



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA
FACOLTÀ DI FARMACIA
DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOFARMACEUTICA-FARMACOCINETICA

MIGLIORAMENTO DEL PROFILO
BIOFARMACEUTICO DELL'ALBENDAZOLO
MEDIANTE CO-CRISTALLIZZAZIONE

Supervisore:

Chiar.mo Prof. Ruggero Bettini

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Paolo Colombo

Dottorando: Marco B. Pranzo

XXII CICLO 2007-2009

Alla mia famiglia

Elenco degli articoli discussi

Questa tesi include il seguente articolo:

M. B. Pranzo, D. Cruickshank, M. Coruzzi, M. R. Caira, R. Bettini “Enantiotropically related albendazole polymorphs” *J. Pharm. Sci.*, accettato per la pubblicazione

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag. 1
1.1 Albendazolo	pag. 1
1.2 Stato solido	pag. 2
1.2.1 Tecniche di cristallizzazione	pag. 2
1.2.2 Polimorfismo e pseudo polimorfismo	pag. 3
1.2.3 Termodinamica dello stato solido	pag. 6
1.3 Crystal engineering e cocristalli	pag. 8
1.4 Biodisponibilità	pag. 14
1.5 Solubilità e velocità di dissoluzione	pag. 15
1.6 Miglioramento della solubilità acquosa di farmaci scarsamente solubili	pag. 16
1.7 Sostanze idrotropiche e co-crystal formers (CCF _s)	pag. 18
1.7.1 Nicotinamide e Isonicotinamide	pag. 20
1.7.2 Acido ascorbico e Ascorbato di sodio	pag. 20
1.7.3 Acido glutarico e Glutarato di sodio	pag. 21
1.7.4 Acido citrico e Citrato di sodio	pag. 22
2. SCOPO DELLA TESI	pag. 23
3. MATERIALI E METODI	pag. 24
3.1 Materiali	pag. 24
3.2 Metodi	pag. 24

3.2.1	Preparazione di nuove forme cristalline e di cocristalli	pag. 24
3.2.2	Preparazione di soluzioni di glutarato di sodio	pag. 24
3.2.3	Caratterizzazione delle fasi cristalline	pag. 25
3.2.4	Determinazione della solubilità all'equilibrio	pag. 26
3.2.5	Determinazione della solubilità dell'albendazolo in soluzioni acquose contenenti quantità crescenti dei vari eccipienti	pag. 26
3.2.6	HPLC	pag. 27
3.2.7	Misure di conducibilità	pag. 30
4.	PARTE TEORICA	pag. 31
4.1	Diagrammi di solubilità di fase secondo Higuchi - Connors	pag. 31
5.	RISULTATI E DISCUSSIONI	pag. 36
5.1	Caratterizzazione dell'albendazolo commerciale	pag. 36
5.1.1	Calorimetria differenziale a scansione (DSC)	pag. 36
5.1.2	Microscopia ottica a luce polarizzata	pag. 36
5.1.3	Analisi termogravimetrica	pag. 37
5.1.4	Diffrazione di raggi X su polvere (PXRD)	pag. 38
5.1.5	Diffrazione di raggi X su cristallo singolo (SC-XRD)	pag. 39
5.2	Caratterizzazione dell'albendazolo ricristallizzato da solvente	pag. 39
5.2.1	Calorimetria differenziale a scansione (DSC)	pag. 39
5.2.2	Diffrazione di raggi X su polvere (PXRD)	pag. 42

5.2.3	Microscopia ottica a luce polarizzata	pag. 43
5.2.4	Diffrazione di raggi X su cristallo singolo (SC-XRD)	pag. 44
5.3	Determinazione della solubilità all'equilibrio	pag. 45
5.4	Valutazione della miscibilità tra l'albendazolo e i vari CCF _s mediante la costruzione dei diagrammi di fase	pag. 51
5.5	Prove di co-cristallizzazione	pag. 56
5.6	Studi di solubilità dell'albendazolo	pag. 57
5.6.1	Solubilità dell'albendazolo in soluzioni acquose di nicotinamide ed isonicotinamide	pag. 57
5.6.2	Solubilità dell'albendazolo in soluzioni acquose di acido ascorbico ed ascorbato di sodio	pag. 61
5.6.3	Solubilità dell'albendazolo in soluzioni acquose di acido glutarico e glutarato di sodio	pag. 65
5.6.4	Solubilità dell'albendazolo in soluzioni acquose di acido citrico e citrato di sodio	pag. 68
5.7	Misure di conducibilità	pag. 72
6.	CONCLUSIONI	pag. 80
	BIBLIOGRAFIA	pag. 82

1. INTRODUZIONE

1.1 Albendazolo

L'albendazolo è un farmaco appartenente alla classe dei derivati benzimidazolici, un gruppo di farmaci ad ampio spettro, scoperti negli anni '60, attivi contro elminti del tratto gastrointestinale.

L'albendazolo è un derivato abbastanza recente, in cui il benzimidazolo ha in posizione 2 un gruppo carbammico, mentre in posizione 5 un gruppo lipofilo propiltioloico (Figura 1).

Si tratta di uno dei pochi composti realmente efficaci nel trattamento dell'echinococcosi. Tale infezione è provocata dall'*Echinococcus granulosus*, una piccola tenia che trascorre la fase adulta nell'intestino tenue di lupi e cani (ospiti definitivi) e quella larvale normalmente nei tessuti degli erbivori e accidentalmente in quelli di altri animali o dell'uomo nei quali si incista. Le uova vengono poste in libertà dopo l'espulsione della proglottide gravida (uno dei segmenti che divide il corpo del cestode adulto) dall'intestino e una volta ingerite dagli animali che possono fungere da ospiti intermedi (pecore, maiali, cavalli) o dall'uomo, si schiudono nel duodeno liberando delle larve. Queste penetrano nelle pareti intestinali e trasportate dal sangue si distribuiscono in tutto l'organismo. Installandosi nei tessuti, il parassita comincia a formare una cavità interna e alla fine della prima settimana ha già l'aspetto di una cisti. Se un cane mangia i visceri di un animale parassitato da cisti fertili, i protoscolici contenuti nelle larve mature si fissano alle pareti dell'intestino tenue e si trasformano nel cestode adulto. Le altre parti della larva vengono digerite. I cani sono spesso infestati da centinaia di tali cestodi e rappresentano perciò una fonte di infestazione per il bestiame e per l'uomo (che diviene un ospite intermedio accidentale). Gli animali da allevamento e l'uomo vengono contagiati ingerendo le uova di *Echinococcus granulosus* disperse con le feci dei cani parassitati. Le uova possono essere presenti nell'erba, sulle verdure, nella polvere¹. L'echinococcosi è una parassitosi diffusa soprattutto nei Paesi dediti alla pastorizia (Sud America, Africa, Australia ed Europa meridionale).

Il principale problema che si incontra nell'uso in terapia dell'albendazolo e, in generale, di tutti i derivati benzimidazolici, è la loro bassa biodisponibilità dovuta al fatto che si tratta di farmaci che vanno incontro ad un notevole metabolismo pre-sistemico (a livello epatico e degli enterociti) e dotati di scarsa solubilità in acqua ($< 0,1 \text{ mg/mL}$)².

Queste caratteristiche rendono oggetto di dibattito l'assegnazione dell'albendazolo alla classe II o IV del Biopharmaceutical Classification System (BCS)².

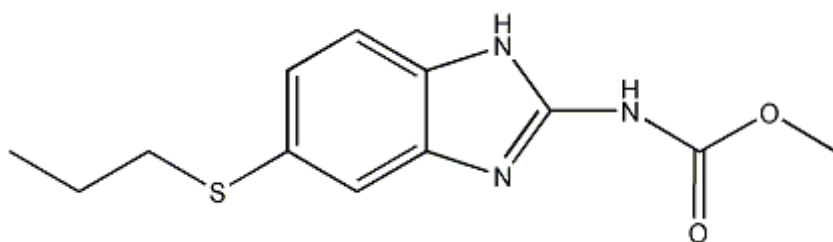


Figura 1. Formula di struttura dell'albendazolo

1.2 Stato solido

1.2.1 Tecniche di cristallizzazione

I metodi utilizzati per l'isolamento di solidi cristallini comprendono:

- **ricristallizzazione:** è una tecnica generalmente utilizzata per rimuovere impurità da un solido cristallino. Consiste nella dissoluzione dei cristalli da purificare in una piccola quantità di un opportuno solvente sottoposto a riscaldamento; la soluzione così ottenuta viene raffreddata allo scopo di ottenere i cristalli puri della sostanza d'interesse. Ovviamente questa tecnica può essere applicata solo se le impurità sono più solubili del prodotto principale nel solvente utilizzato per la dissoluzione iniziale³;

- **precipitazione:** la precipitazione dei cristalli di una sostanza preventivamente disciolta in un opportuno solvente può avvenire in modi diversi:

- addizionando alla soluzione della sostanza d'interesse un anti-solvente che riduca il potere solubilizzante del solvente nei confronti della sostanza di partenza;
- cambiando le condizioni di pH della soluzione qualora si abbia a che fare con acidi o basi deboli;

- **cristallizzazione da "fuso":** con il termine "fuso" si fa riferimento ad un liquido prossimo al suo punto di congelamento, anche se, generalmente, tale termine indica

miscele liquide di più componenti che solidificano per raffreddamento.

E' comunemente intesa come una tecnica di cristallizzazione per raffreddamento allo scopo di produrre uno o più componenti della miscela di partenza in forma relativamente pura³;

- **sublimazione**: la cristallizzazione di una sostanza solida può essere ottenuta a partire dalla forma gassosa della sostanza stessa che incontrando una superficie fredda torna nello stato solido. Tale processo sfrutta la sublimazione ovvero il passaggio diretto della sostanza dallo stato solido a quello gassoso e viceversa³.

Le tecniche di cristallizzazione sopra elencate sono utili sia per aumentare il grado di purezza di un cristallo sia per indurre eventuali transizioni polimorfiche, ovvero modificazioni del reticolo cristallino di una molecola. In effetti, la ricerca e la caratterizzazione di forme cristalline diverse della stessa molecola (polimorfi) o di aggregati della medesima molecola con molecole diverse (idrati, solvati, cocristalli) è uno dei settori di ricerca più importanti della chimica dello stato solido.

In campo farmaceutico il polimorfismo è rilevante per la scelta della forma solida più adatta allo sviluppo di un nuovo farmaco.

La stabilità relativa delle varie forme e la possibilità di interconversione possono avere conseguenze molto serie sulla vita del prodotto e sul mantenimento delle proprietà desiderate.

1.2.2 Polimorfismo e pseudopolimorfismo

La tendenza di una sostanza a cristallizzare in differenti stati cristallini (polimorfi) è detta polimorfismo.

Si può parlare di polimorfi solo nello stato solido poiché nello stato liquido e in quello gassoso due sostanze polimorfiche non sono distinguibili. Nello stato solido, infatti, le differenti disposizioni di molecole o ioni nel reticolo comportano energie di interazione differenti; il polimorfo più stabile sarà rappresentato dalla forma a più bassa energia e gli altri polimorfi tenderanno a trasformarsi in esso.

Il polimorfismo è abbastanza comune tra i composti farmaceutici, anche se le conoscenze che riguardano tale fenomeno non sono ancora così approfondite da poter prevedere in modo efficace quali farmaci possano mostrare questo fenomeno.

Un terzo delle sostanze organiche, nelle condizioni normali di pressione e temperatura, presenta polimorfismo, mentre un altro terzo può dare origine a solvati ed idrati. In Tabella 1, sono riportati alcuni esempi di composti con i loro relativi polimorfi.

Tabella 1. Composti farmaceutici con differenti forme cristalline (polimorfi)⁴

Farmaco	N. polimorfi	Altre forme (solvati)
Ampicillina	1	1
Barbital	6	
Codeina	3	
Cortisone	2	1
Cortisone acetato	8	
Nicotinamide	7	
Testosterone	3	
Tolbutamide	3	

Un fenomeno correlato al polimorfismo è chiamato pseudopolimorfismo, condizione nella quale molecole di solvente restano incorporate nel reticolo cristallino formando i cosiddetti “solvati”; in particolare, nel caso in cui sia l’acqua il solvente di cristallizzazione si parla di “idrati”.

Le forme solvate di un farmaco possono avere punti di fusione e solubilità talmente diversi da influenzare il loro comportamento farmaceutico: solubilità, velocità di dissoluzione, biodisponibilità, stabilità chimica⁵ (Tabella 2). Appare chiaro, quindi, l’importanza di un attento studio durante lo sviluppo della forma farmaceutica proprio al fine di non incorrere in problematiche connesse a tali cambiamenti di attività.

Tabella 2. Proprietà fisiche che possono differire tra polimorfi di uno stesso composto

	<i>Proprietà fisiche</i>
<i>Impacchettamento</i>	Volume molare e densità, indice di rifrazione, conduttività, igroscopicità
<i>Termodinamica</i>	Temperatura di fusione e di sublimazione, entalpia, capacità termica, energia libera, pressione di vapore, solubilità
<i>Spettroscopia</i>	Transizioni vibrazionali (IR), transizioni rotazionali
<i>Cinetica</i>	Velocità di dissoluzione, stabilità
<i>Superficie</i>	Energia libera superficiale, tensione interfacciale, habitus cristallino
<i>Meccanica</i>	Durezza, forza di tensione, compattamento

1.2.3 Termodinamica dello stato solido

Un solo polimorfo può essere stabile in definite condizioni di temperatura e pressione. La differenza di energia libera di Gibbs (G) è la “driving force” di una trasformazione polimorfa a temperatura e pressione costante ed è data da:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

dove H è l'entalpia, T è la temperatura ed S è l'entropia. L'energia totale di un sistema è rappresentata dall'entalpia a pressione costante. Il termine TS rappresenta l'energia del sistema che è associata al disordine delle molecole. La forma stabile ha la più bassa energia libera di Gibbs e, quindi, la più bassa pressione di vapore, attività termodinamica e solubilità.

La stabilità relativa di una coppia di polimorfi può essere descritta dai concetti di *enantiotropia* e *monotropia*. Per gli enantiotropi la stabilità relativa termodinamica è funzione di temperatura e di pressione. Quindi, esiste una temperatura, definita di transizione (T_1), e la transizione è reversibile. Le curve dell'energia libera dei polimorfi in questione si incrociano in corrispondenza della temperatura di transizione (Figura 3.a). In tal caso, da un punto di vista termodinamico, la forma a più basso punto di fusione è stabile a temperature al di sotto del punto di transizione, mentre la forma a più alto punto di fusione è stabile al di sopra del punto di transizione. Il punto di transizione può essere misurato mediante analisi termica, misure di solubilità o una combinazione di misure di solubilità ed entalpie di fusione.

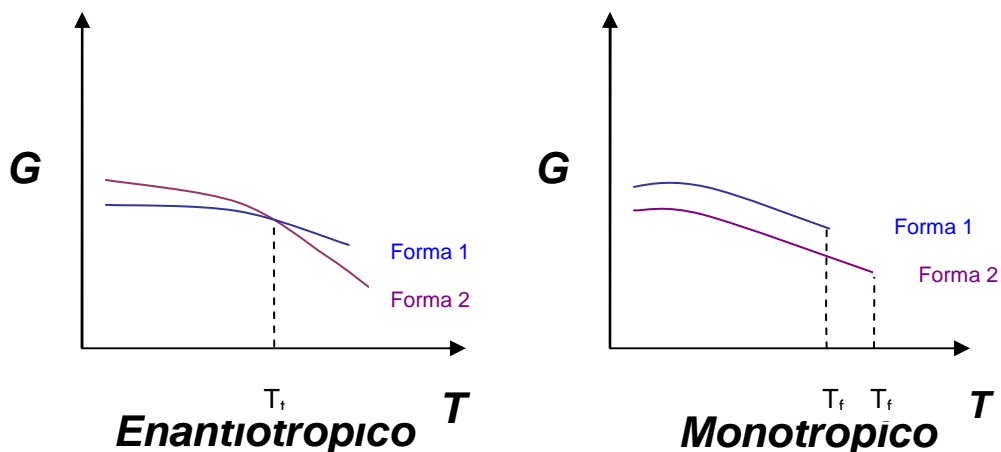


Figura 3. Grafici di energia libera in funzione della temperatura per un sistema a) **enantiotropico** e b) **monotropico**.
La forma avente l'energia libera più bassa è quella più stabile.

In un sistema monotropico, un dato polimorfo è stabile a tutte le temperature al di sotto del punto di fusione, mentre l'altro è instabile. In questo caso le curve dell'energia libera non si incontrano (Figura 3.b) e quindi non è possibile una transizione reversibile⁶.

La tabella 3 riporta sinteticamente le principali differenze tra un sistema enantiotropico ed uno monotropico.

Lo stato amorfo presenta un'entalpia molare più elevata rispetto a quella dello stato cristallino a causa della mancanza di energia reticolare stabile. Inoltre, l'entropia molare della forma amorfa è superiore a quella dello stato cristallino, perché non c'è un ordine a lungo-raggio. Di conseguenza, lo stato amorfo può presentare alcuni vantaggi (quali una più alta solubilità), ma sia la stabilità chimica che quella fisica sono inferiori rispetto a quelle di uno stato cristallino^{6,7}.

Tabella 3. Differenze tra un sistema enantiotropico ed uno monotropico

Enantiotropia	Monotropia
Il punto di transizione giace sotto i punti di fusione	Il punto di transizione giace sopra i punti di fusione
Il punto di transizione viene raggiunto in condizioni di pressione atmosferica	Il punto di transizione non viene raggiunto in condizioni di pressione atmosferica
Ogni varietà polimorfa e' stabile oltre un dato intervallo di temperatura e di pressione rispetto all'altra	Una varietà e' sempre metastabile rispetto all'altra
La trasformazione polimorfa può essere reversibile allo stato solido	La trasformazione e' sempre irreversibile allo stato solido
Se la prima varietà viene riscaldata, si trasforma nella seconda nel punto di transizione. Questa seconda varietà fonde poi ad una temperatura maggiore	Dopo un leggero riscaldamento il polimorfo metastabile fonde e in seguito solidifica per dare la varietà stabile che, a sua volta, fonde a temperatura più alta

1.3 Crystal engineering e cocristalli

L'applicazione delle tecniche di crystal engineering nella progettazione di cocristalli ha una storia relativamente recente. Infatti, nonostante tali cocristalli siano noti da molto tempo come composti di addizione o composti molecolari organici, il loro numero all'interno del Cambridge Structural Database, CSD⁸, è davvero ridotto (circa 1450) se paragonato a quello di altri complessi molecolari come ad esempio gli idrati (circa 35000)⁹. Tale numero si riduce ulteriormente se si considerano i cocristalli contenenti API (Active Pharmaceutical Ingredients) dato che la possibilità di associare in un' unica fase solida due o più composti molecolari ha inizialmente riguardato il campo dei cristalli ottici non lineari, quello dei colori e dei pigmenti ed il settore agrochimico¹⁰.

“Miscele di cristalli” oppure cristalli contenenti due o più molecole diverse possono essere considerate come generiche definizioni di cocristalli; utilizzando, invece, un

linguaggio legato alla chimica sopramolecolare e al crystal engineering un cocristallo può essere inteso come il risultato di un processo di riconoscimento molecolare tra specie molecolari differenti⁹. Al di là delle possibili definizioni, il termine cocristalli nasce dalla necessità di distinguere questi complessi molecolari dalle forme tradizionali in cui un solido può presentarsi (stato amorfo, cristalli ad entità singola, solvati/idrati, clatrati). In particolare, la differenza sostanziale tra un cocristallo ed un solvato (o idrato) bimolecolare è rappresentata dal fatto che in quest'ultimo caso i componenti non sono entrambi solidi a temperatura ambiente, come accade per il cocristallo, ma uno si presenta allo stato solido e l'altro allo stato liquido. Da ciò si intuisce come i cocristalli siano potenzialmente più utili dei solvati o idrati in campo farmaceutico. Infatti, il numero di solventi farmaceuticamente accettabile e che, quindi, può essere utilizzato per la preparazione di solvati è molto ridotto; inoltre, tali solventi di solito evaporano facilmente favorendo processi di desolvatazione o deidratazione con possibile formazione di composti amorfi; nessuno di questi problemi si pone nel caso dei cocristalli dato che i componenti solidi che formano un cocristallo difficilmente vanno incontro ad evaporazione¹⁰.

L'utilizzo di un cocristallo in forme di dosaggio solide può risultare vantaggioso anche rispetto ad un amorfo, che, nonostante presenti migliori caratteristiche di solubilità rispetto ad un solido cristallino, non rappresenta la forma solida maggiormente desiderata a causa della sua instabilità chimico-fisica (presenta spesso un'elevata reattività chimica, tende ad essere igroscopico e la bassa densità di polvere influisce negativamente su alcune proprietà tecnologiche)¹⁰.

Le potenziali applicazioni dei cocristalli in campo farmaceutico sono numerose come emerge da due recenti studi in cui è stata dimostrata la possibilità di aumentare la stabilità fisica della caffeina e della teofillina per formazione di cocristalli con acidi dicarbossilici^{11,12}.

Un altro recente studio ha dimostrato la possibilità di esercitare un controllo polimorfico su sostanze di interesse farmaceutico mediante la realizzazione di cocristalli. In particolare, è stata osservata una riduzione della tendenza al polimorfismo per sostanze dotate di due o più forme cristalline con conseguenti risvolti positivi relativamente alla processabilità di queste sostanze¹³.

La modificazione del profilo biofarmaceutico-farmacocinetico di un API (active pharmaceutical ingredient) attraverso la realizzazione di cocristalli rappresenta forse il potenziale applicativo più importante di questa nuova classe di solidi cristallini ed è proprio questo il filone di ricerca che si è cercato di perseguire nel presente progetto di tesi di dottorato. Esempi inerenti il miglioramento della biodisponibilità di farmaci per loro inserimento all'interno di strutture cocristalline sono presenti in letteratura^{14,15,16} e dimostrano come i processi di cocristallizzazione siano utili per ridurre l'eccessiva solubilità o aumentare la scarsa solubilità di composti di interesse farmaceutico.

Il crystal engineering può essere definito come l'applicazione dei principi della chimica sopramolecolare, la quale si basa sull'idea che ciascun solido cristallino sia di fatto il risultato di un processo di "auto-assemblaggio" tra molecole dello stesso tipo. Le strutture cristalline possono, quindi, essere definite come prodotti derivanti da una serie di interazioni deboli ma direzionali tra molecole¹⁰. L'adeguata comprensione di tali principi ha aperto la strada al disegno razionale di nuovi composti ovvero al crystal engineering il cui scopo è quello di ottenere una struttura molecolare periodica con le caratteristiche desiderate grazie alla possibilità di controllare l'auto-assemblaggio tra molecole mediante interazioni deboli.

Il termine crystal engineering fu coniato da Pepinsky nel 1955¹⁷ ma non trovò un risvolto pratico fino a quando Schmidt non studiò una serie di reazioni dello stato solido per composti cristallini differenti^{10,18}. A partire da quel momento la sintesi sopramolecolare, avendo anche la possibilità di evitare l'uso di solventi, cominciò a rappresentare un'importante area di ricerca che ha conosciuto un rapido sviluppo soprattutto negli anni '90 per quanto riguarda i solidi organici e metallo-organici¹⁹ ma anche le strutture inorganiche^{10,20}. Solo di recente il crystal engineering ha rivolto la sua attenzione alla realizzazione di cocristalli farmaceutici e ciò appare a dir poco sorprendente visto l'importante ruolo che gli API rivestono in ambito terapeutico-clinico.

Gli API possiedono gruppi funzionali responsabili della formazione di interazioni deboli tra molecole dello stesso tipo (cristalli ad entità singola passibili di polimorfismo), interazioni tra API e molecole di solvente (solvati/idrati) o interazioni tra API e co-crystal former, CCF (cocristalli). Se i gruppi funzionali coinvolti in queste

interazioni intermolecolari sono dello stesso tipo si parla di omosintoni sopramolecolari come accade nel caso di due acidi carbossilici (Figura 4.a) mentre se tali gruppi funzionali sono di diverso tipo si hanno gli eterosintoni sopramolecolari come quelli che si formano tra un acido carbossilico ed una amide (Figura 4.b)¹⁰.

