

Rifampicina y biodisponibilidad en productos combinados

Rifampicin and bioavailability in combination formulation

SOSA M, SZÉLIGA ME, FERNÁNDEZ A, BREGNI C

Departamento de Tecnología Farmacéutica
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires
Junín 956, Piso 6° (1113) Buenos Aires, Argentina

RESUMEN

La rifampicina (R) es un antibiótico de primera elección en el tratamiento de la tuberculosis (TB) junto a la Isoniazida (H), Pirazinamida (Z) y Etambutol (E). De acuerdo a las últimas estadísticas, la TB aumentó a nivel mundial y entre las causas más citadas figuran: las monoterapias, la aparición de microorganismos resistentes, la carencia de programas efectivos, el incumplimiento en el tratamiento y las dosis erróneas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades de Pulmón (IUATLD) declararon a la enfermedad en emergencia mundial y establecieron programas terapéuticos para asegurar el cumplimiento y disminuir los problemas relacionados a la terapia. Sobre esta base, figura en la lista oficial la asociación de los cuatro fármacos de primera línea R, Z, H y E combinados en dosis fijas (FDC) que permiten la administración conjunta de los mismos y, en las dosis correctas. Los productos FDC son recomendados oficialmente por la OMS para el tratamiento de la TB. No obstante existen factores que alteran la biodisponibilidad de la R en estas formulaciones, hecho ampliamente reconocido en publicaciones científicas. El objetivo de este trabajo es estudiar los aspectos más relevantes que alteran la biodisponibilidad de la R en los productos FDC y plantear posibles soluciones al problema.

PALABRAS CLAVE: Rifampicina. Isoniazida. Productos FDC. Biodisponibilidad. Estabilidad. Polimorfismo.

ABSTRACT

The drug rifampicin (R) is used as a first line antibiotic treatment for tuberculosis (TB), together with Isoniazide (H), Pyrazinamide (Z) and Ethambutol (E). According to recent statistics, there has been an increase in TB on a worldwide scale, with the main causes being: monotherapies, the appearance of resistant microorganisms, the lack of effective preventative programs, non-compliance to treatment and mistaken dosage schedules. The world health organisation (WHO) and the International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases (IUTALD) declared a state of emergency with respect to the disease and established programs to increase compliance to therapy and to reduce the incidence of problems arising from such. Along these lines, a list of first line drug therapy treatments were established, which included R, Z, H & E combinations at fixed dosage combinations (FDC), permitting safe combined administrations of the drugs at correct dosage levels. These fixed dose combinations have been officially recommended by the WHO in the treatment of TB. However, as has been widely recognised in numerous scientific publications, in such formulations, there are factors that alter the bioavailability of R. The objective of this work has been to study the most relevant aspects concerning R bioavailability alterations and to consider possible solutions to the problem.

KEY WORDS: Rifampicin. Isoniazid. FDC products. Bioavailability. Stability. Polymorphism.

INTRODUCCIÓN

Según datos estadísticos, 1.5 millones de personas mueren por año a causa de la tuberculosis¹ y el 98 % de dichas muertes ocurren en países en desarrollo; estas cifras preocuparon a organismos internacionales, por lo que la OMS declaró a la enfermedad en emergencia mundial.

En la actualidad se dispone de una amplia bibliografía con respecto a la biodisponibilidad disminuida de la rifampicina (R) cuando se halla combinada en dosis fijas con isoniazida (H) pirazinamida (Z) y etambutol (E), fármacos de primera elección en el tratamiento de la TB². La OMS y la IUATLD, publicaron un protocolo en 1999 que establece el uso de las cuatro drogas asociadas en dosis fijas R + H + Z + E (Tabla 1). Estas fórmulas permiten un mayor control de la terapia, previenen la resistencia a las drogas, simplifican el tratamiento, aseguran el cumplimiento, favorecen el suministro a los pacientes y facilitan la prescripción.

INTRODUCTION

According to statistical data, the death rate from tuberculosis¹ is as high as 1.5 million people per year, of which 98% of such deaths occur in developing countries. The magnitude of these figures is a source of great concern for international organisations, and it is for this reason that the WHO has declared a state of world emergency.

