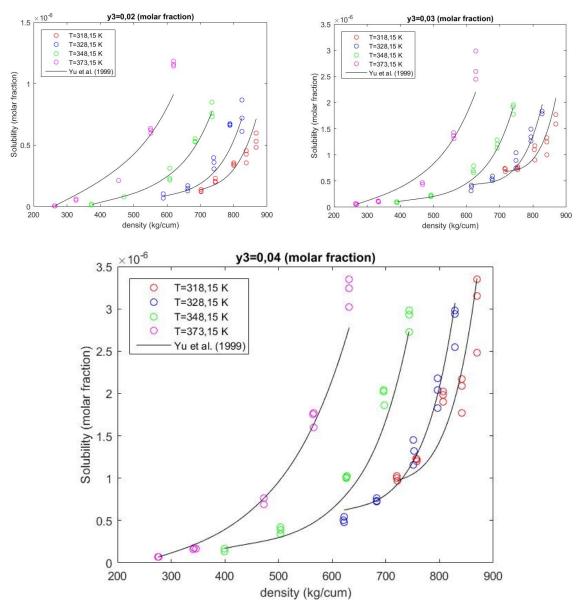


Figura A.21: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

Modello: Gordillo et al. (1999)

$$y_2 = \exp(b_1 + b_2T + b_3T^2 + b_4P + b_5P^2 + b_6TP)$$

Tabella A.22: Coefficienti di regressione del modello investigato.

у3	b 1	b ₂	b 3	b ₄	b 5	b 6
0,02	4,396	-0,052	-9,538*10 ⁻⁵	-0,096	-1,315*10 ⁻⁴	4,974*10 ⁻⁴
0,03	33,398	-0,218	1,827*10-4	-0,089	-6,069*10 ⁻⁵	3,795*10 ⁻⁴
0,04	29,941	-0,199	1,529*10-4	-0,079	-8,087*10 ⁻⁵	3,747*10 ⁻⁴

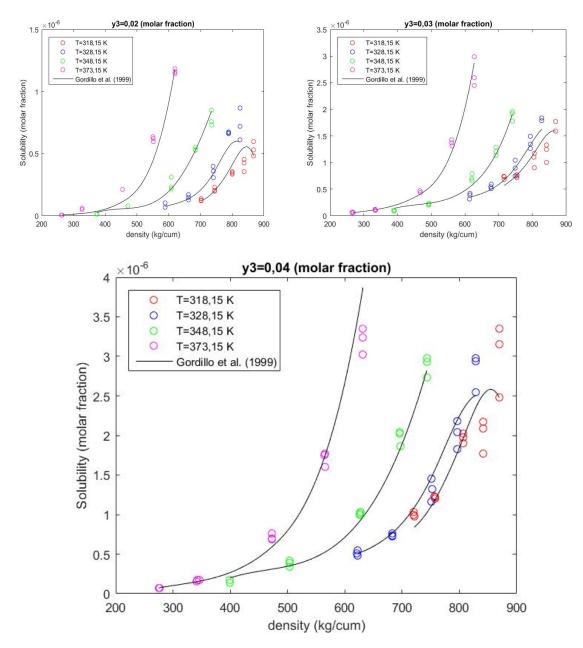


Figura A.22: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

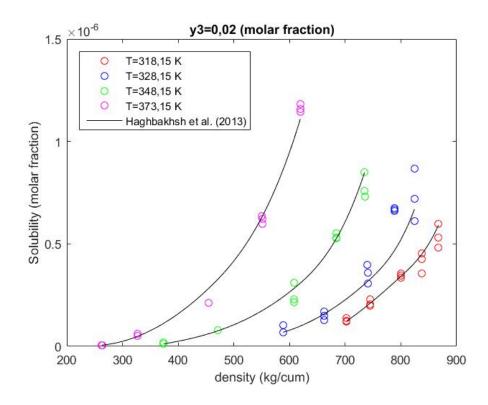
Modello: Haghbakhsh et al. (2013)