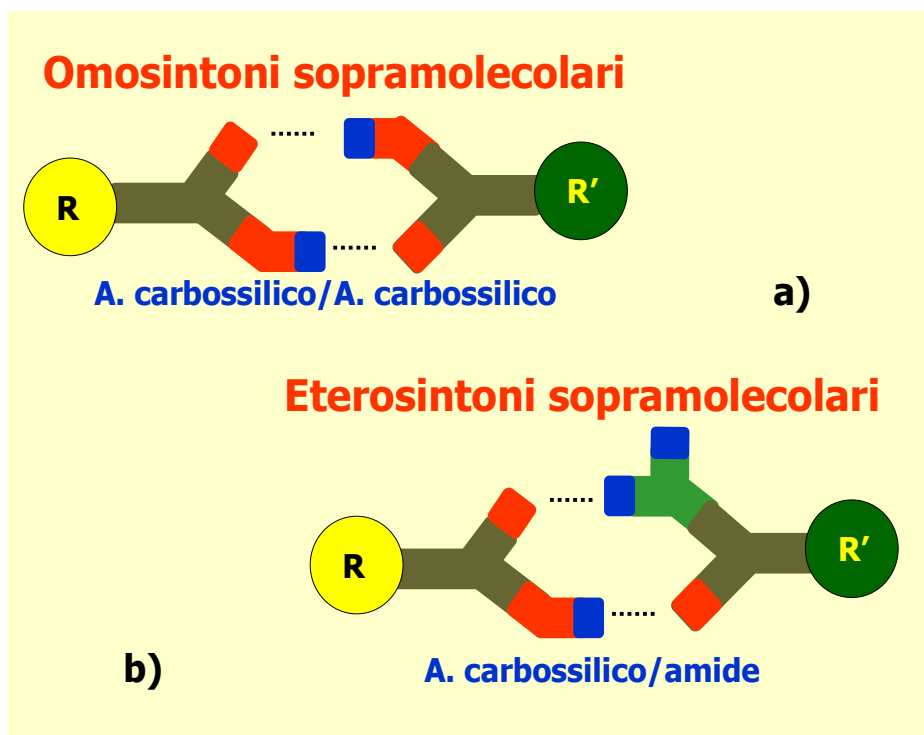


Figura 4. Omosintoni ed eterosintoni molecolari

Il tipo di interazioni intermolecolari che consente la formazione di omosintoni o eterosintoni sopramolecolari deve essere non covalente e direzionale. Ciò spiega il motivo per cui nella maggior parte dei cocristalli, ma anche degli altri complessi molecolari, prevalgono interazioni tipo Van der Waals e legami π ma, soprattutto, legami ad idrogeno per la cui formazione è necessaria la presenza di gruppi donatori e gruppi accettori di protoni.

Dati di letteratura dimostrano che entrambi i tipi di omosintone ed eterosintone sopramolecolare mostrati in Figura 4 sono i più sfruttati per la realizzazione dei cocristalli¹⁶ (Figura 5).

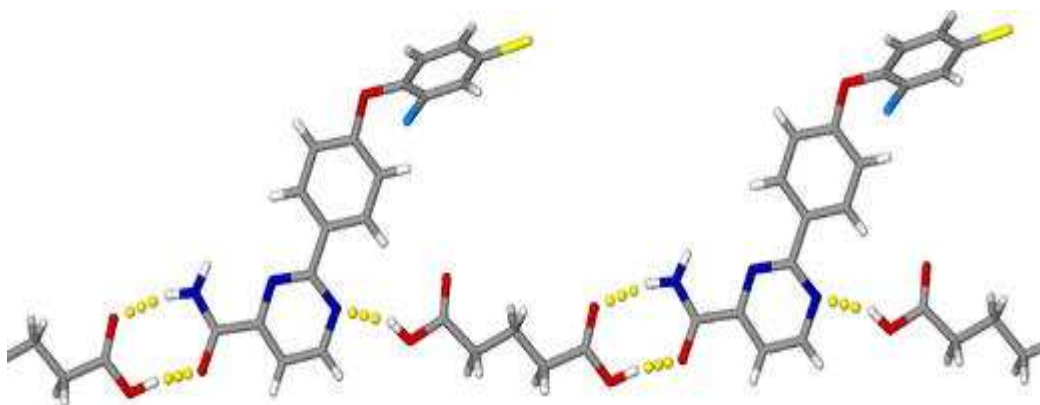


Figura 5. Interazioni intermolecolari tra acido glutarico (CCF) ed una molecola candidato farmaco (API) (tratto da *Pharmaceutical Research*, 2006, 23(8), 1888-1897)

La Figura 5 mostra i legami ad idrogeno che vengono a formarsi tra acido glutarico, che in questo caso viene sfruttato come co-crystal former, ed una molecola farmaco candidata allo sviluppo. Si nota la formazione dell'eterosintone acido carbossilico/amide e dell' eterosintone acido carbossilico/piridina; eterosintone quest'ultimo che è anch'esso di largo utilizzo nella costruzione dei cocristalli come dimostrato dalla struttura itraconazolo:acido succinico (2:1) che rispetto all'itraconazolo presenta una aumentata biodisponibilità e migliori caratteristiche morfologiche e di particle size (Figura 6)¹⁴.

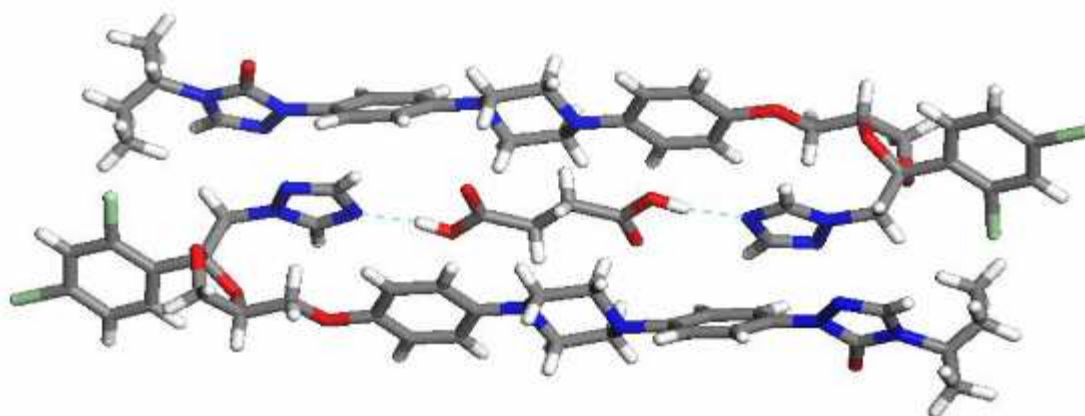


Figura 6. Interazioni intermolecolari tra due molecole di itraconazolo (API) ed una molecola di acido succinico (CCF) (tratto da *Journal of American Chemical Society*, 2003, 125, 8456-8457)

Sulla base di questi dati è evidente che la formazione di eterosintoni sopramolecolari sia più frequente rispetto a quella degli omosintoni e, nell'ambito degli eterosintoni, si ha una netta prevalenza delle interazioni acido-amide e di quelle acido-amina aromatica (piridina). Una conferma in tal senso si ha considerando che nel Cambridge Structural Database sono raccolte 118 strutture cristalline in cui sono presenti contemporaneamente un acido carbossilico ed un'amide. Di queste strutture, 58 partecipano alla formazione di eterosintoni sopramolecolari acido-amide mentre solo 11 formano omosintoni acido-acido e 28 sono impegnate in omosintoni amidici. L'eterosintone acido carbossilico/piridina, invece, ricorre in 119 delle 245 strutture cristalline che contengono entrambi i gruppi funzionali¹⁰.

In definitiva, un cocristallo è un solido cristallino costituito da almeno due sostanze cristalline diverse che a temperatura ambiente si presentino allo stato solido. I componenti di un cocristallo farmaceutico possono essere rappresentati da un principio attivo (API) e da un co-crystal former (CCF) che sia accettabile da un punto di vista farmaceutico (Figura 7.a) oppure possono essere entrambi delle sostanze farmacologicamente attive (Figura 7.b).

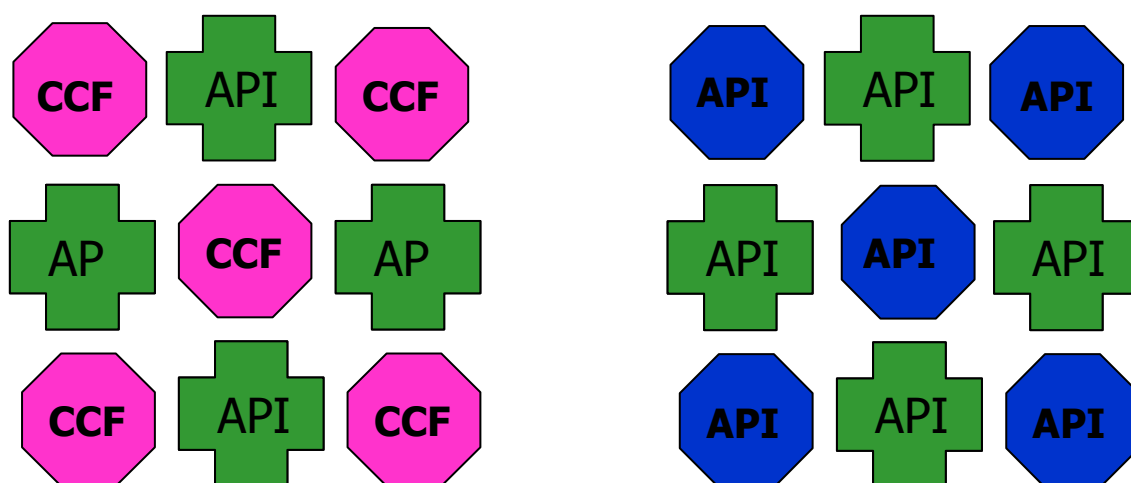


Figura 7.a. Cocristallo costituito da un principio attivo (API) e da una molecola non attiva farmacologicamente (CCF). **b.** Cocristallo costituito da due principi attivi diversi

1.4 Biodisponibilità

La biodisponibilità²¹ è la principale proprietà farmacocinetica. Questo termine viene utilizzato per descrivere la quantità e la velocità con cui un farmaco somministrato raggiunge la circolazione sistemica senza subire alcuna modificazione di tipo chimico. Un farmaco somministrato per via endovenosa ha biodisponibilità pari al 100%, mentre farmaci somministrati per altre vie (ad esempio per via orale) possono avere valori inferiori di biodisponibilità a causa del loro parziale assorbimento e degli effetti metabolici presistemici cui possono andare incontro.

La biodisponibilità, F , può essere calcolata come:

- **biodisponibilità assoluta:** è la biodisponibilità di un dato principio attivo in una forma farmaceutica confrontata con la biodisponibilità dello stesso principio attivo somministrato per via endovenosa. Il confronto viene effettuato ricorrendo all'AUC (area sottesa dalla curva concentrazione plasmatica in funzione del tempo):

$$F = \frac{AUC_{extr}}{AUC_{iv}} \quad (2)$$

dove AUC_{extr} è l'area sotto la curva del farmaco della forma farmaceutica in esame e AUC_{iv} è l'area sotto la curva ottenuta dalla somministrazione endovenosa.

Più è alto questo rapporto maggiore è la biodisponibilità del farmaco somministrato attraverso una via diversa da quella endovenosa.

- **biodisponibilità relativa:** è la biodisponibilità di un principio attivo di una forma farmaceutica campione confrontata con quella di un'altra presa come riferimento. Anche in questo caso il confronto viene effettuato tramite AUC:

$$F = \frac{AUC_{text}}{AUC_{rif}} \quad (3)$$

Dove AUC_{text} è l'area sotto la curva del farmaco dalla forma farmaceutica campione e AUC_{rif} è l'area sotto la curva ottenuta dopo somministrazione del farmaco in una forma farmaceutica presa come riferimento.

Tra i fattori fisiologici che riducono la disponibilità del farmaco prima del suo ingresso nella circolazione sistemica si ricordano:

- scarso assorbimento a livello gastrointestinale;
- degradazione metabolica del farmaco prima dell'assorbimento;
- effetto di primo passaggio epatico.

Tali fattori possono variare da paziente a paziente, così come nello stesso paziente possono mutare nel tempo. Le malattie che interessano il metabolismo epatico o la funzione gastrointestinale, ad esempio, possono avere un effetto sulla biodisponibilità.

1.5 Solubilità e velocità di dissoluzione

Le sostanze con una scarsa solubilità acquosa sono quelle che mostrano i maggiori problemi di biodisponibilità a causa delle loro difficoltà a passare in soluzione e ad essere quindi assorbite a livello gastrointestinale. In effetti, in relazione al passaggio del principio attivo dall'interno di una formulazione al circolo sistemico un ruolo determinante è giocato dalla velocità di dissoluzione. La solubilità, quindi, è determinante per questo processo: più un farmaco è solubile, maggiore sarà la velocità di dissoluzione, la quale a sua volta è correlata alla velocità e all'entità d'assorbimento. In definitiva i tre parametri utilizzati per valutare la biodisponibilità del farmaco sono la velocità di dissoluzione, la solubilità e la permeabilità.

La solubilità²¹ di una sostanza è la quantità massima di soluto che può dissolversi in un certo quantitativo di solvente o quantità di soluzione a una determinata temperatura.

I principali fattori che hanno un effetto sulla solubilità sono:

- **natura del soluto e del solvente**

- **temperatura:** in generale, un aumento della temperatura della soluzione aumenta la solubilità di un soluto solido.

- **pressione:** per soluti solidi e liquidi, i cambiamenti di pressione non hanno praticamente alcun effetto sulla solubilità, per soluti gassosi, invece, la solubilità cresce con l'aumentare della pressione.

Un principio attivo somministrato attraverso una forma farmaceutica solida prima di essere assorbito deve passare in soluzione. Come detto la dissoluzione²¹ rappresenta uno step limitante l'assorbimento.

Alcuni dei fattori che influiscono sulla velocità di dissoluzione sono:

- **dimensioni delle particelle:** minori risultano le dimensioni particellari maggiore è la superficie di contatto tra il soluto e il solvente e, quindi, più elevata è la velocità di dissoluzione.
- **agitazione della soluzione:** l'aumento della velocità di agitazione influisce positivamente sulla velocità di dissoluzione.
- **quantità di soluto già disciolta:** all'aumentare della quantità di soluto in soluzione si riduce progressivamente la velocità di dissoluzione
- **temperatura:** per soluti liquidi e solidi all'aumentare della temperatura aumentano sia la solubilità che la velocità di dissoluzione. Per i gas, è vero il contrario.

1.6 Miglioramento della solubilità acquosa di farmaci scarsamente solubili

La solubilità dei principi attivi farmaceutici (API) ha rappresentato da sempre un importante problema per la formulazione, in quanto l'insufficiente solubilità acquosa può essere di ostacolo allo sviluppo di prodotti parenterali e può limitare la biodisponibilità di formulazioni solide destinate alla somministrazione orale.

La formazione di sali rappresenta un metodo comune ed efficace per aumentare la velocità di dissoluzione e la solubilità di farmaci con caratteristiche di acido o base. Tuttavia, la trasformazione di un farmaco nel corrispondente sale non è sempre così scontata in quanto strettamente correlata ad una serie di fattori come la solubilità intrinseca, il pH, la costante di dissociazione acida, il prodotto di solubilità. Anche la possibilità di auto-associazione dei sali in soluzione può influire negativamente sulla loro solubilità²².

Il crystal engineering, come discusso precedentemente, offre una serie di percorsi per migliorare la solubilità e la velocità di dissoluzione e può essere adottato previa conoscenza approfondita dei processi di cristallizzazione e delle proprietà molecolari di principi attivi farmaceutici²².

Anche le ciclodestrine, che possono formare in soluzione complessi di inclusione non covalenti con un gran numero di API, rappresentano un modo efficace per il miglioramento della solubilità di farmaci scarsamente solubili destinati alla somministrazione parenterale, transmucosale e orale. Una vasta gamma di prodotti a base di ciclodestrine ha raggiunto il mercato grazie alla capacità di mascherare

temporaneamente proprietà chimico-fisiche indesiderate del principio attivo. Quest'importante applicazione delle ciclodestrine ha fatto sì che esse divenissero oggetto di studio relativamente alla cinetica e alla termodinamica di solubilizzazione del farmaco con il quale risultavano complessate²².

E' riportata in letteratura l'esistenza di un effetto sinergico tra l'acido citrico e le idrossipropil- β -ciclodestrine (HP- β -CD) le quali, formando un complesso d'inclusione con l'albendazolo, riescono ad aumentarne la solubilità acquosa. La combinazione tra HP- β -CD (200 mM) e acido citrico (50 mM) permette la dissoluzione di più di 5mg di albendazolo per mL²³.

Risulta anche ampiamente documentata la capacità di formulazioni basate sui lipidi di facilitare l'assorbimento gastro-intestinale di farmaci molto poco solubili, nonostante sia notevole il divario tra la conoscenza teorica di questo tipo di tecnologia e la sua reale applicazione ai fini del miglioramento del profilo biofarmaceutico dei farmaci²².

Infine, si è registrato di recente un incremento percentuale dei profarmaci tra i prodotti farmaceutici immessi in commercio. L'utilizzo dei profarmaci sembra portare in molti casi ad un miglioramento del rilascio orale e parenterale di farmaci con problemi di solubilità²².

1.7 Sostanze idrotropiche e co-crystal formers (CCF_s)

Il termine sostanza idrotropica fu introdotto da Nenberg per designare un sale anionico organico che, ad alte concentrazioni, aumenta la solubilità in acqua di sostanze scarsamente solubili²⁴.

Oggi tale definizione viene estesa anche ai composti organici cationici e neutri.

Gli idrotropi risultano essere composti da una parte idrofila e da una parte idrofoba (analogamente ai surfattanti) e presentano una concentrazione critica oltre la quale si verifica l'autoaggregazione che corrisponde alla formazione di micelle e vescicole dei surfattanti²⁵.

Il lavoro di Saleh e El-Khordagui riporta studi di solubilità in acqua di sostanze idrotropiche come il sodio salicilato, il sodio p-toluensolfonato, il sodio xilensolfonato, il sodio cumene solforato e il sodiobutilmonoglicolsolfato. Tali studi hanno mostrato che queste molecole autoaggregano in soluzione acquosa formando assemblati organizzati. Nonostante ciò il meccanismo con cui agiscono gli idrotropi non è

attualmente del tutto chiaro; infatti, un altro meccanismo proposto per spiegare il fenomeno dell'idrotropia è un processo simile al salting-in: è stato dimostrato che soluzioni acquose di KCN, KSCN e NH₄SCN sono eccellenti solventi per molti composti insolubili in acqua.

Esiste anche l'ipotesi secondo la quale l'idrotropo aumenti la solubilità del composto idrofobico, formando con esso un complesso²⁶. Un'ipotesi opposta, invece, afferma che gli idrotropi agiscano modificando la struttura dell'acqua²⁷.

Un'ulteriore ipotesi sostiene che gli idrotropi si concentrano intorno al soluto idrofobico senza instaurare interazioni specifiche²⁸.

Composti utilizzati come idrotropi sono: urea, cloruro di guanidio, nicotinamide, sodio tiocianato, solforati aromatici.

Gli idrotropi vengono utilizzati con successo nelle separazioni estrattive e nella distillazione come solvente estrattivo. Il sodiobutilmonoglicolsolfato e il sodio p-toluensolfonato, ad esempio, sono stati utilizzati per la separazione degli isomeri *orto* e *para* dell'acido clorobenzoico.

L'uso di soluzioni idrotropiche come solventi è diventato interessante per l'assenza di infiammabilità, per l'elevata selettività, per l'assenza di problemi di emulsione e per il facile recupero di materiale solubilizzato^{29,30}.

Tra le varie applicazioni comunque l'aumento di solubilità in acqua di farmaci rimane quella più importante.

La scarsa solubilità in acqua costituisce, infatti, un significativo ostacolo per le industrie farmaceutiche che sviluppano nuovi farmaci.

Come precedentemente detto, il problema della solubilità incide sulla somministrazione e sulla performance del farmaco in vari modi: in primo luogo, limita il range formulativo (non si possono preparare facilmente formulazioni parenterali); in secondo luogo, limita la biodisponibilità, perché il farmaco, una volta entrato nell'organismo, non raggiunge il sito d'azione in dose adeguata creando, quindi, la necessità di aumentarne il dosaggio e il numero di somministrazioni.

Ad esempio, la nimesulide, un antiinfiammatorio non steroideo, è un farmaco insolubile in acqua e ciò preclude l'uso di formulazioni parenterali.

Lo studio dell'effetto di idrotropi come la nicotinamide, il sodio ascorbato, il sodio benzoato, il sodio salicilato e la piperazina sulla solubilità della nimesulide ha mostrato

un aumento di solubilità acquosa del farmaco soprattutto nel caso della nicotinamide. A basse concentrazioni di idrotropo, l'effetto solubilizzante è stato attribuito alle deboli interazioni ioniche, mentre a concentrazioni più alte all'aggregazione molecolare³¹.

Altri farmaci poco solubili in acqua sono le benzodiazepine, il cui incremento di solubilità, in presenza di sodio salicilato, è stato associato alla formazione di aggregati. Il meccanismo responsabile della solubilizzazione di tale farmaco³² sembra essere l'inclusione di molecole di benzodiazepine in aggregati di sodio salicilato.

Nel presente progetto di ricerca una serie di sostanze idrotropiche sono state sperimentate per aumentare la scarsa solubilità acquosa dell'albendazolo e per la preparazione in fase solida di new chemical entities (cocristalli) che mostrassero un profilo biofarmaceutico migliorato rispetto a quello del solo albendazolo.

1.7.1 Nicotinamide e Isonicotinamide

La nicotinamide e l'isonicotinamide (Figure 8a, 8b) sono due molecole con la stessa formula molecolare che differiscono solo per la posizione del gruppo amidico, situato in C₃ nella nicotinamide e in C₄ nell'isonicotinamide. La nicotinamide non è altro che la vitamina B₃, sostanza farmaceuticamente attiva e caratterizzata da tossicità irrilevante. Oltre alle sue ben note proprietà antiossidanti³³, è stato suggerito l'uso della nicotinamide nella prevenzione del diabete³⁴, come agente antimicrobico, nella prevenzione della fotoimmunosoppressione e fotocarcinogenesi³⁵, nel trattamento della schizofrenia³⁶ e nella cura delle osteoartriti³⁷.

In cosmetica è utilizzata come agente antinfiammatorio nell'acne³⁸ e come agente idratante poiché determina un aumento delle ceramidi e delle proteine barriera quali la cheratina e la flagellina.

Oltre alle sue applicazioni cosmetiche e terapeutiche la nicotinamide si è dimostrata un eccipiente in grado di promuovere la solubilità di molti composti. È infatti, riportata in letteratura la sua azione idrotropica nei confronti di numerosi farmaci quali la nifedipina³⁹, la riboflavina⁴⁰, il paclitaxel⁴¹ e l'alofantrina⁴².

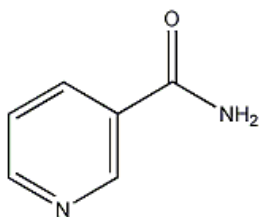


Figura 8a. Formula di struttura nicotinamide.

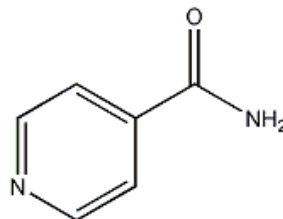


Figura 8b. Formula di struttura isonicotinamide.

1.7.2 Acido ascorbico e ascorbato di sodio

L'acido ascorbico ed il suo sale sodico (Figure 9a, 9b) sono comunemente noti come vitamina C, una vitamina essenziale per la sintesi di collagene e di materiale intracellulare. L'acido ascorbico deve essere introdotto attraverso la dieta data l'incapacità dell'organismo umano di sintetizzarlo e, sebbene il suo apporto sia variabile da un individuo all'altro, la dose giornaliera raccomandata dovrebbe essere di almeno 30 mg.

Le principali applicazioni dell'acido ascorbico rientrano nell'ambito clinico e vanno dal trattamento di deficit da vitamina C alla cura della talassemia in associazione alla desferrossamina.

Ben note sono anche le proprietà antiossidanti dell'acido ascorbico e del suo sale sodico che, per questo motivo, vengono ampiamente utilizzati nell'industria farmaceutica ed alimentare come eccipiente antiossidante.

Inoltre, in letteratura è riportato il suo impiego come sostanza idrotropa per il miglioramento della solubilità acquosa della nimesulide somministrata per via parenterale³¹.