A great number of articles dealing with the reduced bioavailability of rifampicin (R), used in combination with isoniazide (H), pyrazinamide (z) and ethambutol (E), have been published over recent years. These drugs are considered as first line treatments for TB², for which the WHO and the IUATLD published a protocol in 1999, establishing the combined use of the four associated drugs at fixed dosages. (Table 1). The aims of the protocol were to attain; greater control of the therapy, prevent resistance to the drugs, simplify treatment, to assure adequate compliance to treatment, to facilitate dispensation to patients and to simplify prescription procedures.

TABLA 1. Asociaciones de la Rifampicina con las drogas de 1° línea dada por la OMS.

TABLE 1. Associations of Rifampicin with WHO first line drugs.

| Drogas <i>Drug</i> | Forma farmacéutica <i>Pharmaceutical form</i> | Fórmula Indicada para uso diario <i>Suitable formulation for daily use</i> |
|-----------------------|--|---|
| RHZE | Comprimidos <i>Tablet</i> | R (150 mg) + H (75 mg) + Z (400 mg) + E (275 mg) |
| RHZ | Comprimidos <i>Tablet</i> | R (150 mg) + H (75 mg) + Z (400 mg) |
| | Comp. Dispersables <i>Tablet Dispersible</i> | R (60 mg) + H (30 mg) + Z (150 mg) |
| RH | Comprimidos <i>Tablet</i> | R (300 mg) + H (150 mg) |
| | Comprimidos <i>Tablet</i> | R (150 mg) + H (75 mg) |
| | Comp. Dispersables <i>Tablet Dispersible</i> | R (60 mg) + H (30 mg) |
| EH | Comprimidos <i>Tablet</i> | E (400 mg) + H (150 mg) |

Si bien la combinación de los cuatro fármacos mencionados pone de manifiesto las últimas recomendaciones dadas por los organismos internacionales, también figuran en la lista oficial la asociación de tres drogas R + H + Z para el tratamiento en adultos y en menor concentración para uso pediátrico. La combinación de dos drogas esenciales R + H fue una de las primeras asociaciones y, según el tipo de infección, es considerablemente utilizada.

Por lo expuesto, resulta de fundamental importancia mejorar la biodisponibilidad de la rifampicina presente en todas las combinaciones. En consecuencia, es necesario estudiar su estabilidad, los aspectos más relevantes de la fase sólida, las interacciones con excipientes, las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas más importantes, con el objeto de lograr formulaciones estables que garanticen una óptima absorción de los fármacos.

Estabilidad y Aspectos Biofarmacéuticos

Dentro de las formulaciones FDC, la R es el componente más crítico en cuanto a la estabilidad y biodisponibilidad. En orden creciente de estabilidad le sigue la isoniazida y la pirazinamida³. Hay muy poca información bibliográfica en relación a la estabilidad del etambutol.

La R es ligeramente soluble en agua y etanol. La solubilidad en agua es pH dependiente: a pH 2 es de 100 mg/ml; a pH 5,3 disminuye a 4 mg/ml y a pH 7,5 se reduce a 2,8 mg/ml. La solubilidad de la R en agua puede ser incrementada por la adición de ácido ascórbico. La droga tiene un pKa de 1,7 y 7,9⁴

Los productos que contienen R deben ser protegidos de la exposición al aire, la humedad, la luz y al calor excesivo (40 °C o más). En pH alcalino de 7,5 a 9,0 la R sufre una degradación oxidativa en presencia de oxígeno, a temperatura ambiente, formando la rifampicina quinona. Esta oxidación puede ser disminuida por la adición de ácido ascórbico. El pH de máxima estabilidad esta cerca de la neutralidad⁵. A pH ácidos la droga esta sujeta a catálisis ácida (descomposición de la droga in situ en el estómago), así sufre una hidrólisis

The protocol not only outlines recommendations for the combined use of the four drugs, but also officially recommends combinations of three drugs, R+H+Z, for treatment in adults, as well as the same combination for paediatric use at lower concentrations. The use of two of the essential drugs R+H was one of the first combinations to have been established, and in accordance with the type of infection concerned, is one that is still widely used.