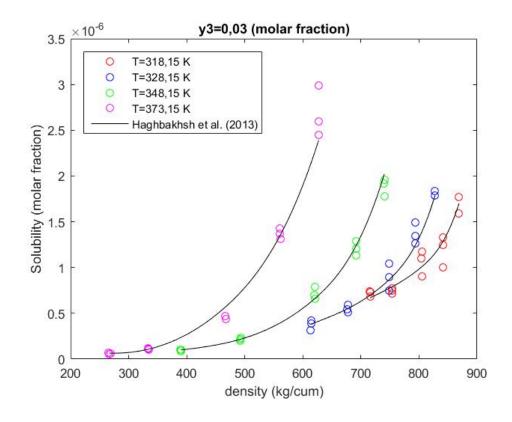
$$y_2 = b_1 + b_2 \rho + b_3 \rho^2 + b_4 \rho^3 + b_5 P + b_6 P^2 + b_7 P^3 + b_8 \rho P + b_9 \rho^2 P + b_{10} \rho P^2$$

Tabella A.23: Coefficienti di regressione del modello investigato.

y 3	b 1	b ₂	b 3	b 4	b 5
0,02	1,492*10 ⁻⁶	-3,899*10 ⁻⁹	1,236*10 ⁻¹³	2,211*10 ⁻¹⁷	-1,754*10 ⁻⁸
0,03	4,123*10 ⁻⁶	-7,677*10 ⁻⁹	9,780*10 ⁻¹³	4,305*10 ⁻¹⁵	-4,970*10 ⁻⁸
0,04	3,788*10 ⁻⁶	-8,558*10 ⁻⁹	-6,314*10 ⁻¹²	2,285*10 ⁻¹⁴	-4,076*10 ⁻⁸

y 3	b 6	b 7	b ₈	b 9	b 10
0,02	1,596*10 ⁻¹¹	2,597*10 ⁻¹³	5,251*10 ⁻¹¹	3,763*10 ⁻¹⁵	-1,934*10 ⁻¹³
0,03	9,675*10 ⁻¹¹	3,216*10 ⁻¹³	9,770*10 ⁻¹¹	-2,805*10 ⁻¹⁴	-2,604*10 ⁻¹³
0,04	-1,613*10 ⁻¹¹	1,218*10 ⁻¹³	1,424*10 ⁻¹⁰	-1,657*10 ⁻¹³	1,028*10 ⁻¹³





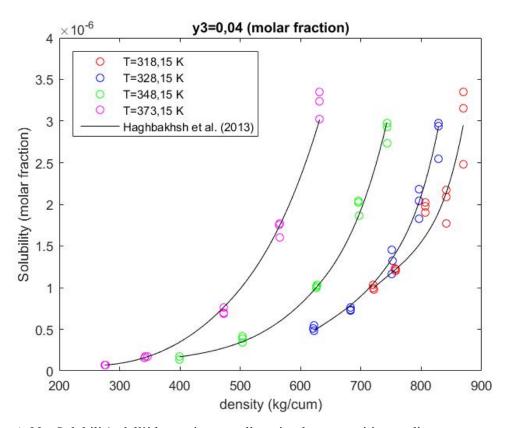


Figura A.23: Solubilità dell'idrocortisone nella miscela supercritica a diversa percentuale di modificante.