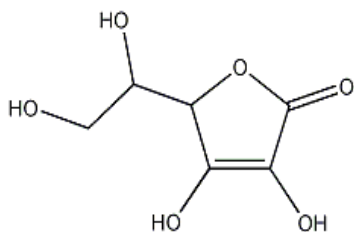


Figura 9a. Formula di struttura acido ascorbico.

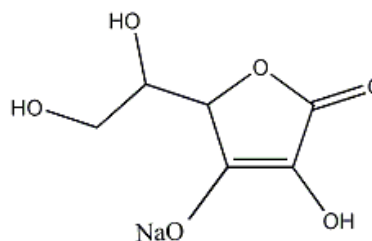


Figura 9b. Formula di struttura ascorbato di sodio.

1.7.3 Acido glutarico e glutarato di sodio

L'acido glutarico (Figura 10a) è un acido dicarbossilico solubile in acqua. Trova applicazione principalmente nella chimica dei materiali; infatti, viene usato per la preparazione di polimeri come polioli e poliammidi poiché grazie al suo numero di atomi di carbonio dispari è in grado di ridurre l'elasticità dei polimeri stessi. Trova anche impiego come agente solubilizzante.

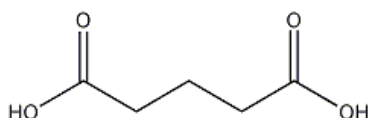


Figura 10a. Formula di struttura acido glutarico.

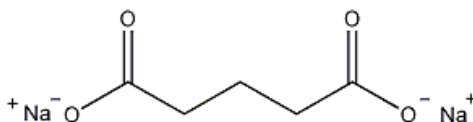


Figura 10b. Formula di struttura glutarato di sodio

1.7.4 Acido citrico e citrato di sodio

L'acido citrico (Figura 11a) è un acido tricarbossilico molto solubile in acqua (1330 g/L a 293 K), rispetto al suo sale sodico (Figura 11b) che ha una solubilità inferiore (425 g/L). E' uno degli acidi più diffusi negli organismi vegetali: il succo di limone ne contiene il 5-7 %, ma è presente anche in quasi tutta la frutta, nei funghi, nel vino e persino nel latte.

L'acido citrico è un fondamentale prodotto intermedio nel catabolismo dei carboidrati di tutti gli esseri viventi aerobi (incluso l'uomo), in quanto partecipa al ciclo di Krebs (importante via metabolica deputata alla produzione di energia).

Nell'industria alimentare è notoriamente usato come acidulante e conservante (con la denominazione E330). In campo farmaceutico viene impiegato come conservante e anticoagulante. Il citrato di sodio è un farmaco utile nel trattamento della litiasi renale, nonché come alcalinizzante metabolico; inoltre viene utilizzato in laboratorio come anticoagulante per la conservazione del sangue nelle sacche.

Come gli acidi carbossilici e i loro sali precedentemente riportati, questa coppia di composti è potenzialmente in grado di agire come solubilizzante nei confronti di principi attivi poco solubili.

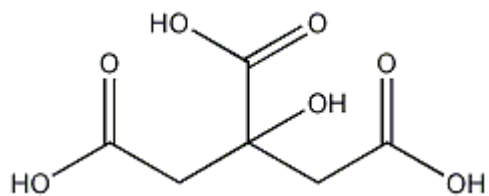


Figura 11a. Formula di struttura acido citrico.

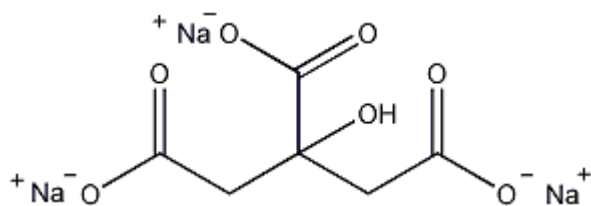


Figura 11b. Formula di struttura citrato di sodio.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiali

Albendazolo (Sigma-Aldrich, Stenheim, Germania)

Sodio idrossido (Carlo Erba Reagenti, Milano)

Nicotinamide, isonicotinamide, acido ascorbico, ascorbato di sodio, acido glutarico (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germania)

Acido citrico, citrato di sodio (A.C.E.F. – Fiorenzuola D'Arda)

Metanolo per HPLC (VWR Prolabo, Fontenay-sous-Bois, Francia)

3.2 Metodi

3.2.1 Preparazione di nuove forme cristalline e di cocristalli

Nel presente progetto di dottorato è stata utilizzata la cristallizzazione da soluzione mediante lenta evaporazione del solvente.

Per la ricristallizzazione del solo albendazolo una quantità nota del farmaco (circa 50 mg) è stata disciolta nel solvente scelto (100 mL di metanolo o dimetilformamide); la soluzione così ottenuta è stata lasciata evaporare lentamente a pressione e temperatura ambiente fino al completo allontanamento del solvente e all'ottenimento di una polvere microcristallina di albendazolo.

Nel caso delle miscele albendazolo:CCF_s, le quantità esattamente pesate corrispondenti a rapporti molarî prefissati (compresi tra 0.1 M e 0.9 M) di ciascuno dei due componenti sono state disciolte in metanolo; quindi, il solvente della soluzione ottenuta è stato lasciato evaporare fino all'ottenimento di una polvere microcristallina.

3.2.2 Preparazione di soluzioni di glutarato di sodio

Sono state preparate soluzioni acquose di glutarato di sodio di concentrazione 0.1 M, 0.3 M, 0.8 M, 1.6 M, 2.4 M e 3.2 M disciogliendo un'opportuna quantità di sodio idrossido in acqua e aggiungendo la soluzione così ottenuta a soluzioni acquose contenenti acido glutarico in quantità tale da raggiungere la concentrazione molare del sale desiderata.

3.2.3 Caratterizzazione delle fasi cristalline

La caratterizzazione delle fasi cristalline è stata effettuata mediante Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC), Microscopia ottica, Diffrazione di Raggi X su Polvere (PXRD), Diffrazione di Raggi X su cristallo singolo (SC-XRD) ed Analisi Termogravimetrica (TGA).

3.2.3.1 Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC)

Nelle analisi effettuate è stato utilizzato un calorimetro differenziale a scansione DSC 821e STARe METTLER TOLEDO. Campioni esattamente pesati di circa 5 mg sono stati inseriti in un crogiolo di alluminio (40 μ l) con coperchio sigillato e forato e sottoposti ad un programma di riscaldamento da 30 ° a 225 °C alla velocità di 1 °C/min o di 5 °C/min e da 30 ° a 270 °C alla velocità di 40 °C/min, in atmosfera dinamica di azoto secco ad un flusso di 100 mL/min.

3.2.3.2 Diffrazione di raggi X su polvere (PXRD)

Gli spettri di diffrazione su polvere sono stati registrati mediante un diffrattometro Rigaku Miniflex (Giappone, Tokyo) con una radiazione CuK α 30 kV, ad una velocità di scansione di 0,05°/min in un intervallo di scansione (2 θ) compreso tra 5° e 40°.

3.2.3.3 Diffrazione di raggi X su cristallo singolo (SC-XRD)

La risoluzione della struttura cristallina dell'albendazolo ricristallizzato da DMF è stata effettuata presso il laboratorio del Centre for Supramolecular Chemistry Research di Cape Town (Sud Africa) utilizzando un diffrattometro con radiazione MoK α ($\lambda = 0.71073$ Å) associato al programma SHELXS-97.

3.2.3.4 Microscopia ottica su piastra riscaldante (HSM)

La microscopia ottica consente di osservare la morfologia dei cristalli in esame fornendo una preziosa informazione dato che strutture cristalline differenti possono presentare un aspetto diverso. In particolare, in questo lavoro di tesi i campioni ottenuti in seguito a ricristallizzazione sono stati osservati mediante un microscopio a luce polarizzata (Labophot II Nikon, Tokio, Japan) con un ingrandimento 10x o 20x.

3.2.3.5 Analisi termogravimetrica (TGA)

L'analisi termogravimetrica (TG 50, Mettler Toledo, USA) è stata condotta su campioni di albendazolo commerciale e di albendazolo ricristallizzato da metanolo e da DMF utilizzando crogioli in allumina con coperchio forato. I campioni sono stati sottoposti ad un programma di riscaldamento da 30 ° a 225 °C alla velocità di 5 °C/min in atmosfera dinamica di azoto secco ad un flusso di 30 mL/min.

3.2.4 Determinazione della solubilità all'equilibrio

La solubilità dell'albendazolo commerciale e dei due prodotti di ricristallizzazione è stata determinata a temperatura ambiente in metanolo ed in HCl 0.1 N. In quest'ultimo solvente la solubilità è stata anche determinata in un intervallo di temperatura compreso tra 25 ° e 100 °C. Un eccesso di farmaco è stato sospeso nel solvente selezionato e sottoposto ad agitazione mediante un Vortex per tre volte nell'arco di un'ora. La sospensione così ottenuta è stata lasciata all'equilibrio per 48 ore in camera termostata a 25 ± 1 °C e 60% U.R. e, poi, filtrata utilizzando dei filtri a membrana (0.45 µm) per separare il corpo di fondo dal surnatante. I filtrati sono stati diluiti ed analizzati mediante HPLC per determinare la concentrazione di albendazolo. Per ciascun campione sono state effettuate tre repliche.

3.2.5 Determinazione della solubilità dell'albendazolo in soluzioni acquose contenenti quantità crescenti di vari eccipienti

Sono state preparate soluzioni sature di albendazolo commerciale, albendazolo ricristallizzato da metanolo e albendazolo ricristallizzato da dimetilformamide pesando esattamente circa 5 mg di albendazolo e aggiungendo 1.5 mL di soluzione acquosa delle varie sostanze idrotropiche (nicotinamide, isonicotinamide, acido ascorbico, ascorbato di sodio, acido glutarico, glutarato di sodio, acido citrico e citrato di sodio) ognuna in una concentrazione compresa tra 0.1 M e 3.2 M^(a).

^(a) Nel caso della isonicotinamide ci si è fermati ad una concentrazione 0.8 M per raggiunti limiti di solubilità dell'eccipiente stesso.

Le soluzioni così ottenute sono state lasciate equilibrare per 72 h in camera termostata a 25 ± 1 °C e 60% U.R.

Quindi le soluzioni sono state filtrate utilizzando dei filtri a membrana (0.45 µm) per separare il corpo di fondo dal surnatante.

L'albendazolo nel surnatante è stato quantificato mediante metodo HPLC.

I risultati ottenuti hanno consentito di costruire dei diagrammi di solubilità di fase e di calcolare le relative costanti di associazione secondo le equazioni di Higuchi e Connors discusse nella "Parte teorica".

3.2.6 HPLC

L'analisi cromatografica è stata effettuata con un cromatografo Shimadzu (LC-10 Atvp; Software Cromatoplus) munito di un rivelatore a fotodiodi (SPD-10 VP Shimadzu) ed equipaggiato di una colonna per cromatografia LiChrospher® 60 RP-select B 125-4 (5 µm). Iniettando 20 o 100 µl per ciascun campione mediante autocampionatore (Waters 717 plus Autosampler) ed impostando un flusso di fase eluente pari a 0,7 mL/min, è stato osservato un tempo di ritenzione dell'albendazolo di circa 6 minuti. Come eluente è stata utilizzata una soluzione al 40% (v/v) di ammonio fosfato monobasico (1,67 g/L) e al 60% (v/v) di metanolo. La lunghezza d'onda del rivelatore è stata impostata in un range compreso tra 250 e 260 nm.

Come standard di riferimento è stata preparata una soluzione di albendazolo (100 µg/mL) utilizzando come solvente una miscela metanolo:acido solforico concentrato (99:1 v/v).

Il metodo di quantificazione dell'albendazolo è stato convalidato per linearità, ripetibilità, limiti di quantificazione e rilevazione, numero di piatti teorici e fattore di scodamento.

La convalida della linearità è stata eseguita costruendo una retta di taratura con soluzioni a titolo noto di albendazolo in una soluzione metanolo: H₂O (60:40). Il valore

numerico del coefficiente di regressione lineare ottenuto ($R^2 = 0,999$) è indice di una buona correlazione fra la concentrazione dell'analita e la risposta dello strumento (Figura 12).

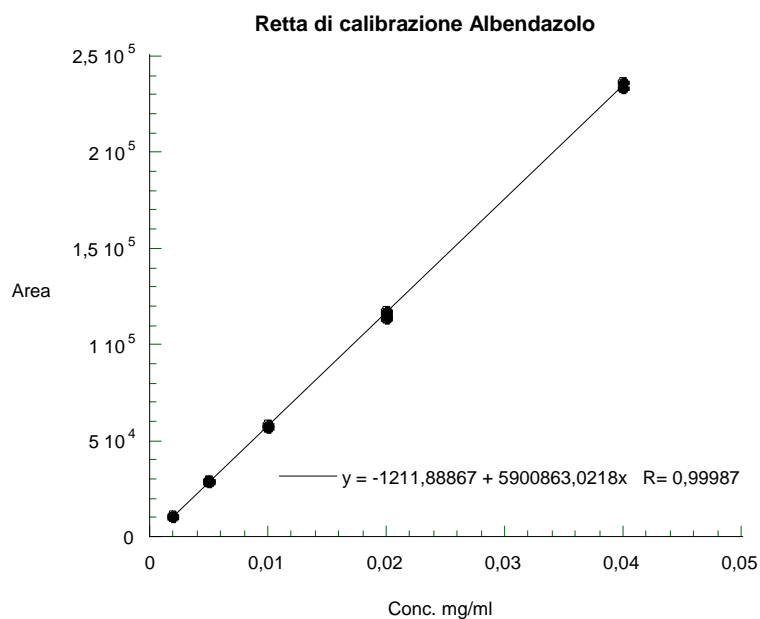


Figura 12. Area sotto la curva del picco HPLC dell'albendazolo in funzione della concentrazione

La convalida della ripetibilità del metodo è stata eseguita calcolando la deviazione standard relativa. Per tutti i punti della retta risulta essere compresa tra lo 0,85 e 1,48 % (Tabella 4).

Tabella 4. Valori di deviazione standard relativa ottenuti da analisi HPLC di soluzioni di albendazolo a diversa concentrazione

Concentrazione (µg/mL)	Deviazione standard relativa %
40	0,85
20	1,48
10	0,96
5	1,33
2	1,37

Il limite di rilevazione, *LOD*, esprime la minima quantità di sostanza che lo strumento può rilevare e per il metodo HPLC si calcola come rapporto tra l'altezza del picco della sostanza (H) e l'oscillazione della linea di base (h); la concentrazione di sostanza per la quale questo rapporto è uguale a 3 rappresenta il *LOD*.

Nel nostro caso,

$$LOD = 1,1 \text{ µg/mL}$$

Il limite di quantificazione, *LOQ*, è la minima quantità di sostanza che lo strumento può quantificare con una precisione e un' esattezza adeguate. La concentrazione di sostanza per la quale il rapporto fra H e h è uguale a 10 è il *LOQ*.

Nel nostro caso,

$$LOQ = 3,6 \text{ µg/mL}$$

Il numero di piatti teorici, *HETP*, è indice dell'efficienza della colonna cromatografica. Maggiore è il numero di piatti teorici e migliore è la risoluzione dei picchi.

$$HETP = 16 \times (t / w_h)^2 \quad (5)$$

dove t è il tempo di ritenzione del picco (misurato lungo la linea di base dal punto di iniezione alla perpendicolare tracciata dal massimo del picco) e w_h è la larghezza del picco a metà altezza.

Nel nostro caso,

$$\text{HETP} = 4928$$

Infine, è stato calcolato il fattore di scodamento, indice della simmetria del picco.

$$T = w / 2f \quad (6)$$

dove w è la larghezza del picco ad un ventesimo della sua altezza e f è la distanza tra la perpendicolare tracciata dal massimo del picco e il punto di inizio ad un ventesimo della sua altezza (F.U. XII ed.).

Nel nostro caso,

$$T = 0,96$$

3.2.7 Misure di conducibilità

E' stata misurata la conducibilità di soluzioni acquose contenenti i vari eccipienti in concentrazione molare uguali a quelle impiegate negli esperimenti di solubilità di fase con e senza l'aggiunta di un eccesso di albendazolo. Tali misure sono state effettuate alla temperatura di 25 °C usando un conduttivimetro Micro CM 2202 (Crison, Barcellona, Spagna).

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 Caratterizzazione dell'albendazolo commerciale

5.1.1 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

Il tracciato DSC relativo all'albendazolo commerciale (analizzato con una velocità di scansione di 5 °C/min) mostra solo un picco endotermico a 202.3 ± 2.2 °C (Figura 14), attribuibile alla fusione seguita poi da una marcata decomposizione. A tale fusione è associata una variazione di entalpia, ΔH_f , di 135.1 ± 1.7 Jg⁻¹.

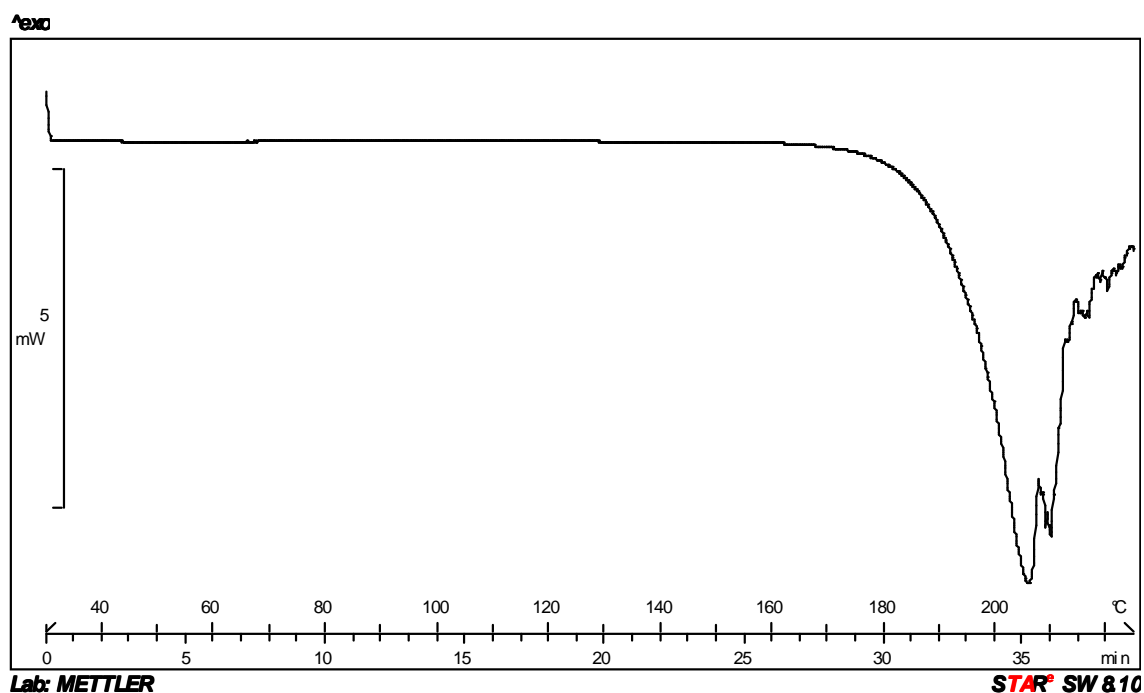


Figura 14. Tracciato DSC dell'albendazolo commerciale (scansione a 5 °C/min)

5.1.2 Microscopia ottica a luce polarizzata

L'analisi mediante microscopio ottico a luce polarizzata (Figura 15) ha rivelato dei cristalli di albendazolo molto piccoli, scarsamente birifrangenti e con una forte tendenza all'aggregazione.

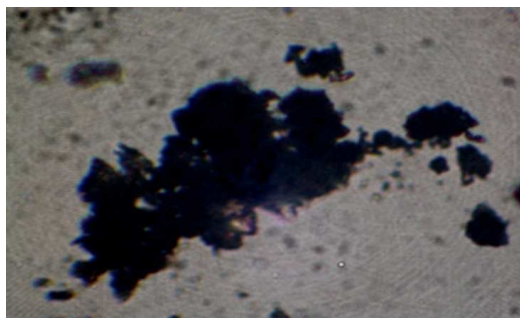


Figura 15. Fotogramma dell'albendazolo commerciale osservato con microscopio ottico a luce polarizzata

5.1.3 Analisi termogravimetrica (TGA)

L'analisi termogravimetrica dell'albendazolo commerciale, condotta ad una velocità di scansione di 5 °C/min, rivela una perdita in peso di circa 1.5 % (w/w) nell'intervallo compreso tra 30° e 150 °C e del 13 % (p/p) tra 175° e 225 °C (Figura 16). Differenze non statisticamente significative di perdita in peso si osservano nel caso dei due prodotti di ricristallizzazione (da metanolo e da DMF) ad indicare che il processo di ricristallizzazione non porta alla formazione di solvati. Infatti, il contenuto teorico di solvente per una forma monosolvata dell'albendazolo dovrebbe essere di 21.6 e 10.8 % (p/p) per il metanolo e la DMF rispettivamente, mentre il contenuto di acqua in peso in un ipotetico monoidrato dovrebbe essere del 6.3 %.

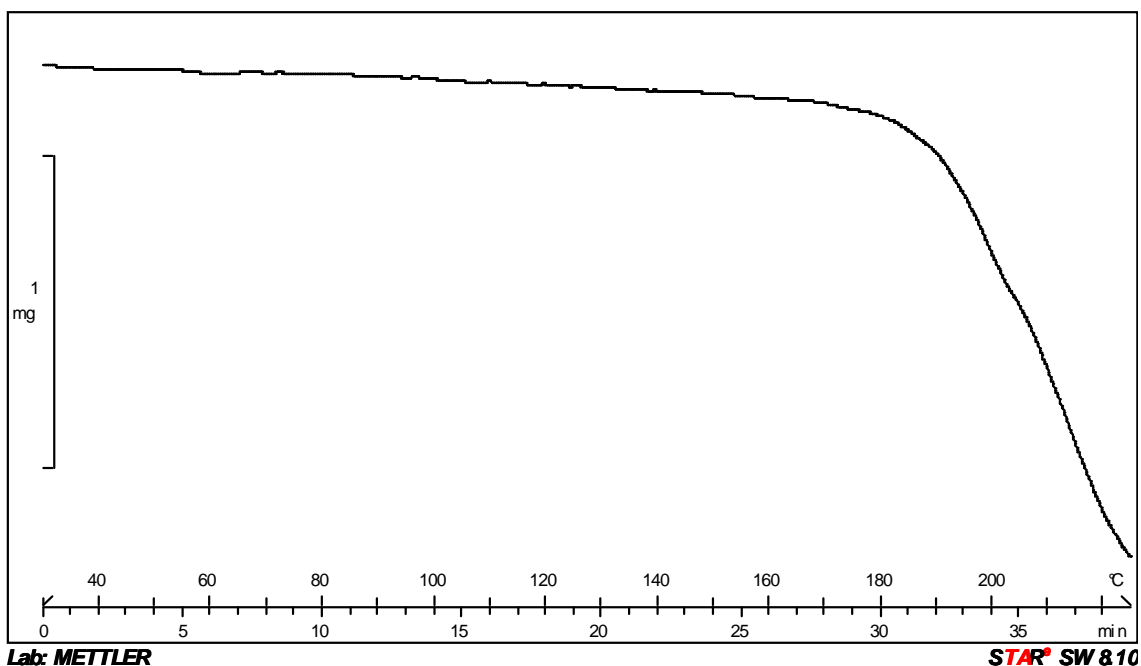


Figura 16. Tracciato TGA dell'albendazolo commerciale (scansione a 5 °C/min)

5.1.4 Diffrazione di raggi X su polvere (PXRD)

Il diffrattogramma dell'albendazolo commerciale (Figura 17) con i suoi picchi ben definiti rivela la natura cristallina del farmaco. In particolare, si osservano picchi di intensità compresa tra 1000 e 4500 cps a 7°, 11.5°, 18° e 25° 2theta. Si tratta del diffrattogramma di un principio attivo non ancora inserito nel Cambridge Structural Database (CSD).

