



UNIVERSITÀ  
DI PAVIA

Dipartimento di Chimica  
Direttore Prof. Mauro Freccero  
**Corso di Laurea in Chimica**

**STUDIO DELLO STATO SOLIDO  
DELLA DORAMECTINA:  
ASPETTI STRUTTURALI E TERMICI**

Relatore:

Prof.ssa Giovanna Bruni

Tesi di Laurea di  
*Stefano Michele Maria Tralli*

*Anno Accademico 2024/2025*



## **INDICE**

<b>ABSTRACT</b>	<b>6</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>15</b>
<b>1.1 SOLIDI AMORFI</b>	<b>15</b>
<b>1.2 SOLIDI CRISTALLINI E POLIMORFISMO</b>	<b>16</b>
<b>1.3 METODI PER OTTENERE DIVERSE FORME SOLIDE</b>	<b>17</b>
<b>1.4 STABILITÀ E RELAZIONI TRA FORME CRISTALLINE DIVERSE</b>	<b>17</b>
<b>1.5 ANALISI E CARATTERIZZAZIONE DELLO STATO SOLIDO</b>	<b>19</b>
<b>1.5.1 Misure di diffrazione di raggi X</b>	<b>19</b>
<b>1.5.1.1 Diffrazione di raggi X da polveri (PXRD)</b>	<b>19</b>
<b>1.5.1.2 Diffrazione di raggi X da cristallo singolo (SC-XRD)</b>	<b>19</b>
<b>1.5.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)</b>	<b>20</b>
<b>1.5.3 Analisi termogravimetrica (TGA)</b>	<b>20</b>
<b>1.5.4 Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)</b>	<b>20</b>
<b>1.5.5 Microscopia elettronica a scansione (SEM)</b>	<b>21</b>
<b>1.6 IMPORTANZA DEL POLIMORFISMO CRISTALLINO DEI FARMACI</b>	<b>21</b>
<b>1.7 DORAMECTINA</b>	<b>22</b>
<b>1.8 PRODOTTI FARMACEUTICI CONTENENTI LA DORAMECTINA</b>	<b>23</b>
<b>1.9 CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DELLA DORAMECTINA:         CHE COSA È NOTO AD OGGI</b>	<b>24</b>
<b>1.10 SCOPO DELLA TESI</b>	<b>27</b>
<b>2. MATERIALI E METODI</b>	<b>28</b>
<b>2.1 MATERIA PRIMA</b>	<b>28</b>
<b>2.2 RICRISTALLIZZAZIONI</b>	<b>28</b>

<b>2.2.1 Ricristallizzazione secondo brevetto</b>	<b>28</b>
<b>2.2.2 Ricristallizzazione a <math>T_{amb}</math></b>	<b>28</b>
<b>2.2.3 Ricristallizzazione a <math>T_{amb}</math> con antisolvente</b>	<b>29</b>
<b>2.2.4 Ricristallizzazione a caldo con antisolvente</b>	<b>29</b>
<b>2.2.5 Ricristallizzazione in rotavapor</b>	<b>29</b>
<b>2.2.6 Ricristallizzazione a caldo</b>	<b>29</b>
<b>2.2.7 Macinazione ad umido</b>	<b>30</b>
<b>2.3 MACINAZIONE A SECCO</b>	<b>30</b>
<b>2.4 METODI</b>	<b>30</b>
<b>2.4.1 Analisi SEM</b>	<b>30</b>
<b>2.4.2 Analisi PXRD</b>	<b>31</b>
<b>2.4.3 Misure VT-XRPD</b>	<b>31</b>
<b>2.4.4 Analisi SC-RXD</b>	<b>31</b>
<b>2.4.5 Analisi DSC e TGA</b>	<b>31</b>
<b>2.4.6 Analisi FT-IR</b>	<b>32</b>
<b>3. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>33</b>
<b>3.1 DORAMECTINA TAL QUALE (<math>DR_{tq}</math>)</b>	<b>33</b>
<b>3.1.1 Aspetto macroscopico e microscopico della polvere</b>	<b>33</b>
<b>3.1.2 Misure di Karl Fisher</b>	<b>34</b>
<b>3.1.3 Analisi PXRD</b>	<b>34</b>
<b>3.1.4 Misure DSC</b>	<b>36</b>
<b>3.1.5 Misure TGA</b>	<b>36</b>
<b>3.1.6 Studio dei singoli eventi termici</b>	<b>42</b>
<b>3.1.6.1 Studio del primo evento endotermico (picco I)</b>	<b>42</b>

<b>3.1.6.2 Studio del secondo evento endotermico (picco II)</b>	<b>47</b>
<b>3.1.6.3 Studio del terzo evento endotermico (picco III)</b>	<b>50</b>
<b>3.2 DORAMECTINA SOTTOPOSTA A DIFFERENTI TRATTAMENTI</b>	<b>53</b>
<b>3.2.1 Campione <i>DRxxMeOH_Tol</i></b>	<b>53</b>
<b>3.2.2 Campioni <i>DRxxMeOH_amb</i> e <i>DRxxBrv</i></b>	<b>57</b>
<b>3.2.3 Misure SC-XRD su <i>DRxxBrv</i></b>	<b>58</b>
<b>3.2.4 Struttura della forma idrata e della forma anidra</b>	<b>60</b>
<b>4. CONCLUSIONI</b>	<b>64</b>
<b>5. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>66</b>
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>70</b>

## ABSTRACT

Doramectin (*DR*, Fig. A1) is a semi-synthetic derivative of the avermectin family, a group of 16-membered macrocyclic lactone compounds;<sup>18</sup> it is widely employed in veterinary medicine for their potent anthelmintic and insecticidal properties and indicated for the treatment of a broad spectrum of internal and external parasites in cattle and livestock, including gastrointestinal roundworms, lungworms, eyeworms, larvae, sucking lice, and mange mites.<sup>19</sup>

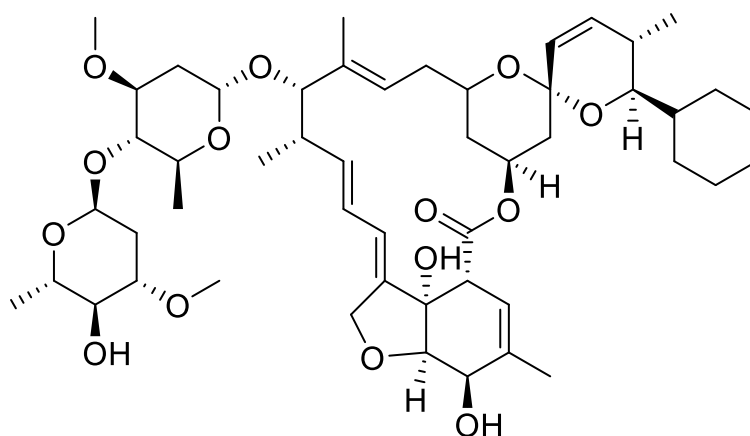


Fig. A1: Molecular structure of doramectin.

Doramectin is present as an active ingredient in several marketed veterinary formulations: Dectomax (Zoetis Inc.),<sup>20</sup> Dectogard (Aurora Pharmaceutical, Inc.),<sup>20</sup> Valcor (Zoetis Inc.),<sup>27</sup> Doracide (Bimeda Animal Health Limited).<sup>28</sup>

Despite the broad and growing range of applications of doramectin, the physicochemical characterization of its solid state remains remarkably incomplete and, in some respects, contradictory. The melting point, for instance, is reported in some sources as lying in the range of 116 °C -119 °C,<sup>30,31,32</sup> while in others it is given as 160 °C -162 °C.<sup>33,34,35</sup> This discrepancy alone highlights the lack of a rigorous and systematic characterization of the compound.

The most significant structural study available is a publication by C.J. Dutton et al.,<sup>36</sup> which reports <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR analyses (both one- and two-dimensional), mass spectrometry, and single-crystal X-ray diffraction data. The unit cell parameters of a monoclinic crystal form are provided, and the structure is described as containing one

mole of MeOH and one mole of water per mole of doramectin; however, the atomic coordinates are not reported.

The Patent of Y. Li et al.<sup>37</sup> describes the synthesis and purification of two polymorphs of doramectin, referred to as form A and form B (Fig. A2), obtained by antisolvent crystallization using different solvent pairs. The PXRD patterns reported for the two forms do not, however, show significant differences that would unambiguously identify two distinct solid phases: the observable differences are limited to peak resolution and relative intensity, and the pattern attributed to form A suggests the possible presence of an amorphous fraction. Neither form is thermodynamically characterized, no thermal behavior data are provided, and the authors assume without verification that doramectin does not exist as a hydrate or solvate.

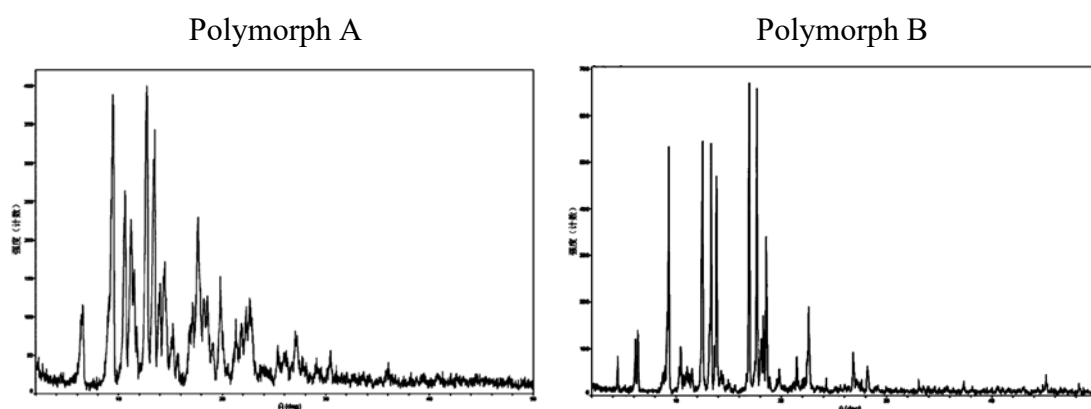


Fig. A2: PXRD pattern of polymorphs A and B as reported in the Patent by Y. Li.<sup>37</sup>

A more recent study<sup>38</sup> reports the formation of three isomorphous solvates of doramectin obtained by crystallization from ethyl acetate, n-propyl acetate, and n-butyl acetate, with a 1:1 drug:solvent molar ratio. This study, however, does not address the characterization of the starting material.

Given the significant and expanding pharmacological interest in doramectin and the critical gaps identified in the existing solid-state literature, a thorough physicochemical characterization of this compound was deemed necessary. Although doramectin is currently administered in liquid formulations, a rigorous understanding of the true nature

of the solid form used in the preparation of the final pharmaceutical product is an indispensable prerequisite for any development activity.

The present thesis therefore pursues four interconnected objectives: (i) a comprehensive diffractometric, thermal, spectroscopic, and microscopic characterization of the commercially available doramectin; (ii) reproduction of the crystallization methods described in the Patent of Y. Li et al.,<sup>37</sup> with the aim of confirming or disproving the existence of two distinct solid forms; (iii) application of a range of alternative preparation methods in a systematic search for new solid forms; and (iv) full characterization of all solid products obtained. The analytical techniques employed are differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TGA), FT-IR spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM), powder X-ray diffraction (PXRD), and single-crystal X-ray diffraction (SC-XRD).

PXRD measurements indicated that the solid form of the commercial *DR* corresponds to polymorph A described in Patent by Y. Li.<sup>37</sup> The entire diffraction profile was refined by full-profile fitting using the crystallographic data reported by C. J. Dutton.<sup>36</sup>

The experimental pattern shows good agreement with the calculated one (Fig. A3), indicating that the crystal structure can be satisfactorily described by the unit cell reported in the aforementioned paper. However, a discrepancy is observed, arising from the fact that the form investigated by these authors is a methanol solvate monohydrate, whereas our sample is a hydrate.

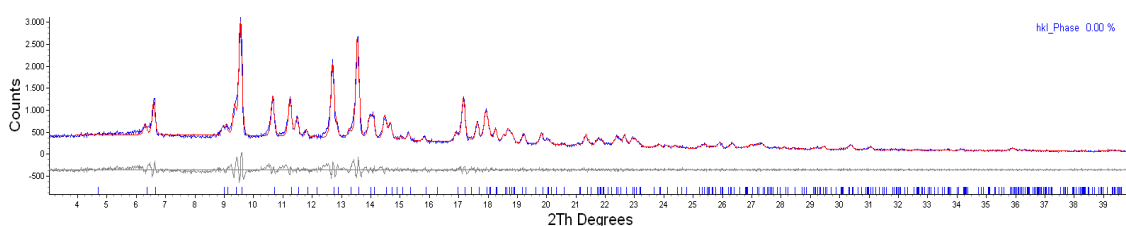


Fig. A3: Full-profile fitting (Pawley method) of commercial *DR*: experimental diffractogram (blue), calculated diffractogram (red), difference curve (grey), and reflection positions of the monoclinic phase of doramectin.

The mode of water release is particularly noteworthy. The sample begins to lose mass immediately upon being placed in the TGA furnace, even before the start of the analysis. During heating, the mass loss is rapid and poorly reproducible (Fig. A4) and amounts to approximately 2.9%, corresponding to about 1.5 mol of water per mole of doramectin.

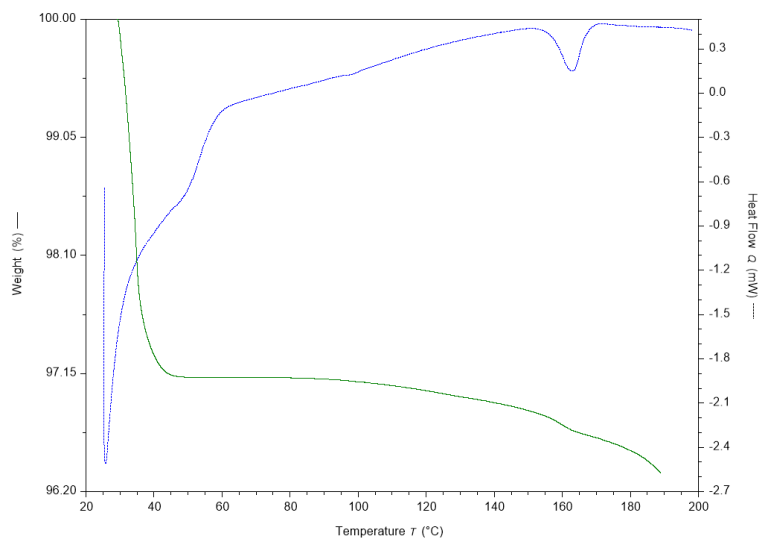


Fig. A4: TG and DSC curves of the commercial *DR* (5 K/min).

The mass loss is completed by approximately 60 °C and is associated with the first peak observed in the DSC curve (Fig. A4), which can therefore be attributed to dehydration. The diffraction pattern collected at 70 °C (Fig. A5) shows only minor changes compared to that at room temperature - the most significant being the peak at  $4.7^\circ 2\theta$  - and becomes more similar to the pattern assigned to polymorph B in Patent by Y. Li.<sup>37</sup> It is thus likely that the removal of water is accompanied by only a minimal structural rearrangement, suggesting the presence of an isomorphous hydrate.

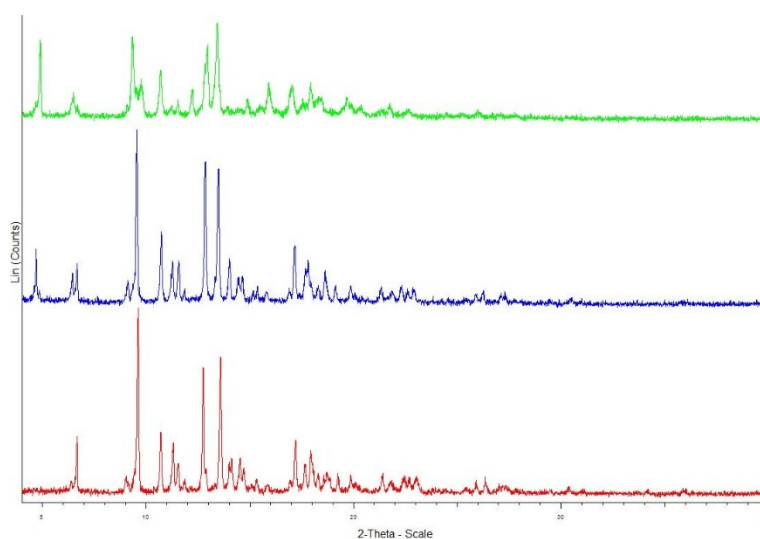


Fig. A5: PXRD patterns of commercial *DR* at 25 °C (red), 70 °C (blue) and 120 °C (green).

At around 95 °C, a second endothermic event is observed (Fig. A4). This peak is relatively broad and of low intensity, is not associated with any mass loss, and is not affected by the heating rate. As expected, our PXRD measurements attribute this event to a phase transition (Fig. A5). Heating commercial *DR* up to 120 °C therefore leads to the formation of a previously unreported polymorph (polymorph C); this transition is reversible.

Upon heating, polymorph C undergoes an endothermic event (third peak in the DSC curve), which is nonreversible and characterized by an enthalpy change that shifts to lower temperatures as the heating rate decreases. The  $T_{\text{onset}}$  decreases from 161 °C at  $\beta = 20 \text{ K min}^{-1}$  to 151 °C at  $\beta = 1 \text{ K min}^{-1}$ .

In addition, within the same temperature range, a slight but measurable mass loss (near 0.22%) is observed. This behavior is clearly inconsistent with a pure melting process - as instead reported in several sources<sup>33,34,35</sup> - but rather indicates at least a combined melting–decomposition process. This interpretation is further supported by the observation that, at the end of the process (173 °C), the sample appears as a yellow–orange glassy material. Considering that the main differences between the FT-IR spectra collected at room temperature and at 173 °C primarily involve the vibrations of the C=O and C–O functional groups, it can be inferred that the decomposition process, at least in its initial stages, predominantly involves the ester functionality.

The solids obtained after mechanical treatment and through various crystallization methods do not exhibit significant differences compared to the original doramectin. The only exception is represented by the product obtained via hot crystallization using methanol as solvent and toluene as antisolvent. DSC, SEM, and PXRD analyses reveal the amorphous nature of this material. Moreover, as expected for an amorphous solid, decomposition begins at significantly lower temperatures compared to the original sample.

The various crystallization routes explored enabled the growth of relatively large crystals, predominantly in the form of prismatic rods, with lengths reaching up to approximately 1 mm. SEM images clearly show the presence of small bubbles and numerous fractures on the particle surfaces, most likely originating from solvent loss under the vacuum conditions of the instrument and from localized heating induced by the electron beam.

The sample obtained by hot recrystallization from acetone and acetonitrile, following the procedure reported in Patent by Y. Li et al. for the preparation of polymorph B,<sup>37</sup> was selected for SC-XRD analysis. The unit cell parameters are consistent with those reported by Dutton.<sup>36</sup> The main difference lies in the solvent content: while the structure reported in the literature contains methanol and water, the crystal obtained in this study incorporates approximately 1.6 water molecules. The agreement in unit cell parameters suggests that the solvent molecules do not play a primary role in determining the crystal structure.

Doramectin crystallizes in the monoclinic space group C2, with one molecule of the active ingredient in the asymmetric unit. In the structure, four peaks of electron density are observed at distances consistent with hydrogen bonding from hydroxyl groups and among themselves, indicating the presence of water molecules of crystallization. However, the electron density at these sites is lower than expected for full occupancy, and each site was therefore refined with a variable occupancy factor.

Furthermore, different crystals exhibited slightly varying unit cell parameters and a variable water content (ranging from 1.5 to 1.7 molecules per asymmetric unit), suggesting that the material is a non-stoichiometric hydrate. Indeed, along the crystallographic a-axis, the drug molecules pack together, separated by a layer of water that is not sterically hindered, thus allowing their release from the structure (Fig. A6).

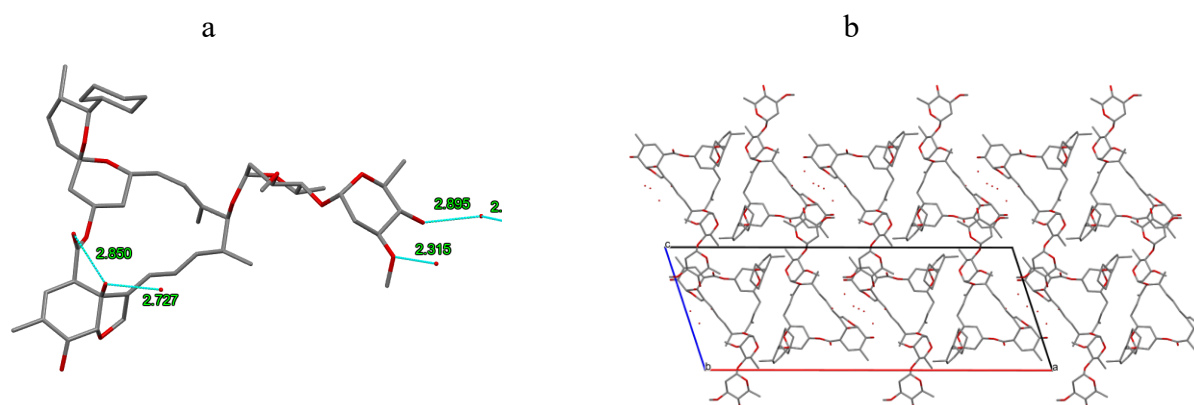


Fig. A6: Crystallized *DR*: asymmetric unit (a) and crystal packing (b) along the crystallographic *a*-axis; hydrogen atoms omitted for clarity.

On the basis of the unit cell parameters obtained from full-profile fitting of the diffraction data of the commercial sample and from the structure determined for the recrystallized sample, the diffraction patterns of both the hydrated and anhydrous forms were calculated.

The simulations (Fig. A7) showed that water absence influences the intensity of certain reflections, particularly the peak at approximately  $4.7^\circ 2\theta$ : this peak is predicted to have negligible intensity in the hydrated form, where it is lost in the background noise, but becomes clearly visible in the anhydrous form. This finding is fully consistent with the experimental observation that the reflection at  $4.7^\circ 2\theta$  appears in the diffractogram collected at  $70^\circ\text{C}$  after dehydration, thus rationalizing the experimentally observed PXRD differences between patterns (Fig. A5) collected at  $25^\circ\text{C}$  (hydrated form) and  $70^\circ\text{C}$  (dehydrated form).

The results obtained thus far reveal an apparent inconsistency: although the presence of water molecules in doramectin does not appear to be essential for the existence of the crystal lattice, the anhydrous form differs significantly from the hydrated one (Fig. A7), in particular for the peak at  $4.7^\circ 2\theta$ . On the other hand, the intensity of a diffraction peak is strongly dependent on the nature and occupancy of the atoms at the crystallographic sites; therefore, it is reasonable to expect significant changes in intensity upon removal of these atoms.