Bibliografia

- [1] Delgado J. M. P. Q., 2010, Supercritical fluids and its applications, in "*Recent Progress in Chemical Engineering*", Chap. 10, Studium Press LLC, Houston, 293-312.
- [2] Tabernero A., Vieira de Melo S. A. B., Mammuccari R., Martin del Valle E. M. and Foster N. R., 2013, Modeling solubility of solids in supercritical carbon dioxide using q-Chrastil equation, *III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids*, Cartagena de Indias, Colombia, 1-5 April 2013, 1-8.
- [3] Naviglio D. e Ferrara L., 2008, Le tecniche di estrazione solido-liquido tradizionali, in "*Tecniche Estrattive Solido-Liquido*", Cap. 2, Aracne editrice, Roma, 60-71.
- [4] Karimi Sabet J., Ghotbi C. and Striolo A., 2012, Solubilities of acetominophen in supercritical carbon dioxide with and without menthol cosolvent: measurement and correlation, *Scientia Iranica*, **19** (3), 619-625.
- [5] Quiñones-Cisneros S.E., 1996, Phase and critical behaviour in type III phase diagrams, *Fluid Phase Equilibria*, **134** (1), 103-112.
- [6] McHardy J. and Sawan S.P., 1994, Phase diagrams for supercritical fluid-solute mixtures, in "Supercritical Fluid Extraction: Principle and Practice" Chap. 3, Butterworth-Heinemann, Stoneham, 27-84.
- [7] Sima S., Feroiu V. and Geană D., 2011, New high pressure vapor-liquid equilibrium and density predictions for the carbon dioxide + ethanol system, *Journal of Chemical and Engineering Data*, **56** (1), 5052-5059.
- [8] Dohrn R., Berkatis E., Behrend O., Voutsas E. and Tassios D., 2007, Melting point depression by using supercritical CO₂ for a novel melt dispersion micronization process, *Journal of Molecular Liquids*, **131-132** (1), 53-59.
- [9] McHardy J. and Sawan S.P., 1994, Thermodynamic modeling of supercritical fluid-solute phase behaviour, in "Supercritical Fluid Extraction: Principle and Practice" Chap. 5, Butterworth-Heinemann, Stoneham, 99-134.
- [10] Huang Z., Kawi S. and Chiew Y.C., 2004, Solubility of cholesterol and its esters in supercritical carbon dioxide with and without cosolvents, *Journal of Supercritical Fluids*, **30**, 25-39.
- [11] Zhang M., Han B. and Yan H., 1997, Solubility of stearic acid in supercritical carbon dioxide with cosolvents, *Journal of Supercritical Fluids*, **10** (1), 113-118.
- [12] Al-Matar A. and Shawish S., 2012, Influence of cosolvents on the solubility of cholesterol in supercritical carbon dioxide, *The Sixth Jordan International Chemical Engineering Conference*, Ammen, Jordan, 12-14 March 2012, 1-13.

- [13] Gupta R.B. and Shim J.J., 2007, *Solubility in Supercritical Carbon Dioxide*, CRC Press, New York.
- [14] Jouyban A., Chan H. K. and Foster N., 2002, Mathematical rappresentation of solute solubility in supercritical carbon dioxide using empirical expressions, *Journal of Supercritical Fluids*, **24** (1), 19-35.
- [15] Khansary M. A., Amiri F., Hosseini A., Sani A. H. and Hossein S., 2015, Representing solute solubility in supercritical carbon dioxide: a novel empirical model, *Chemical Engineering Research and Design*, **93** (1), 355-365.
- [16] Garnier S., Neau E., Alessi P., Cortesi A. and Kikic I., 1999, Modelling solubility of solids in supercritical fluids using fusion properties, *Fluid Phase Equilibria*, **158-160** (1), 491-500.
- [17] Si-Moussa C., Belghait A., Khaouane L. and Hanini S., 2017, Novel density-based model for the correlation of solid drugs solubility in supercritical carbon dioxide, *Comptes Rendus Chimie*, **20** (1), 559-572.
- [18] Jafari Nejad Sh., Albolghasemi H., Moosavian M.A. and Maragheh M.G., 2010, Prediction of solute solubility in supercritical carbon dioxide: a novel semi-empirical model, *Chemical Engineering Research and Design*, **88** (1), 893-898.
- [19] Chrastil J.,1982, Solubility of solids and liquids in supercritical gases, *The Journal of Physical Chemistry*, **86** (15), 3016-3021.
- [20] Bian X. Q., Zhang Q., Du Z. M., Chen J. and Jaubert J. N., 2016, A five-parameter empirical model for correlating the solubility of solid compounds in supercritical carbon dioxide, *Fluide Phase Equilibria*, **411** (1), 74-80.
- [21] Zhang P., Yang H. J. and Xu L., 2014, Solubility and partial volume of N,N-dimethylformamide diethyl acetal in supercritical carbon dioxide: measurement and correlations, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **20** (1), 1243-1246.
- [22] Amooey A. A., 2014, A simple correlation to predict drug solubility in supercritical carbon dioxide, *Fluid Phase Equilibria*, **375** (1), 332-339.
- [23] Hajjati M., Yamini Y., Khajeh M. and Vatanara A., 2007, Solubility of some statin drugs in supercritical carbon dioxide and representing the solute solubility data with several density-based correlations, *Journal of Supercritical Fluids*, **41** (1), 187-194.
- [24] Ch R. and Madras G., 2010, An association model for the solubilities of pharmaceuticals in supercritical carbon dioxide, *Thermochimica Acta*, **507-508** (1), 99-105.
- [25] Hezave A. Z., Shahnazer S., Rajaei H., Lashkarbolooki M. and Esmailzadeh F., 2013, Solubility of spironolactone in supercritical carbon dioxide: experimental and modeling approaches, *Fluid Phase Equilibria*, **355** (1), 130-134.