Given that rifampicin is the drug that is common to all of the combinations, it is therefore of fundamental importance that its bioavailability is improved. Further study is therefore necessary to discover its stability, aspects regarding solid phase, interactions with excipients, as well as the most important physicochemical and biopharmaceutical properties, as a means to achieving stable formulations which guarantee optimal absorption of the drugs.

Stability and Biopharmaceutical Aspects

In FDC formulations, R is the most critical component with regard to stability and bioavailability. In increasing order of stability isoniazide and pyrazinamide³ follow. However, there is little bibliographical information available with regard to the stability of ethambutol.

R is slightly soluble in water and ethanol. at pH 2 it is 100mg/ml, at pH 5.3 it is reduced to 4mg/ml and at pH 7.5 reduces to 2.8 mg/ml. R solubility in water can be increased by adding ascorbic acid. The drug has a pKa of 1.7 and 7.9⁴.

Products containing R should be protected from exposure to air, humidity, light and excessive heat (40° or more). Under alkaline pH conditions of between 7.5 to 9.0, R undergoes oxidative degradation in the presence of oxygen, at room temperature, forming rifampicin-quinone. Such an oxidation can be reduced through the addition of ascorbic acid. Maximum R stability is found to exist at pH values close to neutrality⁵. For acid pH values, the drug is subject to acid catalysis (decomposition of the drug in situ in the stomach) and consequently undergoes a process of specific hydrolysis giving 3-formyl rifamycin and 1-amino 4-methyl piperazine. The phos-

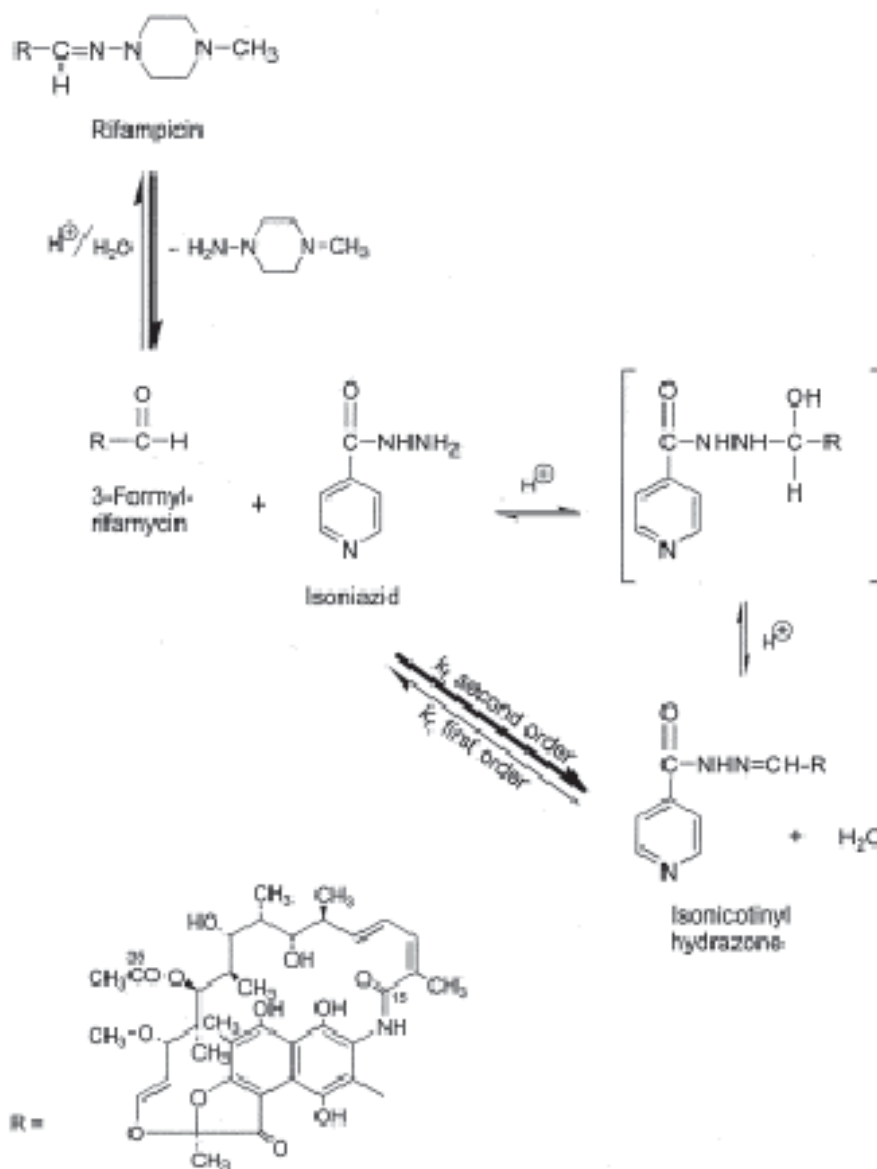
sis específica obteniéndose el 3-formil-rifampicina y el 1-amino-4-metil piperazina. Los buffer fosfato también catalizan la descomposición.