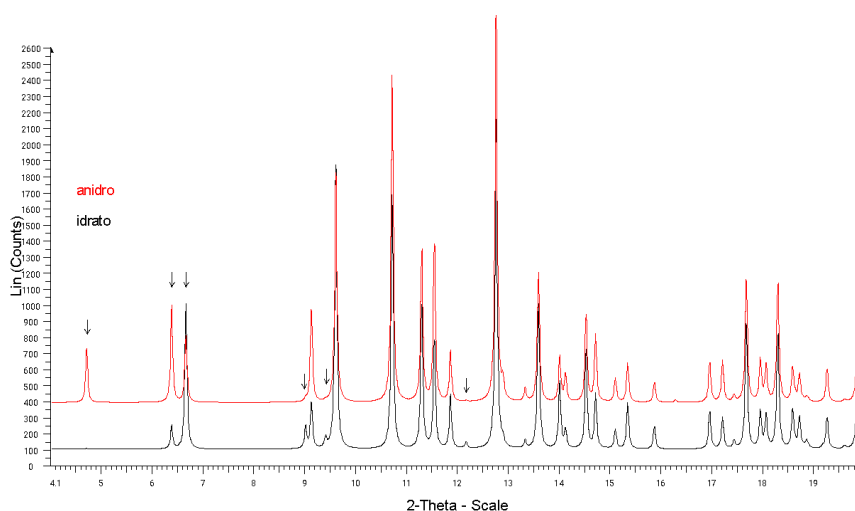


Fig. A7: Calculated diffractograms for the hydrated form (black) and the anhydrous form (red) in the 4 - 20° 2 $\theta$  range.

### Concluding remarks

This thesis work has gathered significant information toward a thorough understanding of the solid state of doramectin, shedding light on many previously uninvestigated aspects of this compound and correcting information reported in the scientific literature.

The thermal behavior of this active ingredient was found to differ from what is described in the literature and on the websites of various manufacturers. Contrary to published reports, no thermal event is observed between 116 and 119 °C,<sup>30,31,32</sup> and the endothermic event occurring around 157 °C<sup>33,34,35</sup> is attributable to a combined melting/decomposition process rather than pure melting. Additional thermal events not previously reported in the literature were also measured: at low temperatures, loss of hydration water and transition to the corresponding isomorph desolvate; at 95 °C, a reversible phase transition leading to the formation of a new polymorph, referred to here as polymorph C; and a reversible phase transition around 0 °C.

A key finding of this thesis, entirely overlooked in the literature, is the strong tendency of doramectin to absorb water: at room temperature, 1.5 mol of water are taken up rapidly. This represents the maximum absorbable amount, even after conditioning at 100% relative humidity. The hydrogen bonds formed between doramectin and water are, however, very weak, resulting in rapid water expulsion upon heating or exposure to N<sub>2</sub> flow. Water is accommodated between the molecular layers of the active ingredient,

forming a non-stoichiometric hydrate. Its presence does not affect the crystal structure of doramectin but does alter peak intensities in the PXRD patterns; in particular, the intensity of the peak at  $4.7^\circ 2\theta$  decreases with increasing water content.

The numerous recrystallization attempts carried out to obtain new polymorphs yielded no additional solid forms other than an amorphous phase. The procedure described in the Patent of Y. Li et al. likewise failed to produce what the authors designate as polymorph B.<sup>37</sup> Considering the diffraction data collected on both hydrated and anhydrous doramectin, it is reasonable to conclude that polymorphs A and B actually correspond to the same crystal form with differing water contents.

## **1. INTRODUZIONE**

Un solido può presentarsi principalmente in due forme differenti: lo stato cristallino e lo stato amorfo. Il solido si definisce cristallino se presenta un ordine spaziale a lungo raggio, ossia presente su distanze molto maggiori rispetto alla scala atomica; in altre parole, un solido è detto cristallino se la sua unità strutturale di base, detta cella cristallina, si ripete in modo regolare in una o più direzioni dello spazio. Per uno stesso solido possono esistere due o più forme cristalline differenti, dette polimorfi, di cui si discuterà in seguito. Al contrario, il solido si definisce amorfo se le molecole che lo compongono presentano una struttura priva della ripetitività a lungo raggio propria dei solidi cristallini. I solidi amorfi e i solidi cristallini, pur avendo stessa composizione chimica, presentano caratteristiche chimiche, fisiche, spettroscopiche, meccaniche e diffrattometriche anche molto differenti tra loro; questo genere di differenze si possono riscontrare anche tra forme polimorfiche diverse di uno stesso solido.

### **1.1 SOLIDI AMORFI**

I solidi amorfi hanno aspetto, grado di durezza e rigidità tipici dei solidi, ma le loro unità costituenti presentano periodicità traslazionale, conformazionale e di orientamento solo a corto raggio;<sup>1</sup> questo “disordine” nell’impaccamento a lungo raggio si può altresì descrivere come una distribuzione casuale delle unità che costituiscono il solido. Per questo motivo, un solido amorfo può anche essere considerato come un “liquido sotto-raffreddato” in cui la libertà conformazionale a livello microscopico è quella propria di un liquido, mentre la viscosità a livello macroscopico è propria di un solido. Le diversità nell’impaccamento tra solidi cristallini e amorfi spiegano le differenze osservate in molte loro proprietà fisico-chimiche quali la densità, la durezza, la solubilità e le proprietà termiche.<sup>2</sup>

Al pari dei solidi cristallini, non esistono metodi sicuri per ottenere un solido amorfo e la loro formazione deve essere verificata per ogni molecola e per ogni processo eseguito; tuttavia, i solidi amorfi si ottengono generalmente a partire da processi che avvengono in tempi rapidi e che non danno al solido il tempo di formare un reticolo cristallino ordinato.<sup>3</sup> Tra questi processi, alcuni dei più rilevanti sono la fusione del solido,<sup>4</sup> la precipitazione del solido in soluzione mediante aggiunta di un solvente in cui il solido stesso è poco o

per niente solubile (metodo dell'antisolvente), il brusco raffreddamento (ad esempio con bagno di ghiaccio) di una soluzione portata all'ebollizione, la desolvatazione di un solvato per trattamento termico<sup>5</sup> e trattamenti meccanici come la macinazione.

I solidi amorfi presentano un contenuto energetico superiore a quello delle corrispondenti forme cristalline; di conseguenza, essi sono meno stabili rispetto a questi ultimi e tendono a convertire ai solidi cristallini per esposizione al calore o all'umidità. Oltre a ciò, i solidi amorfi presentano maggiori solubilità e velocità di dissoluzione, dal momento che le interazioni intermolecolari sono indebolite rispetto al solido cristallino e, dunque, si abbassa la barriera energetica da superare per la solubilizzazione del principio attivo.<sup>2</sup>

## **1.2 SOLIDI CRISTALLINI E POLIMORFISMO**

I solidi cristallini sono dei solidi che presentano un ordine a lungo raggio, vale a dire che la loro unità elementare, ossia la cella cristallina, si ripete in maniera regolare nelle tre dimensioni; il polimorfismo, invece, si può definire come la possibilità di un dato elemento o composto di cristallizzare in più di una specie cristallina distinta.<sup>6,7</sup> L'esistenza dei polimorfi è dovuta principalmente alla flessibilità conformazionale della molecola e alla sua capacità di creare legami idrogeno intra-molecolari ed inter-molecolari.<sup>8</sup> Un tipo particolare di polimorfi sono i solvati, anche noti come pseudo-polimorfi: si tratta di solidi cristallini che contengono al loro interno molecole di solvente di cristallizzazione in rapporto stechiometrico; se il solvente è l'acqua, si parla di idrati.<sup>8</sup> Un solvato che perde il solvente di cristallizzazione, mantenendo però la struttura cristallina di partenza, è detto desolvato isomorfo.

A causa del diverso impaccamento cristallino e del differente schema di interazioni intermolecolari, due differenti polimorfi o solvati possono presentare diverse proprietà chimiche, fisiche e meccaniche tra di loro, con una serie di conseguenze sul loro utilizzo, manipolazione e assorbimento di acqua.<sup>9</sup> Queste differenze possono riguardare:

- proprietà fisiche e termodinamiche (volume molare, temperatura di fusione, entalpia, entropia, energia libera, solubilità, stabilità termica...);
- proprietà cinetiche (velocità di dissoluzione e delle reazioni allo stato solido, stabilità...);

- proprietà di superficie (adsorbimento, bagnabilità, granulometria e morfologia della polvere...);
- proprietà meccaniche (durezza, plasticità, scorrimento della polvere...);
- proprietà diffrattometriche e spettroscopiche (elettroniche, vibrazionali...).

Le differenze di queste proprietà permettono di distinguere e caratterizzare i diversi polimorfi.

### **1.3 METODI PER OTTENERE DIVERSE FORME SOLIDE**

Ad oggi non sono noti metodi generali per stabilire quanti e quali polimorfi possa formare un solido.

La ricerca di nuove forme cristalline ha essenzialmente una base sperimentale, e viene condotta attraverso un meccanismo di *try-and-error*.<sup>10</sup> Le cristallizzazioni da evaporazione di soluzioni sature sono il metodo più usato per la loro efficienza e convenienza.<sup>10</sup> Le condizioni sperimentali che possono essere variate per ottenere nuove forme cristalline sono numerose, tra queste si possono citare il solvente adoperato, la temperatura di riscaldamento, le condizioni di raffreddamento (eseguito ad esempio a temperatura ambiente o in bagno di ghiaccio), il rapporto solvente-soluto e l'aggiunta di un cosiddetto anti-solvente, ossia un solvente miscibile con il solvente già presente ma non con il composto. Operativamente, si procede modificando un parametro sperimentale alla volta.<sup>4,5,10,11</sup> Altre procedure prevedono il trattamento meccanico, ossia la macinazione a secco o ad umido, e il trattamento termico.<sup>5</sup>

### **1.4 STABILITÀ E RELAZIONI TRA FORME CRISTALLINE DIVERSE**

Non tutti i polimorfi di uno stesso composto presentano la stessa stabilità; anzi, a determinate condizioni di temperatura e pressione un solo polimorfo è stabile, ossia quello a più bassa energia, mentre gli altri sono metastabili e tenderanno a trasformarsi nel polimorfo stabile. Il campo di stabilità di ciascun polimorfo può essere studiato mediante diagrammi energia-temperatura nei quali sono visibili, per una coppia di polimorfi, le curve dell'energia libera  $G$  e dell'entalpia  $H$  in funzione della temperatura  $T$ ; il polimorfo che in un determinato intervallo di  $T$  presenta il minor valore di  $G$  sarà la forma stabile.

Basandosi su questo genere di diagrammi, è possibile definire la relazione tra due polimorfi come una relazione di enantiotropia o di monotropia. Se i due polimorfi sono in relazione di enantiotropia, allora ciascuno di essi avrà il suo campo di stabilità in intervalli di temperatura differenti fino al raggiungimento della temperatura di fusione, in cui la forma più stabile diventa quella liquida. Partendo dal polimorfo stabile a basse temperature e scaldandolo, esso compirà la transizione all'altro polimorfo a una temperatura detta di transizione polimorfica; questo processo è endotermico. Una volta superata la temperatura di transizione polimorfica, se non si verificano fenomeni di decomposizione è possibile che, raffreddando il polimorfo ottenuto, si ottenga nuovamente la specie di partenza mediante un processo esotermico.

Se i due polimorfi, invece, sono in relazione di monotropia, allora esisterà un solo polimorfo stabile per tutto l'intervallo di temperatura fino alla temperatura di fusione, mentre l'altro sarà metastabile in tutto questo intervallo. La transizione dal polimorfo metastabile a quello stabile è un processo esotermico.

Lo studio degli aspetti termodinamici delle transizioni di fase permette di stabilire delle regole, note come regole di Burger-Ramberger, per predire la relazione esistente tra i due polimorfi:

- Regola del calore di transizione: per due polimorfi in relazione di enantiotropia, la transizione polimorfica è un processo endotermico per temperature superiori a quella di transizione, ed esotermico per temperature inferiori; per due polimorfi in relazione di monotropia, invece, il processo è sempre esotermico.
- Regola del calore di fusione: per due polimorfi in relazione di enantiotropia, il polimorfo altofondente ha un calore di fusione inferiore al polimorfo bassofondente, mentre è il contrario se i due polimorfi sono monotropici.
- Regola della densità: per due polimorfi in relazione di enantiotropia, il polimorfo altofondente ha densità inferiore al polimorfo bassofondente, mentre è il contrario se i due polimorfi sono monotropici.

## **1.5 ANALISI E CARATTERIZZAZIONE DELLO STATO SOLIDO**

Lo studio e la caratterizzazione dei solidi amorfi e cristallini si avvale di numerose tecniche di indagine chimico-fisica; di seguito sono messe in luce le principali informazioni apportate da quelle utilizzate in questo lavoro di tesi.

### **1.5.1 Misure di diffrazione di raggi X**

#### **1.5.1.1 Diffrazione di raggi X da polveri (PXRD)**

La tecnica PXRD è il metodo più impiegato per riconoscere le diverse forme solide di un composto: ogni forma cristallina, infatti, presenta una serie di picchi di diffrazione definiti a valori bassi dell'angolo di diffrazione  $2\theta$ . Solitamente, l'analisi viene compiuta in un intervallo di  $2\theta$  compreso tra  $3^\circ$  e  $40^\circ$ . Polimorfi diversi sono riconosciuti per la presenza di picchi che possono differire per numero, posizione e intensità.<sup>5,12</sup> Questa analisi è di tipo qualitativo e può essere utilizzata anche per monitorare le transizioni polimorfiche nel tempo.<sup>9</sup>

Al contrario, i solidi amorfi non diffrangono i raggi X e presentano un profilo tipico privo di picchi o in cui sono presenti, al più, dei picchi molto larghi e non definiti, indice in questo caso della presenza di un composto cristallino a corto raggio o amorfo a lungo raggio.<sup>1</sup>

È anche possibile eseguire una misura PXRD a temperatura variabile (VT-PXRD): si raccoglie il pattern di diffrazione del campione a differenti temperature per valutare la sua stabilità e studiare eventuali transizioni di fase, che possono avvenire in un intervallo di temperatura più o meno ampio, nonché fusioni e decomposizioni.<sup>4,5,13</sup>

#### **1.5.1.2 Diffrazione di raggi X da cristallo singolo (SC-XRD)**

La tecnica SC-XRD è il metodo principale utilizzato per determinare le strutture molecolari esatte dei solidi, poiché fornisce informazioni sui parametri geometrici delle celle cristalline quali le lunghezze e gli angoli di legame, gli angoli di torsione, le distanze interplanari e le geometrie delle interazioni intermolecolari.<sup>9,14</sup>

Nonostante la diffrazione di raggi X da cristallo singolo (SC-XRD) permetta di ottenere informazioni più precise sulla struttura cristallina del campione analizzato, la diffrazione

da polveri è la tecnica prevalente per lo studio dei polimorfi. La diffrazione SC-XRD, infatti, richiede l'utilizzo di cristalli singoli che in numerosi casi sono difficili da ottenere.<sup>9</sup>

### **1.5.2 Calorimetria a scansione differenziale (DSC)**

La calorimetria differenziale a scansione (Differential Scanning Calorimetry) è la tecnica termica più utilizzata in virtù della sua velocità e semplicità; essa misura la differenza del calore scambiato tra un campione e un riferimento sottoposti allo stesso programma termico, che può prevedere rampe di riscaldamento e raffreddamento, misure isoterme a una data temperatura o una combinazione di questi eventi. Dal momento che consente di determinare parametri di fusione, desolvatazione, transizione di fase, decomposizione e cristallizzazione, la DSC è particolarmente indicata per eseguire screening di polimorfismo, oltre che studi cinetici e di controllo di purezza dei composti.<sup>9,15</sup> In genere, comunque, le misure DSC sono associate a quelle PXRD per migliorare la comprensione dei fenomeni termici: ad esempio, eventi endotermi o esotermi associati a basse variazioni di energia libera indicano in genere transizioni di fase, le quali avvengono mediante riarrangiamento della struttura interna del cristallo, caratterizzata da deboli interazioni di non legame.<sup>5,12,13</sup>

### **1.5.3 Analisi termogravimetrica (TGA)**

L'analisi termogravimetrica viene solitamente associata alla DSC e permette anzitutto di distinguere tra gli eventi termici che comportano perdita di massa, ad esempio disidratazione, desolvatazione e decomposizione, da quelli che non la comportano, come le ricristallizzazioni e la fusione. È una tecnica importante per lo studio di idrati e solvati.<sup>5</sup>

### **1.5.4 Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR)**

Polimorfi diversi possono mostrare differenze nello spettro nel medio infrarosso; tali differenze traggono origine da cambiamenti della rete di legami a idrogeno inter e intramolecolare e si ripercuotono in uno spostamento dell'assorbimento dei gruppi funzionali coinvolti.

Nei solidi amorfi l'intorno delle molecole è privo di ordine; di conseguenza, le vibrazioni nel medio infrarosso possono risultare disomogenee e produrre bande larghe e diffuse con risoluzione minore rispetto ai solidi cristallini.<sup>4,8,12,13</sup>

### **1.5.5 Microscopia elettronica a scansione (SEM)**

L'analisi al microscopio elettronico a scansione, che consente di studiare morfologia e dimensioni di polvere e cristalli singoli, può costituire un valido aiuto nello studio dello stato solido,<sup>16</sup> anche se non sempre esiste corrispondenza tra morfologia e struttura cristallina.

### **1.6 IMPORTANZA DEL POLIMORFISMO CRISTALLINO DEI FARMACI**

La sfida più importante per i prodotti farmaceutici è il miglioramento delle proprietà di solubilità dei principi attivi, dal momento che circa il 40% dei farmaci approvati e quasi il 90% di quelli in via di sviluppo presentano una bassa solubilità;<sup>9</sup> questo tema è fondamentale, dal momento che la forma del principio attivo solubilizzata corrisponde alla forma che può essere assorbita dall'organismo e, dunque, biodisponibile.<sup>2</sup> Tra le vie più seguite per migliorare la solubilizzazione c'è la ricerca di nuovi polimorfi.<sup>8,9</sup> È importante, quindi, investigare tutte le possibili fasi solide di un principio attivo (*screening*), le loro proprietà chimico-fisiche e le possibili interconversioni che possono avvenire tra differenti polimorfi, tra composti cristallini ed amorfi, e tra solvati e desolvati, per selezionare quello con le proprietà più adatte per il suo utilizzo farmaceutico.<sup>5,10</sup> Gli studi preclinici dei farmaci sono, dunque, preceduti da studi di preformulazione in cui si studiano le proprietà chimico-fisiche, meccaniche e farmaceutiche del principio attivo, ossia morfologia, cristallinità, comportamento termico, solubilità, velocità di dissoluzione e assorbimento di umidità, oltre alla stabilità e all'interconversione tra polimorfi. La transizione polimorfica, infatti, può modificare il comportamento tecnologico e l'efficacia terapeutica del farmaco, causando addirittura il fallimento del prodotto commercializzato. Inoltre, nonostante i solidi amorfi garantiscano una migliore cinetica di dissoluzione, permettendo quindi potenzialmente una maggior biodisponibilità, si tende a non utilizzarli nella formulazione dei farmaci a causa della loro igroscopicità e della loro instabilità termodinamica, che può causare una loro parziale o totale cristallizzazione.<sup>13</sup>

FDA (*Food and Drug Administration*) ed EMA (*European Medicines Agency*) richiedono alle industrie farmaceutiche lo studio del polimorfismo dei farmaci sottoposti a test clinici

e un monitoraggio continuo del processo di produzione. Esiste inoltre l'EPO (*European Patent Office*) che impone, a chi deposita un brevetto su un farmaco in polvere cristallina, una caratterizzazione approfondita della fase solida.<sup>8,10</sup>

### 1.7 DORAMECTINA

Le avermectine sono un gruppo di derivati lattonici macrociclici a 16 elementi, generalmente utilizzate per il trattamento di parassiti interni ed esterni degli animali domestici grazie alle loro proprietà antelmintiche e insetticide. Esse possiedono, inoltre, proprietà antitumorali, antidiabetiche, antivirali e antimicotiche e sono utilizzati per il trattamento di numerosi disturbi metabolici. Le avermectine sono presenti in natura come prodotto di fermentazione dello *Streptomyces avermitilis*, un attinomicete isolato dal terreno, e agiscono legandosi ai canali del cloruro controllati dal glutammato (GluCl) specifici degli invertebrati e presenti in nematodi e artropodi. Amplificando l'effetto del glutammato, causano un massiccio afflusso di ioni cloruro nelle cellule nervose e muscolari, provocando iperpolarizzazione e inibizione della trasmissione degli impulsi elettrici nei muscoli e nei nervi degli invertebrati e causando quindi paralisi e morte dei parassiti. Le dosi somministrate che generano questo effetto non sono tossiche per i mammiferi, poiché questi ultimi mancano del canale del cloruro glutammato-dipendente.<sup>17</sup>

La doramectina, *25-cicloesil-5-O-demetil-25-de(1-metilpropil)avermectina* (peso molecolare = 899.128 g mol<sup>-1</sup>), è un derivato sintetico dell'avermectina.<sup>18</sup> È un principio attivo utilizzato in campo veterinario sui bovini e sugli animali da allevamento per il trattamento di parassiti quali ascaridi gastrointestinali, vermi polmonari, vermi oculari, larve, pidocchi succhiatori e acari della rogna.<sup>19</sup>

I farmaci che contengono la doramectina come principio attivo sono numerosi; di seguito sono riportati alcuni tra i più utilizzati.

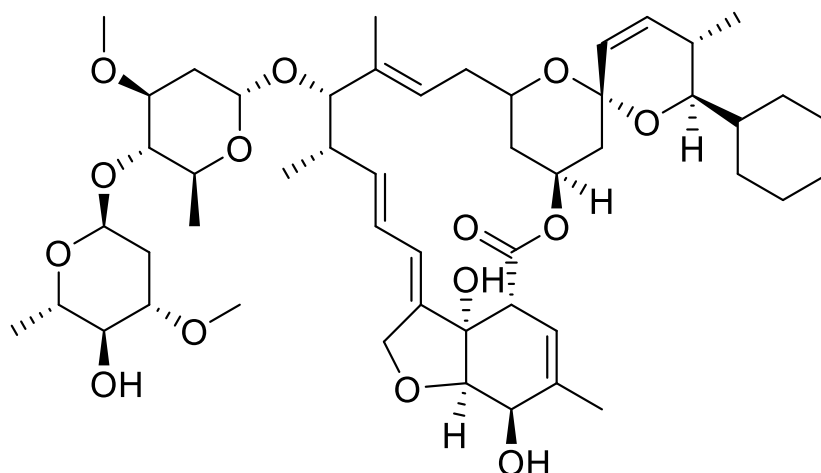


Fig. 1.1: Struttura molecolare della doramectina.