- [26] Aminian A., 2017, Estimating the solubility of different solutes in supercritical carbon dioxide covering a wide range of operating conditions by using neural network models, *The Journal of Supercritical Fluids*, **125** (1), 79-87.
- [27] Bian X., Du Z. and Tang Y., 2011, An improved density-based model for the solubility of some compounds in supercritical carbon dioxide, *Thermochimica Acta*, **519** (1), 16-21.
- [28] Haghbakhsh R., Hayer H., Saidi M., Keshtkari S. and Esmailzadeh F., 2013, Density estimation of pure carbon dioxide at supercritical region and estimation solubility of solid compounds in supercritical carbon dioxide: correlation approach based on sensitivity analysis, *Fluid Phase Equilibria*, **342** (1), 31-41.
- [29] Soltani S. and Mazloumi S. H., 2017, A new empirical model to correlate solute solubility in supercritical carbon dioxide in presence of cosolvent, *Chemical Engineering Research and Design*, **125** (1), 79-87.
- [30] Zhab S., Cui L., Zhao Q., Li C., Wang J., Chen S. and Ding S., 2015, Measurement and correlation of solubility of nitrendipine in supercritical carbon dioxide with and without ethanol cosolvent, *Journal of Solution Chemistry*, 44 (1), 1-15.
- [31] Tabernero A., Vieira de Melo S. A. B., Mammuccari R., Martin del Valle E. M. and Foster N. R., 2014, Modelling solubility of solid active principle ingredients in sc-CO₂ with and without cosolvents: a comparative assessment of semiempirical models based on Chrastil's equation and its modifications, *The Journal of Supercritical Fluids*, **93** (1), 91-102.
- [32] Golovenko N. Ya. and Borisyuk I. Yu., 2008, The biopharmaceutical classification system-experimental model of prediction of drug bioavailability, *Biochemistry* (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry, 2 (3), 235-244.
- [33] Kawabata Y., Wada K., Nakatani M., Yamada S. and Onoue S., 2011, Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutical classification system: basic approaches and practical application, *International Journal of Pharmaceutics*, **420** (1), 1-10.
- [34] Papich M. G. and Martinez M. N., 2015, Applying biopharmaceutical classification system (BCS) criteria to predict oral absorption of drugs in dogs: challenges and pitfalls, *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, **17** (4), 948-963.
- [35] Mehta M. U., Uppoor R. S., Conner D. P., Seo P., Vaidyanathan J., Volpe D. A., Stier E., Chilukuri D., Dorantes A., Ghosh T., Mandula H., Raines K., Dhanormchitphong P., Woodcock J. and X Yu L., 2017, Impact of the US FDA "biopharmaceutical classification system" (BCS) guidance on global drug development, *Molecular Pharmaceutics*, **14** (1), 4334-4338.
- [36] Brookes J. C., Galigniana M. D., Harker A. H., Stoneham A. M. and Vinson G. P., 2012, System among the corticosteroids: specifity and molecular dynamics, *Journal of the Royal Society Interface*, **9** (1), 43-53.