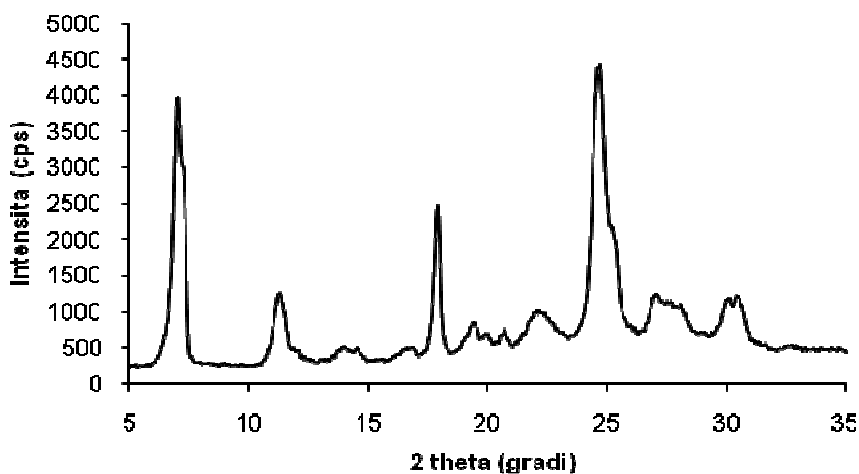


Figura 17. Diffrattogramma dell'albendazolo commerciale

5.1.5 Diffrazione di raggi X su cristallo singolo (SC-XRD)

I cristalli dell' albandazolo commerciale, a causa della loro morfologia appiattita e dello scarso spessore, non hanno consentito di effettuare un'analisi di raggi X su cristallo singolo del farmaco stesso se non attraverso ricristallizzazione di quest'ultimo in opportuno solvente.

5.2 Caratterizzazione dell'albandazolo ricristallizzato da solvente

Per osservare eventuali modificazioni della struttura cristallina, l'albandazolo commerciale è stato ricristallizzato da due solventi che differiscono principalmente per il loro grado di volatilità: il metanolo, con caratteristiche protiche ed un punto di ebollizione di 64.8 °C e la dimetilformamide, solvente aprotico con punto di ebollizione pari a 153 °C.

5.2.1 Calorimetria differenziale a scansione (DSC)

Dall'analisi calorimetrica condotta a 5°C/min emergono, sia nel caso del ricristallizzato da metanolo che nel caso del ricristallizzato da dimetilformamide, dei tracciati DSC (Figure 18.a e 18.b) che, oltre al picco di fusione attorno a 202 °C, mostrano un fenomeno endo-eso tra 130° e 170°C. Tale fenomeno che può essere interpretato come una fusione e successiva ricristallizzazione è ancor più evidente se l'analisi viene condotta sui due ricristallizzati ad una velocità di scansione di 40 °C/min (Figure 19.a e 19.b). Al contrario un'analisi calorimetrica condotta alla stessa velocità di scansione (40 °C/min) sull'albandazolo commerciale produce un tracciato (Figura 20) che si differenzia da quello mostrato in figura 14 solo per uno spostamento del picco a circa 225° C.

Ciò ha fatto avanzare l'ipotesi che in seguito al processo di ricristallizzazione (qualunque sia il solvente utilizzato) si abbia la formazione di un polimorfo bassofondente rispetto all'albandazolo commerciale che, invece, rappresenterebbe la forma altofondente. In effetti, il fatto che la scansione più rapida (40 °C/min) renda più evidente il processo endo-eso rispetto a quando l'analisi viene effettuata a 5 °C/min può essere attribuito al minor tempo che, nel primo caso, la sostanza ha di convertirsi dalla

forma bassofondente a quella altofondente.

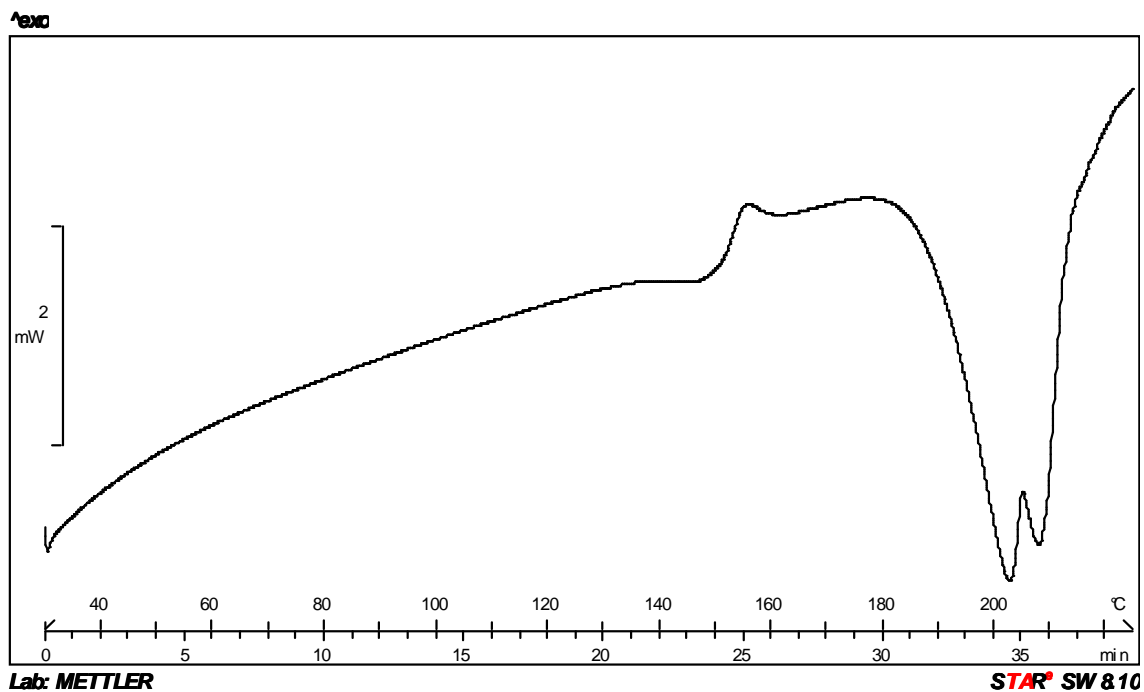


Figura 18.a. Tracciato DSC dell'alendazolo ricristallizzato da metanolo (scansione a 5 °C/min)

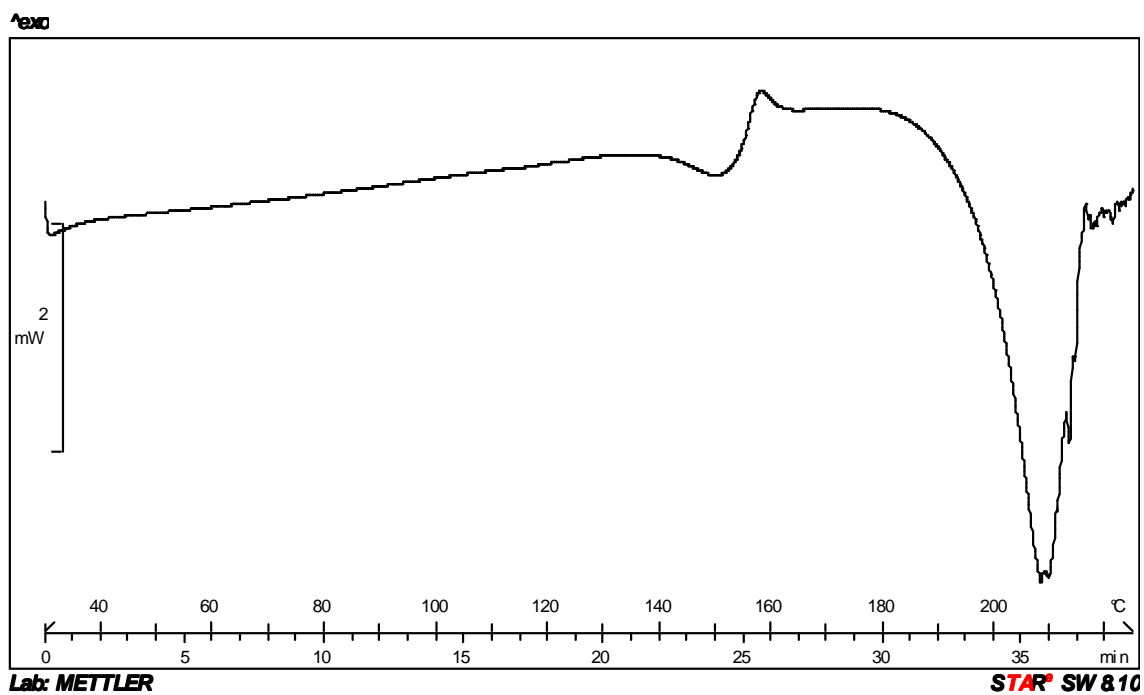


Figura 18.b. Tracciato DSC dell'alendazolo ricristallizzato da dimetilformamide (scansione a 5 °C/min)

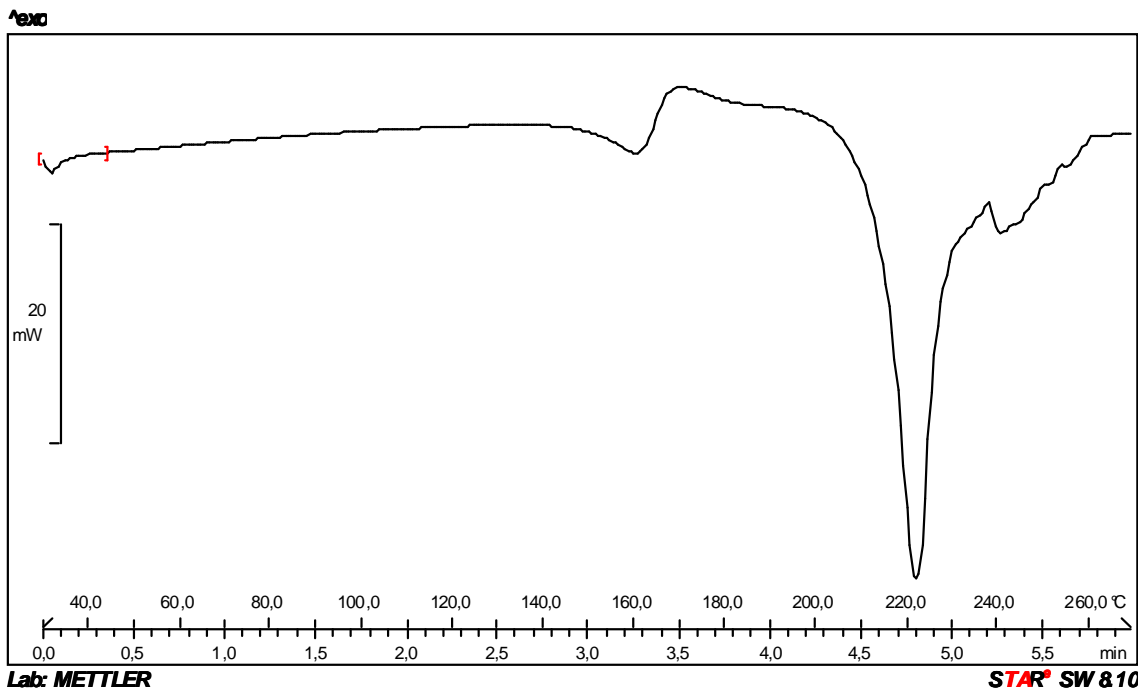


Figura 19.a. Tracciato DSC dell'alendazolo ricristallizzato da metanolo (scansione a 40 °C/min)

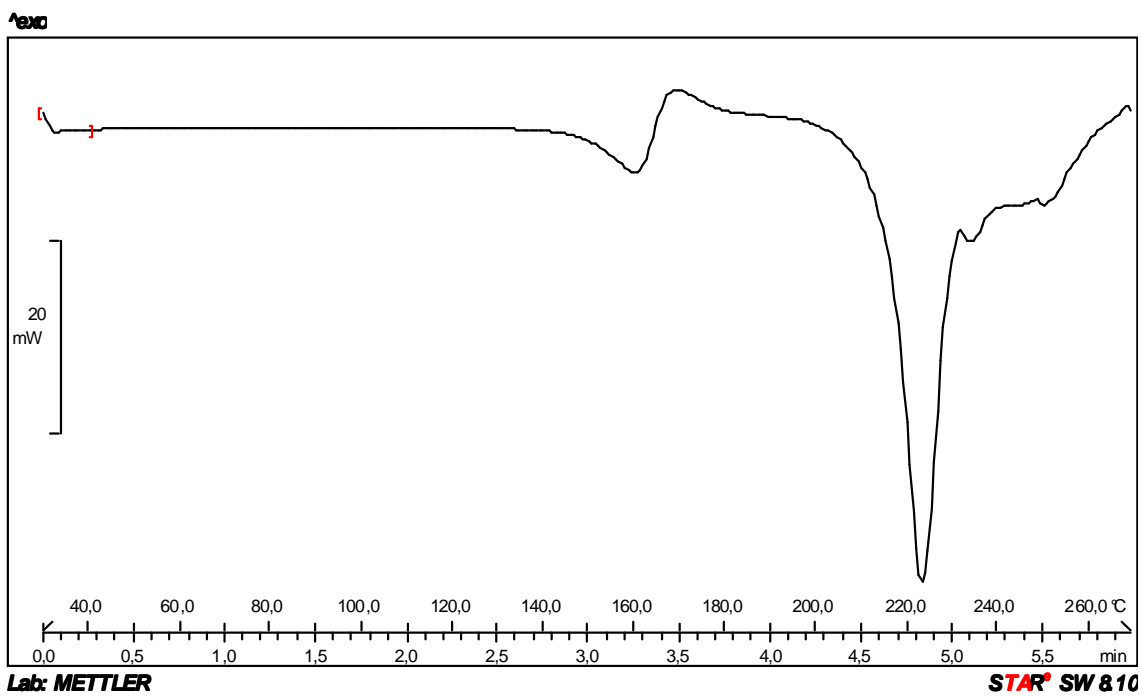


Figura 19.b. Tracciato DSC dell'alendazolo ricristallizzato da dimetilformamide (scansione a 40 °C/min)

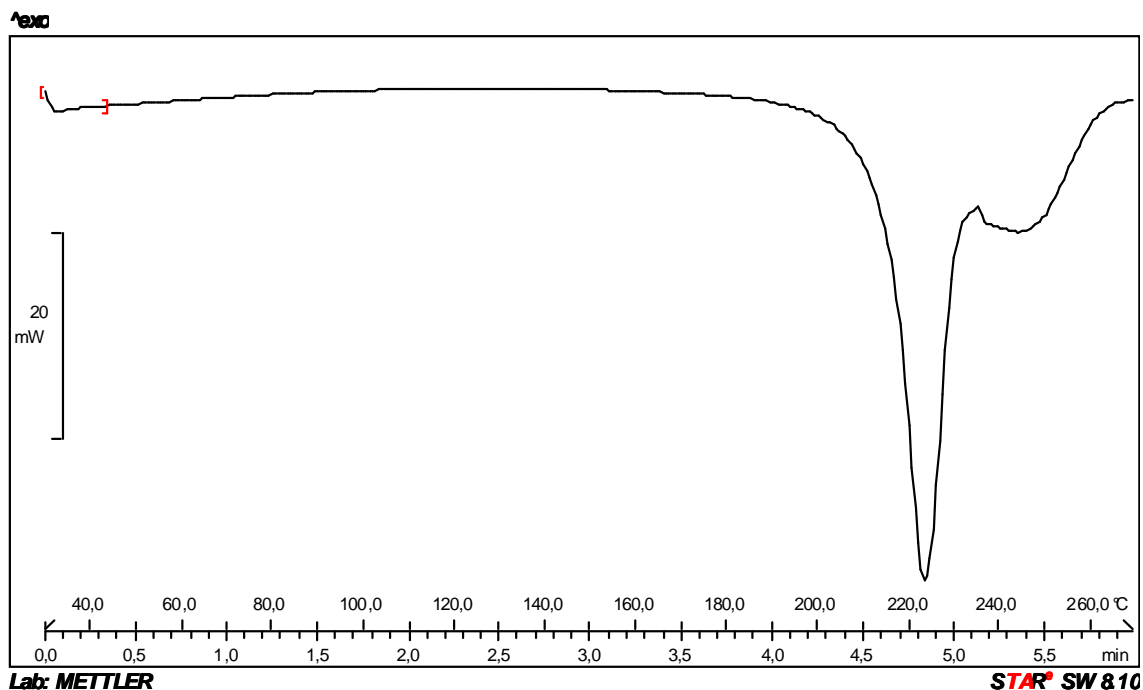


Figura 20. Tracciato DSC dell'albendazolo commerciale (scansione a 40 °C/min)

5.2.2 Diffrazione di raggi X su polvere (PXRD)

In figura 21 è mostrata la sovrapposizione dei diffrattogrammi relativi all'albendazolo commerciale ed ai due ricristallizzati, da metanolo e da dimetilformamide. Si nota come il pattern dell'albendazolo commerciale non sia del tutto sovrapponibile (10.5° , 15° e 30° 2θ) a quello dei due ricristallizzati che invece appaiono perfettamente coincidenti per quanto riguarda la posizione dei picchi. Questa è un'ulteriore conferma del fatto che i ricristallizzati presentino una struttura cristallina differente rispetto a quella dell'albendazolo commerciale. Inoltre, è interessante notare come l'intensità dei picchi del ricristallizzato da dimetilformamide sia di almeno un ordine di grandezza superiore a quello degli altri due prodotti. Ciò è da attribuire al maggior grado di cristallinità del ricristallizzato da dimetilformamide dovuto ai tempi più lunghi di evaporazione del solvente rispetto, ad esempio, a quanto accade con il metanolo.

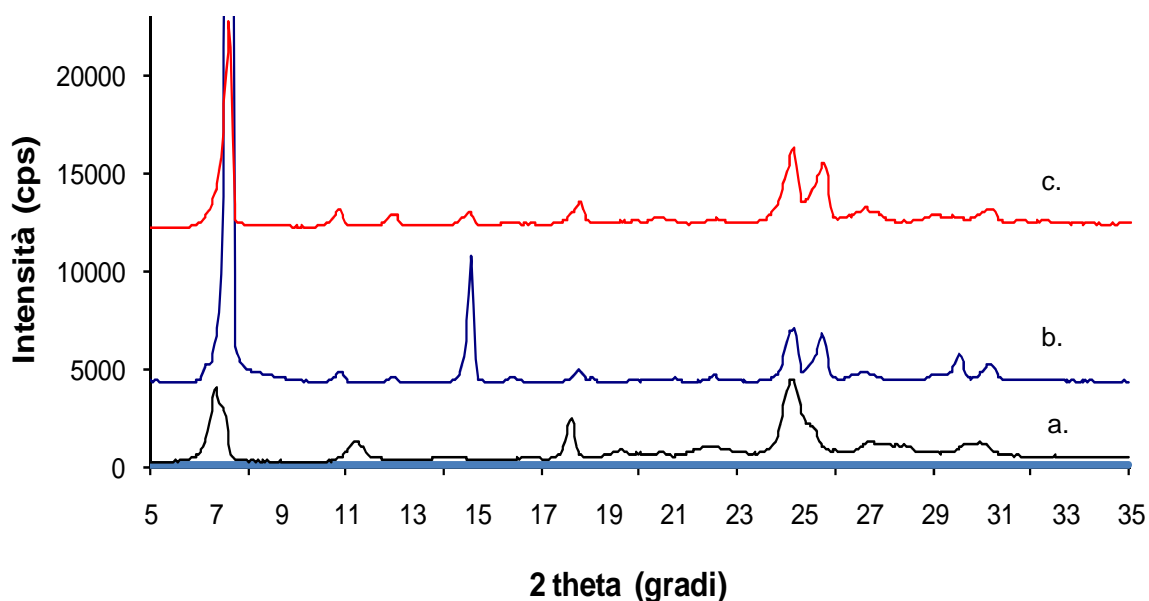


Figura 21. Sovrapposizione dei diffrattogrammi relativi all'albendazolo commerciale (a.) ed ai da prodotti di ricristallizzazione da metanolo (b.) e da dimetilformamide (c.)

5.2.3 Microscopia ottica a luce polarizzata

Le figure 22.a e 22.b mostrano i fotogrammi relativi all'albendazolo ricristallizzato da metanolo e all'albendazolo ricristallizzato da dimetilformamide. Entrambi i cristalli appaiono birifrangenti e con un habitus cristallino differente rispetto a quello osservato per l'albendazolo commerciale (Figura 16). Inoltre, i cristalli dell'albendazolo ricristallizzato da DMF mostrano una morfologia che meglio si adatta ad un'analisi di diffrattometria di raggi X su cristallo singolo.

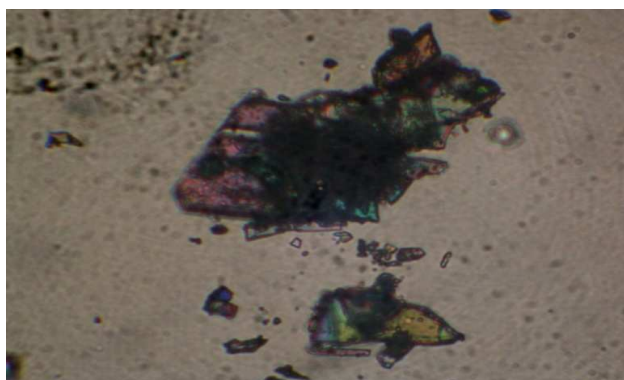


Figura 22.a. Fotogramma dell'albendazolo ricristallizzato da metanolo osservato con microscopio ottico a luce polarizzata

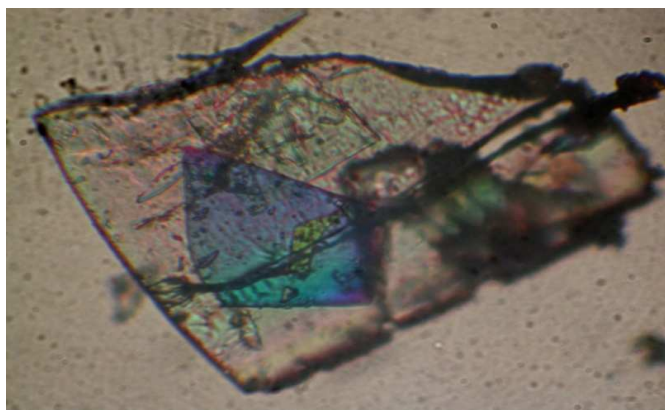


Figura 22.b. Fotogramma dell'albendazolo ricristallizzato da dimetilformamide osservato con microscopio ottico a luce polarizzata

5.2.4 Diffrazione di raggi X su cristallo singolo (SC-XRD)*

In figura 23 è mostrata la struttura ed i numeri atomici del ricristallizzato da dimetilformamide, con gli ellissoidi termici disegnati secondo un livello di probabilità del 50%. Quest'analisi ha consentito di individuare l'impaccamento cristallino dell'albendazolo, che in figura 24 è mostrato secondo l'asse "c" (dall'alto) e secondo l'asse "b" (dal basso).