## 1.8 PRODOTTI FARMACEUTICI CONTENENTI LA DORAMECTINA

### Dectomax

Dectomax, approvato per l'uso negli USA nel 1997<sup>20</sup> e prodotto da Zoetis Inc. (USA), contiene doramectina all'1% w/v; è venduto come una soluzione oleosa trasparente, somministrata per iniezione sottocutanea per i bovini e intramuscolare per ovini e suini. È utilizzato per il trattamento regolare e il controllo strategico a lungo termine di molte specie parassitiche, in particolare gli acari della rogna; la sua applicazione consiste in una singola iniezione di 0.2 mg di principio attivo per kg dell'animale (bovini e ovini) o di 0.3 mg per kg dell'animale (suini).<sup>21,22</sup>

La doramectina presente nel farmaco viene espulsa attraverso le feci degli animali come principio attivo immodificato (nei bovini, l'80% della doramectina è espulsa in questa forma), accumulandosi nei sedimenti a livelli potenzialmente tossici anche per molte settimane dopo il trattamento; questo fatto comporta effetti negativi sulla fauna del letame, sugli organismi acquatici e, in generale, sulle specie non bersaglio, incluso l'uomo. Per queste ragioni, è fondamentale smaltire i residui di principio attivo e i contenitori come rifiuti speciali.<sup>21,23</sup>

Nel 2025 negli Stati Uniti è stato approvato l'uso di questo farmaco contro una nuova specie parassitica e contro il rischio di nuova infestazione parassitaria negli animali già trattati.<sup>24</sup>

## **Dectogard**

Dectogard, prodotto da Aurora Pharmaceutical, Inc. (USA), è una soluzione topica di colore azzurro che contiene doramectina allo 0.5% w/v. Il suo uso è stato approvato nel 2023 dalla FDA come la prima soluzione topica generica contenente doramectina per il trattamento e il controllo dei parassiti nei bovini.<sup>20</sup> Il dosaggio raccomandato è di 0,5 mg per kg di peso vivo e possiede lo stesso regime di controllo del farmaco Dectomax, ma con un costo minore. È stato osservato che i residui nei prodotti alimentari derivati da bovini trattati con DectoGard non rappresentano un problema di salute pubblica quando il prodotto è utilizzato secondo le istruzioni riportate sull'etichetta.<sup>25,26</sup>

## **Valcor**

Valcor, prodotto da Zoetis Inc. (USA), è un farmaco su prescrizione che contiene due principi attivi, ossia la doramectina allo 0.5% w/v e il levamisolo, che svolgono una funzione antielmintica per il controllo ad ampio spettro dei parassiti interni ed esterni dei bovini. Il dosaggio indicato è pari a 0.2 mg per kg dell'animale; è vietato l'utilizzo sugli animali destinati alla riproduzione o al consumo umano.<sup>27</sup>

## **Doracide**

Doracide, prodotto da Bimeda Animal Health Limited, è un farmaco generico approvato nel 2024 con approvazione abbreviata (ANADA)<sup>28</sup> e possiede lo stesso dosaggio e le stesse indicazioni riportate per Dectogard.<sup>29</sup>

## **1.9 CARATTERIZZAZIONE CHIMICO-FISICA DELLA DORAMECTINA: CHE COSA È NOTO AD OGGI**

Nonostante il campo di applicazioni di questo principio attivo sia ampio e in continua espansione, gli studi eseguiti sullo stato solido e le proprietà chimico-fisiche di questa molecola sono veramente pochi e, a volte, riportano informazioni contrastanti. La temperatura di fusione, per esempio, in alcuni casi è indicata nell'intervallo 116 °C - 119 °C<sup>30,31,32</sup> mentre, in altri casi, nell'intervallo 160 °C - 162 °C.<sup>33,34,35</sup>

Un lavoro di C.J. Dutton et al. del 1995<sup>36</sup> riporta i risultati di analisi <sup>1</sup>H-NMR e <sup>13</sup>C-NMR in una e in due dimensioni, eseguite per determinare la struttura chimica del principio attivo e attribuire a ciascun atomo di idrogeno e carbonio i rispettivi segnali, di spettrometria di massa e di diffrazione di raggi X su cristallo singolo. Sono riportati i parametri geometrici della cella cristallina, che sembra contenere 1 mole di metanolo e 1 mole di acqua per mole di doramectina; tuttavia, non sono riportate le posizioni degli atomi.

In un brevetto del 2020 di Y. Li et al.<sup>37</sup> sono descritti i passaggi della sintesi e della purificazione di due polimorfi della doramectina, indicati come polimorfi A e B, e ne sono riportati i pattern di diffrazione (Fig. 1.2 e Fig. 1.3). Da un confronto tra i due pattern riportati dagli autori non emergono, in realtà, differenze significative che possano indicare la presenza di due forme solide diverse: ciò che si può osservare è solo una diversa risoluzione e una diversa intensità relativa dei picchi. Inoltre, sembra che nel pattern attribuito al polimorfo A ci sia una gobba alla base dei picchi, che suggerisce la presenza di una quota di polvere amorfa.

Il metodo di cristallizzazione seguito dagli autori è quello dell'antisolvente e segue i medesimi passaggi per i due prodotti, differendo unicamente per i solventi utilizzati. Non viene descritto, tuttavia, quale sia la forma solida di partenza e le due forme solide non vengono caratterizzate dal punto di vista termodinamico, né viene descritto il loro comportamento termico. Gli autori non prendono in considerazione la possibilità che la doramectina si presenti in forma di idrato o di solvato.

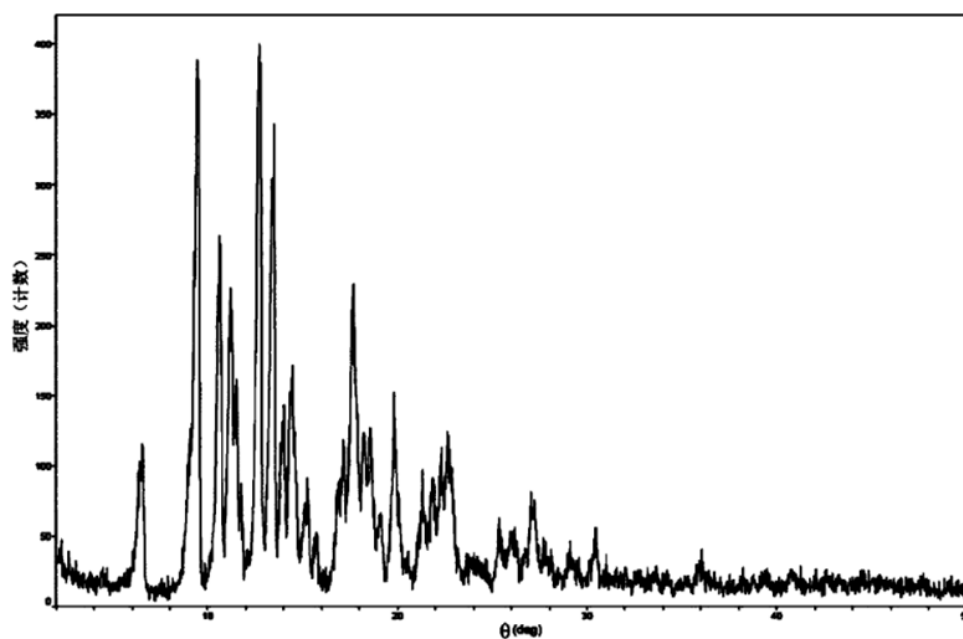


Fig. 1.2: Pattern PXRD del polimorfo A come riportato nel Patent di Y. Li.<sup>37</sup>

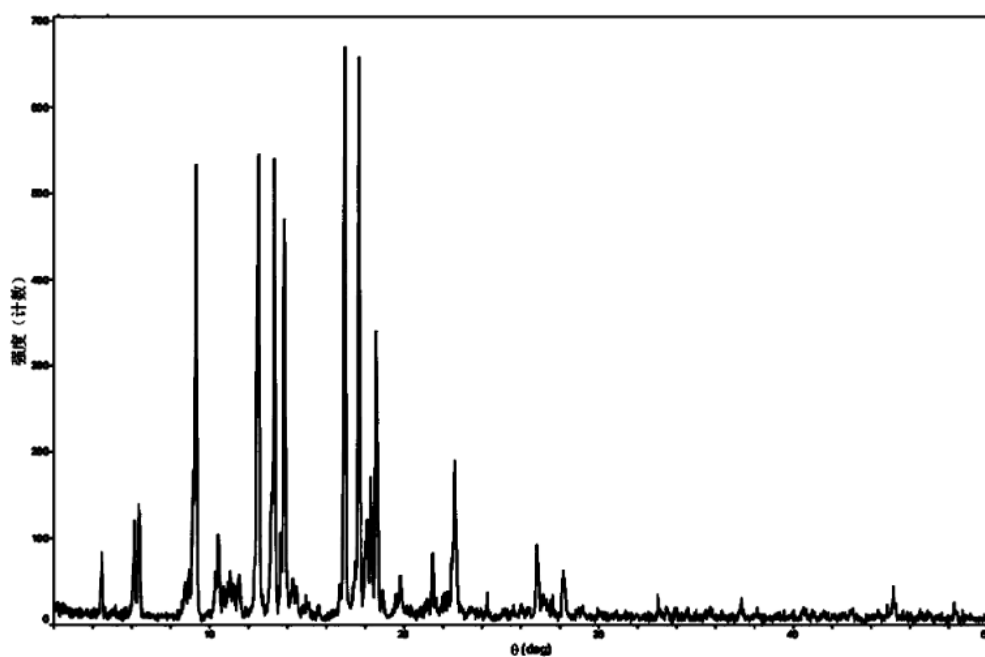


Fig 1.2: Pattern PXRD del polimorfo B come riportato nel Patent di Y. Li.<sup>37</sup>

Uno studio del 2025,<sup>38</sup> infine, discute l'ottenimento di tre solvati isomorfi della doramectina mediante cristallizzazione da soluzione con i solventi etilacetato, *n*-propilacetato e *n*-butilacetato. In ognuno di questi solvati il rapporto molare tra

doramectina e solvente è 1:1 e le due molecole interagiscono mediante legami a idrogeno. Neanche in questo studio, tuttavia, si fa cenno alla caratterizzazione della doramectina tal quale.

La doramectina presenta buona solubilità in solventi organici e scarsa o nulla solubilità in acqua,<sup>33,39</sup> in linea con il suo carattere prevalentemente lipofilo.

### **1.10 SCOPO DELLA TESI**

Considerato il grande interesse per l'azione farmacologica di questa molecola e le sue crescenti applicazioni, risulta necessario approfondire la caratterizzazione chimico-fisica del suo stato solido, che ad oggi risulta fortemente incompleta e poco chiara. Nonostante la sua somministrazione attualmente impieghi una forma liquida, la comprensione della vera natura del solido utilizzato nella preparazione della forma farmaceutica finale è imprescindibile.

Ad oggi non c'è chiarezza sul fatto che la doramectina tal quale e i suoi polimorfi esistano come composti idrati, come solvati o in altre forme. L'unico studio noto che analizza in parte questo aspetto<sup>38</sup> rileva, semplicemente, la capacità della doramectina di formare forti legami a idrogeno e di formare solvati con alcuni solventi.

La seguente tesi si concentra dunque: i) sullo studio della doramectina commerciale tal quale (*DRTq*) dal punto di vista microscopico, termico, spettroscopico e diffrattometrico; ii) sulla riproduzione dei metodi di sintesi impiegati nel brevetto di Y. Li et al.,<sup>37</sup> al fine di confermare o smentire l'ottenimento di due forme solide diverse; iii) sull'applicazione di diversi metodi alla ricerca di nuove forme solide; iv) sulla caratterizzazione dei prodotti ottenuti.

Le tecniche impiegate sono la DSC, la TGA, la spettroscopia FT-IR, SEM, e la diffrazione di raggi X da polveri e da cristallo singolo.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 MATERIA PRIMA

Il principio attivo doramectina è stato acquistato da Baoji Guokang Bio-Technology Co., Ltd. Purezza dichiarata: 98%.

### 2.2 RICRISTALLIZZAZIONI

Di seguito sono descritti i metodi seguiti per le ricristallizzazioni della doramectina. Una volta cristallizzati, i campioni sono stati conservati in essiccatore anidro per gel di silice.

#### 2.2.1 Ricristallizzazione secondo brevetto

È stata seguita la ricetta indicata nel Patent di Y. Li<sup>37</sup> utilizzando, in particolare, i solventi indicati nell'Esempio 2 per ottenere il polimorfo B, ossia acetone e acetonitrile.

1 g di DR è aggiunto a 3 mL di acetone e solubilizzato con riscaldamento a 40 °C, seguito da agitazione per 15 minuti; il volume è dimezzato in rotavapor. Si aggiunge 1 mL di acetonitrile e si applica agitazione per altri 15 minuti; il volume è nuovamente dimezzato in rotavapor. La soluzione è raffreddata a 0 °C e lasciata sotto agitazione per 1 ora. I solventi sono fatti evaporare in flusso di azoto, tenendo la beuta chiusa per alcuni giorni inizialmente con un tappo di silicone e successivamente con cotone.

Il solido ottenuto è indicato con la sigla *DRxxBrv*.

#### 2.2.2 Ricristallizzazione a $T_{amb}$

All'interno di un becker si pongono 100 mg di *DRtq* e si aggiungono 20 mL di un solvente forte (MeOH, Acetone, EtOH, IPrOH) opportunamente scelto. La soluzione ottenuta, di colore trasparente per tutti i quattro solventi, viene coperta con pellicola di cera e lasciata sotto agitazione per 10 minuti a temperatura ambiente ( $T_{amb}$ ). Al termine, la pellicola viene forata e, dopo completa evaporazione del solvente, il solido viene macinato manualmente per pochi istanti.

I solidi così ottenuti sono indicati con le sigle *DRxxMeOH\_amb*, *DRxxAc\_amb*, e *DRxxEtOH\_amb*.

### **2.2.3 Ricristallizzazione a $T_{amb}$ con antisolvente**

In un becker si sciolgono sotto agitazione 200 mg di *DRtq* in 1.5 mL di acetone, solvente in cui la doramectina è solubile; alla soluzione ottenuta si aggiungono 3.0 mL di H<sub>2</sub>O. Si copre il becker con pellicola di cera forata e si conserva la soluzione a  $T_{amb}$  fino a completa evaporazione del solvente. Il solido così ottenuto è stato leggermente macinato a mano in un mortaio di agata.

### **2.2.4 Ricristallizzazione a caldo con antisolvente**

In questo metodo si abbina una ricristallizzazione a caldo all'uso di due solventi, uno forte e uno debole, in modo conforme a quanto descritto nel brevetto di Y. Li.<sup>37</sup> Le coppie di solventi scelti sono state: Acetone (forte) - ACN (debole) e MeOH (forte) - Toluene (debole).

In un becker si pongono 500 mg di *DRtq*, che vengono sciolti nel minimo volume di solvente forte (3.0 mL di Acetone o MeOH); si aggiunge poi il solvente debole in due riprese separate da pochi secondi di agitazione (2 mL + 1 mL di ACN o 1.2 mL + 0.8 mL di toluene), ottenendo soluzioni trasparenti, di cui quella da toluene ha colorazione gialla. Il becker coperto con pellicola di cera è posto sotto agitazione a bagnomaria per 10 minuti a 40 °C e, successivamente, posto in frigorifero a 4 °C fino a completa evaporazione del solvente.

I solidi così ottenuti sono leggermente macinati a mano in un mortaio di agata e saranno nel seguito indicati con le sigle *DRxxAc\_ACN* e *DRxxMeOH\_Tol*.

### **2.2.5 Ricristallizzazione in rotavapor**

In un pallone si solubilizzano 300 mg di *DRtq* nella minima quantità di EtOH, che viene poi evaporato a pressione ridotta in rotavapor, a  $T_{amb}$ , per 1h 30min. Successivamente, il pallone viene conservato in essiccatore su gel di silice e, dopo quattro ore, si raccoglie il materiale solidificato sulle pareti del pallone.

### **2.2.6 Ricristallizzazione a caldo**

I solventi scelti per la procedura a caldo sono stati: MeOH, acetone, EtOH, IPrOH.

All'interno di un becker si pongono 200 mg di *DRtq* e la minima quantità di solvente necessaria per la solubilizzazione del principio attivo (2.5 mL per MeOH, Acetone e EtOH; 5 mL per H<sub>2</sub>O). La soluzione così creata, di colore giallo trasparente per la coppia Acetone ed EtOH, e trasparente per MeOH e IPrOH, è coperta con pellicola di cera e lasciata sotto agitazione per 10 minuti a 50 °C ( $T_{amb}$  nel caso dell'acetone); successivamente, è trasferita in un cristallizzatore, che viene coperto con pellicola forata e lasciato a  $T_{amb}$  fino a completa evaporazione del solvente.

Si è cercato di eseguire questa procedura usando come solvente l'acqua, ma non è stato possibile a causa della scarsissima solubilità in acqua della doramectina.

### **2.2.7 Macinazione ad umido**

Si esegue la macinazione manuale assistita da solvente (LAG), in mortaio di agata, di 200 mg di *DRtq*, usando acetone e acetonitrile in rapporto 3:2 v:v, scelti come miscela di solvente forte e solvente debole in linea con il brevetto di Y. Li.<sup>37</sup> Successivamente, il campione è fatto asciugare in stufa per una notte a 70 °C o a 120 °C.

Si esegue anche una prova analoga utilizzando come unico solvente MeOH e lasciandolo essiccare inizialmente all'aria e successivamente in essiccatore con gel di silice.

## **2.3 MACINAZIONE A SECCO**

*DRtq* è stata macinata in un mulino planetario (Pulverizette 7, Fritsch GmbH, Manufacturers of Laboratory Instruments, Idar-Oberstein, Germany) con tre sfere di agata (10 mm di diametro) a 500 rpm per tempi differenti.

## **2.4 METODI**

### **2.4.1 Analisi SEM**

I campioni osservati al microscopio elettronico a scansione sono stati preventivamente sottoposti a *sputterazione* con oro al fine di renderli conduttivi. Lo strumento utilizzato è uno Zeiss EVO MA10 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germania) (voltage applicato: 20 kV).

#### 2.4.2 Analisi PXRD

Le misure di diffrazione RX da polvere sono state eseguite utilizzando un diffrattometro Bruker D6 (Siemens, Germany), operante con geometria Bragg-Brentano, equipaggiato di detector PSD (radiazione  $\text{CuK}\alpha$ ; voltaggio 40 kV e corrente 15 mA). I pattern sono stati raccolti nella modalità “step scan” (step:  $0.02^\circ 2\theta$ ; tempo di conteggio: 0.3 s/step) nell’intervallo angolare  $2\theta = 3 - 35^\circ$  in aria a temperatura ambiente.

#### 2.4.3 Misure VT-XRPD

I diffrattogrammi in temperatura sono stati raccolti utilizzando il diffrattometro Anton Paar XRDynamic 500 equipaggiato con il detector X’Celerator (geometria Bragg-Brentano). È stata utilizzata una sorgente al Cu ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ) nell’intervallo angolare  $2\theta$  compreso tra  $4^\circ$  e  $40^\circ$  (ampiezza dello step:  $0.01^\circ$ ; tempo di conteggio: 20 s; divergences slit: 0.055; 50 mA, 40 kV).

I diffrattogrammi sono stati raccolti a differenti temperature sotto flusso di azoto e con una velocità di riscaldamento pari a 1 K/min.

#### 2.4.4 Analisi SC-RXD

I dati di diffrazione da cristallo singolo sono stati raccolti a 150 K, su un cristallo prismatico ricoperto di olio criogenico, con un diffrattometro Bruker D8 QUEST equipaggiato sia con sorgente al Cu ( $\lambda \text{K}\alpha_1 = 1.54056 \text{ \AA}$ ) sia al Mo ( $\lambda \text{K}\alpha_1 = 0.71073 \text{ \AA}$ ), con un detector Photon 100 e con un sistema di cryocooling Oxford Cryosystem 800 a 150 K. I dati sono stati integrati con il software APEX4. Le strutture sono state risolte utilizzando i programmi SHELXT<sup>40</sup> e SHELXL<sup>41</sup> attraverso l’interfaccia OLEX2.<sup>42</sup>

Gli atomi di H sono stati posizionati nelle posizioni calcolate; invece, gli altri atomi sono stati raffinati in modo anisotropico. Le rappresentazioni grafiche sono state ottenute utilizzando il software Mercury.<sup>43</sup>

#### 2.4.5 Analisi DSC e TGA

Il comportamento termico dei campioni è stato studiato con uno strumento DSC Q2000 interfacciato con una stazione dati TA5000 e un termoanalizzatore gravimetrico Q50 (TA Instruments, New Castle, DE, USA).

La calibrazione dello strumento DSC è stata eseguita utilizzando indio ultrapuro (99.999%; punto di fusione = 156.6 °C; entalpia di fusione = 28.54 J/g) come standard. I campioni sono stati sottoposti a diverse velocità di riscaldamento in flusso di azoto (45 ml min<sup>-1</sup>) su una quantità di polvere compresa tra 3 - 4 mg ed utilizzando crogioli di alluminio aperti.

#### **2.4.6 Analisi FT-IR**

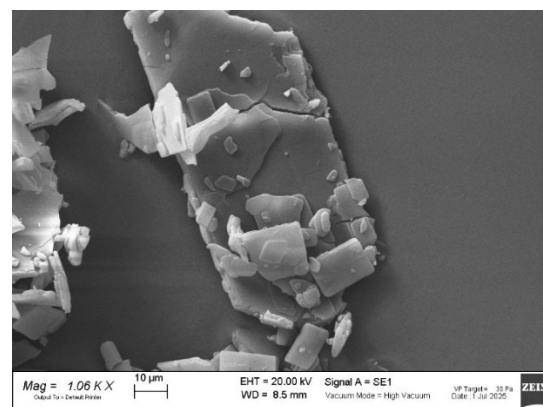
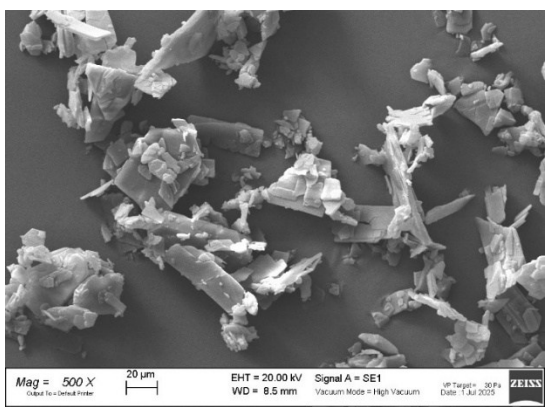
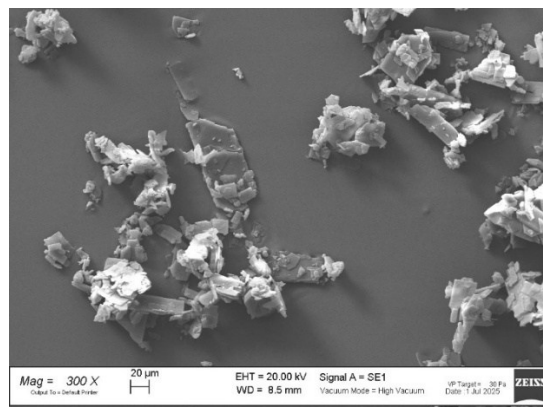
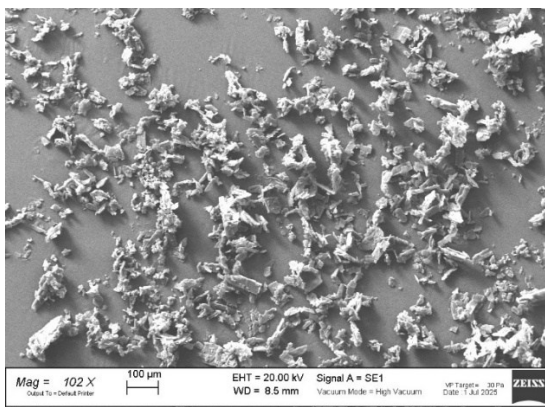
Le misure FT-IR sono state eseguite mediante uno spettrofotometro FT-IR iS10 (Nicolet, Madison, WI, USA) dotato di accessorio di campionamento ATR (Riflettanza Totale Attenuata), modello Smart iTR con cristallo in diamante; somma di 32 scansioni nell'intervallo di numeri d'onda 4000 - 650 cm<sup>-1</sup> con risoluzione di 4 cm<sup>-1</sup>.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.1 DORAMECTINA TAL QUALE (*DRtq*)

##### 3.1.1 Aspetto macroscopico e microscopico della polvere

Il campione *DRtq* si presenta come una polvere bianca; al microscopio elettronico a scansione (SEM) essa appare costituita da particelle a forma di scaglie, di lunghezza compresa tra 40 e 100  $\mu\text{m}$  e larghezza tra 10 e 40  $\mu\text{m}$ . Dalle fotografie SEM con maggiore ingrandimento (Fig. 3.1) si osserva la presenza di fratture lungo le scaglie che potrebbero essere originate, come spesso accade, da allontanamento di solvente a causa delle condizioni di vuoto dello strumento e al riscaldamento conseguente all'impatto del fascio elettronico sul campione.