- [37] Speight J., 2011, Pharmaceuticals, in "Handbook of Industrial Hydrocarbon Process", Chap. 13, Elservier Inc., Oxford, 474-483.
- [38] Ghosh I., Bose S., Vippagunta R. and Harmon F., 2011, Nanosuspension for improving the bioavailability of a poorly soluble drug and screening of stabilizing agents to inhibit crystal growth, *International Journal of Pharmaceutics*, **409** (1), 260-268.
- [39] Loh Z. H., Samanta A. K. and Sia Heng P. W., 2015, Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs, *Asian Journal of Pharmaceutical Science*, **10** (1), 255-274.
- [40] Blagden N., de Matas M., Gavan P. T. and York P., 2007, Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **59** (1), 617-630.
- [41] El-Gizawy S. A., Osman M. A., Arafa M. F. and El Maghraby G. M., 2015, Aerosil as a novel co-crystal co-former for improving the dissolution rate of hydrochlorothiazide, *International Journal of Pharmaceutics*, **478** (1), 773-778.
- [42] Sotthivirat S., McKelvey C., Moser J., Rege B., Xu W. and Zhang D., 2013, Development of amorphous solid dispersion formulation of a poorly water-soluble drug, MK-0364, *International Journal of Pharmaceutics*, **452** (1), 73-81.
- [43] Sun Y. P., Rollins H. W. and Guduru R., 1999, Preparation of Nickel, Cobalt and Iron Nanoparticles through the Rapid Expansion of Supercritical Fluid Solutions (RESS) and Chemical Reduction, *Chemistry of Materials*, **11** (1), 7-9.
- [44] Tabernero A., Martín del Valle E. M. and Galán M. A., 2012, Supercritical fluids for pharmaceutical particle engineering: Methods, basic foundamentals and modelling, *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, **60** (1), 9-25.
- [45] Schaeffer S. T., Zalkow L. H. and Teja A. S., 1989, Extraction of monocrotaline from crotolaria spectabilis using supercritical carbon dioxide and carbon dioxide-ethanol mixtures, *Biotechnology and Bioengineering*, **34** (1),1357-1365.
- [46] Martín A. and Cocero M. J., 2008, Micronization process with supercritical fluids: foundamentals and mechanisms, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60** (1), 339-350.
- [47] Byrappa K., Ohara S. and Adschiri T., 2008, Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology towards biomedical application, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **60** (1), 299-327.
- [48] Duarte A. C., Gordillo M. D., Cardoso M. M., Simplício A. L. and Duarte C. M., 2006, Preparation of ethyl cellulose/methyl cellulose blends by supercritical antisolvent precipitation, *International Journal of Pharmaceutics*, **311** (1), 50-54.
- [49] Chang Y. P., Tang M. and Chen Y. P., 2008, Micronization of sulfamethoxazole using the supercritical anti-solvent process, *Journal of Materials Science*, **43** (7), 2338-2335.