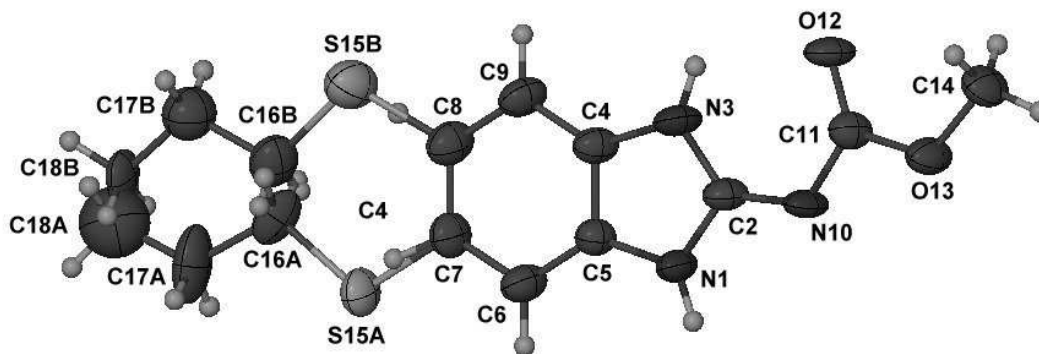


Figura 23. Struttura e numero atomico dell'albendazolo ricristallizzato da dimetilformamide

* Questa analisi è stata condotta presso i laboratori del Department of Chemistry dell'Università di Cape Town dalla dott.ssa D. Cruickshank e dal prof. M.R. Caira

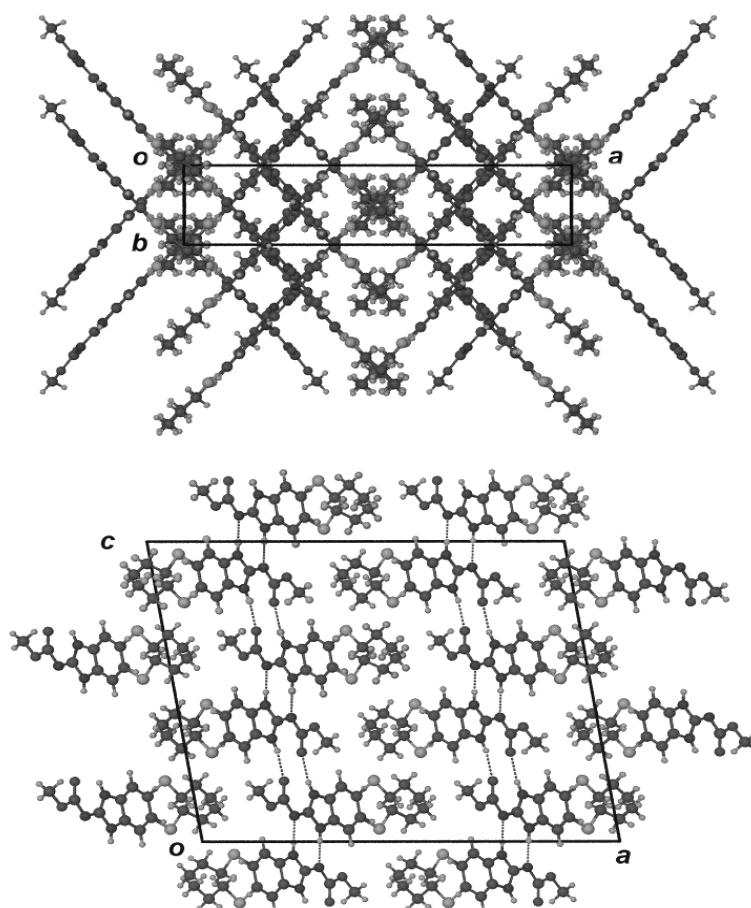


Figura 24. Impaccamento cristallino dell'albendazolo ricristallizzato da dimetilformamide lungo l'asse "c" (top) e lungo l'asse "b" (down)

5.3 Determinazione della solubilità all'equilibrio

I dati relativi alle misure di solubilità in metanolo o in HCl 0.1 N condotte sui campioni preparati secondo quanto descritto nella sezione "Materiali e metodi" (3.2.4) sono riassunti in tabella 5 ed evidenziano differenze di solubilità statisticamente significative ($p < 0.01$ secondo il t-test) tra l'albendazolo commerciale e il prodotto di ricristallizzazione da dimetilformamide.

Tabella 5. Solubilità dell'albendazolo commerciale e del ricristallizzato da dimetilformamide in HCl 0.1 N e in metanolo a 25 °C. Deviazione standard in parentesi (n = 3)

	Solubilità in metanolo	Solubilità in HCl 0.1 N
Albendazolo commerciale	1.45 (0.47)	0.54 (0.17)
Ricristallizzato da DMF	0.72 (0.05)	0.30 (0.07)

Le misure di solubilità sono state riportate in HCl 0.1 N a diverse temperature e utilizzate per costruire le curve di solubilità in funzione della temperatura mostrate in figura 25. Le curve si incrociano ad una temperatura di circa 80 °C che rappresenta la temperatura di transizione alla quale avviene il passaggio dalla forma bassofondente (l'albendazolo ricristallizzato) alla forma altofondente (l'albendazolo commerciale). Questo grafico consente di affermare che i due prodotti cristallini sono tra loro in rapporto enantiotropico, con il ricristallizzato che rappresenta la forma stabile e meno solubile al di sotto del punto di transizione ed il commerciale che rappresenta la forma metastabile e più solubile al di sopra di tale punto.

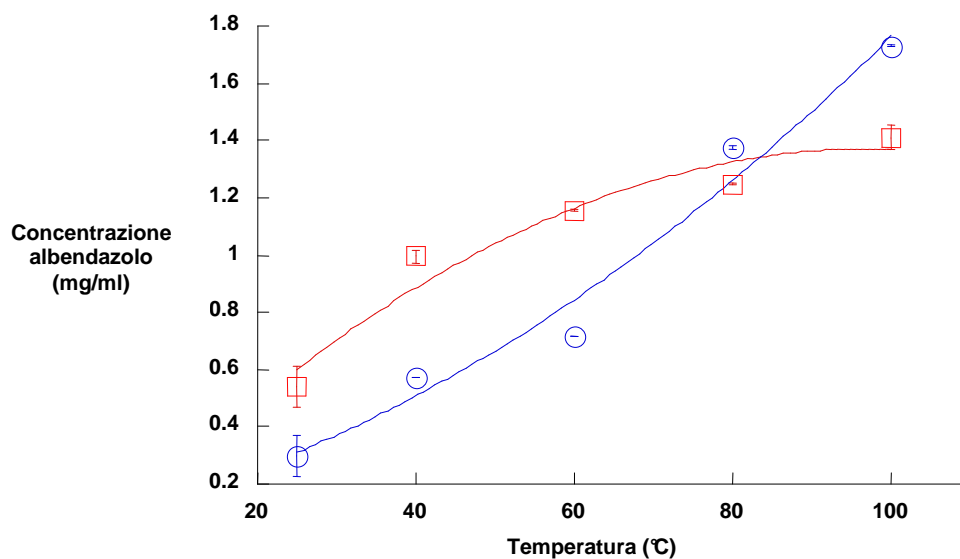


Figura 25. Grafico solubilità in funzione della temperatura relativo all'albendazolo commerciale ed al suo prodotto di ricristallizzazione da metanolo

Con gli stessi dati di solubilità è stato costruito un classico diagramma di Van't Hoff (Figura 26) attraverso il quale è possibile osservare l'esistenza di una relazione lineare tra il logaritmo della solubilità e l'inverso della temperatura assoluta (R^2 : 0.9 e 0.94 per l'albendazolo commerciale e per il ricristallizzato da metanolo rispettivamente); quindi, le entalpie di soluzione apparenti dei due polimorfi possono essere calcolate dalla pendenza delle curve secondo l'equazione:

$$\ln C_s = \frac{-\Delta H_s}{R} \frac{1000}{T} + \beta \quad (22)$$

dove C_s rappresenta la solubilità molare, ΔH_s è l'entalpia di soluzione alla saturazione, R è la costante dei gas, T è la temperatura assoluta e β è una costante.

Sulla base dei valori di entalpia ottenuti (21.2 e 10.4 kJ/mol per il ricristallizzato e per il commerciale rispettivamente) è stata calcolata l'entalpia di transizione ($\Delta H_{I \rightarrow II}$) dall'albendazolo commerciale (Forma I) all'albendazolo ricristallizzato da metanolo (Forma II); essa è risultata essere pari a - 10.8 kJ/mol.

A temperatura e pressione costanti la differenza di energia libera tra le due forme, ΔG_T , può essere calcolata dal logaritmo del rapporto tra i valori di solubilità delle due forme stesse:

$$\Delta G_T = -RT \ln \frac{C_{smetastabile}}{C_{sstabile}} \quad (23)$$

A 25 °C il cambiamento di energia libera rilevato dai dati di solubilità ottenuti in soluzioni acquose di HCl è risultato pari a - 1.5 kJ/mol. Questo valore non presenta una differenza statisticamente significativa rispetto a quello ricavato dai dati di solubilità in metanolo alla stessa temperatura (- 1.7 kJ/mol) giustificando così il calcolo delle relazioni termodinamiche sulla base della legge di Henry e il fatto che i valori ottenuti sono indipendenti dal solvente utilizzato.

I valori di ΔG_T sono riportati in figura 27 in funzione della temperatura assoluta in un intervallo compreso tra 25° e 100 °C. In questo grafico la temperatura di transizione può essere stimata graficamente individuando il punto in cui ΔG_T diventa zero.

Infine, l'entropia di transizione dalla Forma I alla Forma II ad una determinata temperatura è stata calcolata sulla base della seguente equazione:

$$\Delta S_T = \frac{\Delta H_{I \rightarrow II} - \Delta G_T}{T} \quad (24)$$

A 25 °C ΔS_T è pari a -31.5 J/K mol. Alla temperatura di transizione (350 K) ΔG_T risulta pari a zero e considerando l'equazione (24) si calcola una variazione di entropia di - 30.9 J / K mol.

Questi dati mettono in evidenza che la nuova forma cristallina isolata dell'albendazolo e quella disponibile in commercio costituiscono una coppia enantiotropica dato che l'albendazolo commerciale risulta metastabile a temperatura ambiente e termodinamicamente stabile sopra i 350 K.

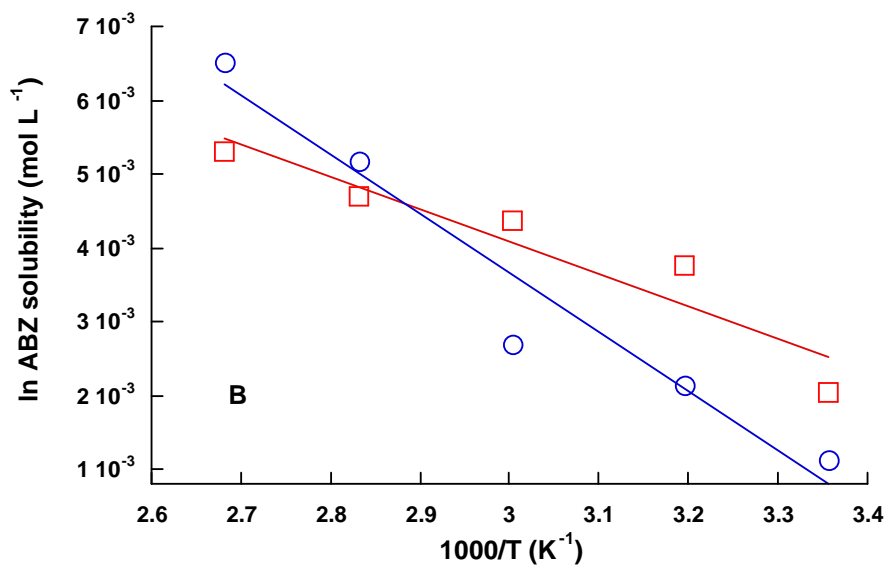


Figura 26. Diagramma di Van't Hoff dell'albendazolo commerciale (Forma I, quadrati) e dell'albendazolo ricristallizzato da metanolo (Forma II, cerchi).

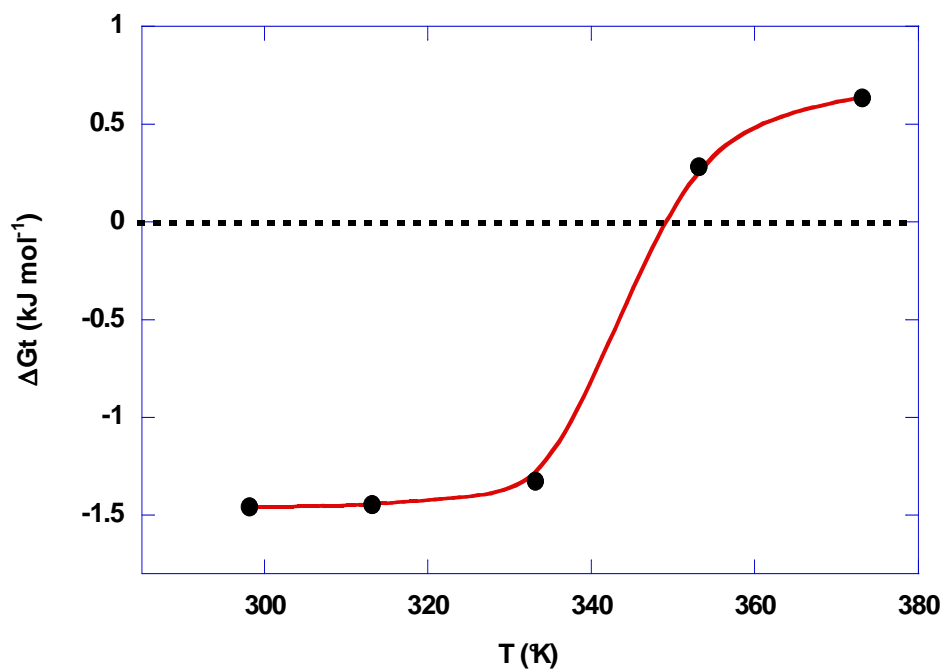


Figura 27. Variazione di energia libera di Gibbs in funzione della temperatura per la coppia albendazolo commerciale (Forma I) - albendazolo ricristallizzato da metanolo (Forma II)

L'isolamento di questa nuova fase cristallina, in rapporto enantiotropico con la forma commerciale, va considerato con molta attenzione dal punto di vista delle applicazioni farmaceutiche. Infatti, l'uso di una forma metastabile può essere vantaggioso (ad esempio, per sfruttare la più alta solubilità nel tratto gastro-intestinale) ma solo quando le cinetiche di conversione sono lente, ovvero quando la barriera energetica tra una forma e l'altra non può essere superata in determinate condizioni di stoccaggio del materiale. A tal proposito la forma metastabile dovrebbe essere conservata in assenza di umidità e al fresco e non dovrebbe avere un particle-size eccessivamente ridotto. Inoltre, molte operazioni farmaceutiche potrebbero provocare il passaggio dalla forma metastabile alla forma stabile, specialmente quelle in cui la conversione risulti mediata da un processo di solubilizzazione⁴⁵.

In generale, è possibile affermare che l'albendazolo ricristallizzato (da metanolo o da dimetilformamide), nonostante rappresenti la forma stabile della coppia enantiotropica, sia relativamente stabile come dimostrano i risultati delle analisi DSC condotte con una scansione di 5 °C/min. In effetti, è sufficiente una velocità di scansione così bassa per osservare la fusione e ricristallizzazione della forma stabile.

L'albendazolo ricristallizzato da metanolo è stato anche sottoposto a riscaldamento; mantenuto alla temperatura di 110 °C in atmosfera di azoto per 48 ore non ha mostrato alcuna transizione di fase mentre sottoposto alla temperatura di 130 °C per 20 ore si è convertito completamente nella forma altofondente.

5.4 Valutazione della miscibilità tra l'albendazolo e i vari CCF_s mediante la costruzione dei diagrammi di fase

Attraverso la costruzione dei diagrammi di fase è stata valutata la miscibilità in fase solida e la possibile formazione di co-cristalli tra l'albendazolo ed i vari CCF_s sperimentati.

Le miscele tra l'albendazolo e i diversi eccipienti (CCF_s) sono state preparate secondo quanto descritto nella sezione "Materiali e Metodi" (3.2.1) ed i risultati ottenuti dalle successive analisi DSC condotte su tali miscele hanno consentito di costruire una serie di diagrammi di fase, confrontati di volta in volta con i profili teorici calcolati a partire dalla forma semplificata dell'equazione di Schroeder Van-Laar⁴⁶ per l'albendazolo e i vari CCF_s rispettivamente

$$\ln x = \frac{\Delta H_f^A}{R} \left(\frac{1}{T_f^A} - \frac{1}{T_f} \right) \quad (25)$$

dove x è la frazione molare del componente più abbondante di una miscela la cui fusione termina a T_f ; ΔH_f^A e T_f sono rispettivamente l'entalpia di fusione e il punto di fusione del componente puro; R è la costante dei gas.

Nelle figure 28-34 è mostrata la sovrapposizione tra i diagrammi di fase teorici e quelli sperimentali relativi a ciascuna miscela ABZ:CCF_s, fatta eccezione per il sistema binario ABZ:ascorbato di sodio nel qual caso non è stato possibile costruire alcun diagramma poichè la notevole decomposizione cui va incontro l'eccipiente non consente di individuare in nessuna miscela il punto di fusione dell'eccipiente stesso.

A differenza di quanto emerge dall'andamento delle curve teoriche, che in tutte le miscele sembrano avvicinarsi e in alcuni casi incontrarsi in un range compreso tra 0.7 e 0.9 molare di eccipiente e 0.3 – 0.1 M di albendazolo, le curve sperimentali, invece, sembrano svilupparsi indipendentemente l'una dall'altra. Inoltre, se le curve sperimentali dell'eccipiente mostrano in tutti i casi un andamento poco o per nulla sovrapponibile a quello delle corrispondenti curve teoriche, tutte le curve sperimentali dell'albendazolo (fatta eccezione per l'albendazolo in miscela con l'acido ascorbico) mostrano una buona sovrapposizione, fino ad una concentrazione equimolare dei due componenti, con le corrispondenti curve teoriche. Ciò è indice di una significativa

miscibilità dell'albendazolo e dell'eccipiente in fase liquida nell'intervallo di concentrazione del principio attivo che va da 1 M a 0.5 M. Non è, invece, possibile parlare di alcuna miscibilità in fase solida né della formazione di un terzo componente⁴⁷.

È interessante notare, anche, che i punti di fusione dell'albendazolo in miscela con l'isonicotinamide, l'acido ascorbico, l'acido glutarico o l'acido citrico mostrano oscillazioni molto più ampie (tra 40 e 60 K) rispetto a quelle osservate nelle restanti miscele ad indicare come il farmaco risenta della presenza in miscela dell'eccipiente.

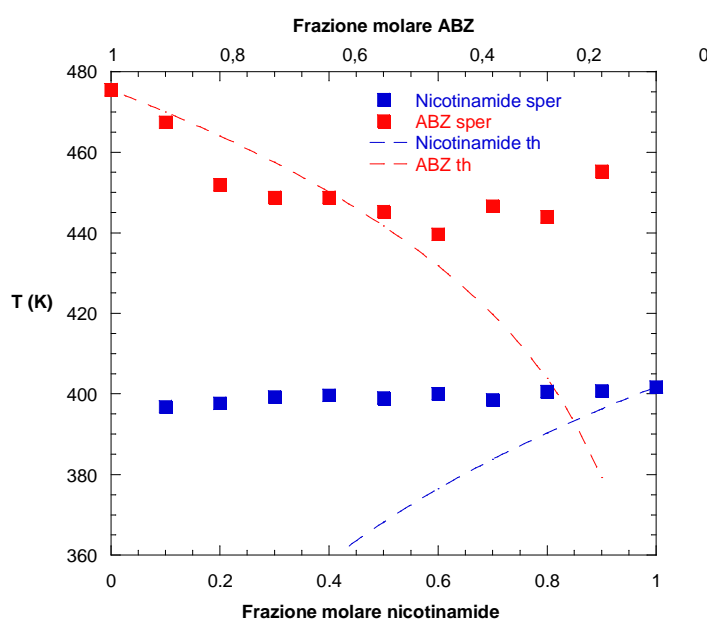


Figura 28. Sovrapposizione del diagramma di fase teorico con il diagramma di fase sperimentale relativo alle miscele albendazolo : nicotinamide

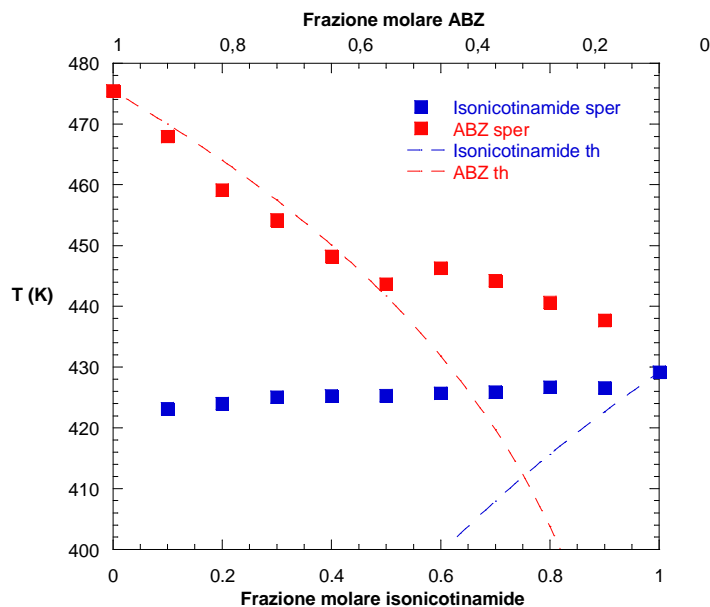


Figura 29. Sovrapposizione del diagramma di fase teorico con il diagramma di fase sperimentale relativo alle miscele albendazolo : isonicotinamide

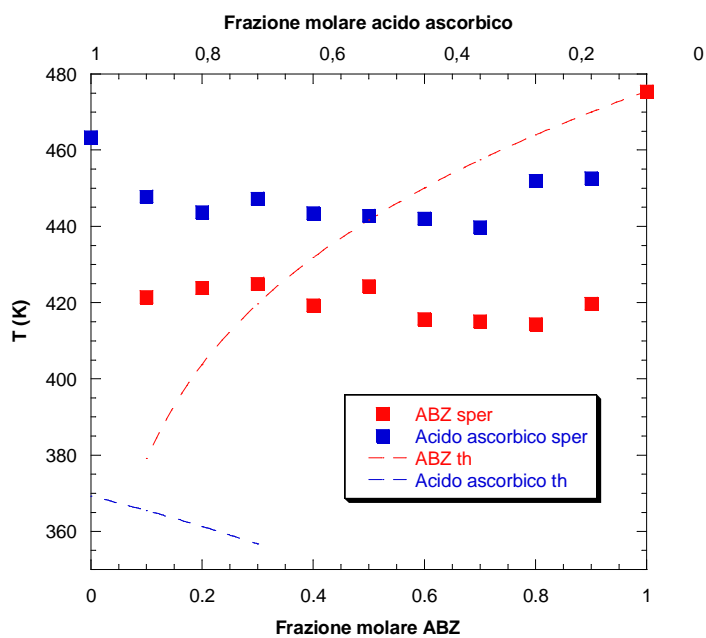


Figura 30. Sovrapposizione del diagramma di fase teorico con il diagramma di fase sperimentale relativo alle miscele albendazolo : acido ascorbico

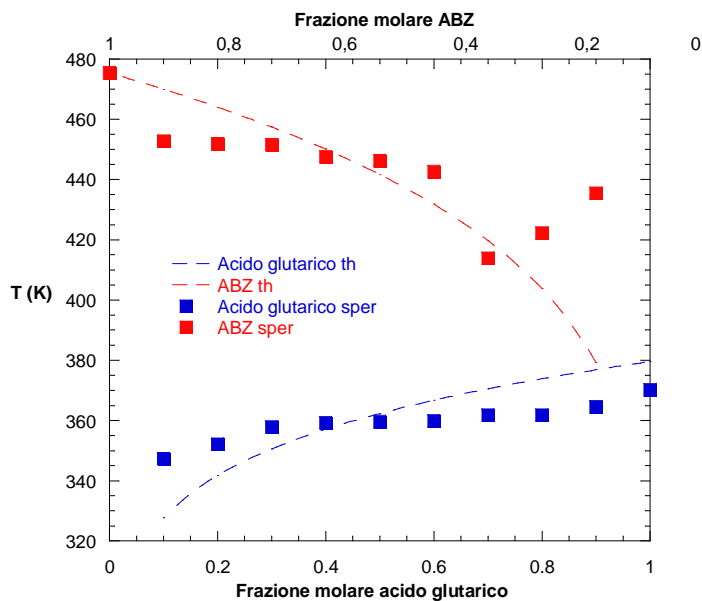


Figura 31. Sovrapposizione del diagramma di fase teorico con il diagramma di fase sperimentale relativo alle miscele albendazolo : acido glutarico.

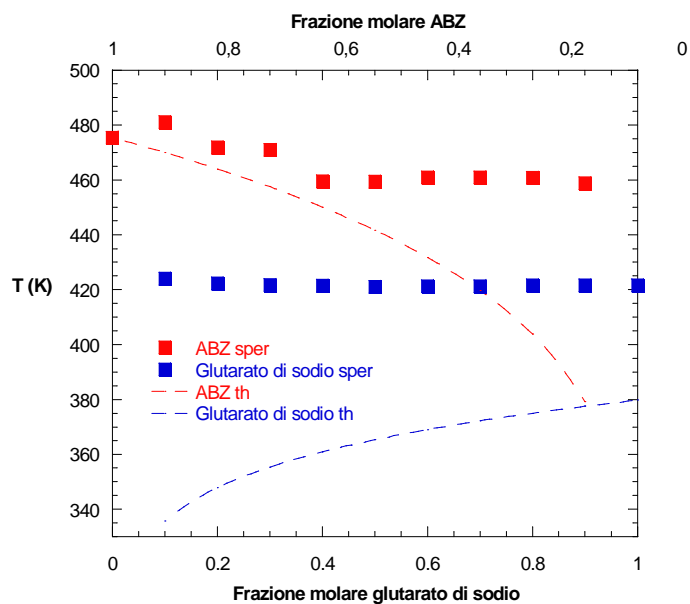


Figura 32. Sovrapposizione del diagramma di fase teorico con il diagramma di fase sperimentale relativo alle miscele albendazolo : glutarato di sodio.