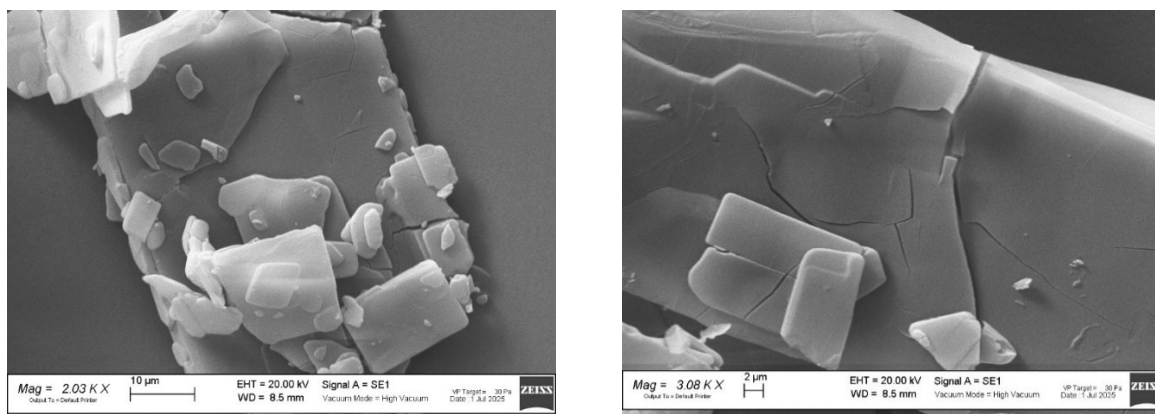


Fig. 3.1: Fotografie SEM di *DRtq* a diversi ingrandimenti.

### 3.1.2 Misure di Karl Fisher

Per il campione *DRtq* si misura un contenuto di acqua pari al 3.0%, vicino al valore di 2.9% atteso ( $\Delta m(\%)_{th}$ , calcolato mediante l'Equazione 3.1) per la presenza di 1.5 moli di acqua per mole di doramectina. Si ipotizza, pertanto, che la polvere ricevuta sia costituita da doramectina emiidrata.

Equazione 3.1:

$$\Delta m(\%)_{th} = \frac{n \cdot MM(H_2O)}{MM(DR) + n \cdot MM(H_2O)}$$

$MM(H_2O)$  e  $MM(DR)$  rappresentano, rispettivamente, la massa molare dell'acqua e della doramectina e  $n$  il numero di moli di acqua per mole di doramectina.

La presenza di acqua nel campione rende conto delle fratture osservate al SEM nelle particelle.

### 3.1.3 Analisi PXRD

L'analisi PXRD del campione *DRtq* fornisce un pattern (Fig. 3.2) molto simile a quello riportato come caratteristico del polimorfo A (Fig. 1.2).<sup>37</sup>

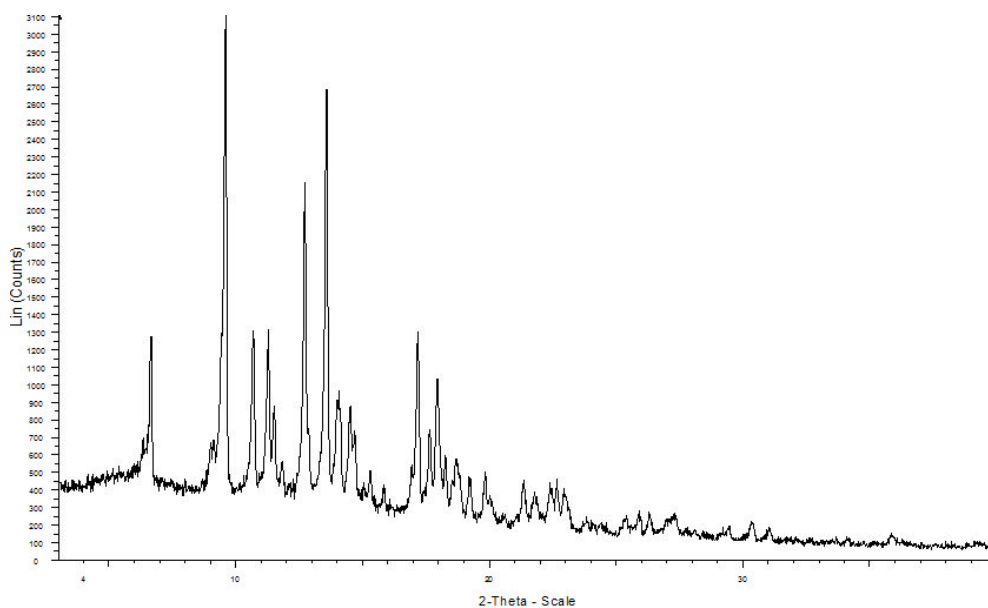


Fig. 3.2: Pattern PXRD del campione *DRtq*.

Nel lavoro di C.J. Dutton et al.<sup>36</sup> sono riportati cella cristallina, gruppo spaziale, lati di cella e numero di molecole per cella della doramectina, ma non le posizioni atomiche; la struttura descritta da questi autori è una forma metanolata monoidrata con cella monoclinica, gruppo spaziale C2,  $a = 39.088 \text{ \AA}$ ,  $b = 10.043 \text{ \AA}$ ,  $c = 14.729 \text{ \AA}$ ,  $\beta = 108.21^\circ$ ,  $Z = 4$ . L'intero profilo di diffrazione raccolto sul nostro campione di doramectina è stato affinato (full profile fitting) utilizzando i dati cristallografici del lavoro di C.J Dutton,<sup>36</sup> ottenendo i seguenti parametri di cella:  $a = 39.4795(7) \text{ \AA}$ ,  $b = 10.0203(18) \text{ \AA}$ ,  $c = 14.5811(32) \text{ \AA}$ ,  $\beta = 107.877(8)^\circ$ .

Il diffrattogramma sperimentale ben si compara a quello così calcolato (Fig. 3.3), dimostrando, dunque, che la cella riportata in letteratura spiega la forma cristallina del nostro campione *DRtq*.

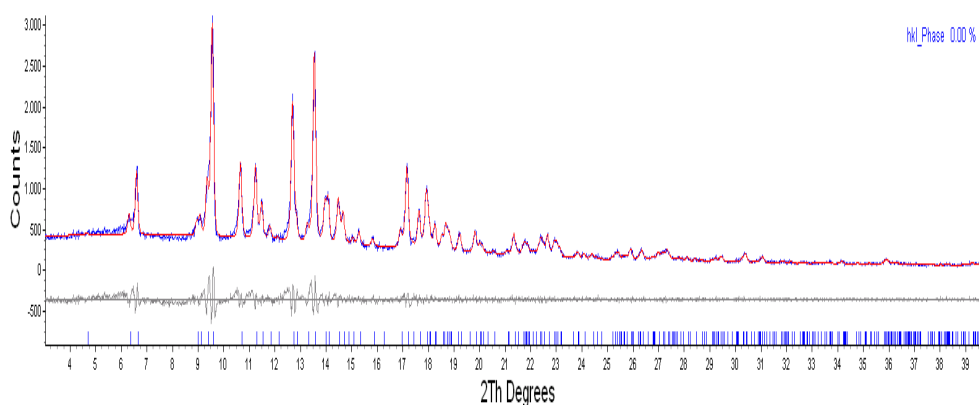


Fig. 3.3: Affinamento dell'intero profilo di diffrazione (metodo Pawley) del campione *DRtq*: diffrattogrammi sperimentale (blu) e calcolato (rosso), curva differenza (grigia) e posizione delle riflessioni della fase monoclinica della doramectina.

### 3.1.4 Misure DSC

Come studio iniziale del comportamento termico della doramectina sono state eseguite una serie di misure DSC in N<sub>2</sub> secco a differenti velocità di riscaldamento ( $\beta$ ): 20 K/min, 10 K/min, 5 K/min, 2 K/min e 1 K/min. Le curve DSC ottenute alle varie velocità sono riportate in Fig. 3.4; in Fig. 3.5 è riportato unicamente il tracciato DSC ottenuto a 5 K/min per evidenziare meglio anche i più deboli effetti termici presenti.

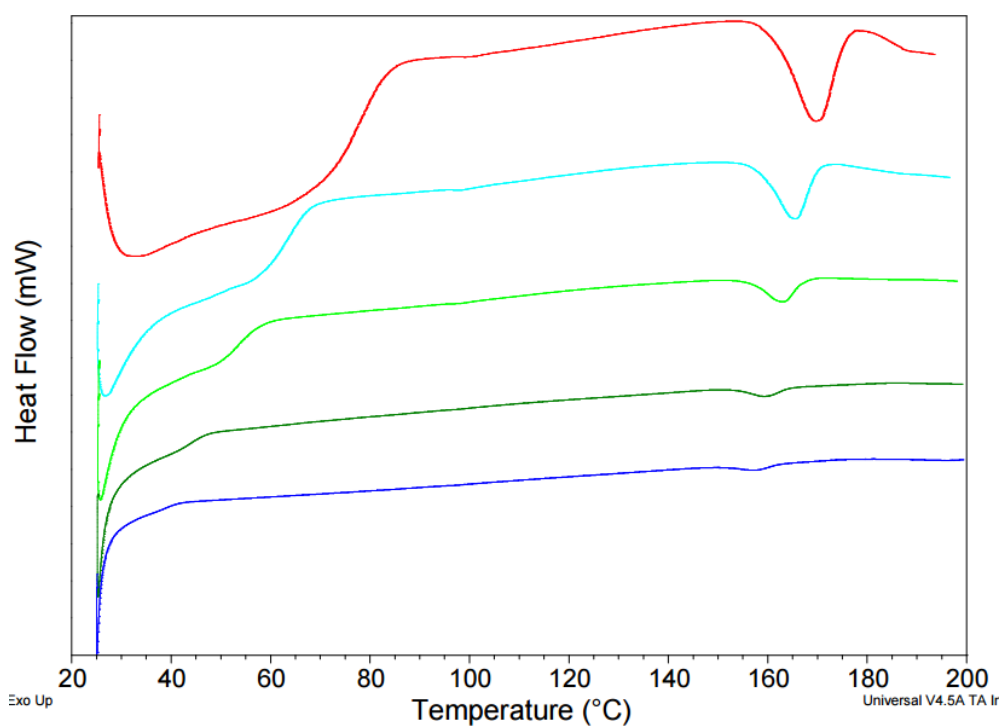


Fig. 3.4: Curve DSC del campione *DRtq* a  $\beta = 20$  K/min (rossa),  $\beta = 10$  K/min (azzurra),  $\beta = 5$  K/min (verde chiaro),  $\beta = 2$  K/min (verde scuro) e  $\beta = 1$  K/min (blu).

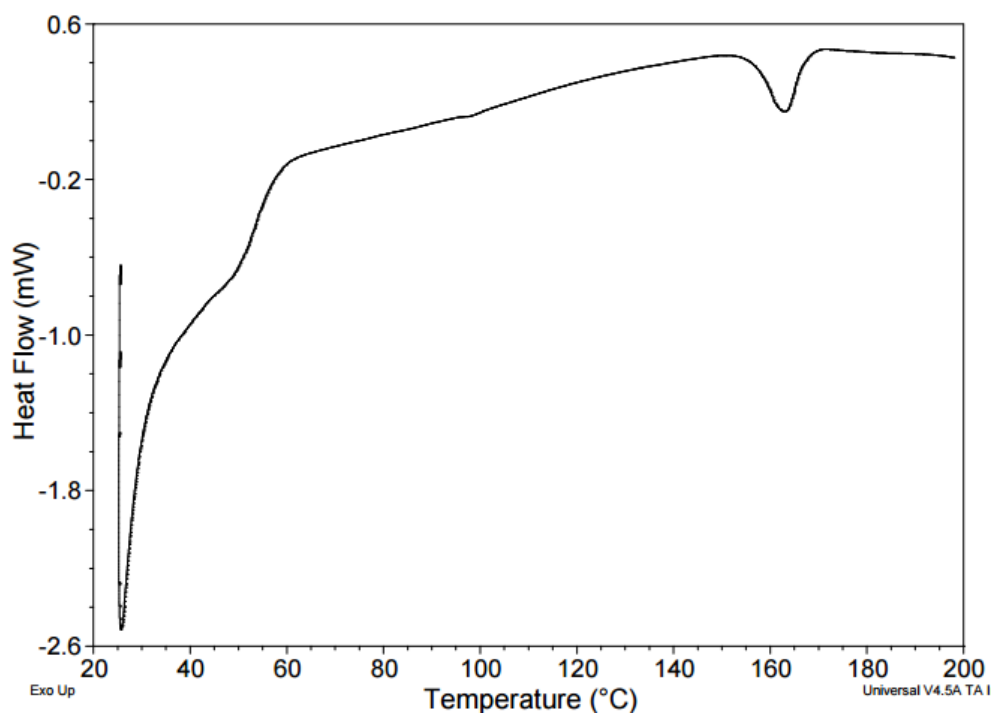


Fig. 3.5: Curva DSC del campione *DRtq* con  $\beta = 5$  K/min.

Si osservano tre eventi termici significativi:

- Un primo evento endotermico (picco I) che si apre a basse temperature, quando ancora la linea di base si sta stabilizzando; al diminuire di  $\beta$  diminuiscono sia la temperatura di onset ( $T_{\text{onset}}$ ) e l'intervallo termico corrispondente, sia il valore di variazione entalpica ( $\Delta H$ ) associato al picco.
- Un secondo evento termico (picco II), accompagnato da variazione entalpica molto bassa, pari a  $0.19 \pm 0.05$  J/g; la sua  $T_{\text{onset}}$ , a differenza degli altri effetti termici presenti, non varia al variare di  $\beta$  ed è pari a  $95.2 \pm 0.6$  °C.
- Un terzo evento endotermico (picco III), che si sposta a basse temperature al diminuire di  $\beta$ ; in particolare, si passa da 161 °C con  $\beta = 20$  K/min a 151 °C con  $\beta = 1$  K/min. Anche il valore di  $\Delta H$  non è costante al variare di  $\beta$ .

Non si osserva, invece, alcun evento termico tra 116 °C e 119 °C, temperature che in alcuni casi i produttori riportano come temperature di fusione della doramectina.<sup>30,31,32</sup>

In Tabella 3.1 sono riportati i valori di  $T_{\text{onset}}$  e di  $\Delta H$  dei diversi picchi presenti in funzione di  $\beta$ .

$\beta$ (K/min)	Picco I		Picco II		Picco III	
	$T_{\text{onset}}$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)	$T_{\text{onset}}$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)	$T_{\text{onset}}$ (°C)	$\Delta H$ (J/g)
<b>20</b>	44(2)	13.4(7)	95.2(8)	0.15(1)	160.9(4)	10.0(9)
<b>10</b>	41.9(6)	8.5(4)	94.4(2)	0.24(1)	158.5(2)	8.7(2)
<b>5</b>	40(1)	4.3(5)	93.9(5)	0.16(2)	157.3(1)	7.9(6)
<b>2</b>	36.0(9)	2(1)	96(1)	0.21(4)	153.5(1)	7.4(6)
<b>1</b>	34(2)	0.4(2)	95(1)	0.20(9)	151.0(3)	8.5(3)

Tab. 3.1:  $T_{\text{onset}}$  e variazione entalpica dei diversi picchi, in funzione di  $\beta$  (valori medi e deviazione standard).

### 3.1.5 Misure TGA

Sul campione *DRtq* sono state eseguite misure TG in N<sub>2</sub> a 20 K/min (Fig. 3.6), 10 K/min (Fig. 3.7), 5 K/min (Fig. 3.8), 2 K/min (Fig. 3.9) e 1 K/min (Fig. 3.10) fino a 200 °C. Di

seguito sono riportate le curve TG, confrontate con le curve DSC eseguite alla stessa  $\beta$ , e le perdite di massa che si verificano nel corso della misura.

Si osserva che:

- Il campione inizia subito a perdere massa, appena posto all'interno del forno della TG, prima ancora che l'analisi sia avviata. La perdita di massa durante il riscaldamento è rapida e scarsamente riproducibile, è compresa tra il 2.7% e il 3.0% e il suo valore medio su 11 misure eseguite a differenti velocità è pari a  $2.9 \pm 0.2\%$ . Essa, inoltre, ha termine entro i 60 °C e risulta accoppiata al picco I nella curva DSC la cui origine è attribuita, dunque, all'allontanamento di acqua.
- Non ci sono variazioni di massa intorno a 95 °C, temperatura alla quale si registra il secondo evento termico in DSC. Questa evidenza, unita alla bassa quantità di calore in gioco, fa ipotizzare che l'evento che ha luogo in questo intervallo termico sia una transizione di fase.
- In corrispondenza del picco III si osserva sempre un salto di perdita di massa, seppur di minima entità, il cui valore è pari a  $0.22 \pm 0.07\%$ . Questo fatto fa scartare l'idea che tale picco DSC sia dovuto a semplice fusione, come è invece riportato nella letteratura scientifica<sup>32,34</sup> e sui siti di importanti fornitori di standard.<sup>33,35</sup>  
La diminuzione di massa continua dopo la chiusura del picco DSC ed è tanto più ripida quanto minore è la velocità di riscaldamento.

In Tab. 3.2 sono riportati i valori di  $\Delta m(\%)$  associati al primo ( $\Delta m(\%)_I$ ) e al terzo ( $\Delta m(\%)_{III}$ ) evento DSC in funzione di  $\beta$ .

$\beta$ (K/min)	$\Delta m(\%)_I$	$\Delta m(\%)_{III}$
<b>20</b>	2.8(3)	0.17(1)
<b>10</b>	2.9(3)	0.17(4)
<b>5</b>	2.9(1)	0.28(1)
<b>2</b>	2.8(2)	0.2(1)
<b>1</b>	2.9(2)	0.3(1)

Tab. 3.2: Valori di  $\Delta m(\%)$  associati al primo ( $\Delta m(\%)_I$ ) e al terzo ( $\Delta m(\%)_{III}$ ) evento DSC in funzione di  $\beta$  (valori medi e deviazione standard).

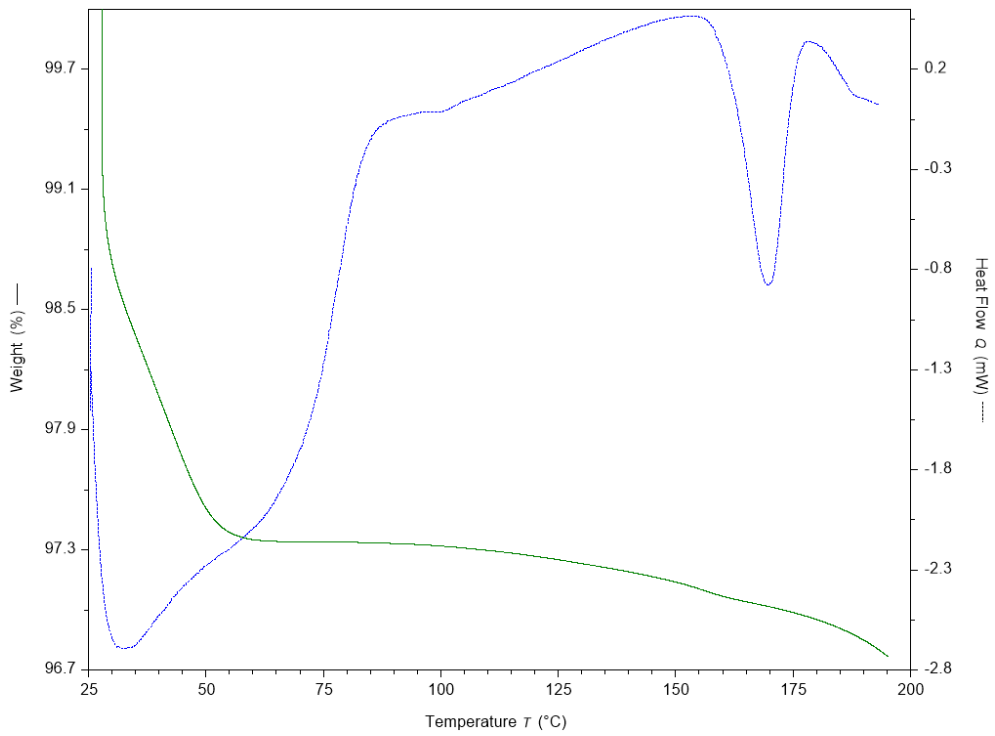


Fig. 3.6: Curve TG e DSC con  $\beta = 20$  K/min del campione *DRtq*.

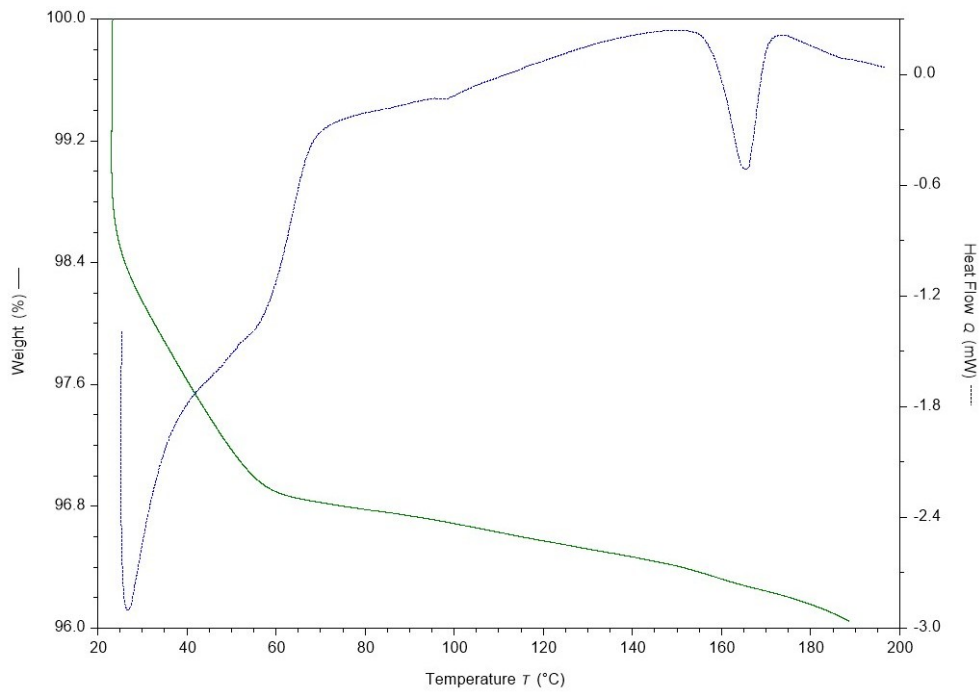


Fig. 3.7: Curve TG e DSC con  $\beta = 10$  K/min del campione *DRtq*.