La descomposición que sufre la R en medio ácido aumenta en forma significativa en presencia de la H. Singh S. *et al*⁶. comprobaron el mecanismo por el cual ocurre la reacción de degradación y se identificaron los productos y la cinética de estos procesos. Así la R se descompone en 3 formil-rifampicina y en la 1-amino-4-metil piperazina mediante una reacción de primer orden, luego la 3-formil-rifampicina reacciona mediante una reacción de segundo orden con la H formando una hidrazona (isonicotinil hidrazona) (Figura I). La inestabilidad de la hidrazona resulta en la regeneración de la isoniazida y la 3-formil rifampicina por una reacción de pseudoprimer orden. Como se observa en la figura 1 este equilibrio está desplazado hacia la formación de la hidrazona que fue aislada y caracterizada. Este mecanismo conduce a la degradación de la R en presencia de H y explica los resultados obtenidos en los ensayos realizados a distintas formulaciones, en donde la R sola, en las mismas condiciones, se descompone en un promedio que no excede el 6.33 %; mientras que asociada a la H el promedio de descomposición aumenta al 16,32 %. De esta manera se explica su baja estabilidad y disminuida biodisponibilidad. No se encontraron modificaciones en los porcentajes de degradación de R cuando esta combinada con la Z y/o el E⁷, drogas que no intervienen en la reacción ni modifican la estabilidad de los otros componentes.

phate buffers also catalyse this decomposition.

R decomposition in acid media increases significantly in the presence of H. Singh *et al*⁶ identified the mechanism through which this reaction occurs, as well as the products and kinetic processes involved. R decomposes, through a first order reaction, in 3-formylrifamycin and 1-amino 4-methyl piperazine, and subsequently, a second order reaction occurs between 3-formyl rifamycin and H, forming a hydrazone (Isonicotinyl hydrazone) (Figure 1). Hydrazone instability results in 3-formylrifamycin and H regeneration through a pseudo first order reaction. As shown in figure 1, this equilibrium is displaced towards the formation of hydrazone, which was subsequently isolated and characterised. It is through this mechanism that R degradation takes place in the presence of H and serves as a basis from which the results obtained from different tests carried out on different formulations may be evaluated. R alone under the same conditions decomposes at an average of no more than 6.33%, while decomposition rates in association with H reach averages of 16.32%. It is through such a process that the low stability and reduced bioavailability of R can be explained. Modifications in R degradation percentages were not found when, combined with Z and/or E⁷, which are drugs that neither intervene in the reaction, or modify the stability of other components.

FIGURA 1. mecanismo de descomposición de la Rifampicina en presencia de Isoniazida en medio ácido.
FIGURE 1. The decomposition mechanism of Rifampicin in the presence of Isoniazide in acid medium.