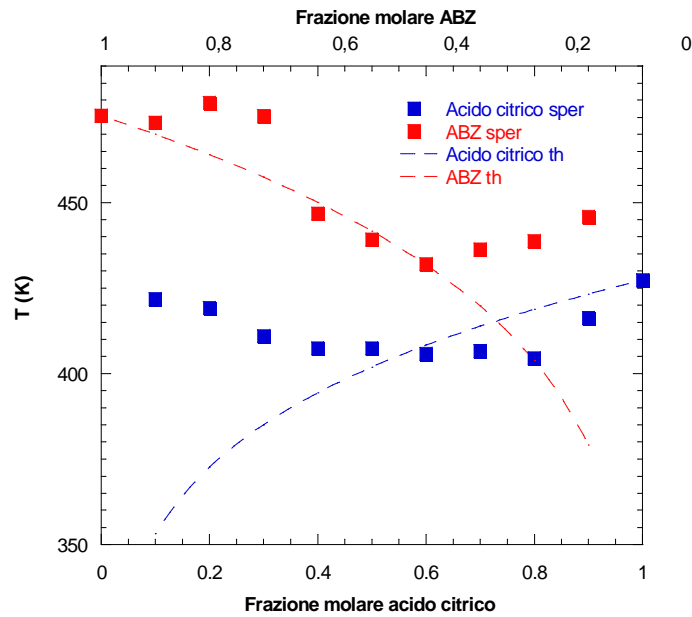


Figura 33. Sovrapposizione del diagramma di fase teorico con il diagramma di fase sperimentale relativo alle miscele albandazolo : acido citrico

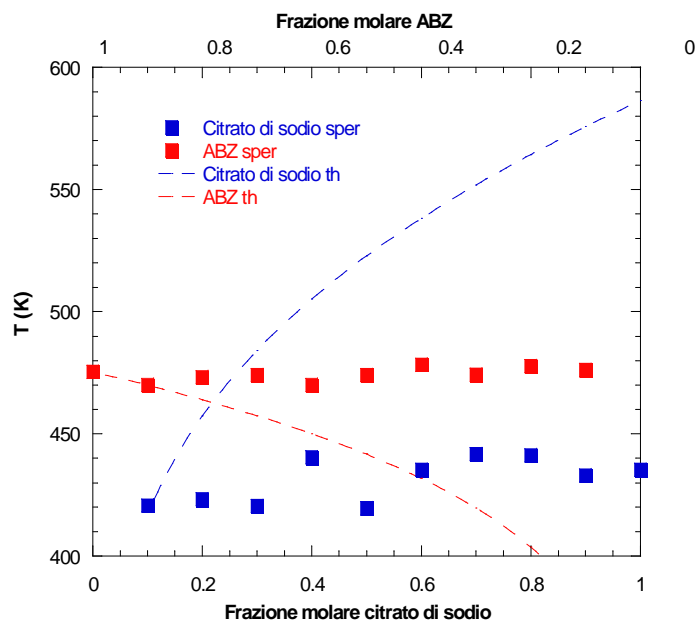


Figura 34. Sovrapposizione del diagramma di fase teorico con il diagramma di fase sperimentale relativo alle miscele albandazolo : citrato di sodio

5.5 Prove di co-cristallizzazione

Nonostante l'immiscibilità in fase solida tra l'albendazolo ed i vari eccipienti testati come suggerito dai diagrammi di fase ottenuti, sono state effettuate una serie di prove di co-cristallizzazione e complessazione con ciclodestrine utilizzando varie metodiche, diversi solventi ed altrettanti eccipienti.

Come metodi sono stati utilizzati la cocristallizzazione da solvente, il grinding, il kneading e la coprecipitazione.

Cocristallizzazione da solvente

Solventi utilizzati: acetone, 1,4-diossano, metiletilchetone

CCF_s utilizzati: nicotinamide, isonicotinamide, saccarina, acido citrico

Cocristallizzazione mediante grinding

CCF_s utilizzati: saccarina, nicotinamide, isonicotinamide, acido citrico monoidrato ed acido tartarico

Complessazione mediante kneading

Solvente utilizzato: acqua

Ciclodestrine utilizzate: α -CD; β -CD ; γ -CD; DIMEB; TRIMEB; TRIMEA

Complessazione mediante co-precipitazione

Solvente utilizzato: acqua

Ciclodestrine utilizzate. α , β , γ – CD, TRIMEA, TRIMEB e DIMEB, β -CD acetilata e γ -CD acetilata

In nessun caso è stata osservata la formazione di un co-cristallo o di complessi tra l'albendazolo ed il secondo componente.

5.6 Studi di solubilità dell'albendazolo

5.6.1 Solubilità dell'albendazolo in soluzioni acquose di nicotinamide e di isonicotinamide

In figura 35 è presentato il diagramma di solubilità di fase in soluzione acquosa di nicotinamide relativo all'albendazolo tal quale ed ai due ricristallizzati; in esso si osserva come la solubilità acquosa dell'albendazolo ricristallizzato da metanolo e da dimetilformamide cresca in modo apprezzabile a partire da soluzioni aventi una concentrazione di nicotinamide di 1.6 M, mentre nel caso dell'albendazolo commerciale sono necessarie concentrazioni più alte di eccipiente (2.4 M) per osservare un incremento di solubilità. Per tutti i prodotti la solubilità acquosa del principio attivo si mantiene su valori dell'ordine di 10^{-4} mol/L. Il valore massimo si ottiene per l'albendazolo ricristallizzato da metanolo in soluzioni 3.2 M di nicotinamide ed è pari a $3.37 \cdot 10^{-4}$ mol/L (0.089 mg/mL).

E' possibile, quindi, parlare di un incremento della solubilità acquosa dell'albendazolo in presenza di concentrazioni crescenti di nicotinamide in soluzione, sebbene sia necessario portarsi a molarità dell'ordine di 0.8 M per raggiungere valori di solubilità significativamente diversi dal valore di solubilità che si osserva in assenza di nicotinamide.

Tuttavia, la solubilità massima raggiunta si mantiene a valori ancora molto bassi per poter prevedere un effetto biofarmaceutico positivo.

Si deve sottolineare che, ad eccezione del dato riportato in soluzioni di nicotinamide 2.4 M, si osserva in tutti i casi una solubilità apparente dell'albendazolo ricristallizzato (da entrambi i solventi) significativamente più elevata rispetto a quella dell'albendazolo commerciale.

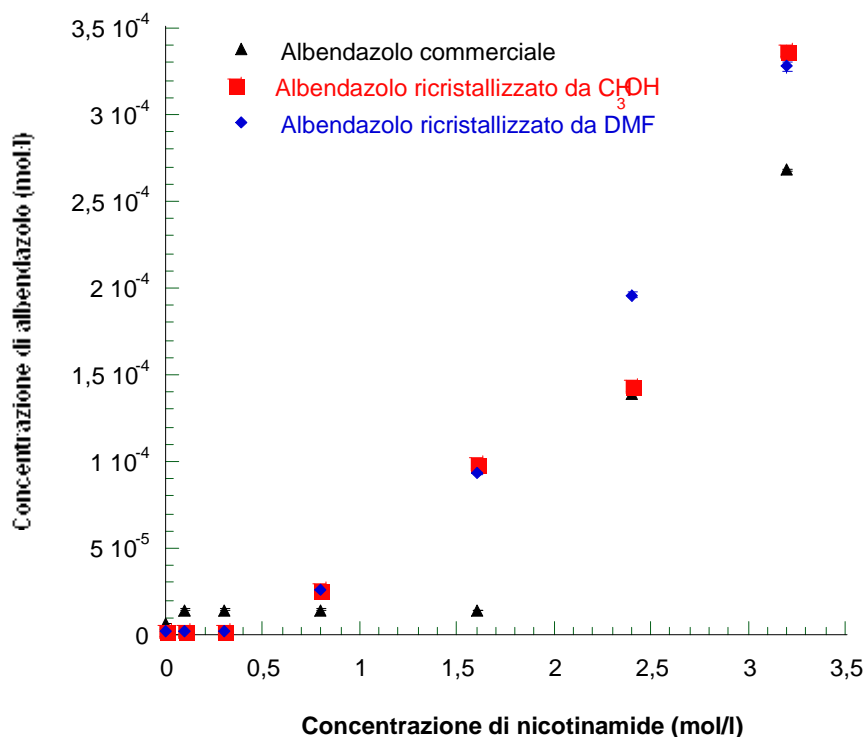


Figura 35. Diagramma di solubilità di fase dell'albendazolo (commerciale e ricristallizzati) in soluzioni acquose di nicotinamide a diversa concentrazione.

In Figura 36 è riportato il diagramma di solubilità di fase dell'albendazolo tal quale e dei ricristallizzati in soluzioni a concentrazione molare crescente di isonicotinamide. In questo caso la concentrazione massima di isonicotinamide impiegata è stata di 0.8 M, poiché questo valore rappresenta il limite di solubilità della sostanza in acqua a 25°C. A differenza di quanto osservato nel caso della nicotinamide, con l'isonicotinamide è possibile evidenziare un incremento della solubilità acquosa del farmaco già a partire da una concentrazione 0.1 M della sostanza idrotropica. Inoltre, ad una concentrazione di isonicotinamide di 0.8 M si raggiunge un valore di solubilità massima di $6.78 \cdot 10^{-5}$ mol/L (0.018 mg/mL) per l'albendazolo ricristallizzato da metanolo, ovvero solo circa 5 volte inferiore a quello raggiunto in soluzioni contenenti una concentrazione di nicotinamide 3.2 M.

Rispetto a quanto osservato con la nicotinamide, in questo caso la differenza di solubilità apparente tra le varie fasi cristalline riportata in figura 37 segue l'ordine:

albendazolo ricristallizzato da metanolo > albendazolo commerciale > albendazolo ricristallizzato da dimetilformamide.

Questi risultati dimostrano come una piccola variazione nella struttura di una molecola possa influire sulle proprietà idrotropiche della molecola stessa; infatti, l'isonicotinamide mostra una maggiore tendenza ad interagire in soluzione con l'albendazolo rispetto alla nicotinamide nonostante la differenza tra le due molecole sia rappresentata solamente dalla posizione del gruppo amidico sull'anello piridinico. Quest'ultima variazione strutturale conferisce caratteristiche più idrofobiche all'isonicotinamide rispetto alla nicotinamide.

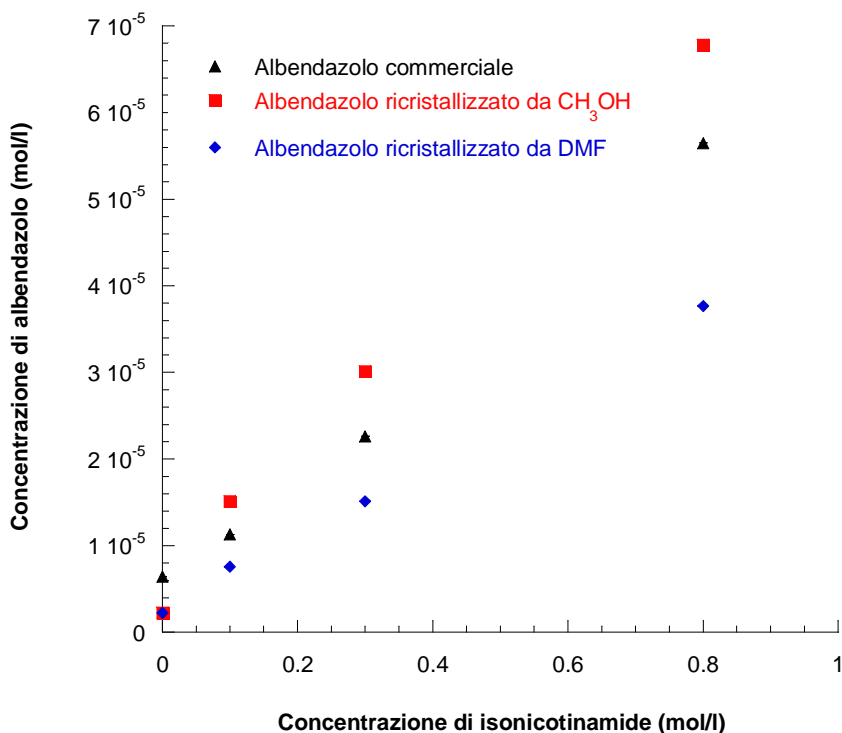


Figura 36. Diagramma di solubilità di fase dell'albendazolo (commerciale e dei ricristallizzati) in soluzioni acquose di isonicotinamide a diverse concentrazioni.

In tabella 6 sono presentate le costanti di associazione ($K_{1:1}$ e $K_{1:2}$) calcolate con il metodo di Higuchi e Connors per i tre prodotti cristallini nell'ipotesi della formazione

di un complesso a stechiometria 1:1 o 1:2 tra albendazolo e nicotinamide o tra albendazolo e isonicotinamide.

Tabella 6. Costanti di associazione ($K_{1:1}$ e $K_{1:2}$) per i complessi tra ciascun prodotto cristallino e nicotinamide o isonicotinamide. Deviazione standard in parentesi.

		Complessi con ABZ commerciale	Complessi con ABZ da CH ₃ OH	Complessi con ABZ da DMF
NA	$K_{1:1}$	1.28 (0.40)	13.84 (7.06)	14.16 (1.23)
	$K_{1:2}$	2.10 (1.02)	0.89 (0.61)	0.69 (0.0880)
IsoNA	$K_{1:1}$	10.14 (1.10)	35.40 (0.00)	17.7 (0.00)
	$K_{1:2}$	0.04 (0.13)	0.03 ($2.45 \cdot 10^{-5}$)	0.13 (0.00)

ABZ = albendazolo NA = nicotinamide IsoNA = isonicotinamide

Si osserva, in generale, che i valori delle costanti di aggregazione risultano in tutti i casi piuttosto bassi. Inoltre per entrambe le sostanze testate i valori di $K_{1:1}$ sono sempre maggiori dei valori delle costanti $K_{1:2}$, ad eccezione del complesso tra nicotinamide e albendazolo commerciale nel quale il valore di $K_{1:2}$ risulta essere superiore a quello di $K_{1:1}$. Tuttavia le differenze tra i due valori risultano essere statisticamente non significative ($p = 0.16$ da T-test).

Si può, quindi, affermare che nei sistemi studiati si osserva una debole tendenza a formare complessi con stechiometria 1:1, mentre la formazione di complessi con stechiometria 1:2 risulta irrilevante.

Infine, si deve sottolineare che in tutti i casi le costanti $K_{1:1}$, relative all'interazione dell'albendazolo con isonicotinamide, risultano significativamente più elevate rispetto a quelle ottenute con nicotinamide.

5.6.2 Solubilità dell'albendazolo in soluzioni acquose di acido ascorbico e ascorbato di sodio

In figura 37 è mostrato il diagramma di solubilità di fase relativo all'albendazolo tale quale ed ai ricristallizzati in soluzioni di acido ascorbico. Si osserva un incremento della solubilità acquosa del farmaco in presenza di concentrazioni molari crescenti di questo eccipiente. In particolare, i valori di solubilità emersi si attestano tra 10^{-5} e 10^{-3} mol/L per tutti e tre i prodotti e risultano essere superiori di un ordine di grandezza rispetto a quelli osservati per lo stesso albendazolo in soluzioni acquose di nicotinamide. Tali valori, invece, appaiono più vicini a quelli osservati per l'isonicotinamide e, analogamente, l'albendazolo risente dell'effetto idrotropico già ad una concentrazione 0.1 M di acido ascorbico. La solubilità acquosa massima si ha per l'albendazolo ricristallizzato da metanolo in soluzioni 3.2 M di acido ascorbico ed è di $3.69 \cdot 10^{-3}$ mol/L (0.980 mg/mL); per i restanti due prodotti la solubilità risulta essere pari a $2.75 \cdot 10^{-3}$ mol/L (0.73 mg/mL) e $2.92 \cdot 10^{-3}$ mol/L (0.78 mg/mL) per il prodotto commerciale e per il ricristallizzato da dimetilformamide rispettivamente.

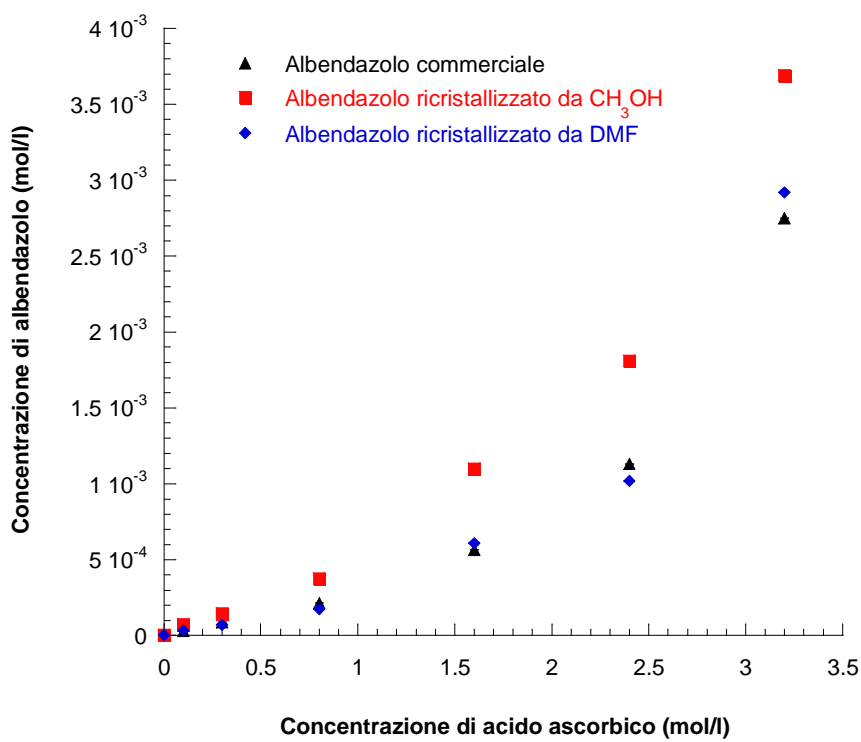


Figura 37. Diagramma di solubilità di fase dell'albendazolo (commerciale e ricristallizzati) in soluzioni acquose di acido ascorbico a diverse concentrazioni.

Sono state, quindi, effettuate prove di solubilità in ascorbato di sodio. Il diagramma di solubilità di fase che ne deriva (Figura 38) mostra un incremento della solubilità acquosa del prodotto commerciale a partire da una concentrazione della sostanza idrotropica di 2.4 M per l'albendazolo tal quale; l'albendazolo ricristallizzato sia da metanolo sia da dimetilformamide, invece, risente dell'effetto idrotropico già a concentrazioni 1.6 M di ascorbato di sodio. La solubilità massima raggiunta, è circa un ordine di grandezza inferiore a quella raggiunta in soluzioni acquose di acido ascorbico.

Pertanto si può affermare che l'albendazolo mostra una maggiore tendenza ad interagire in soluzione con l'acido ascorbico, piuttosto che con il suo sale sodico.

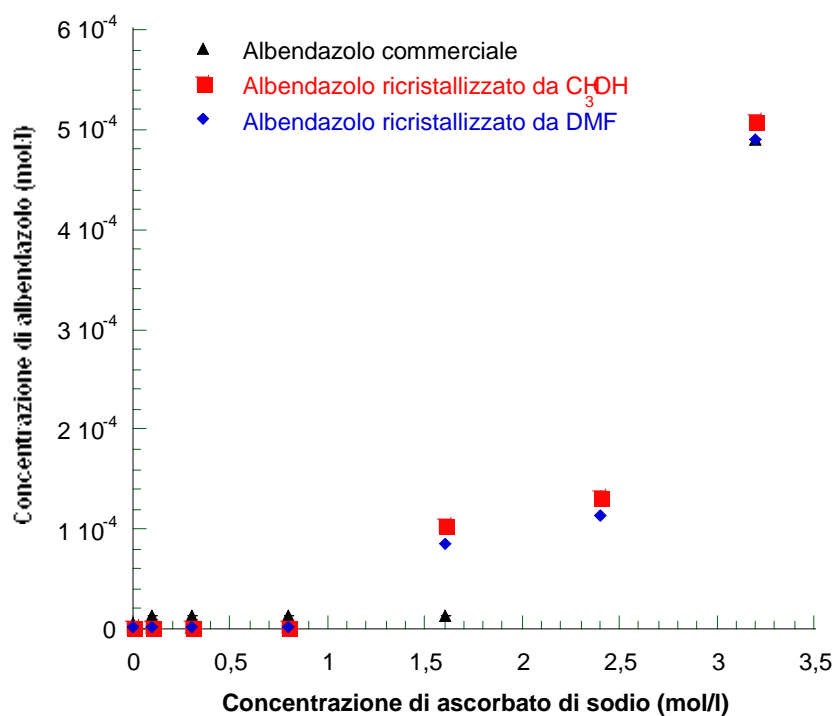


Figura 38. Diagramma di solubilità di fase dell'albendazolo (commerciale e ricristallizzati) in soluzioni acquose di ascorbato di sodio a diverse concentrazioni.

Tale dato è confermato dai valori delle costanti di associazione riportati in tabella 7.

Tabella 7. Costanti di associazione ($K_{1:1}$ e $K_{1:2}$) per i complessi tra ciascun prodotto cristallino e acido ascorbico o ascorbato di sodio. Deviazione standard in parentesi.

		Complessi con ABZ commerciale	Complessi con ABZ da CH ₃ OH	Complessi con ABZ da DMF
ACIDO ASCORBICO	$K_{1:1}$	159.29 (0.00)	582.62 (9.41)	478.39 (0.00)
	$K_{1:2}$	0.05 (0.00)	0.04 (0.0044)	0.05 (0.00)
ASCORBATO DI SODIO	$K_{1:1}$	47.6 (1.10)	89.09 (0.00)	79.66 (0.00)
	$K_{1:2}$	0.16 (0.0036)	0.05 (0.00)	0.05 (0.00)

Anche in questo caso tutti i valori delle costanti $K_{1:2}$ risultano essere insignificanti.

In tutti i casi, i valori delle costanti $K_{1:1}$ ottenuti con acido ascorbico risultano elevati indicando una spiccata tendenza dell'albendazolo ad aggregare con i due eccipienti.

In accordo con la migliore solubilità acquosa del farmaco e analogamente a quanto osservato per la coppia nicotinamide - isonicotinamide i valori di $K_{1:1}$ risultano essere più elevati per l'eccipiente più lipofilo (acido ascorbico) rispetto a quelli misurati con l'eccipiente più idrofilo (ascorbato di sodio).

Considerando l'acido ascorbico si ottiene il valore di $K_{1:1}$ più elevato con l'albendazolo ricristallizzato da metanolo, mentre con l'albendazolo ricristallizzato da dimetilformamide il valore risulta minore. Il valore della $K_{1:1}$ calcolata per l'albendazolo commerciale risulta significativamente più basso. Anche nel caso dell'ascorbato di sodio, la $K_{1:1}$ è più alta per i ricristallizzati rispetto al prodotto commerciale.

5.6.3 Solubilità dell'albendazolo in soluzioni acquose di acido glutarico e glutarato di sodio

E' stata misurata la solubilità dell'albendazolo in soluzioni acquose contenenti concentrazioni crescenti di acido glutarico ed anche con quest'eccipiente il farmaco mostra un incremento della sua solubilità acquosa. In figura 39 è mostrato il diagramma di solubilità di fase relativo all'albendazolo tal quale e ai ricristallizzati in soluzioni acquose di acido glutarico. I valori di solubilità acquosa emersi si attestano attorno a $10^{-2} - 10^{-4}$ mol/L. In presenza di acido glutarico l'albendazolo mostra un aumento di solubilità già ad una concentrazione di 0.8 M; la solubilità acquosa massima si ha per l'albendazolo ricristallizzato da metanolo in soluzione 3.2 M di acido glutarico ed è di 0.0085 mol/L (2.26 mg/mL).