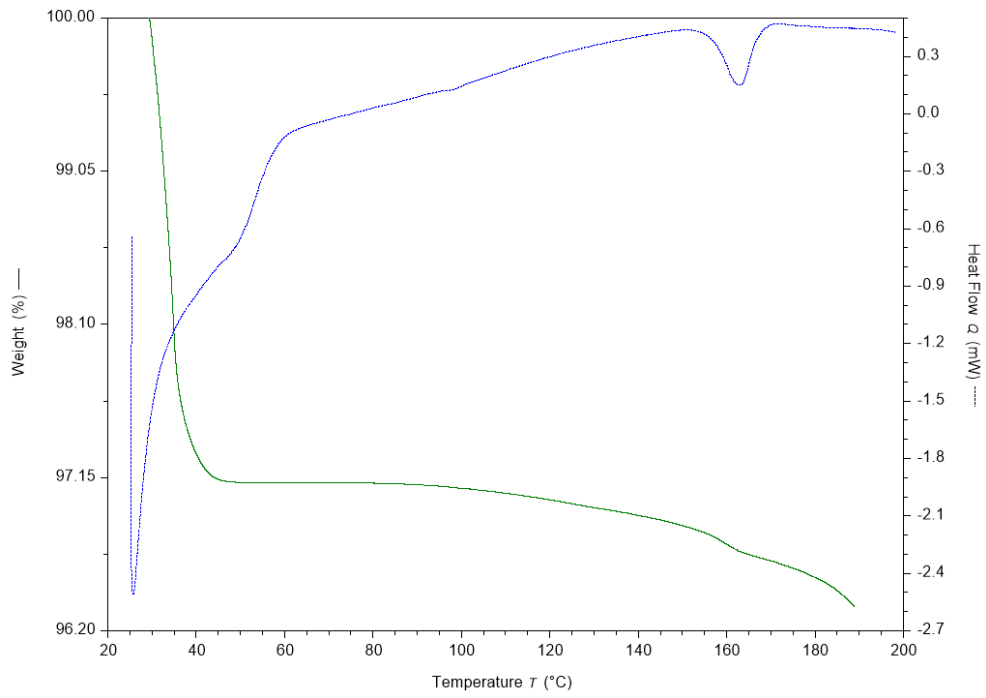


Fig. 3.8: Curve TG e DSC con  $\beta = 5$  K/min del campione *DRtq*.

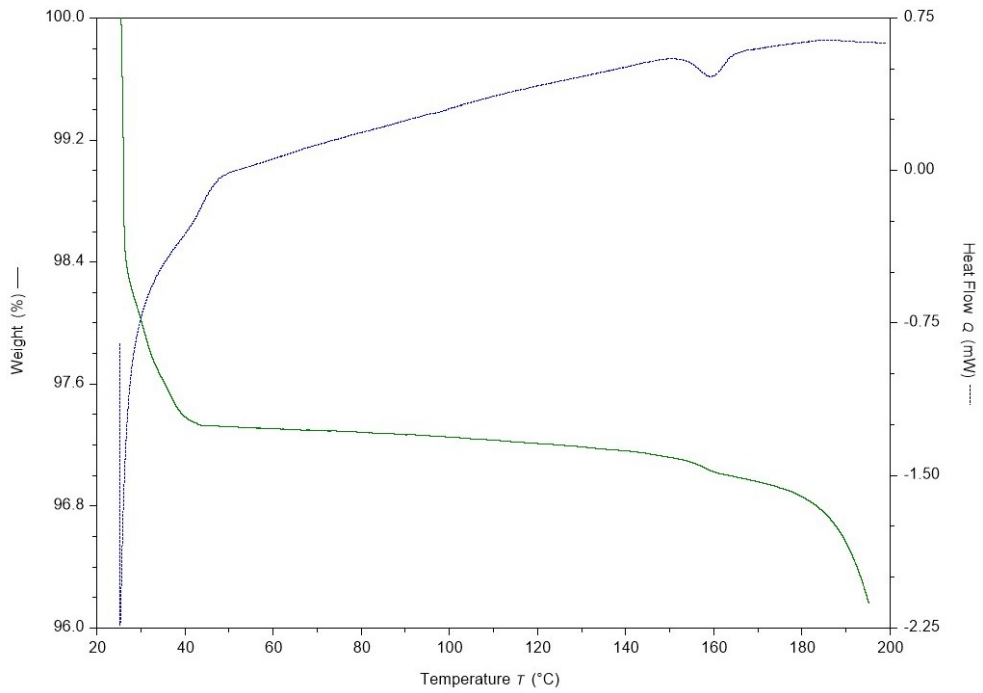


Fig. 3.9: Curve TG e DSC con  $\beta = 2$  K/min del campione *DRtq*.

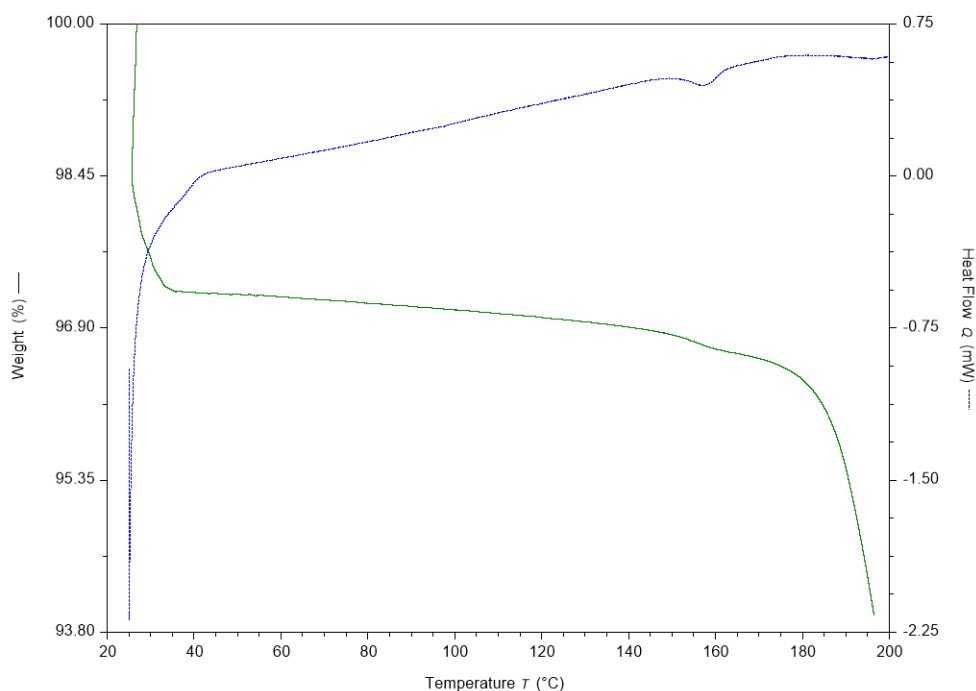


Fig. 3.10: Curve TG e DSC con  $\beta = 1$  K/min del campione *DRtq*.

### 3.1.6 Studio dei singoli eventi termici

Gli eventi termici osservati in DSC sono di seguito analizzati e discussi separatamente nel tentativo di chiarire meglio i processi in corso.

#### 3.1.6.1 Studio del primo evento endotermico (picco I)

##### - Contenuto di acqua e modalità del suo allontanamento

Sono state eseguite una serie di analisi per cercare di approfondire la natura del primo evento termico che, in linea con quanto previsto per un processo di disidratazione, trova una controparte sia nella curva DSC sia in quella TG.

Come detto, il campione inizia a perdere massa appena inserito nel forno: infatti, se lasciato in isoterma a  $T_{amb}$  per 20 minuti sotto flusso di  $N_2$  prima di far partire la rampa di riscaldamento, esso si disidrata totalmente (Fig. 3.11) perdendo il 2.9% del proprio peso; addirittura, dopo soli 5 minuti, la perdita di massa del campione è pari a 2.7%. Questa evidenza, unita alla inevitabile variabilità delle condizioni ambientali e dei tempi di preparazione del campione per la misura, giustifica la scarsa riproducibilità della variazione di massa misurata durante il primo evento su *DRtq*.

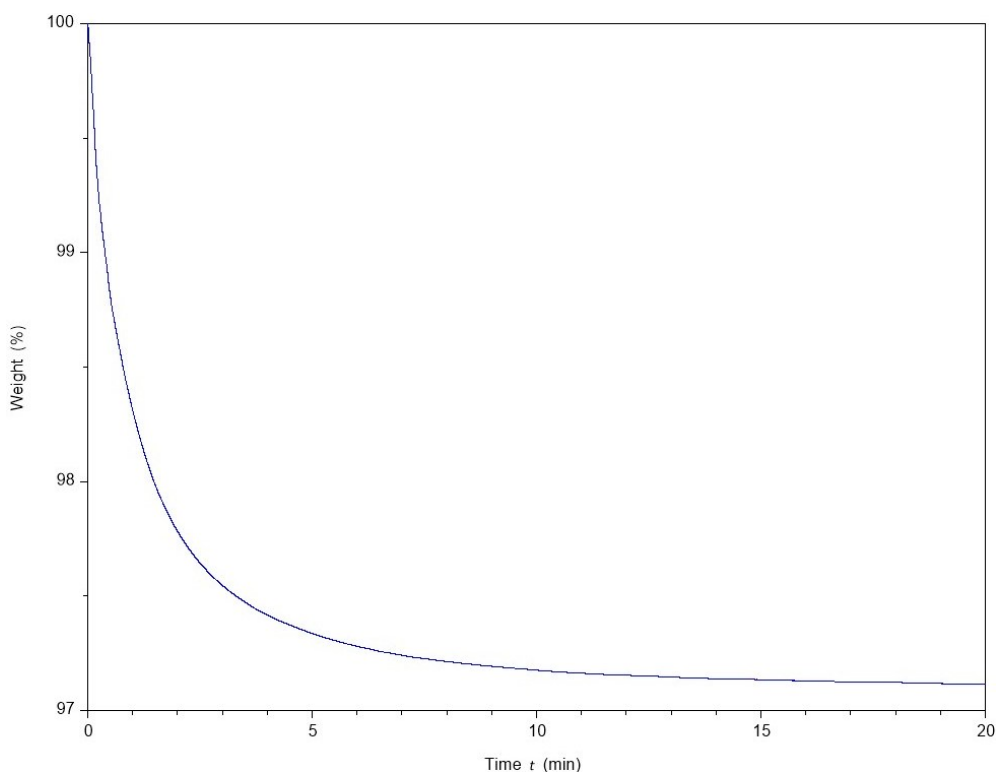


Fig. 3.11: Curva TG di *DRtq* durante lo stadio isoterma di 20 minuti a  $T_{amb}$  sotto flusso di  $N_2$ .

Inoltre, se il campione è equilibrato in ambiente con umidità relativa (UR) del 100%, la variazione di massa misurata nel corso di una misura TG dinamica risulta invariata rispetto a quella del campione originale. Essa non cambia neppure dopo 7 giorni di conservazione a UR 100% e continua a coincidere perfettamente con il valore atteso per la perdita di 1.5 mol di acqua per mole di doramectina.

Prendiamo ora in esame il profilo della curva TG. Le curve TG (Fig 3.6 - 3.10) mostrano che la perdita di massa entro i 60 °C ha luogo con due velocità diverse: nei primi istanti della misura, la curva scende quasi perpendicolarmente e la diminuzione di massa è pari a  $1.7 \pm 0.2\%$ ; successivamente, la pendenza della curva TG diminuisce e la perdita di massa è pari si attesta a  $1.2 \pm 0.2\%$ . La prima diminuzione della massa è compatibile con la perdita di 1 mol di  $H_2O$  (per la quale si attende una perdita pari a 1.96%), mentre la seconda è compatibile con la perdita di 0.5 mol di  $H_2O$  (per la quale la perdita attesa è pari a 0.99%).

Le caratteristiche di queste diminuzioni di massa, in special modo del primo step, fanno pensare che siano dovute alla rimozione di acqua legata molto debolmente.

#### **- Caratteristiche del picco I DSC**

Come anticipato, i valori di  $T_{\text{onset}}$  e di  $\Delta H$  del primo picco DSC diminuiscono al diminuire di  $\beta$ . Il fatto che il picco DSC si chiuda a temperature sempre più basse al diminuire della velocità di riscaldamento è compatibile con un evento dovuto alla perdita di acqua. Per questo campione si osserva, inoltre, una diminuzione di  $\Delta H$  al diminuire di  $\beta$ : a basse  $\beta$  aumenta la quota di acqua persa a basse temperature, quando ancora la linea di base non si è stabilizzata e gli scambi termici, dunque, avvengono sempre più a bassa temperatura e sono quasi assenti nella misura DSC. In questo caso, pertanto, per lo studio della disidratazione lavorare a bassa  $\beta$  è controproducente, perché impedisce di vedere una parte del fenomeno.

Per provare a integrare il picco I in maniera più affidabile, sono state eseguite misure DSC su  $DRtq$  con partenza da  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  e rampa a due differenti  $\beta$  (Fig. 3.12). In questi casi si registra un picco preceduto da una buona linea base e, quindi, facilmente integrabile. Esso si apre a temperature inferiori o uguali a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a seconda della  $\beta$  selezionata, e la variazione entalpica è  $42.7 \pm 0.7\text{ J/g}$ , valore decisamente superiore a quello misurato quando la rampa parte da temperatura ambiente: partendo da bassa temperatura, infatti, si riescono a registrare tutti gli scambi termici che accompagnano la disidratazione del campione.

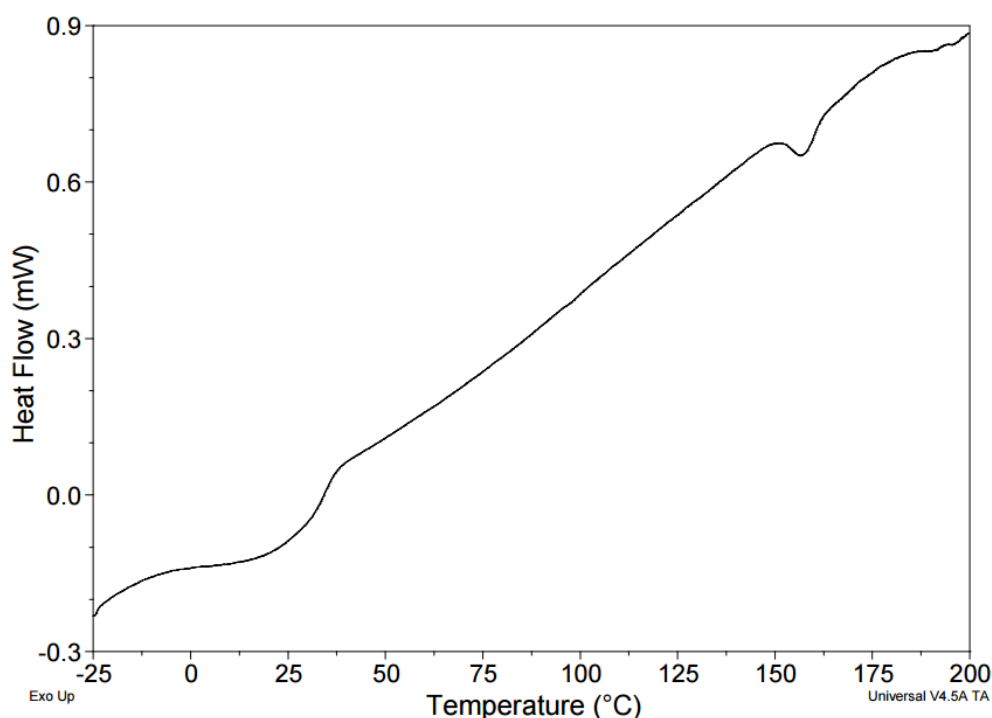


Fig. 3.12: Curva DSC di riscaldamento della *DRtq* da -25 °C a 200 °C con  $\beta = 1$  K/min.

### - Reversibilità del picco I

Al fine di studiare la reversibilità di questo evento, è stata eseguita una misura DSC ciclica, in cui il campione è stato inizialmente riscaldato a 60 °C con  $\beta = 5$  K/min e successivamente raffreddato a 30 °C con  $\beta = 2$  K/min: come previsto, poiché nel forno si ha un flusso di azoto, il picco endotermico attribuito a disidratazione non è reversibile. Se, tuttavia, si esegue lo stesso ciclo ma lasciando equilibrare il campione in aria per un'ora dopo il raffreddamento, il picco endotermico ricompare nel corso del secondo riscaldamento.

È stato effettuato un altro studio sulla reversibilità di questo evento termico, scaldando ripetutamente *DRtq* da  $T_{amb}$  fino a 70 °C (le prime tre volte con  $\beta = 5$  K/min e le altre con  $\beta = 10$  K/min) e raffreddandolo poi fino a -25 °C (con  $\beta = 2$  K/min in tutti i casi); in Fig. 3.13 è mostrata una delle rampe registrate a partire dal secondo riscaldamento. Come si può osservare, la curva DSC presenta sempre un picco di intensità costante; i valori di  $\Delta H$  e di  $T_{onset}$  misurati nei cinque cicli di riscaldamento sono riportati in Tab. 3.3. Misure TG cicliche analoghe a quelle DSC indicano che la massa del campione rimane costante dopo il primo riscaldamento.

Queste evidenze combinate suggeriscono la presenza di un processo di transizione di fase intorno a 0 °C.

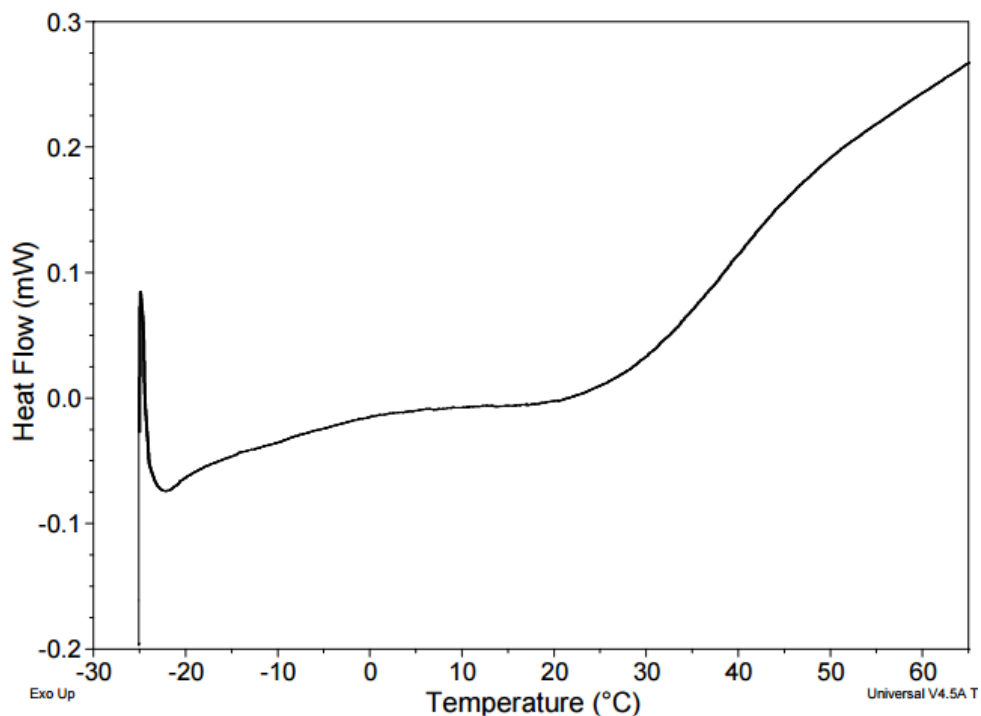


Fig. 3.13: Riscaldamento da -25 °C a 70 °C con  $\beta = 5$  K/min di *DRtq* sottoposto al ciclo per lo studio della reversibilità.

	$\Delta H$ (J/g)	$T_{\text{onset}}$ (°C)
<b>II rampa</b>	9.263	-0.67
<b>III rampa</b>	9.731	-1.19
<b>IV rampa</b>	8.929	2.95
<b>V rampa</b>	8.764	1.61
<b>VI rampa</b>	9.259	2.28
<b>Valori medi (d.s.)</b>	9.2(4)	1(2)

Tab. 3.3: Valori di  $\Delta H$  e di  $T_{\text{onset}}$  delle singole rampe registrati nel ciclo di riscaldamento e raffreddamento da -25 °C a 70 °C.

## - PXRD

Confrontando i pattern PXRD della *DRtg* raccolti a 25 °C e 70 °C (Fig. 3.14) in camera politermica in flusso di N<sub>2</sub>, si osservano la comparsa nel pattern a 70 °C di un picco a circa 4.7° 2θ e qualche altra piccola variazione, come una modifica del segnale intorno a 18° 2θ. Questo pattern è paragonabile a quello del polimorfo B descritto nel Patent di Y. Li<sup>37</sup> e la variazione osservata del suo profilo rispetto al pattern raccolto a 25 °C è dovuta, verosimilmente, ad una minima variazione strutturale conseguente all'allontanamento di acqua, come verrà discusso nel capitolo 3.2.4.

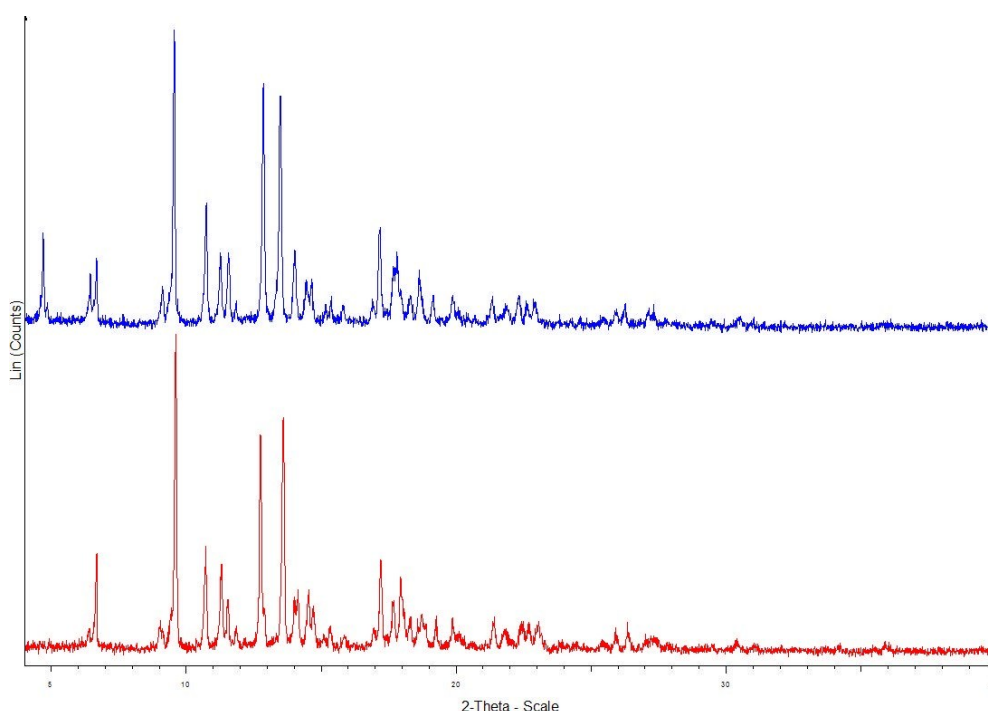


Fig. 3.14: Confronto tra i PXRD della *DRtg* in flusso di N<sub>2</sub> a 25 °C (rosso) e a 70 °C (blu) registrati nella camera politermica.