- [50] Rossmann M., Braeur A., Dowy S., Gallinger T. G., Leipertz A. and Schluecker E., 2012, Solute solubility as criterion for the appearance of amorphous particle precipitation or crystallization in the supercritical antisolvent (SAS) process, *The Journal of Supercritical Fluids*, **66** (1), 350-358.
- [51] Parhi R. and Suresh P., 2013, Supercritical fluid technology: a review, *Advanced Pharmaceutical Science and Technology*, **1** (1), 13-36.
- [52] Luther S. K. and Braeuer A., 2012, High-pressure microfluidics for the investigation into multi-phase systems using the supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE), *Journal of Supercritical Fluids*, **65** (1), 78-86.
- [53] Sievers R. E., Huang E. T. S., Villa J. A., Engling G. and Brauer P. R., 2003, Micronization of water-soluble or alcohol-soluble pharmaceuticals and model compounds with a low temperature Bubble Dryer[®], *Journal of Supercritical Fluids*, **26** (1), 9-16.
- [54] Wu H. T., Lee H. K., Chen H. C. and Chien L. J., 2015, Precipitation kinetics and biological properties of chitosan microparticles produced using supercritical assisted atomization, *Chemical Engineering Research and Design*, **104** (1), 615-625.
- [55] Zhang F., Zhou J., Shi Y., Tavlarakis P. and Karaisz K., 2016, Mechanism driven structural elucidation of forced degradation products from hydrocortisone in solution, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **128** (19), 333-341.
- [56] Andela C. D., Staufenbiel S. M., Joustra S. D., Pereira A. M., van Rossum E. F. C. and Biermasz N. R., 2016, Quality of life in patients with adrenal insufficiency correlates stronger with hydrocortisone dosage, than with long term systemic cortisol levels, *Psychoneuroendocrinology*, **72** (1), 80-86.

Ringraziamenti

Ringrazio il prof. Luigi Manna ed il prof. Mauro Banchero per la professionalità e disponibilità dimostrata nel seguire il presente progetto di tesi.

E adesso è arrivata la parte più difficile per me. Avevo 18 anni quando, per la prima volta, ho messo piede a Torino: non conoscevo le linee degli autobus, non conoscevo le strade, non avevo nessuno. Ero sola nonostante gli 899.455 abitanti. Quindi, scusatemi l'egocentrismo ma il primo grazie va a me che da ragazza impaurita della vita quale ero, ho imparato a destreggiarmi in questa giungla e a viverla a pieno. Ma una lezione così complicata e così grande non è, ovviamente, merito solo mio.

Grazie Papà che, nonostante tutto, mi ha dato una seconda possibilità sebbene hai dovuto privarti più di tutti, cercando lavoro fuori, non facendomi mancare mai nulla.

Grazie Mamma che hai creduto tanto in me, dandomi la forza di migliorare e non mollare mai perché, ai tuoi occhi, sono in grado di superare qualsiasi ostacolo mi si presentasse.

Grazie Chri per essere sempre pronto a suggerirmi la cosa giusta da dire o fare, per essere il fratellone dal cuore grande che sei.

Grazie Ale per avermi insegnato a lottare con le mani e i denti per le persone che si amano. I The Ferranti's sono tutti gli eroi di cui ho bisogno.

Grazie alla mia seconda big family che in 7 anni ha sopportato e supportato tutto di me, rendendomi parte di qualcosa di meraviglioso che custodirò gelosamente dentro di me e per sempre. Il nostro sarà sempre un arrivederci e mai un addio.

Grazie al team Calabria che mi ha adottato come quinta coinquilina volontariamente abusiva e per avermi fatto sentire una di loro, con tanto di spazzolino in bagno di cui puntualmente dimentico il colore.

Grazie Luca per essere stato un amico paziente e comprensivo, non dimenticherò le nostre passeggiate e i discorsi fatti durante il laboratorio sostenendoci fino alla fine.

Grazie Daniè per esserti assicurata che sapessi camminare prima di lasciarmi correre per la mia strada.

Grazie Marmottina per esserti presa cura di me quando io non ero in grado, per essermi stata accanto in qualunque momento del giorno e della notte, per avermi fatto riflettere sui massimi sistemi della vita con i tuoi "tu che pensi?". Sei la complice migliore che si possa desiderare.

Grazie Paa per esserci sempre, per non avermi mai fatto dubitare del tuo bene. Ti ho conosciuto al secondo anno per pura casualità e ringrazio ancora il limonene che ci ha unito, mostrandomi la persona speciale che sei.

Grazie Giant perché mi hai insegnato che un giorno, un mese, un anno non costruiscono un rapporto, ma è l'intensità con cui si vive ogni attimo a renderlo indelebile e speciale. Ci sei sempre e nonostante tutto.