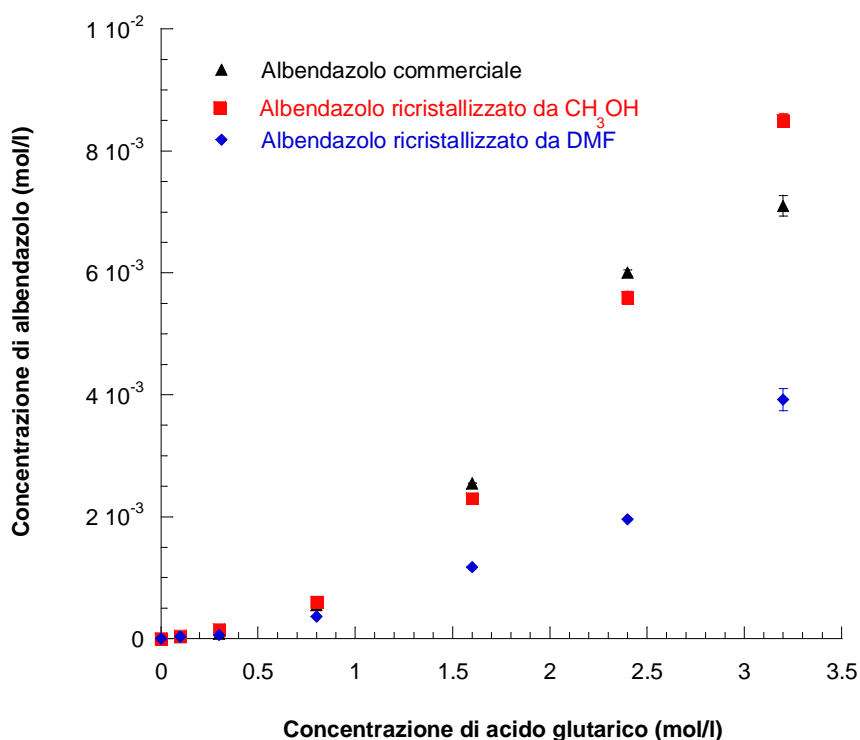


Figura 39. Diagramma di solubilità di fase dell'albendazolo (commerciale e ricristallizzati) in soluzioni acquose di acido glutarico a diverse concentrazioni.

Il diagramma di solubilità di fase dell'albendazolo in soluzioni contenenti concentrazioni crescenti di glutarato di sodio (Figura 40) mostra come l'azione idrotropica del sale si manifesti a partire da una concentrazione di 1.6 M, sia per l'albendazolo tal quale sia per i ricristallizzati. In particolare, i valori di solubilità acquosa emersi per i tre prodotti, in concentrazioni di sostanza idrotropica comprese tra 0.1 M e 3.2 M si attestano attorno a 10^{-6} – 10^{-4} mol/L (pari a 0.0016–0.145, 0.0006–0.129 e 0.0006–0.129 mg/mL rispettivamente per l'albendazolo commerciale, il prodotto ricristallizzato da metanolo e quello ricristallizzato da dimetilformamide).

I risultati ottenuti con questo eccipiente consentono di affermare che ad una concentrazione di glutarato di sodio pari a 3.2 M si ottiene un valore di solubilità dell'ordine di 10^{-4} mol/L per i tre prodotti cristallini dell'albendazolo, simile a quello raggiunto nelle soluzioni contenenti una concentrazione di acido glutarico pari a 0.8 M. Questo conferma quanto detto precedentemente per la coppia acido ascorbico - ascorbato di sodio ovvero la maggiore tendenza dell'albendazolo ad interagire con l'acido glutarico per le sue migliori proprietà idrofobiche rispetto al corrispondente sale sodico.

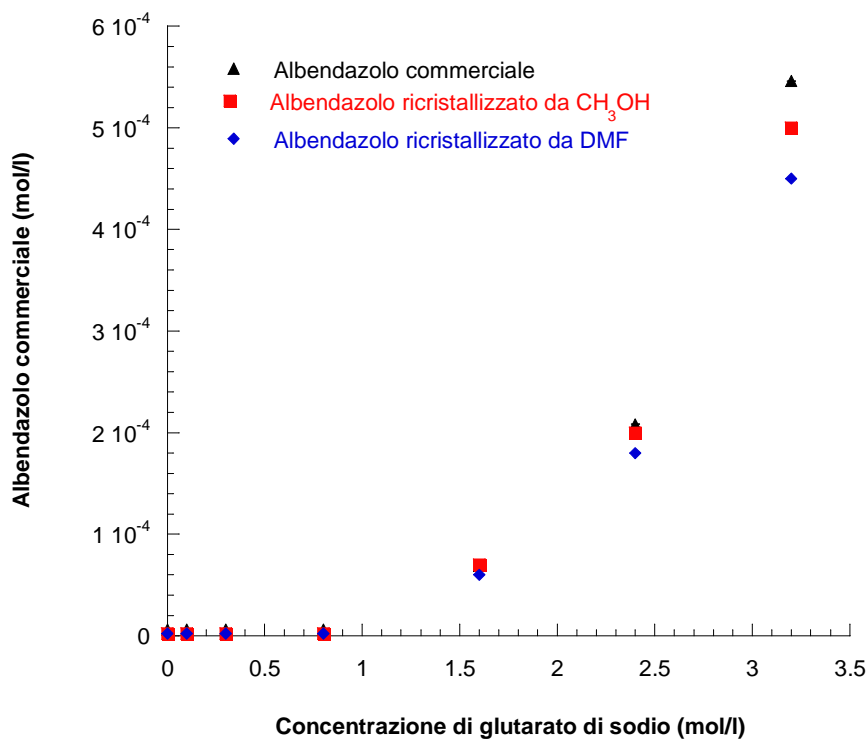


Figura 40. Diagramma di solubilità di fase dell'albendazolo (commerciale e ricristallizzati) in soluzioni acquose di glutarato di sodio a diverse concentrazioni.

Questa osservazione è confermata dai valori delle costanti $K_{1:1}$ riportati in tabella 8. E' da notare, in particolare, che, nel complesso dell'albendazolo ricristallizzato da metanolo con acido glutarico, la $K_{1:1}$ risulta piuttosto alta, mentre la $K_{1:1}$ dell'albendazolo ricristallizzato da dimetilformamide è circa la metà della precedente. La $K_{1:1}$ del complesso con albendazolo commerciale è leggermente inferiore a quella del complesso con albendazolo ricristallizzato da dimetilformamide. Le $K_{1:2}$ sono, invece, molto simili tra loro ed anche in questo caso insignificanti.

Le $K_{1:1}$ calcolate per i complessi con glutarato di sodio sono, invece, molto simili nei complessi dell'albendazolo ricristallizzato da entrambi i solventi, mentre quella dell'albendazolo commerciale è più bassa.

Tabella 8. Costanti di associazione ($K_{1:1}$ e $K_{1:2}$) per i complessi tra ciascun prodotto cristallino e acido glutarico o glutarato di sodio. Deviazione standard in parentesi.

		Complessi con ABZ commerciale	Complessi con ABZ da CH ₃ OH	Complessi con ABZ da DMF
ACIDO GLUTARICO	$K_{1:1}$	401.97 (2.22)	1271.35 (84.96)	542.70 (21.95)
	$K_{1:2}$	0.23 (0.0030)	0.27 (0.0389)	0.31 (0.0254)
GLUTARATO DI SODIO	$K_{1:1}$	46.04 (1.10)	117.29 (3.13)	110.65 (0.00)
	$K_{1:2}$	0.13 (0.0043)	0.14 (0.0047)	0.14 (0.00)

5.6.4 Solubilità dell'albendazolo in soluzioni acquose di acido citrico e citrato di sodio

In figura 41 è presentato il diagramma di solubilità di fase relativo all'albendazolo tal quale ed ai ricristallizzati. In soluzioni acquose di acido citrico si osserva come la solubilità acquosa dei tre prodotti cristallini cominci ad essere apprezzabile a partire da soluzioni aventi una concentrazione di acido citrico di 1.6 M. In particolare, i valori di solubilità acquosa emersi sono dell'ordine di 10^{-3} M e risultano leggermente più elevati per l'albendazolo ricristallizzato da metanolo rispetto al prodotto tal quale e, soprattutto, al ricristallizzato da dimetilformamide. La solubilità acquosa massima si ha per l'albendazolo ricristallizzato da metanolo in soluzione 3.2 M ed è di 0.0120 mol/L (3.2 mg/mL).

Tali valori sono decisamente i più alti osservati tra i vari eccipienti testati; ciò indica che tra le diverse sostanze sperimentate l'acido citrico possiede le migliori proprietà idrotropiche e, così come l'acido glutarico, consente di raggiungere valori di solubilità acquosa dell'albendazolo biofarmaceuticamente accettabili⁴⁸.

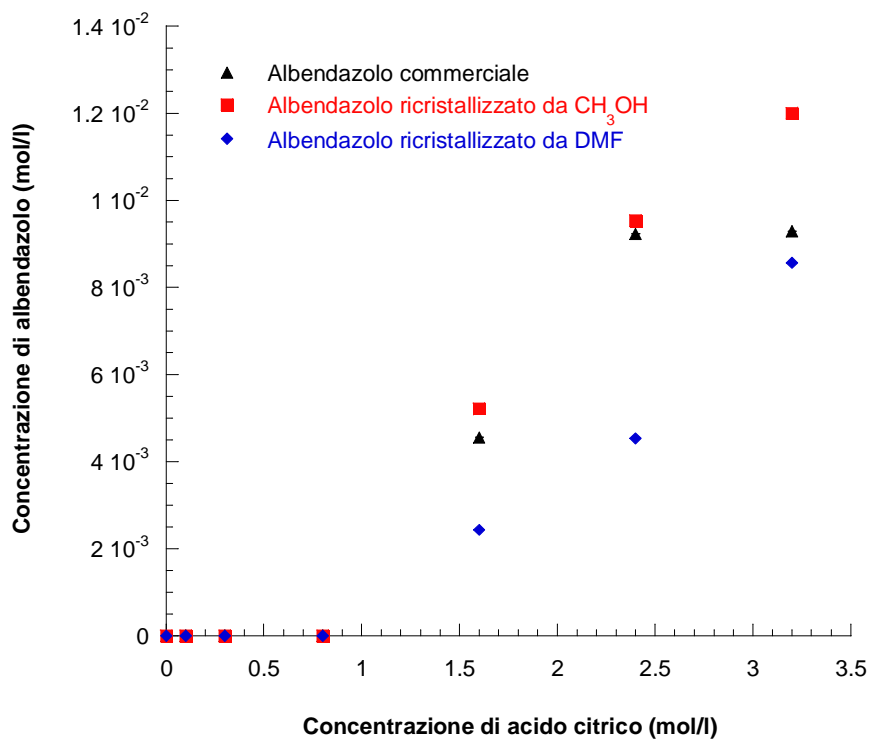


Figura 41. Diagramma di solubilità di fase dell'albendazolo (commerciale e ricristallizzati) in soluzioni acquose di acido citrico a diverse concentrazioni.

Sono state, infine, effettuate prove di solubilità su soluzioni acquose a concentrazione molare crescente di citrato di sodio, per confrontare i risultati ottenuti con quelli relativi al corrispondente acido. Il diagramma di solubilità di fase (Figura 42) mostra che le proprietà idrotropiche del sale si manifestano solo a partire da una concentrazione di 1.6 M sia per l'albendazolo tal quale sia per i ricristallizzati; i valori di solubilità sono tutti dell'ordine di 10^{-4} mol/L ed, in particolare, si ha: $9.83 \cdot 10^{-4}$ mol/L (0.261 mg/mL) per l'albendazolo tal quale, $8.70 \cdot 10^{-4}$ mol/L (0.231 mg/mL) per l'albendazolo ricristallizzato da metanolo e $6.00 \cdot 10^{-4}$ mol/L (0.160 mg/mL) per l'albendazolo ricristallizzato da dimetilformamide.

Nel caso del citrato di sodio non è stata superata la concentrazione di 1.6 M in quanto oltre questo valore la sostanza comincia a precipitare. Come già visto precedentemente

per le altre coppie acido – sale sodico, l'albendazolo manifesta una maggiore tendenza a formare complessi con la forma indissociata (acido) rispetto a quella salificata.

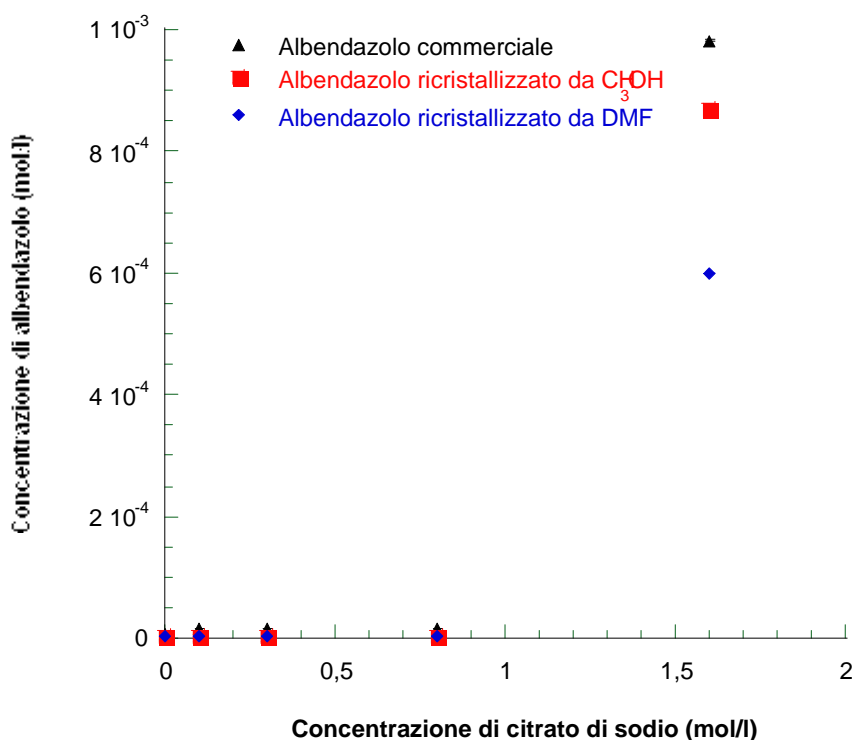


Figura 42. Diagramma di solubilità di fase dell'albendazolo (commerciale e ricristallizzati) in soluzioni acquose di citrato di sodio a diverse concentrazioni.

Le costanti di associazione calcolate per la coppia acido citrico – citrato di sodio (Tabella 9), come negli altri casi, risultano più alte per l'acido rispetto al sale sodico corrispondente, in quanto quest'ultimo ha caratteristiche più idrofiliche. In entrambi i casi le $K_{1:1}$ sono più alte nei ricristallizzati, probabilmente perché la loro differente struttura cristallina (rispetto all'albendazolo commerciale) favorisce una migliore interazione con la forma meno idrofila.

In accordo con la maggiore solubilità acquosa dell'albendazolo ricristallizzato da metanolo, si può affermare che nei complessi formati con l'acido citrico e con il citrato di sodio si ottengono le $K_{1:1}$ maggiori.

Le $K_{1:2}$ dei complessi con acido citrico risultano, invece, simili per i tre prodotti cristallini. Anche per il citrato di sodio le $K_{1:2}$ non presentano valori che indicano la formazione di un complesso con stechiometria 1:2.

Tabella 9. Costanti di associazione ($K_{1:1}$ e $K_{1:2}$) per i complessi tra ciascun prodotto cristallino e acido citrico o citrato di sodio. Deviazione standard in parentesi.

		Complessi con ABZ commerciale	Complessi con ABZ da CH ₃ OH	Complessi con ABZ da DMF
ACIDO CITRICO	$K_{1:1}$	636.47 (8.9)	2248.83 (374.03)	1542.91 (16.29)
	$K_{1:2}$	0.09 (0.0031)	0.08 (0.0389)	0.07 (0.0025)
CITRATO DI SODIO	$K_{1:1}$	123.34 (4.42)	314.38 (0.00)	214.706 (9.39)
	$K_{1:2}$	0.14 (0.02)	0.15 (0.00)	0.14 (0.02)

5.7 Misure di conducibilità

I dati presentati sembrano suggerire che l'albendazolo sia in grado di formare complessi con stechiometria 1:1 con i diversi eccipienti testati e che la formazione di detti complessi si traduca in un incremento della solubilità apparente.

Ciò è in accordo con quanto riportato da diversi autori sulla base di simulazioni di dinamica molecolare⁴⁹, di studi cristallografici su complessi solidi⁵⁰ o di misure di solubilità⁵¹.

Altri autori attribuiscono l'aumento di solubilità del principio attivo, che si osserva con molte sostanze idrotropiche, ad una variazione delle caratteristiche di polarità del solvente dovuta all'aggiunta dell'eccipiente.

Per verificare questa ipotesi sono state effettuate misure di conducibilità su soluzioni acquose contenenti i vari eccipienti in concentrazione molare uguali a quelle impiegate negli esperimenti di solubilità di fase con e senza l'aggiunta di un eccesso di albendazolo commerciale o di albendazolo ricristallizzato da metanolo e da dimetilformamide. Di seguito vengono presentati, a titolo di esempio, solo i dati di conducibilità relativi alle soluzioni contenenti i vari eccipienti in presenza e in assenza di albendazolo commerciale vista la riproducibilità di tali dati anche per i due ricristallizzati.

In figura 43 è rappresentata la conducibilità di soluzioni acquose in funzione della concentrazione di sola nicotinamide e di nicotinamide in presenza di un eccesso di albendazolo. Nel caso della sola nicotinamide i valori di conducibilità aumentano da 0.009 ± 0.085 mS/cm a 0.075 ± 0.208 mS/cm per soluzioni aventi concentrazioni comprese tra 0.1 e 3.2 M (curva blu). L'incremento di conducibilità osservato diminuisce progressivamente con l'aumento della concentrazione di nicotinamide. La presenza di un eccesso di albendazolo non determina una notevole variazione dei valori di conducibilità osservati con la sola nicotinamide (curva rossa). Le stesse considerazioni possono essere fatte per l'isonicotinamide, anche se in questo caso non è stata superata la concentrazione di 0.8 M in relazione al limite di solubilità della sostanza. I risultati ottenuti mostrano comunque un aumento della conducibilità della soluzione maggiore di quello riscontrato per la nicotinamide alla stessa concentrazione (Figura 44).

Soluzioni a concentrazione crescente di acido ascorbico (0.1 M – 0.8 M) determinano un aumento della conducibilità della soluzione (Figura 45) che cresce da 0.81 ± 1.53 mS/cm a 2.13 ± 1.5 mS/cm (curva blu). L'ulteriore incremento della concentrazione di acido ascorbico non determina un aumento della conducibilità che si attesta attorno al valore di 2.0 mS/cm. Le soluzioni di acido ascorbico contenenti un eccesso di albendazolo (curva rossa), invece, mostrano un'elevata conducibilità già a partire da basse concentrazioni di eccipiente (tra 2.3 e 3.0 mS/cm) per poi decrescere e stabilizzarsi su valori molto prossimi a quelli osservati con le soluzioni di solo acido ascorbico (circa 2.0 mS/cm). Le stesse osservazioni non possono essere fatte nel caso dell'ascorbato di sodio. Infatti, come emerge dall'andamento delle curve in figura 46 sia le soluzioni contenenti il solo ascorbato di sodio sia le soluzioni con l'aggiunta di un eccesso di albendazolo mostrano un analogo incremento della conducibilità da 0.1 fino a 1.6 M (da 5.0 a 30.0 mS/cm). L'unica eccezione è rappresentata dalla concentrazione 0.8 M alla quale le due soluzioni mostrano una differenza di conducibilità di circa 10.0 mS/cm. A partire dalla concentrazione 1.6 M si osserva un plateau: soluzioni aventi concentrazione differente (1.6 e 2.4 M) mostrano conducibilità simile (tra 30.0 e 35.0 mS/cm). A concentrazioni superiori (3.2 M) si ha, invece, un leggero calo della conducibilità ma sempre dello stesso ordine di grandezza per entrambe le soluzioni.

Quindi, se nel caso delle soluzioni di acido ascorbico la presenza di albendazolo determina una variazione significativa della conducibilità, perlomeno fino ad una concentrazione di 1.6 M, non può dirsi lo stesso per le soluzioni di ascorbato di sodio che in presenza o in assenza di albendazolo mostrano valori di conducibilità analoghi.

In figura 47 è rappresentata la conducibilità di soluzioni acquose in funzione di concentrazioni crescenti di acido glutarico in presenza (curva rossa) ed in assenza (curva blu) di un eccesso di albendazolo. L'incremento di conducibilità osservato con entrambe le soluzioni è quasi completamente sovrapponibile e l'andamento risulta crescente fino ad una concentrazione di eccipiente 1.6 M (2.5 mS/cm) per poi decrescere fino a 3.2 M (2.3 mS/cm). Nel caso del glutarato di sodio, come emerge dalle due curve in figura 49, i valori misurati risultano più alti rispetto a quelli rilevati per soluzioni della stessa concentrazione di acido glutarico; inoltre, in questo caso l'andamento dei grafici, quasi del tutto sovrapponibili, è sempre crescente e non si

osserva una riduzione dell'incremento della conducibilità all'aumentare della concentrazione di glutarato di sodio (Figura 48).

Soluzioni acquose di acido citrico, infine, determinano un aumento della conducibilità abbastanza consistente già a concentrazioni di 0.1 M (circa 3.0 mS/cm) sia nel caso del solo acido citrico sia nel caso dell'acido citrico in presenza di albendazolo. In figura 49 si nota che il valore più alto si raggiunge in corrispondenza della soluzione 1.6 M della sostanza idrotropica (circa 8.0 mS/cm). Si assiste poi ad un calo della conducibilità per concentrazioni di 2.4 e 3.2 M dell'eccipiente come emerge dall'andamento decrescente di entrambi i grafici. Anche per il citrato di sodio è stato dimostrato che i valori di conducibilità misurati, sia per le soluzioni di solo eccipiente sia per quelle di eccipiente con eccesso di albendazolo, sono elevati già a concentrazioni di 0.1 M (circa 18.0 mS/cm). Si ottengono due grafici (Figura 50) con andamento crescente fino a concentrazioni di eccipiente di 0.8 M e successivo plateau per concentrazioni superiori (1.6 M). In questo caso non è stata superata la concentrazione di 1.6 M in relazione al limite di solubilità della sostanza.

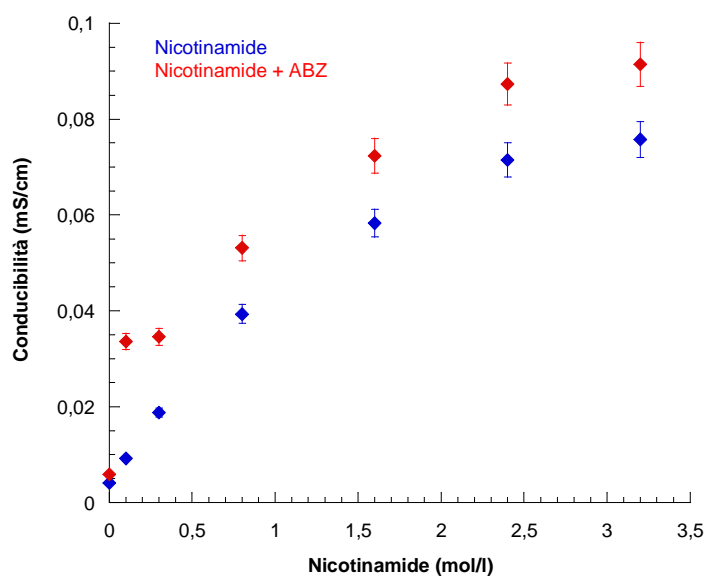


Figura 43. Conducibilità di soluzioni acquose contenenti concentrazioni crescenti di nicotinamide in presenza ed in assenza di un eccesso di albendazolo commerciale.

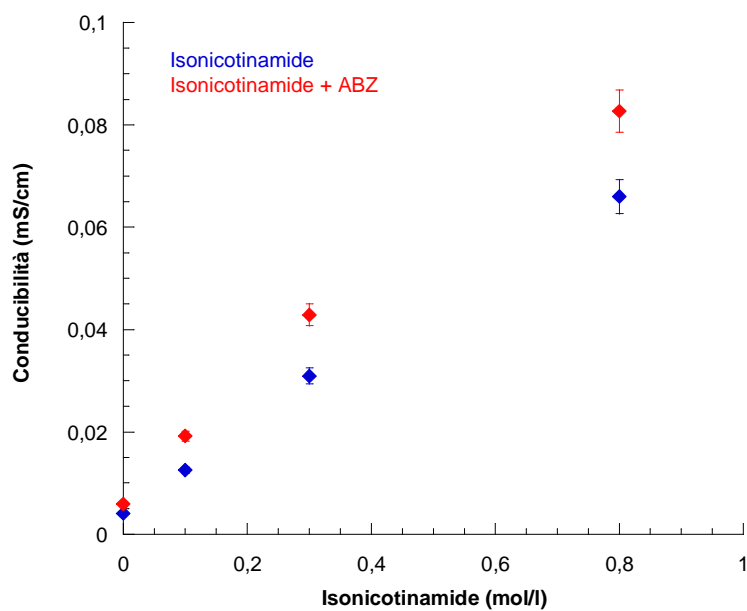


Figura 44. Conducibilità di soluzioni acquose contenenti concentrazioni crescenti di isonicotinamide in presenza ed in assenza di un eccesso di albendazolo commerciale.