### 3.1.6.2 Studio del secondo evento endotermico (picco II)

Le misure PXRD confermano l'ipotesi che il picco II osservato in DSC sia dovuto ad una transizione di fase. Il pattern PXRD raccolto nella camera politermica dopo riscaldamento a 120 °C in flusso di N<sub>2</sub>, infatti (Fig. 3.15), mostra significative differenze rispetto al pattern raccolto a 70 °C: si osservano la scomparsa dei picchi tra 14 e 15° 2θ e oltre i 25° 2θ, la variazione dell'intensità dei picchi tra 11 e 12° 2θ e la comparsa di picchi attorno a

12.5° 2θ e tra 15 e 17°2θ. Si può dunque affermare che il riscaldamento di *DRtq* a 120 °C porta alla formazione di un polimorfo non descritto fino a questo momento in letteratura, che nel seguito verrà chiamato polimorfo C.

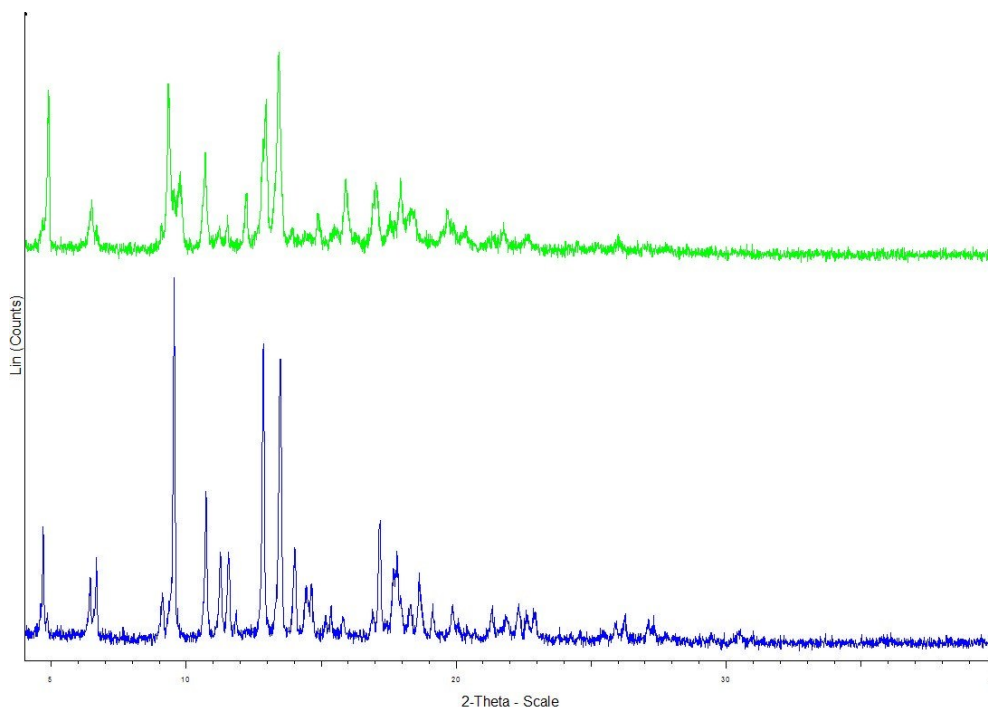


Fig. 3.15: Confronto tra PXRD della *DRtq* in flusso di N<sub>2</sub> a 70 °C (blu) e a 120 °C (verde).

Al fine di valutare la reversibilità di questa transizione, è stata eseguita una misura DSC ciclica riscaldando il campione fino a 120 °C con  $\beta = 5$  K/min, raffreddandolo a 30 °C con  $\beta = 2$  K/min e riscaldandolo nuovamente a 120 °C con  $\beta = 5$  K/min. Durante il raffreddamento si osserva un picco esotermico a  $T_{\text{onset}} = 93.45$  °C e con  $\Delta H = -0.21$  J/g (Fig. 3.16); il picco endotermico ricompare nel secondo riscaldamento a  $T_{\text{onset}} = 93.32$  °C con  $\Delta H = 0.15$  J/g e presenta, dunque, carattere reversibile. Si fa notare che, naturalmente, nel secondo riscaldamento è assente il picco di disidratazione.

Il carattere reversibile della transizione è confermato dalle misure PXRD eseguite in camera politermica (Fig. 3.17).

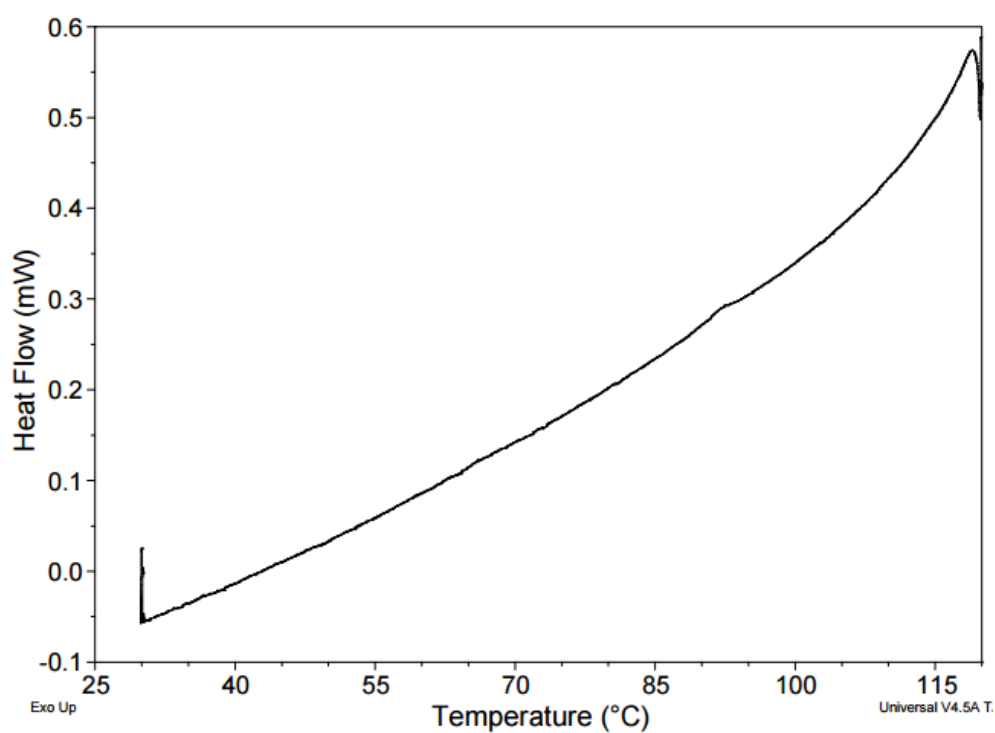


Fig. 3.16: Curva DSC di raffreddamento da 120 °C a 30 °C con  $\beta = 2$  K/min.

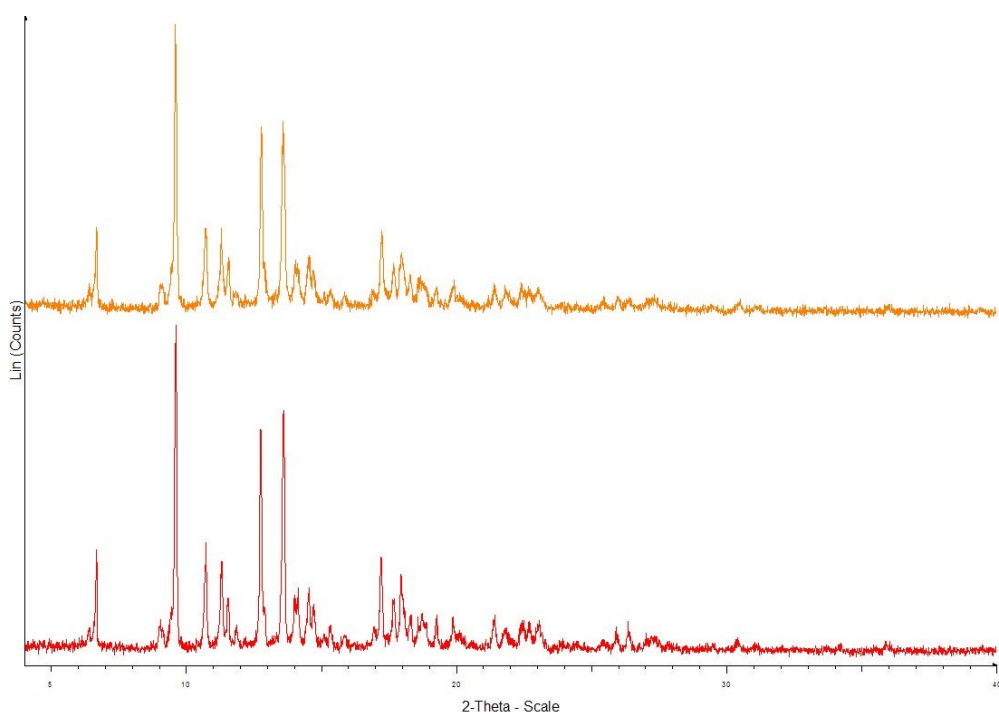


Fig. 3.17: Confronto tra i PXRD a 25 °C della *DRtg* prima (rosso) e dopo (verde) il riscaldamento a 120 °C.

### 3.1.6.3 Studio del terzo evento endotermico (picco III)

Stante quanto appena osservato, il solido che dà luogo al picco III nella curva DSC è rappresentato dal polimorfo C.

Si è visto che le misure DSC e TGA indicano che il terzo effetto termico avviene a temperatura variabile e dipendente da  $\beta$ , con l'acquisizione di una quantità di calore relativamente bassa e con una minima diminuzione di massa: questo comportamento non è assolutamente compatibile con un processo di pura fusione. Di sicuro, invece, ha luogo una decomposizione in concomitanza con una fusione, poiché al termine del processo - ossia a 173 °C - il campione recuperato si presenta come un vetro di colore giallo-arancio (Fig. 3.18).



Fig. 3.18: *DRtq* (sinistra) e *DRtq* dopo riscaldamento fino a 173 °C (destra).

Il fatto che alla base del picco III ci sia un processo di decomposizione è confermato da una misura DSC ciclica con temperatura massima raggiunta nel primo riscaldamento di 173 °C e successivo raffreddamento, la quale rivela un comportamento molto diverso nel corso del secondo riscaldamento. Nella curva DSC della seconda salita, infatti, (Fig. 3.19) scompaiono tutti i segnali caratteristici della *DRtq*, mentre è presente un nuovo picco di intensità bassa ( $\Delta H = 2.186 \text{ J/g}$ ) a  $T_{\text{onset}} = 138.03 \text{ °C}$ .

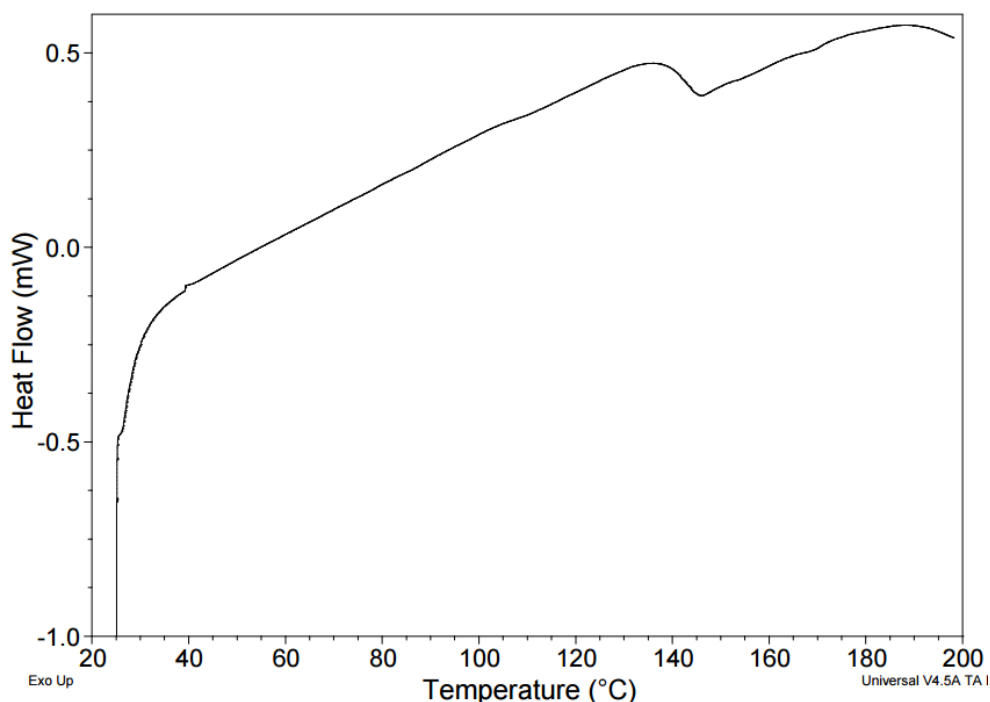


Fig. 3.19: DSC a 5 K/min di *DRTq* dopo riscaldamento a 173 °C e raffreddamento a 30 °C.

Per tentare di comprendere meglio la natura della decomposizione alla quale va incontro la doramectina, sono stati presi in considerazione la perdita di massa e lo spettro FT-IR del campione recuperato dopo il terzo evento termico.

La perdita di massa percentuale in corrispondenza del picco III, come detto, è pari a  $0.23 \pm 0.06\%$ : questo valore è compatibile con la perdita di due atomi di idrogeno.

In Fig. 3.20 A e B è riportato lo spettro FT-IR del campione riscaldato fino a 173 °C, confrontato con quello di *DRTq*; in Tab. 3.4 è riassunta l'attribuzione dei picchi alle vibrazioni dei vari gruppi funzionali presenti nella molecola di doramectina. La differenza principale tra gli spettri raccolti sulla *DRTq* e sul campione recuperato riguarda il picco causato dallo stretching del carbonile dell'estere, che si sposta da  $1735 \text{ cm}^{-1}$  a  $1716 \text{ cm}^{-1}$ ; cambia, inoltre il profilo dei picchi a  $1371 \text{ cm}^{-1}$  (bending C-H), tra  $1184$  e  $1143 \text{ cm}^{-1}$  e intorno a  $1100 \text{ cm}^{-1}$  e scompaiono i picchi a  $1066$  e  $1020 \text{ cm}^{-1}$  attribuibili allo stretching dei legami C-O. Le misure di spettroscopia FT-IR indicano, dunque, che la decomposizione ha ripercussioni importanti sugli assorbimenti del gruppo estereo.

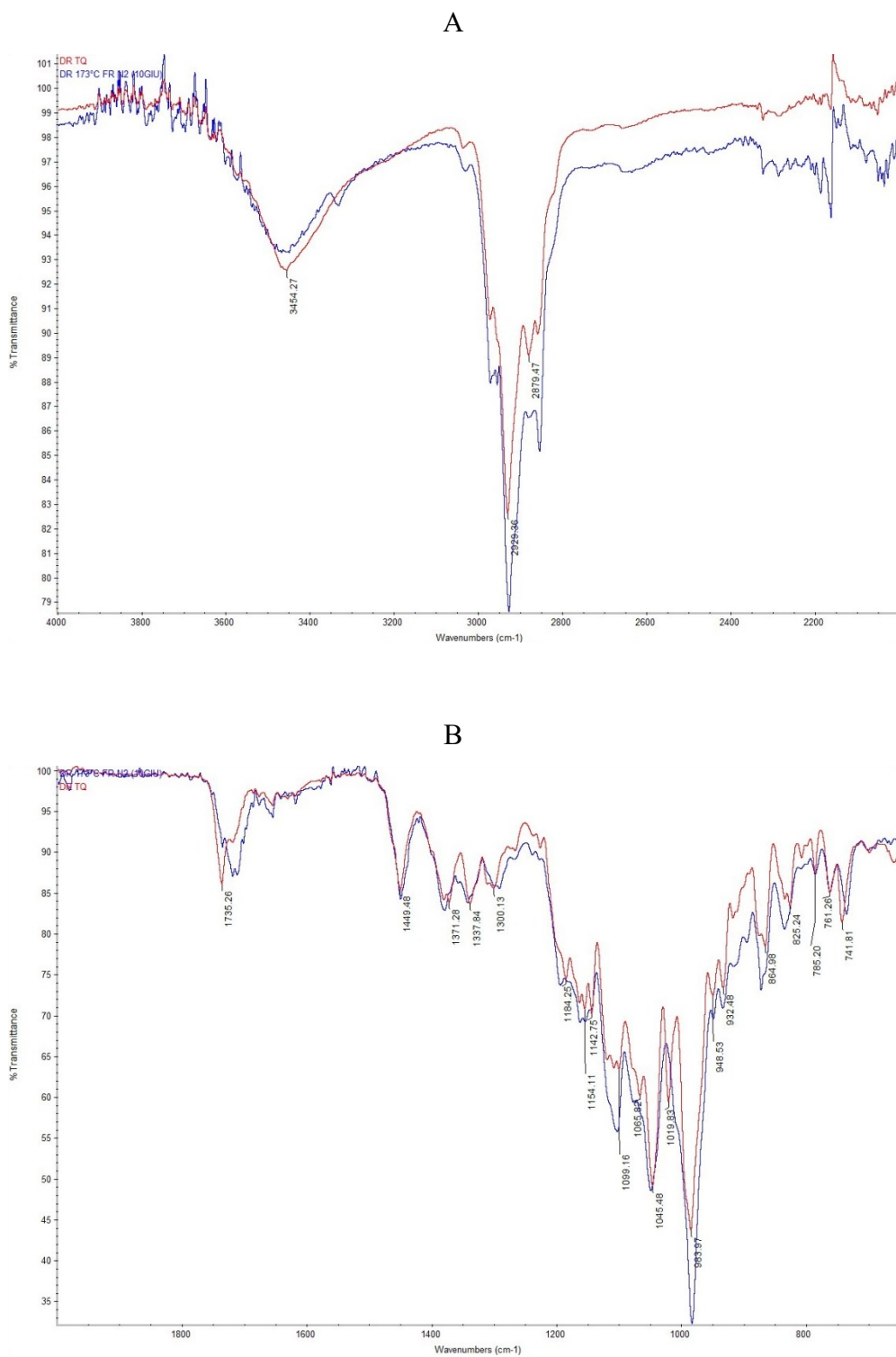


Fig. 3.20: Confronto degli spettri FT-IR di *DRtq* (rosso) e di *DR* riscaldata fino a 173 °C (blu) tra 4000 e 2000  $cm^{-1}$  (A) e tra 2000 e 650  $cm^{-1}$  (B).

<b>Numeri d'onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Vibrazioni</b>
3454.27	Stretching OH
3000-2700	Stretching CH alifatici
1735.26	Stretching C=O estere
1654.27	Stretching C=C
1449.48; 1379.84	Bending CH asimmetrico e simmetrico
1337.84	Bending CH=C nel piano
1184.25	Stretching C-OH terziario
1180-1010	Stretching C-O di etere ed estere
833.48; 825.24	Bending CH=C fuori dal piano
761.26	Bending C=C anello

Tab. 3.4: Attribuzione dei picchi/bande IR registrati nello spettro della *DRtq* alle vibrazioni dei gruppi funzionali presenti nella molecola della doramectina.

### 3.2 DORAMECTINA SOTTOPOSTA A DIFFERENTI TRATTAMENTI

I solidi ottenuti dai diversi metodi di cristallizzazione, ad eccezione del prodotto *DRxxMeOH\_Tol*, non presentano differenze significative rispetto a *DRtq*; nel seguito sono riportate la caratterizzazione di questo solido e una sintesi degli studi eseguiti sugli altri prodotti, nonché i risultati delle misure SC-XRD.

#### 3.2.1 Campione *DRxxMeOH\_Tol*

Il campione *DRxxMeOH\_Tol*, ottenuto dal processo di cristallizzazione a caldo con antisolvente descritto al capitolo 2.2.4, al SEM appare costituito da scaglie con superficie liscia (Fig. 3.21). L'aspetto suggerisce la presenza di un campione amorfo, confermato dal pattern PXRD (Fig 3.22) e dalla curva DSC (Fig 3.23).<sup>1</sup>

Inoltre, in linea con quanto atteso per un solido a più alta energia libera, la misura TG indica che il campione inizia a decomporre ad una temperatura decisamente inferiore rispetto al campione cristallino (Fig. 3.23): a 160 °C il campione ha già perso quasi il 10% in massa.

Lo spettro FT-IR di *DRxxMeOH\_Tol* (Fig. 3.24 A e B) presenta numerose differenze rispetto a quello di *DRtq*; le principali riguardano i picchi/bande compresi nell'intervallo  $1200-800\text{ cm}^{-1}$  e intorno a  $1735\text{ cm}^{-1}$  (stretching C=O estereo).

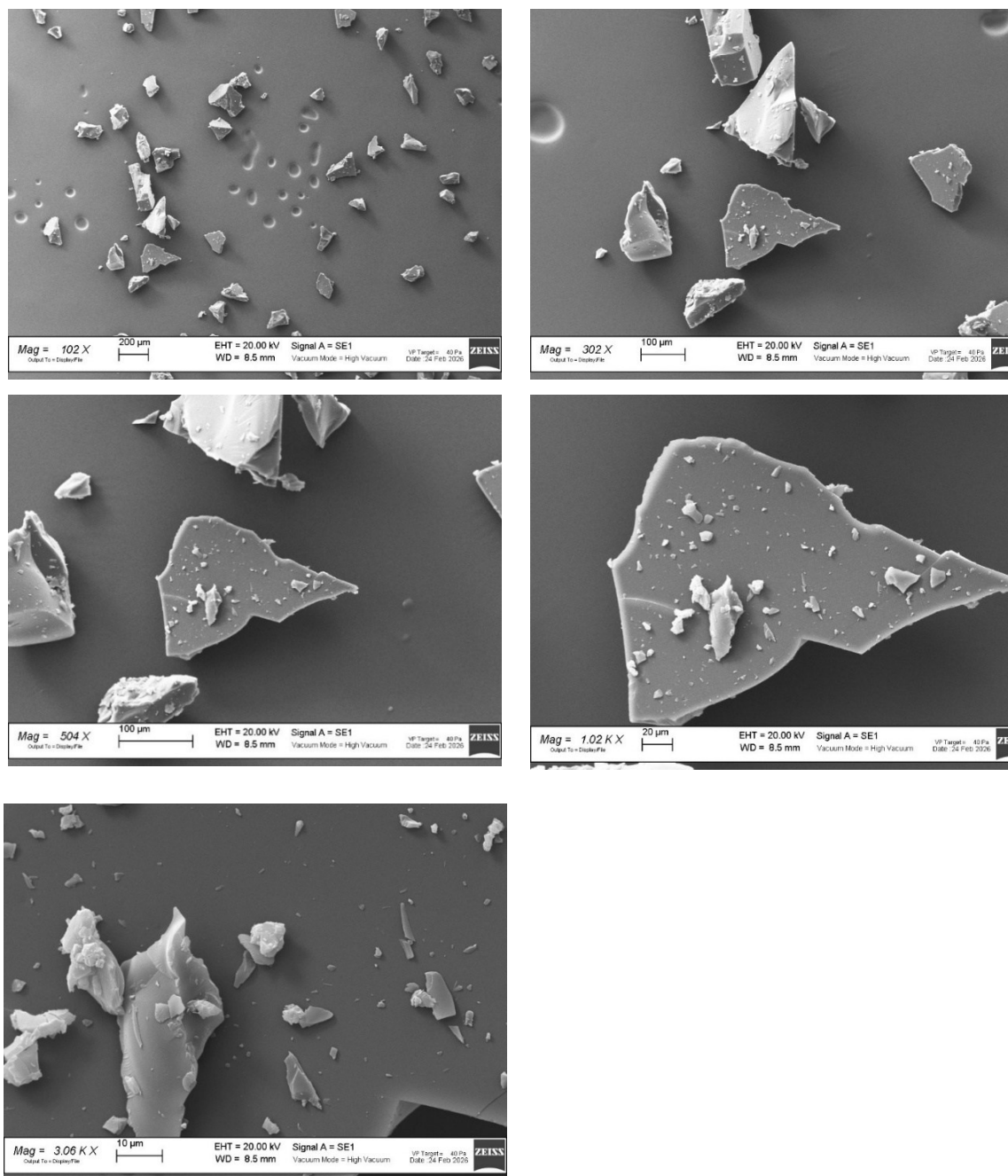


Fig. 3.21: Fotografie SEM di *DRxxMeOH\_Tol* a diversi ingrandimenti.

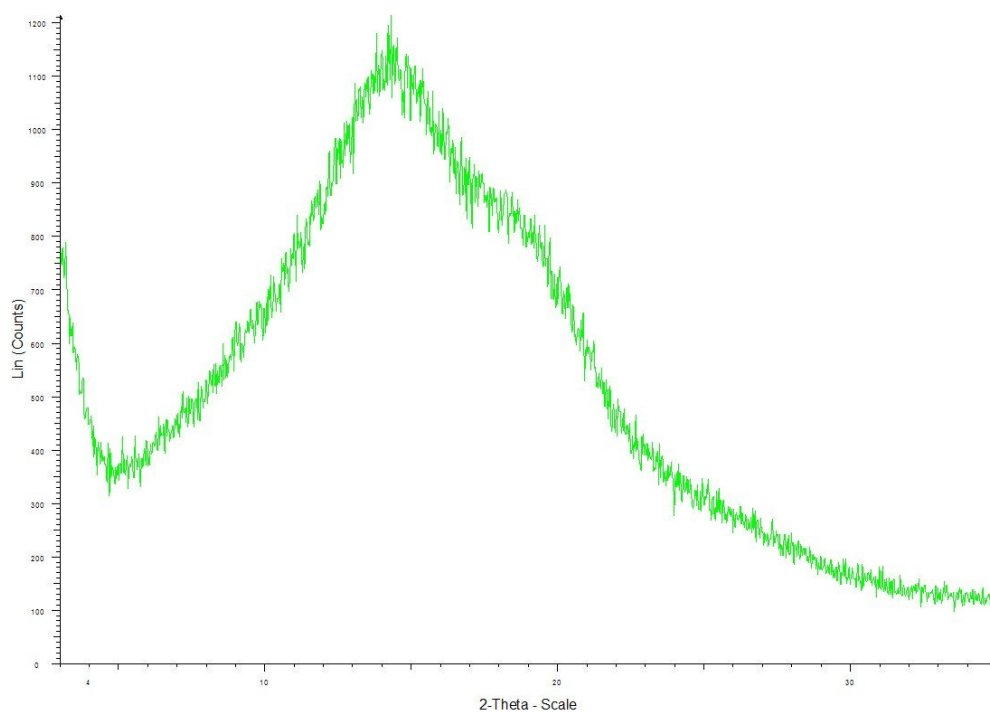


Fig. 3.22: PXRD pattern di *DRxxMeOH\_Tol*.

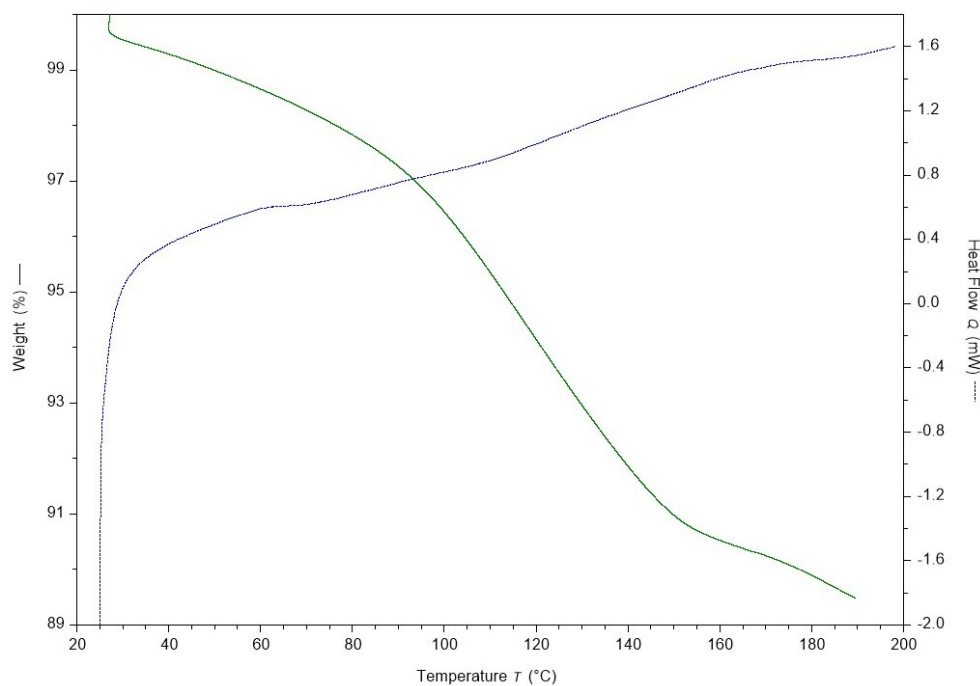
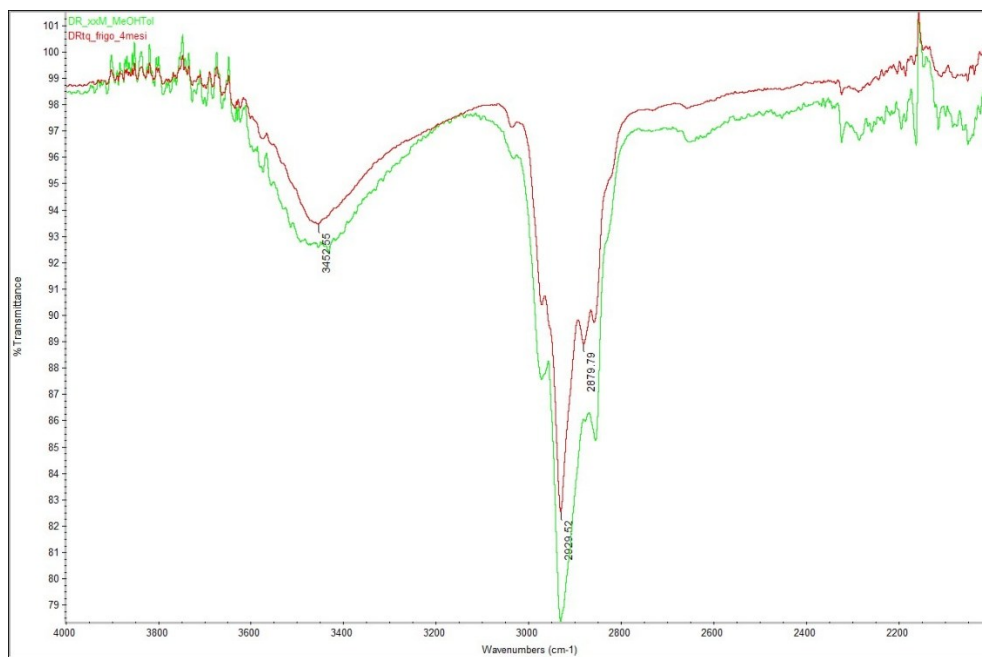


Fig. 3.23: Curve TG e DSC ( $\beta = 5$  K/min) di *DRxxMeOH\_Tol*.

A



B

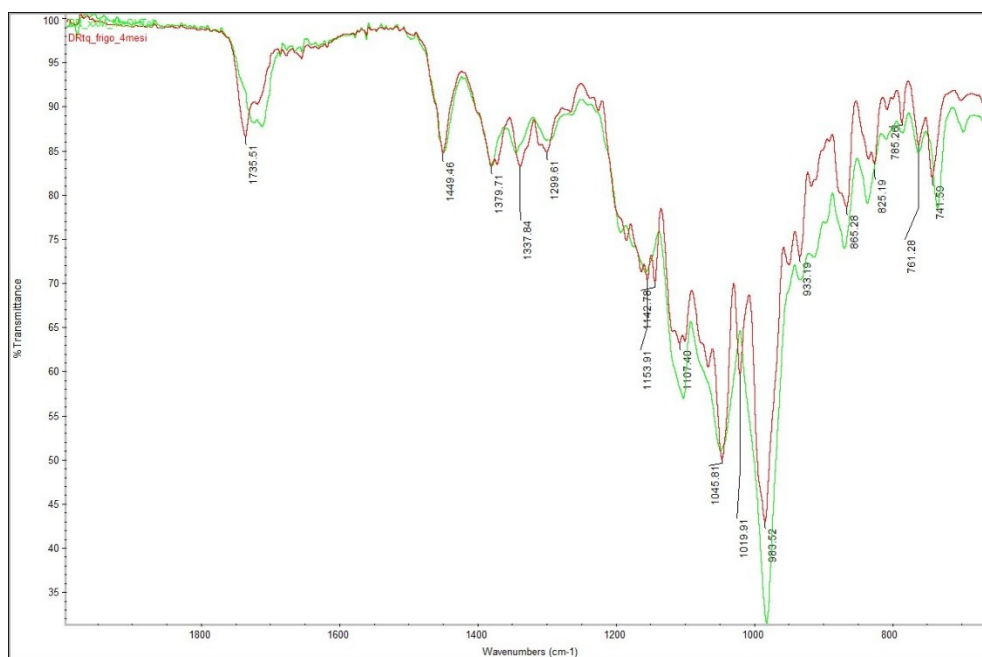


Fig. 3.24: Confronto tra lo spettro FT-IR del campione *DRtq* (rosso) e del campione *DRxxMeOH\_Tol* (verde) tra 4000 e 2000  $\text{cm}^{-1}$  (A) e tra 2000 e 650  $\text{cm}^{-1}$  (B).

### 3.2.2 Campioni *DRxxMeOH\_amb* e *DRxxBrv*

Questi solidi al microscopio elettronico a scansione appaiono costituiti da bastoncini prismatici non più lunghi di 1 mm e di larghezza pari a qualche centinaio di  $\mu\text{m}$  (Fig. 3.25 e Fig. 3.26). Sulla superficie delle particelle sono presenti piccole bolle e numerose fratture, originate verosimilmente dall'allontanamento del solvente dovuto alle condizioni di vuoto dello strumento e al riscaldamento conseguente all'impatto del fascio elettronico sul campione. Questo aspetto è particolarmente evidente nel campione *DRxxBrv*.

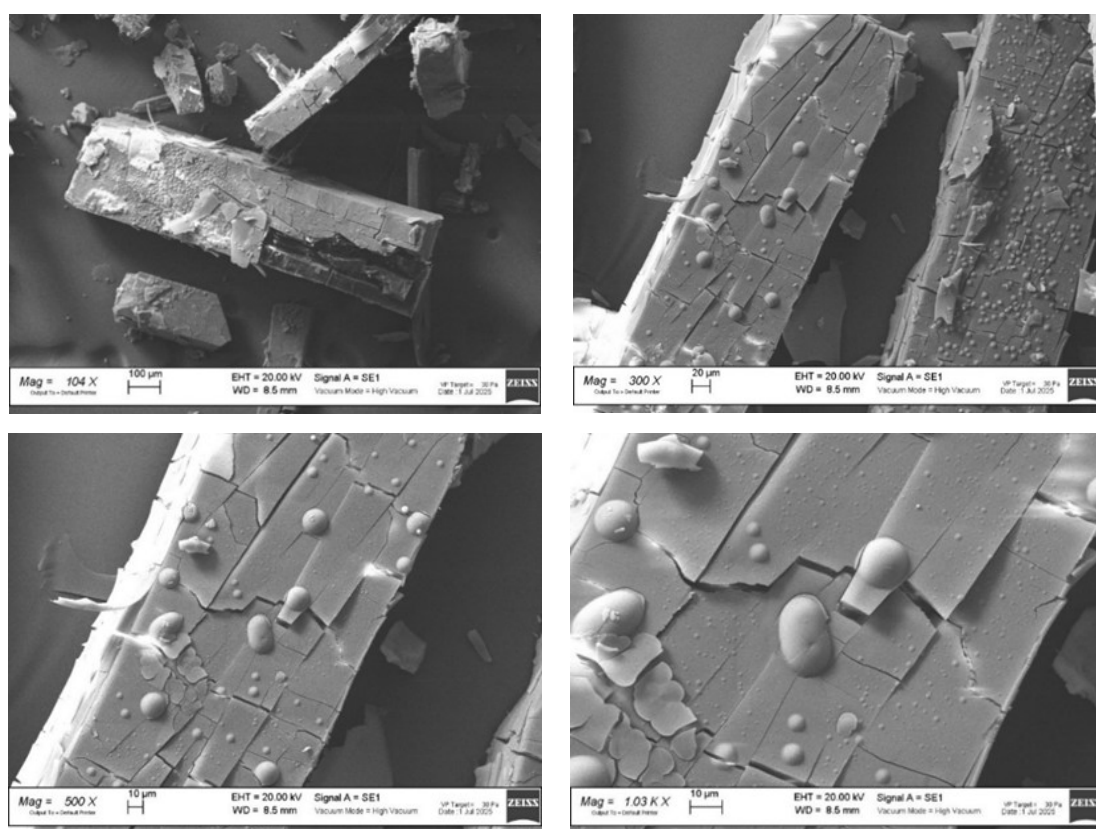


Fig. 3.25: Fotografie SEM di *DRxxAmb\_MeOH* a diversi ingrandimenti.

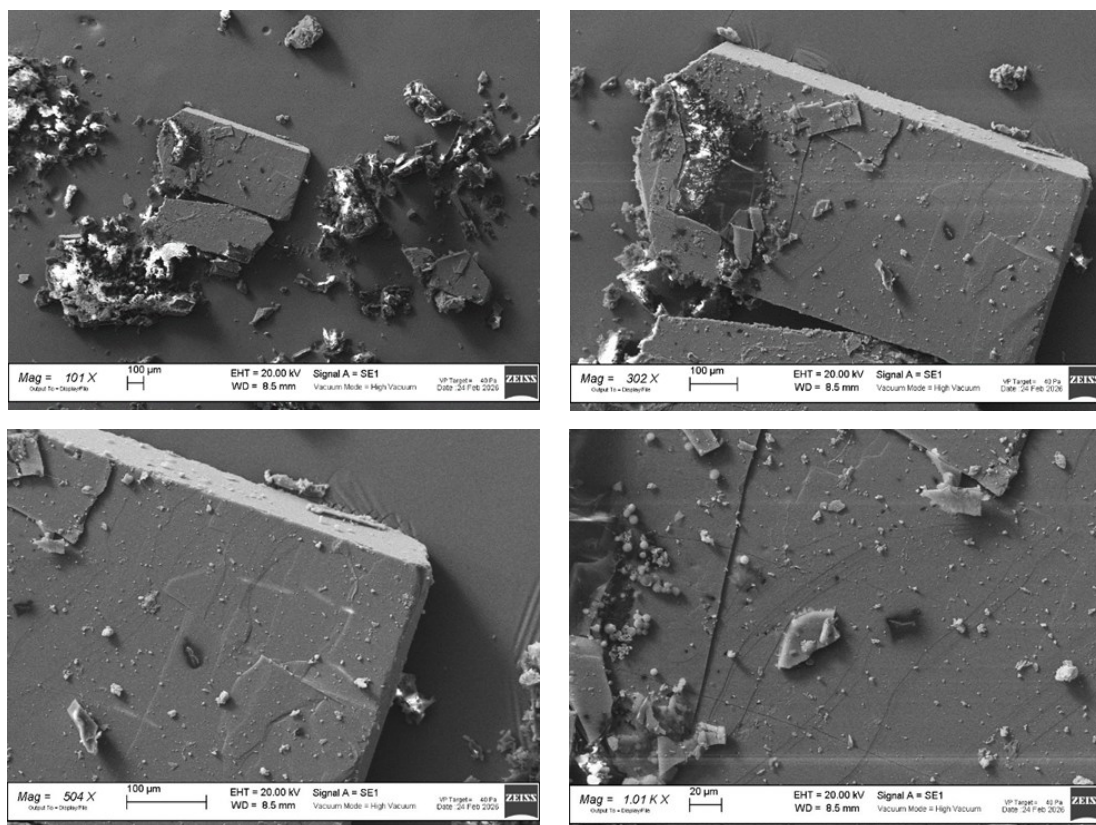


Fig. 3.26: Fotografie SEM di *DRxxBrv* a diversi ingrandimenti.

Le curve TG e DSC, gli spettri FT-IR e i pattern raccolti da questi solidi sono praticamente sovrapponibili a quelli raccolti dal campione di *DRtq* e, pertanto, non sono riportati.

Le dimensioni dei cristalli di questi prodotti sono sufficientemente grandi da essere sottoposti ad analisi SC-XRD.

### 3.2.3 Misure SC-XRD su *DRxxBrv*

Le misure SC-XRD indicano che il campione cristallizza nel gruppo spaziale monoclinico C2, con una molecola di doramectina nell'unità asimmetrica. Nelle strutture, sono visibili quattro picchi aggiuntivi di densità elettronica posti a circa la distanza del legame a idrogeno dai gruppi ossidrilici e tra loro (da 2,7 a 2,8 Å, Fig. 3.27), suggerendo la presenza di molecole di acqua di cristallizzazione. Tuttavia, la densità elettronica in questi punti è inferiore a quella prevista per la piena occupazione e, di conseguenza, ciascuna è stata assegnata a una variabile libera. Gli ossigeni che identificano i siti cristallografici che ospitano le molecole di acqua sono indicati con le sigle O1, O2, O3 e O4.

Diversi cristalli hanno mostrato celle unitarie leggermente diverse e un diverso contenuto d'acqua (tra 1,5 e 1,7 per unità asimmetrica), suggerendo che il cristallo sia un idrato non-stechiometrico. Infatti, lungo l'asse *a* le molecole del farmaco si impaccano tra loro, separate da uno strato d'acqua che non trova alcun impedimento sterico che ne ostacoli l'uscita dalla struttura (Fig. 3.28).

La formula della molecola diventa quindi  $C_{50}H_{77.09}O_{15.55}$ . La struttura è monoclinica con gruppo spaziale  $C2$ ,  $a = 39.1404 \text{ \AA}$ ,  $b = 9.9239 \text{ \AA}$ ,  $c = 14.5837 \text{ \AA}$ ,  $\beta = 108.138^\circ$ ,  $Z = 4$ ; i dati di cella ottenuti per il campione ricristallizzato coincidono con quelli riportati da C.J. Dutton.<sup>36</sup> La differenza principale tra le due strutture risiede nel fatto che, mentre nella cella strutturale riportata in letteratura sono presenti metanolo e acqua, nel cristallo qui ottenuto sono presenti 1.6 molecole di acqua. Il fatto che i dati di cella corrispondano indica che le molecole di solvente non dovrebbero partecipare attivamente alla determinazione della struttura cristallina.

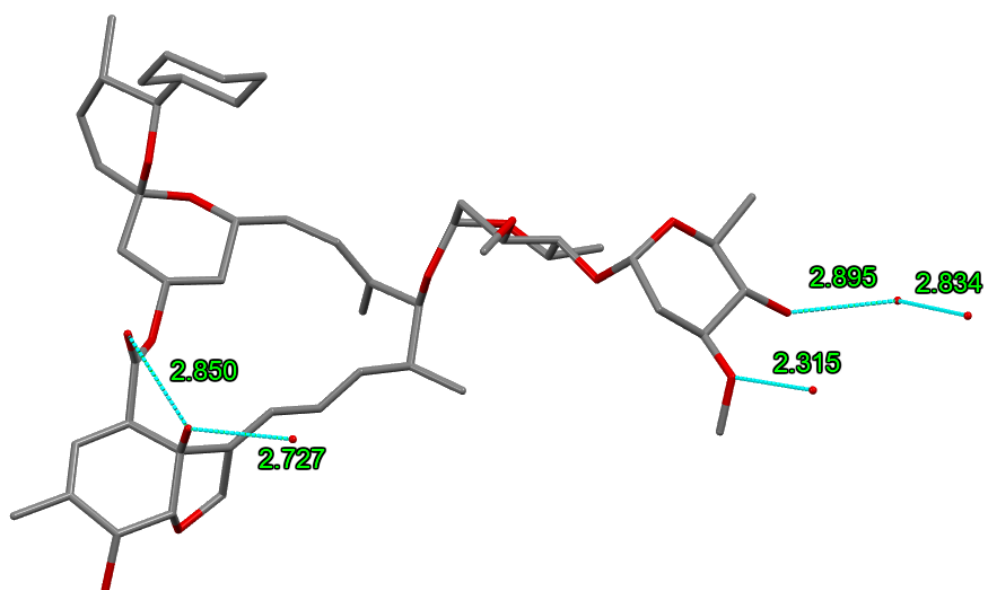


Fig. 3.27: Unità asimmetrica di *DRxxBrv*.

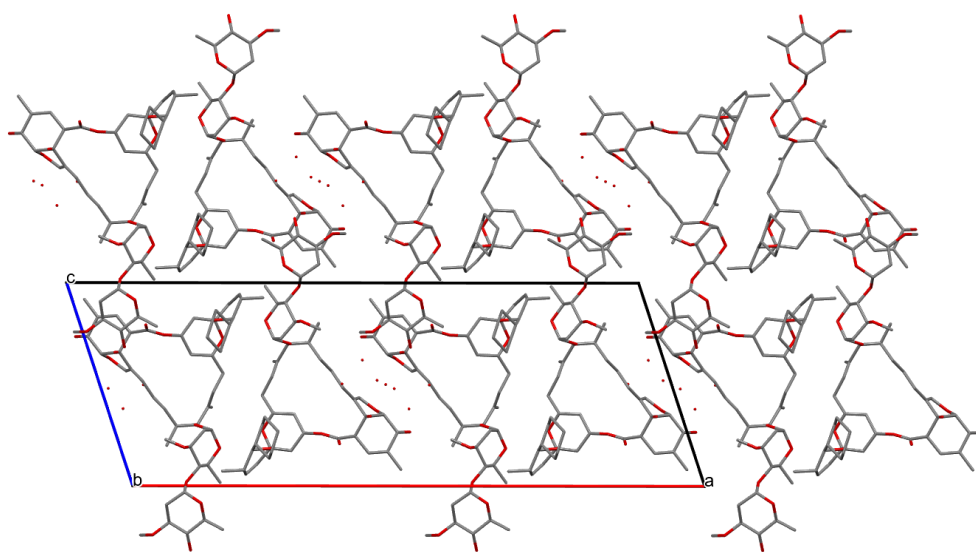
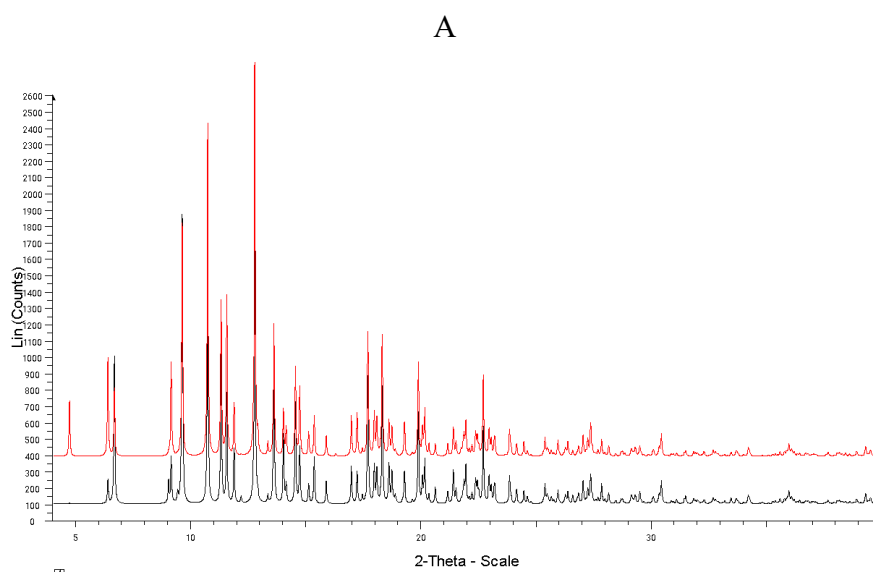


Fig. 3.28: Rappresentazione del packing cristallino di *DRxxBrv* lungo l'asse cristallografico *a*; idrogeni non mostrati per chiarezza, legami ad H rappresentati in linee tratteggiate azzurre.