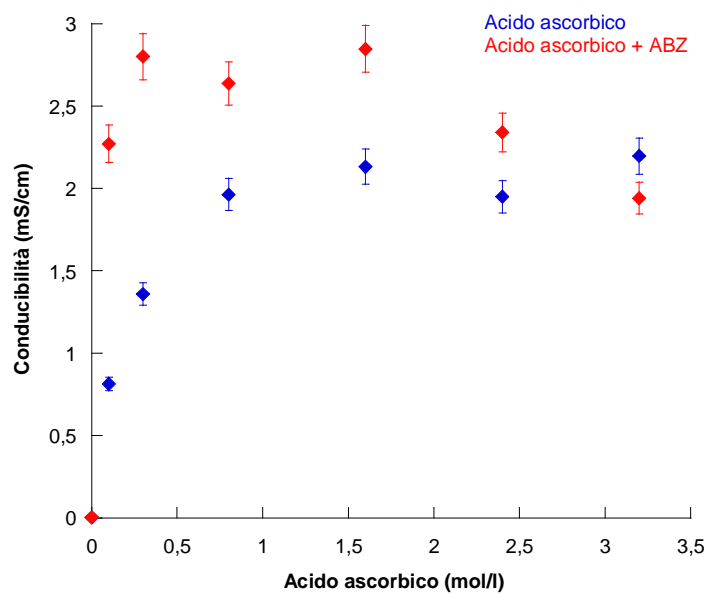


Figura 45. Conducibilità di soluzioni acquose contenenti concentrazioni crescenti di acido ascorbico in presenza ed in assenza di un eccesso di albendazolo commerciale.

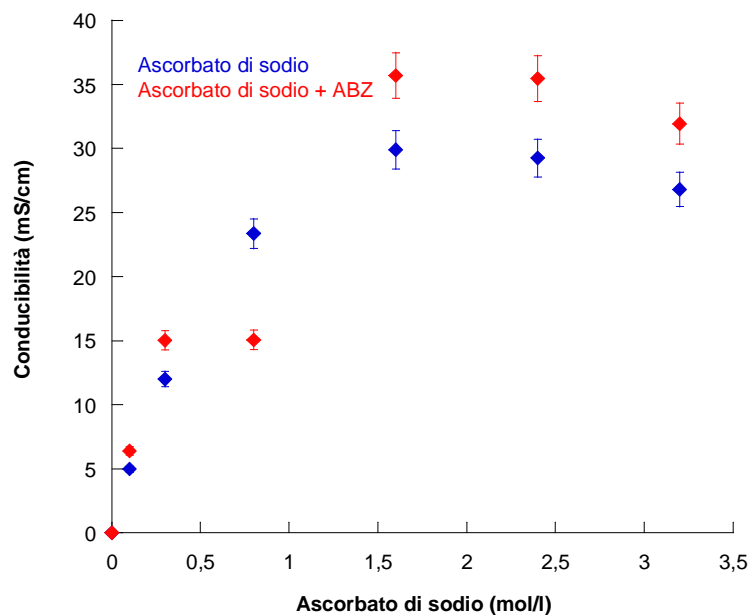


Figura 46. Conducibilità di soluzioni acquose contenenti concentrazioni crescenti di ascorbato di sodio in presenza ed in assenza di un eccesso di albendazolo commerciale.

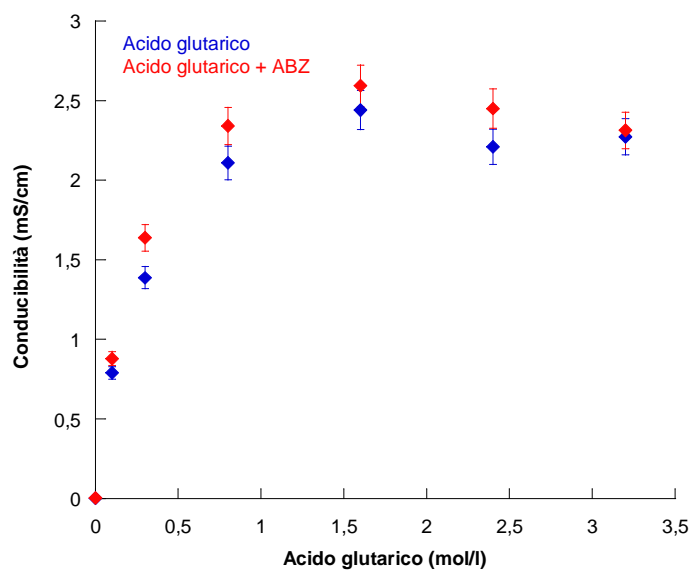


Figura 47. Conducibilità di soluzioni acquose contenenti concentrazioni crescenti di acido glutarico in presenza ed in assenza di un eccesso di albendazolo commerciale.

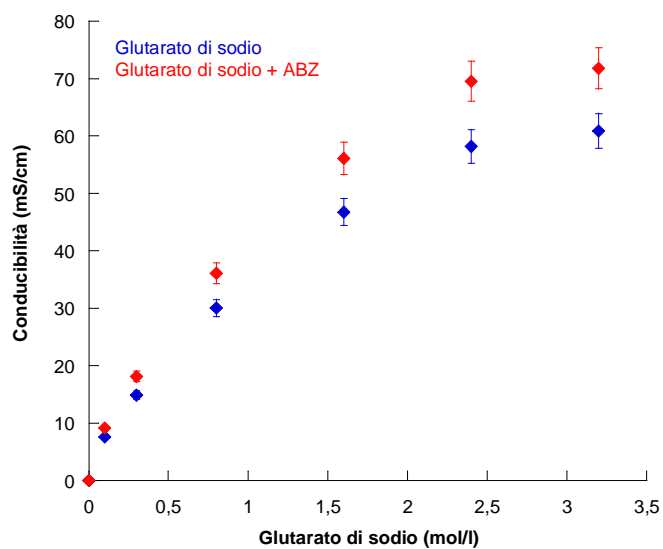


Figura 48. Conducibilità di soluzioni acquose contenenti concentrazioni crescenti di glutarato di sodio in presenza ed in assenza di un eccesso di albendazolo commerciale

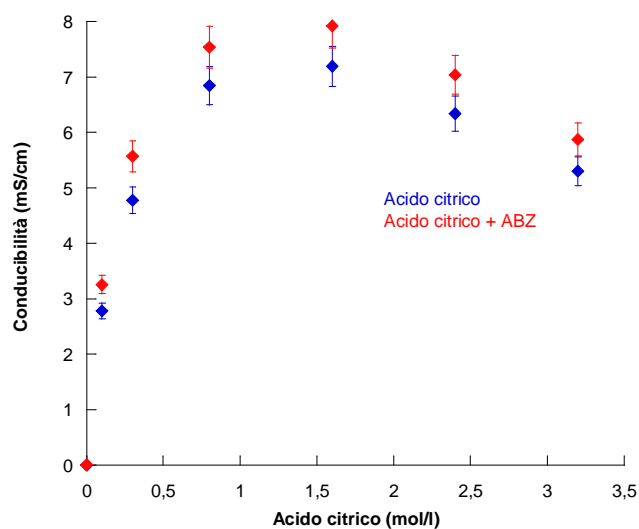


Figura 49. Conducibilità di soluzioni acquose contenenti concentrazioni crescenti di acido citrico in presenza ed in assenza di un eccesso di albendazolo commerciale

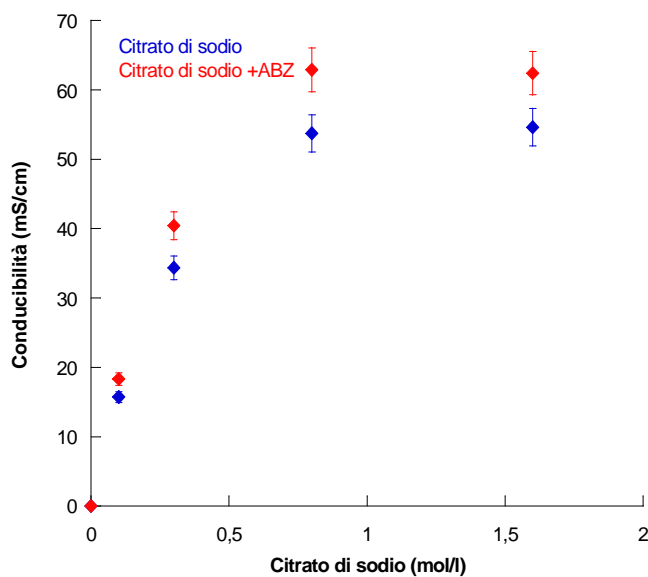


Figura 50. Conducibilità di soluzioni acquose contenenti concentrazioni crescenti di citrato di sodio in presenza ed in assenza di un eccesso di albendazolo commerciale

Osservando le curve di conducibilità relative alle soluzioni acquose dei vari eccipienti (acidi e sali) in presenza ed in assenza di albendazolo, si può concludere che l'andamento delle conducibilità non sembra variare di molto in seguito all'aggiunta del farmaco perché nell'interazione tra il farmaco e l'eccipiente, ipotizzando la formazione di un complesso, risultano impegnati gruppi funzionali probabilmente idrofobici che, se liberi, non determinerebbero comunque un aumento di conducibilità del mezzo acquoso. Sulla base di queste osservazioni, in definitiva, è possibile affermare che l'effetto idrotopico dei vari eccipienti sia con maggiore probabilità attribuibile alla formazione di complessi piuttosto che ad un cambiamento delle caratteristiche di polarità dell'acqua. In effetti, i sali che, come è logico attendersi, determinano una variazione della polarità della soluzione acquosa molto più accentuata rispetto ai corrispondenti acidi, sono quelli che provocano un minor aumento della solubilità dell'albendazolo.

6. CONCLUSIONI

La ricristallizzazione dell'albendazolo da metanolo e da dimetilformamide ha portato all'individuazione di una nuova forma polimorfica dell'albendazolo. Questo nuovo polimorfo, non riportato nel Cambridge Structural Database (CSD), rappresenta la forma bassofondente in rapporto enantiotropico con la forma polimorfica altofondente rappresentata dall'albendazolo commerciale come dimostrato dalle prove di solubilità a differenti temperature effettuate sui ricristallizzati e sul prodotto tal quale per la determinazione della temperatura di transizione.

La reale formazione di cocristalli o altri composti d'interazione tra il farmaco e i vari eccipienti non è stata confermata visto quanto emerso dai diagrammi di fase albendazolo:eccipiente; tuttavia, i punti di fusione dell'albendazolo mostrano oscillazioni molto più ampie (tra 40 e 60 K) rispetto a quelle osservate nelle restanti miscele quando il farmaco si trova in miscela con l'isonicotinamide, l'acido ascorbico, l'acido glutarico o l'acido citrico; si tratta degli stessi eccipienti che in soluzione mostrano le migliori proprietà idrotropiche come confermato dalla costruzione di diagrammi di solubilità di fase.

In effetti, l'attività idrotropica delle diverse sostanze testate determinano un incremento della solubilità acquosa apparente dell'albendazolo. L'acido citrico possiede le migliori proprietà idrotropiche e così come l'acido glutarico consente di raggiungere valori di solubilità acquosa farmaceuticamente accettabili.

Inoltre, dal confronto del comportamento in acqua delle coppie di composti omologhi (nicotinamide – isonicotinamide; acido ascorbico – ascorbato di sodio; acido glutarico – glutarato di sodio; acido citrico – citrato di sodio) si evince che il composto più idrofobico ha una maggiore tendenza ad interagire con l'albendazolo e questa complessazione sembra essere guidata termodinamicamente: il composto meno idrofilo tende ad associarsi con l'albendazolo per ridurre la superficie esposta all'ambiente polare rappresentato dall'acqua. Dal confronto delle $K_{1:1}$ e delle $K_{1:2}$ dei vari complessi

ottenuti, si può dedurre una forte tendenza alla formazione di complessi 1:1 con l'albendazolo, piuttosto che di complessi con stechiometria 1:2.

Infine, benché le misure di conducibilità non permettano di escludere in modo univoco che la variazione di polarità del mezzo acquoso giochi un ruolo nell'aumento della solubilità del principio attivo, sulla base dei dati raccolti si può concludere che l'ipotesi di formazione dei complessi sia la più probabile per spiegare l'aumento di solubilità dell'albendazolo nelle soluzioni acquose dei vari eccipienti.

A conclusione di questo lavoro di tesi è possibile individuare un filo conduttore tra i risultati ottenuti nello studio delle interazioni in fase solida tra l'albendazolo e i vari eccipienti e quelli ottenuti nello studio delle interazioni in fase liquida. Infatti, le sostanze che mostrano la migliore miscibilità in fase liquida con l'albendazolo (sulla base di quanto emerso dai diagrammi di fase) sono le stesse in grado di formare complessi preferenzialmente con stechiometria 1:1 con il farmaco stesso. Complessi quest'ultimi la cui formazione è favorita da interazioni di tipo idrofobico e non idrofilico come, invece, solitamente avviene in fase solida per la formazione di cocristalli (sintoni carbossilico/aminico e carbossilico/amidico). Ciò giustifica il mancato ottenimento di cocristalli tra l'albendazolo e le sostanze utilizzate come CCF_s.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Ivo De Carneri, *Parassitologia generale e umana*, 219-225.
- ² N.A. Kasim, M. Whitehouse, C. Ramachandran, M. Bermejo, H. Lennernäs, A.S. Hussain, H.E. Junginger, S.A. Stavchansky, K.K. Midha, V.P. Shah, G.L. Amidon, *Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification*, *Molecular Pharmaceutics*, 2003, 1(1), 85-96.
- ³ J. W. Mullin, *Crystallization*, Butterworth-Heinemann (2000), 264-332.
- ⁴ P. A. Tishmack, D. E. Bugay, S. R. Byrn, *Solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy – pharmaceutical applications*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92 (2003), 441.
- ⁵ A.T. Florence, D. Attwood, *Le basi chimico-fisiche della Tecnologia Farmaceutica*, EdiSES (2002), 5-34.
- ⁶ Anna Cecilia Jorgensen, *Increasing process understanding of wet granulation by spectroscopic methods and dimension reduction tools*, Tesi Dottorale, Università di Helsinki (2004).
- ⁷ H.G. Brittain Polymorphism in Pharmaceutical Solids, *Drugs and The Pharmaceutical Sciences*, Marcel Dekker, New York, 130 (1999), 246-248.
- ⁸ F.H. Allen and O. Kennard, *Chemical Design Automation News*, 1993, 8, 31.
- ⁹ (a) P.Vishweshwar, J.A. McMahon, J.A. Bis, M.J. Zaworotko, *Pharmaceutical Co-Crystals*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, 95, 3; (b) D.J. Dunitz, *Crystal and co-crystal: a second opinion*, *Cryst. Eng. Comm.*, 2003, 4:506.
- ¹⁰ (a) Ö. Almarsson and M.J. Zaworotko, *Crystal engineering of the composition of pharmaceutical phases. Do pharmaceutical co-crystals represent a new path to improved medicines?*, *Chemical Communication*, 2004, 1889-1896; (b) J. Fabian, H. Nakazumi, M. Matsuoka, *Chem. Rev.*, 1992, 92, 1197; (c) G. de la Torre, P. Vazquez, F. Agullo-Lopez, T. Torres, *J. Mater. Chem.* 1998, 8, 1671.
- ¹¹ A.V. Trask, W.D.S. Motherwell, W. Jones, *Physical stability enhancement of theophylline via cocrystallization*, *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, 320, 114-123.

- ¹² A.V. Trask, W.D.S. Motherwell, W. Jones, *Pharmaceutical CocrySTALLIZATION: Engineering a Remedy for Caffeine Hydration*, *Crystal Growth and Design*, 2005, 5(3), 1013-1021.
- ¹³ P.Vishweshwar, J.A. McMahon, M.L. Peterson, M.B. Hickey, T.R. Shattock, M.J. Zaworotko, *Crystal engineering of pharmaceutical co-crystals from polymorphic active pharmaceutical ingredients*, *Chemical Communication*, 2005, 4601-4603.
- ¹⁴ J.F. Remenar, S.L. Morissette, M.L. Peterson, B. Moulton, J.M. MacPhee, H.R. Guzmàn, Ö. Almarsson, *Crystal engineering of novel cocrystals of a triazole drug with 1,4-dicarboxylic acids*, *Journal of American Chemical Society*, 2003, 125, 8456-8457.
- ¹⁵ M.L. Brader, M. Sukumar, A.H. Pekar, D.S. McClellan, R.E. Chance, D.B. Flora, A.L. Cox, L. Irwin, S.R. Myers, *Hybrid insulin cocrystals for controlled release delivery*, *Nature biotechnology*, 2002, 20, 800-804.
- ¹⁶ D.P. McNamara, S.L. Childs, J. Giordano, A. Iarriccio, J. Cassidy, M.S. Shet, R. Mannion, E. O'Donnell, A. Park, *Use of a glutaric acid cocrystal to improve oral bioavailability of a low solubility API*, *Pharmaceutical Research*, 2006, 23(8), 1888-1897.
- ¹⁷ R. Pepinsky, *Physical Review*, 1955, 100, 971.
- ¹⁸ G.M. Schmidt, *Pure Appl. Chem.*, 1971, 27, 647.
- ¹⁹ D. Braga, F.Grepioni, G.R. Desiraju, *Chemical Review*, 1998, 98, 1375-1405.
- ²⁰ R.C. Finn, J. Zubieta, R.C. Haushalter, *Prog. Inorg. Chem.*, 2003, 51, 412-601.
- ²¹ P. Colombo, P.L. Catellani, A. Gazzaniga, E. Menegatti, E. Vidale, *Principi di tecnologie farmaceutiche*, Casa Editrice Ambrosiana, 115-157.
- ²² *Advanced Drug Delivery Reviews – Preface* 59 (2007) 531-532.
- ²³ B. Evrard, P. Chiap, P. DeTullio, F. Ghalmi, G. Piel, T. Van Hees, J. Crommen, B. Losson and L. Delattre, *Oral bioavailability in sheep of albendazole from a suspension and from a solution containing hydroxypropyl- β -cyclodextrin*, *Journal of Controlled Release*, 13 December 2002, 83 (1-3), 45-50.
- ²⁴ C. Neuberg, *Journal of Chemical Society*, 110 (1916), 555
- ²⁵ A.M. Saleh, L.K. El-Khordagui, *Hydrotropic agents: a new definition*, *International Journal of Pharmaceutics*, 1985, 24(2-3), 231-238.

- ²⁶ (a) A.H. Sijpkens, G.J. van de Kleut, S.C. Gill, *Biophys. Chem.* 46 (1993) 171; (b) E.M. Duffy, P.J. Kowalczyk, W.L. Jorgensen, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 9271; (c) G. Dempsey, P. Molyneux, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 88 (1992) 971.
- ²⁷ G.S.S. Ferreira, D.M. Perigo, M.J. Politi, S. Schreier, *Photochem. Photobiol.* 63 (1996) 755
- ²⁸ D. Balasubramanian, V. Srinivas, *J. Phys. Chem.*, 93 (1989) 3865
- ²⁹ D. Balasubramanian, V. Srinivas, *Aggregation Behavior of Hydrotropic Compounds in Aqueous Solution*, *J. Phys. Chem.*, 93 (1989), 3865-3870.
- ³⁰ R.C. da Silva, M. Spitzer, L.H.M. da Silva, W. Loh, *Investigations on the mechanism of aqueous solubility increase caused by some hydrotropes*, *Termochimica Acta*, 328 (1999), 161-167.
- ³¹ S. Agrawal, S.S. Pancholi, N.K. Jain, G.P. Agrawal, *Hydrotropic solubilization of nimesulide for parenteral administration*, *International Journal of Pharmaceutics*, 274 (2004), 149-155.
- ³² A.A. Badwan, L.K. El-Khordagui, A.M. Saleh, S.A. Khalil, *The solubility of benzodiazepines in sodium salicylate solution and a proposed mechanism for hydrotropic solubilization*, *International Journal of Pharmaceutics*, 1982, 13(1), 67-74.
- ³³ J.P. Kamat, T.P. Devasagayam, *Nicotinamide (vitamin B₃) as an effective antioxidant against oxidative damage in rat brain mitochondria*, *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 1999, 4(4), 179-184.
- ³⁴ M. Beheme, *Nicotinamide and diabetes prevention*, *Nut. Rev.*, 53 (1995), 137-139.
- ³⁵ H.E.A. Gensler, *Prevention of photoimmunosuppression and photocarcinogenesis by topical nicotinamide*, *Nutr. Cancer*, 1997, 29(2), 157-162.
- ³⁶ H. Mohler, P. Polc, *Nicotinamide is a brain constituent with benzodiazepine-like actions*, *Nature*, 278 (1978), 563-565.
- ³⁷ M.F. McCarty, A.L. Russell, *Niacinamide therapy for osteoarthritis. Does it inhibit nitric oxide synthase induction by interleukin 1 in chondrocytes?*, *Medical Hypotheses*, 1999, 53(4), 350-360.
- ³⁸ A.R. Shalita et al., *Topical nicotinamide compared with clindamycin gel in the treatment of inflammatory acne vulgaris*, *International Journal of Dermatology*, 1995, 34(6), 434-437.
- ³⁹ H. Suzuki, H. Sunada, *Mechanistic studies on hydrotropic solubilization of nifedipine in nicotinamide solution*, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1998, 46(1), 125-130.

- ⁴⁰ R.E. Coffman, D.O. Kildsig, *Effect of nicotinamide and urea on the solubility of riboflavin in various solvents*, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1996, 85(9), 951-954.
- ⁴¹ J. Lee et al., *Hydrotropic solubilization of paclitaxel: analysis of chemical structures for hydrotropic property*, Pharmaceutical Research, 2003, 20(7), 1022-1030.
- ⁴² Lee-Young Lim, Mei-Lin Go, *Caffeine and nicotinamide enhances the aqueous solubility of the antimalarial agent halofantrine*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 10 (2000), 17-28.
- ⁴³ T.Higuchi, K.A. Connors, *Phase-Solubility Techniques, Advances in analytical chemistry and instrumentation*, 4 (1965), 117.
- ⁴⁴ S. Nicoli, F. Zani, S. Bilzi, R. Bettini, P. Santi, *Association of nicotinamide with parabens: Effect on solubility, partition and transdermal permeation*, European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics), 69 (2008), 613-621.
- ⁴⁵ R. Bettini, L. Bonassi, V. Castoro, A. rossi, L. Zema, A. Gazzaniga, F. Giordano, *Solubility and conversion of carbamazepine polymorphism in supercritical carbon dioxide*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001, 13 (3), 281-286
- ⁴⁶ J.T. Carstensen, *Advanced Pharmaceutical Solids*, Ed.Marcel Dekker, Drugs and Pharmaceutical Sciences – vol. 110, 2001, 171-172.
- ⁴⁷ S. Nicoli, S. Bilzi, P. Santi, M.R. Cairra, J. Li, R. Bettini, *Ethyl-Paraben and nicotinamide Mixtures. Apparent Solubility, Thermal Behavior and X-Ray Structure of the 1:1 Co-Crystal*, Journal of pharmaceutical Sciences, 2008, 97 (11) 4830-4839
- ⁴⁸ James I. Wells, *Pharmaceutical Preformulation: The Physicochemical properties of Drug Substances*, John Wiley & Sons, New York, 1988, pp. 20-25.
- ⁴⁹ E.M. Duffy, P.J. Kowalczyck, W.L. Jorgensen, Journal American Chemical Soc., 115 (1993), 2971.
- ⁵⁰ A.H. Sijpkens, G.J.vand de Klent, S.C. Gill, Biophys.Chem., 46 (1993) 171.
- ⁵¹ Ritesh Sanghvi, Daniel Evans, Samuel H. Yalkowsky, *Stacking complexation by nicotinamide: A useful way of enhancing drug solubility*, International Journal of Pharmaceutics, 336 (2007), 35-41.