### 3.2.4 Struttura della forma idrata e della forma anidra

Sulla base dei lati di cella ottenuti dall'affinamento dell'intero profilo di diffrazione del campione *DRtq* (vedi capitolo 3.1.3) e della struttura ottenuta sul campione *DRxxBrv*, si è calcolato il diffrattogramma della struttura idrata e quello della forma anidra; il confronto è mostrato in Fig. 3.29.



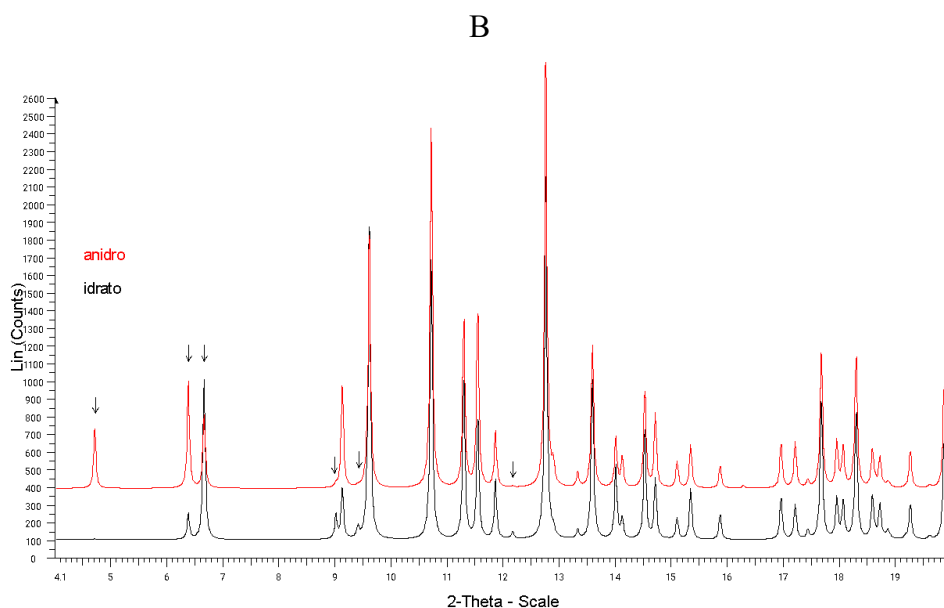


Fig. 3.29: Diffratogrammi calcolati per la forma idrata (nero) e per quella anidra (rosso) nell'intero intervallo angolare (A) e nell'intervallo 4 - 20° 2θ (B).

Si può osservare come l'assenza delle molecole di acqua influenzi l'intensità di alcune riflessioni, indicate dalle frecce in Fig. 3.30: l'andamento delle intensità dei picchi a circa 4.7°, 6.37°, 6.65°, 9.0°, 9.4° e 12.2° 2θ è in accordo con le variazioni di intensità osservate sperimentalmente nei diffratogrammi del campione *DRtq* a 25 °C e 70 °C (Fig. 3.14). La struttura idrata ottenuta corrisponde, pertanto, al diffratogramma raccolto a 25 °C, ma occorre rimuovere l'acqua per ottenere il diffratogramma osservato a 70 °C in cui compare il picco caratteristico a 4.7° 2θ.

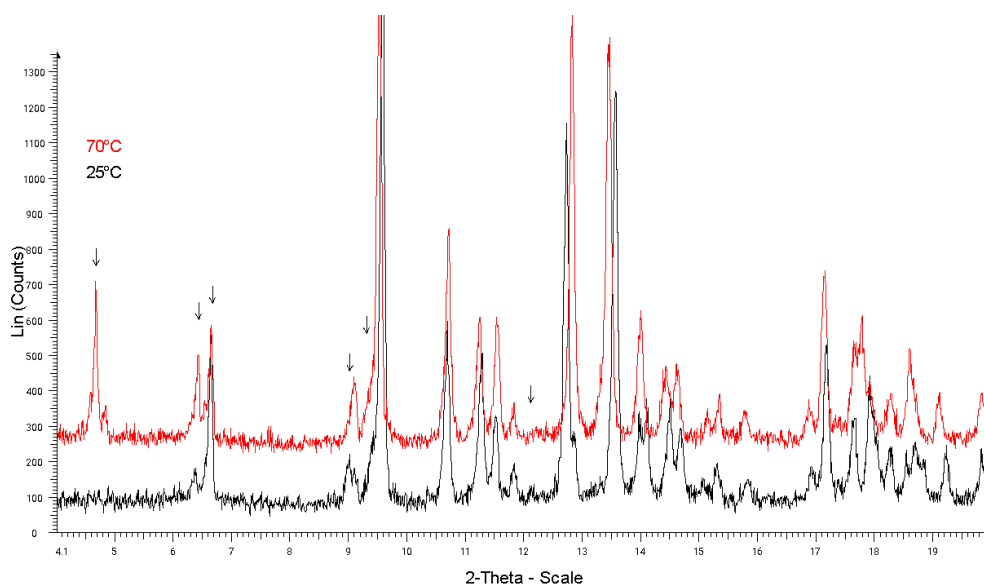


Fig. 3.30: Diffrattogrammi di *DRtq* a 25 °C (rosso) e a 70 °C (nero). Le frecce indicano i picchi che presentano intensità diverse a seconda che la forma sia idrata oppure anidra.

Dai risultati sin qui ottenuti emerge una discordanza dovuta al fatto che, se da un lato la presenza di molecole di acqua nella doramectina non risulta determinante per l'esistenza della cella cristallina, dall'altro la forma anidra si differenzia in modo significativo dalla forma idrata principalmente per la presenza nella forma anidra del picco a  $4.7^\circ 2\theta$ ; sebbene la presenza di questo picco sia prevista anche nella struttura idrata, esso presenta un'intensità trascurabile, tanto da confondersi nel rumore di fondo del pattern. D'altra parte, l'intensità di un picco è strettamente legata al tipo di elemento che risiede sul sito e alla sua occupanza ed è lecito, pertanto, aspettarsi che l'intensità possa variare nel momento in cui gli atomi di quel sito vengono rimossi.

Può essere interessante studiare l'influenza del numero di molecole di acqua sull'intensità del picco a  $4.7^\circ 2\theta$ , al fine di individuare quale molecola di acqua, se rimossa, determini la maggior variazione di intensità del picco. In particolare, sono stati calcolati i diffrattogrammi togliendo di volta in volta, da posizioni diverse all'interno della cella cristallina della doramectina, tre molecole d'acqua (Fig. 3.31), oppure una sola molecola (Fig. 3.32), sulle quattro presenti. I risultati ottenuti da queste simulazioni confermano la dipendenza dell'intensità del picco a  $4.7^\circ 2\theta$  dal contenuto di acqua, ma non permettono

di individuare quale molecola di acqua, se rimossa, determini la variazione maggiore di intensità del picco.

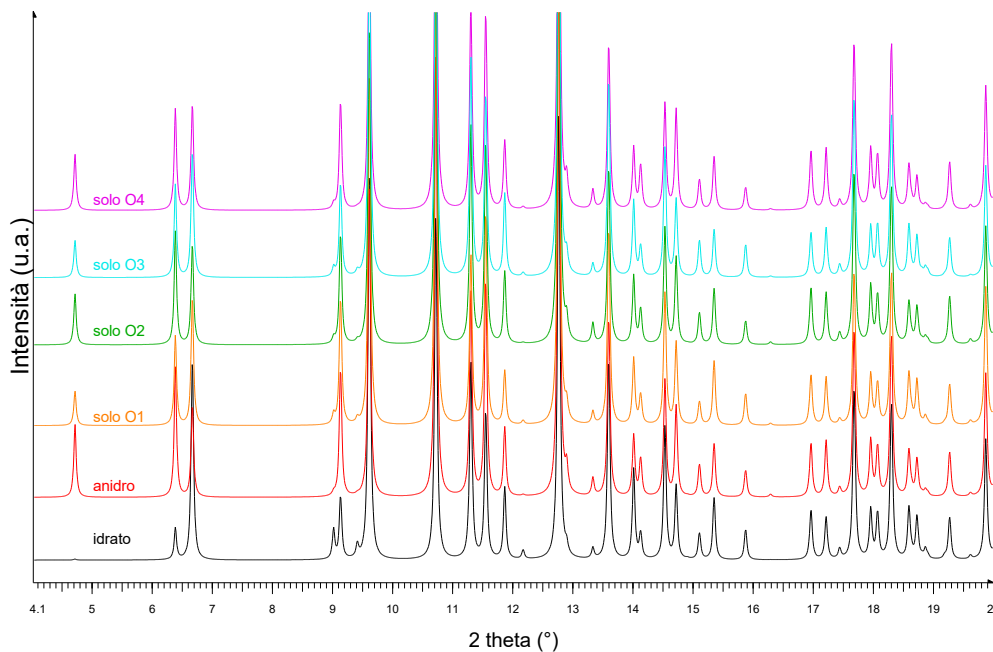


Fig. 3.31: Diffratogrammi calcolati lasciando le molecole d'acqua di un solo sito. I diffratogrammi calcolati della forma anidra e idrata sono riportati per confronto.

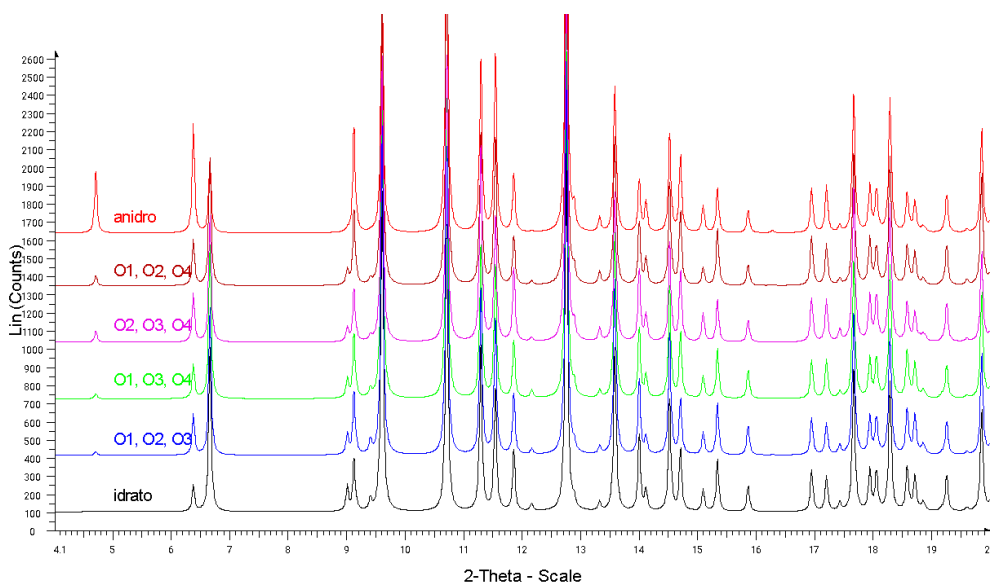


Fig. 3.32: Diffratogrammi calcolati lasciando le molecole d'acqua di tre siti su quattro. I diffratogrammi della forma anidra e idrata sono riportati per confronto.

#### 4. CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi sono state raccolte informazioni importanti per acquisire una conoscenza approfondita dello stato solido della doramectina; esse chiariscono molti aspetti non ancora indagati di questo composto e correggono le informazioni riportate nella letteratura scientifica.

Si è osservato, anzitutto, che il comportamento termico di questo principio attivo non corrisponde a quello descritto in letteratura e nei siti internet dei vari produttori. Diversamente da quanto si può leggere, infatti, non si osserva alcun evento termico tra 116 e 119 °C<sup>30,31,32</sup> e l'evento endotermico che ha luogo intorno a 157 °C è da attribuire a un doppio processo di fusione/decomposizione; non si tratta, quindi, di pura fusione come riportato.<sup>33,34</sup> Sono stati misurati, inoltre, eventi termici non riportati in letteratura: a basse temperature, perdita di acqua di idratazione e transizione al corrispondente desolvato isomorfo; a 95 °C, una transizione di fase reversibile che porta alla formazione di un nuovo polimorfo, indicato in questo lavoro come polimorfo C; una transizione di fase reversibile intorno a 0 °C.

Un altro aspetto fondamentale emerso nel lavoro di tesi, per nulla indagato in letteratura, è la forte tendenza all'assorbimento di acqua da parte della doramectina: a temperatura ambiente, in tempi rapidi, vengono assorbite 1.5 mol di acqua, corrispondente alla quantità massima assorbibile anche a seguito di condizionamento a umidità relativa pari al 100%. Tuttavia, i legami a idrogeno che la doramectina forma con l'acqua sono molto deboli e causano una sua rapida espulsione per riscaldamento o per esposizione a flusso di N<sub>2</sub>. L'acqua è assorbita tra gli strati molecolari del principio attivo, andando a formare un idrato non stechiometrico e la sua presenza non influenza la struttura cristallina della doramectina, ma determina la variazione dell'intensità dei picchi nei pattern PXRD; in particolare, l'intensità del picco a 4.7° 2θ diminuisce al crescere della quantità di acqua presente.

Infine, i numerosi tentativi intrapresi per ottenere nuovi polimorfi mediante ricristallizzazione non hanno portato alla formazione di altre forme solide, se non di una

forma amorfa; neppure la procedura descritta nel brevetto di Y. Li et al.<sup>37</sup> ha consentito l'ottenimento di quello indicato come polimorfo B dagli autori. Alla luce delle osservazioni raccolte dalle misure di diffrazione sulla doramectina idrata e anidra, è invece ragionevole supporre che i polimorfi A e B riportati nel brevetto corrispondano in realtà alla stessa forma cristallina con un diverso contenuto di acqua.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. A. Paudel, J. Meeus, G. Van den Mooter, *Structural Characterization of Amorphous Solid Dispersions*, Advances in Delivery Science and Technology, Amorphous Solid Dispersions, 2014, 421-485.
2. R.A. Bellantone, *Fundamentals of Amorphous Systems: Thermodynamic Aspects*, Advances in Delivery Science and Technology, Amorphous Solid Dispersions, 2014, 3-35.
3. G. Herzer, *Modern soft magnets: Amorphous and nanocrystalline materials*, Acta materialia, 2013, 61, 713-738.
4. G. Bruni, F. Pardi, D. Capsoni, V. Berbenni, M. Bini, G. Valle, C. Milanese, A. Girella, A. Marini, *Febantel: looking for new polymorphs*, J Therm Anal Calorim, 2017, 130, 1605–1612.
5. S. Ge, M. Fu, Z. Cai, D. Gu, Y. Ma, H. Wang, M. Ge, Y. Wang, *Study of the Polymorphic Transformation Mechanism and Crystal Habits Control of Peramivir from Dihydrate to Trihydrate*, Cryst. Growth Des., 2024, 24, 7936–7947.
6. J. Halebian, W. McCrone, *Pharmaceutical Applications of Polymorphism*, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1965, 58, 911-1042.
7. A.Y. Lee, D. Erdemir, A.S. Myerson, *Crystal polymorphism in chemical process development*, Annu Rev Chem Biomol Eng. 2011, 2, 259-80.
8. R. Thakuria, T.S. Thakur, *Crystal Polymorphism in Pharmaceutical Science*, Comprehensive Supramolecular Chemistry, 2017, 5, 283–309.
9. E. Pindelska, A. Sokal, W. Kolodziejski, *Pharmaceutical cocrystals, salts and polymorphs: Advanced characterization techniques*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2017, 117, 111–146.
10. C. Yao, S. Zhang, L. Wang, X. Tao, *Recent Advances in Polymorph Discovery Methods of Organic Crystals*, Cryst. Growth Des. 2023, 23, 637–654.
11. S.A. Kulkarni, E.S. McGarrity, H. Meekesc, J.H. ter Horsta, *Isonicotinamide self-association: the link between solvent and polymorph nucleation*, Chem. Commun., 2012, 48, 4983–4985.

12. G. Bruni, I. Ghione, V. Berbenni, A. Cardini, D. Capsoni, A. Girella, C. Milanese, A. Marini *The Physico-Chemical Properties of Glipizide: New Findings*, *Molecules*, 2021, 26, 3142.
13. M.M. de Villiers, R.J. Terblanche, W. Liebenberg, E. Swanepoel, T.G. Dekker, M. Song, *Variable-temperature X-ray powder diffraction analysis of the crystal transformation of the pharmaceutically preferred polymorph C of mebendazole*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 38, 435–441.
14. D. Trzybiński, P. Niedziałkowski, T. Ossowski, A. Trynda, A. Sikorski, *Single-crystal X-ray diffraction analysis of designer drugs: Hydrochlorides of metaphedrone and pentedrone*, 232, 2013, e28-e32.
15. D. Maddileti, B. Swapna, A. Nangia, *Tetramorphs of the antibiotic drug trimethoprim: characterization and stability*, *Cryst. Growth Des.*, 2015, 15, 1745–1756.
16. J.H.T. Luong, Keith B. Male, J.D. Glennon, *Boron-doped diamond electrode: synthesis, characterization, functionalization and analytical applications*, *Analyst*, 2009, 134, 1965-1979.
17. G.E. Batiha, A. Alqahtani, O.B. Ilesanmi, A.A. Saati, A. El-Mleeh, H.F. Hetta, A.M. Beshbishy, *Avermectin Derivatives, Pharmacokinetics, Therapeutic and Toxic Dosages, Mechanism of Action, and Their Biological Effects*, *Pharmaceuticals*, 2020, 13, 196.
18. A.C. Goudie, N.A. Evans, K.A. Gration, B.F. Bishop, S.P. Gibson, K.S. Holdom, B. Kaye, S.R. Wicks, D. Lewis, A.J. Weatherley, *Doramectin - a potent novel endectocide*, *Veterinary parasitology*, 1993, 49, 5-15.
19. C. Eddi, R.A. Muniz; J. Caracostantogolo, J.O. Errecalde, R.S. Rew, S.L. Michener, M.E. McKenzie, *Comparative persistent efficacy of doramectin, ivermectin and fenbendazole against natural nematode infections in cattle*, *Vet. Parasitol.*, 1997, 72, 33–41.
20. *FDA Approves First Generic Doramectin Topical Solution for Treatment of Certain Parasites in Cattle*, U.S. Food and Drug Administration, 2023.
21. *Dectomax ad us. vet., Injektionslösung*, Institut für Veterinärpharmakologie und toxikologie, Università di Zurigo, 2023.
22. *DECTOMAX- doramectin injection, solution*, DailyMed, 2025.

23. *DECTOMAX POUR-ON- doramectin solution*, DailyMed, 2023.
24. *Recent Animal Drug Approvals*, U.S. Food and Drug Administration, 2025.
25. *DECTOGARD POUR-ON- doramectin solution*, DailyMed, 2026
26. *DectoGard (doramectin topical solution)*, Aurora Pharmaceutical, 2026
27. *VALCOR - doramectin and levamisole injection, solution*, National Library of Medicine, 2025.
28. *DORACIDE (doramectin topical solution)*, FDA Center for Veterinary Medicine, 2024.
29. *DORACIDE POUR-ON- doramectin solution*, DailyMed, 2025.
30. *Doramectin*, Pubchem, 2026, National Institutes of Health.
31. *Doramectin*, Chemical Book, 2023, National Institutes of Health.
32. M.J. O'Neil, P.E. Heckelman, C.B. Koch, K.J. Roman, *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, J. Med. Chem., 2007, 50, 590.
33. *Doramectin*, Veterinary Substances DataBase, 2025, Agriculture & Environment Research Unit.
34. R.J. Heitzman, *Doramectin*, FAO Food and Nutrition PAPER, 1999, 41, 27-36
35. *Doramectin*, InvivoChem, 2020.
36. C.J. Dutton, S. Gibson, M. Kinns, A. Swanson, J. Bordner, *Structure of doramectin*, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1995, 403-408.
37. Y. Li, Y. Wu, Y. Sun, B. Wang, P. Zhang, Q. Li, X. Xia, A. Liu, S. Li, *Doramectin crystal form a, crystal form b, and preparation method thereof*, Brevetto internazionale N. PCT/CN2019/117678, 2020, Tianjin Ringpu Bio-technology CO., LTD.
38. R. Gui, T. Li, M. Li, Y. Du, S. Wu, L. Zhou, J. Gong, *Study on the Formation Mechanism of Doramectin Solvate and the Desolvation Process*, Cryst. Growth Des., 2025, 25, 10610-10618.
39. *Doramectin*, APExBIO, 2026.
40. G.M. Sheldrick, *SHELXT-Integrated space-group and crystal-structure determination*, Foundations of Crystallography, 2015, 71, 3-8.
41. G.M. Sheldrick, *Crystal structure refinement with SHELXL*, Crystal Structure Communications, 2015, 71, 3-8.

42. O.V. Dolomanov, L.J. Bourhis, R.J. Gildea, J.A. Howard, H. Puschmann, *OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program*, *Applied Crystallography*, 2009, 42, 339-341.
43. C.F. Macrae, I. Sovago, S.J. Cottrell, P.T. Galek, P. McCabe, E. Pidcock, M. Platings, G.P. Shields, J.S. Stevens, M. Towler, *Mercury 4.0: From visualization to analysis, design and prediction*, *Applied Crystallography*, 2020, 53, 226-235.

## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio la professoressa Giovanna Bruni, relatrice di questa tesi di laurea magistrale, per avermi permesso di svolgere questo lavoro. Sebbene l'ambito di ricerca non fosse quello che avevo previsto inizialmente, il lavoro svolto si è rivelato molto interessante e pieno di spunti differenti e stimolanti; questo mi ha permesso di comprendere un po' meglio il funzionamento e l'utilità della ricerca accademica e scientifica. La ringrazio anche per avermi seguito nel corso dell'anno e per avermi aiutato nelle indicazioni sui tentativi sperimentali da seguire e nella comprensione dei risultati ottenuti.

Ringrazio il professor Matteo Lusi dell'Università di Limerick e i professori Davide Ravelli, Doretta Capsoni e Daniele Merli dell'Università di Pavia per l'aiuto fornito in alcuni passaggi importanti del mio lavoro di tesi.

Ringrazio i miei genitori per avermi permesso di studiare, da fuori sede, questa facoltà per loro totalmente estranea, nonché per non aver mai dubitato della mia scelta. Ringrazio i miei fratelli per avermi accompagnato, anche quando non era possibile vedersi quotidianamente.

Ringrazio, infine, la città di Pavia per la sua bellezza e accoglienza, nonché i numerosissimi amici, amiche e fratelli che ho incontrato qui e che hanno dato una svolta irreversibile alla mia vita. Ringrazio anche i tanti amici di Monza e di Milano, con cui ho mantenuto rapporti importanti e significativi. Carissimi, avremo modo di festeggiare insieme.