Estos estudios realizados *in-vitro* pueden compararse con otras investigaciones que se llevaron a cabo *in-vivo*. Shishoo *et al*⁸ en un trabajo realizado en voluntarios sanos determinaron distintos parámetros farmacocinéticos de la R y de su metabolito activo 25-desacetilrifampicina (25-DAR). Se midieron los niveles de excreción urinaria de formulaciones con R como único componente y de formulaciones con R + H. Se observó una disminución en la cantidad excretada del 27,90 % para R, y del 32,35 % para su metabolito activo 25 -DAR, en relación a las formulaciones que

The results obtained from these *in-vitro* studies are comparable to those obtained from other *in-vivo* studies. Shishoo *et al*⁸ determined different pharmacokinetic parameters of R and of its active metabolite 25-desacetyl rifampicin (25 DAR) in a study carried out on healthy volunteers, in which levels of R alone and co-administered R + H formulations were determined from urine samples. A decrease in the excreted quantity of 27.90% was observed for R and 32.35% for its active metabolite 25 DAR, in comparison with formulations containing R alone. Decreases in

contienen R sola. Las disminuciones en el área bajo la curva (AUC_{0-24}) fueron de un 34,24 % y 29,26 % para la R y 25-DAR respectivamente.

Desde el aspecto biofarmacéutico, es necesario destacar que la R pertenece a la clase II en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico, sustancia de baja solubilidad y alta permeabilidad, mientras que los otros componentes Z, H y E pertenecen a la clase I, alta solubilidad y alta permeabilidad. Por esta razón la R resulta ser el componente más limitante de los productos FDC.

Además, la R es una molécula compleja que tiene diferentes conformaciones de acuerdo a las interacciones entre sus grupos funcionales generando distintos hábitos cristalinos. Los procesos involucrados en la manufactura tales como la molienda, el mezclado, la granulación y el secado pueden modificar la naturaleza cristalina de la droga. Por este motivo, es indispensable hacer un seguimiento en las distintas etapas de elaboración del producto terminado a fin de no producir cambios cristalinos en el principio activo y en consecuencia no dar lugar a una modificación en la liberación de la R. Asimismo, los excipientes comúnmente usados en la preparación de los comprimidos tales como el talco, bentonita o caolín, adsorben la R y disminuyen su liberación en el tracto gastrointestinal.

Estudios realizados sobre fase sólida

El polimorfismo es una de las causas más citadas en la literatura porque tiene gran influencia en la biodisponibilidad del principio activo y en consecuencia en la efectividad del tratamiento. La R presenta polimorfismo, una de las propiedades más importantes del estado sólido que debe considerarse en las etapas de desarrollo del producto terminado. Las distintas estructuras cristalinas se deben a interacciones moleculares tales como puentes de hidrogeno, cambios conformacionales y estados de ionización que ocasionan reordenamientos moleculares, se forma una celda unitaria y la repetición de la misma, forma un retículo cristalino que caracteriza al cristal. La estructura cristalina adoptada por una sustancia activa ejerce cambios sobre las propiedades del es-

the area under the curve (AUC_{0-24}) were 34.24% and 29.26% for R and 25-DAR respectively.

From a bio pharmaceutical point of view, it should be pointed out that in the Biopharmaceutical Classification System, R is classified as a Type II substance of low solubility and high permeability, while other the components Z, H & E belong to type I substances of high solubility and high permeability. For this reason, the R component is the main limiting factor in FDC products.

Furthermore, the R molecule is a complex one, which presents different conformations in accordance with interactions between its functional groups, generating different crystalline habits. Different processes involved in the elaboration of the drug, such as grinding, mixing, granulation or drying may alter the crystalline nature of the drug. It is therefore essential to monitor the different stages of elaboration of the finished product, so as to guard against changes in the crystal habit of the active principle and the consequent changes in R liberation capacity. It should also be taken into account that commonly used excipients, in the preparation of tablet formulations, such as talc, bentonite and kaolin may adsorb R and therefore reduce its liberation within the gastrointestinal tract.

Solid phase studies

According to many bibliographic references, polymorphism is one of the most influential factors in the bioavailability of active principle and the effectiveness of treatment. The polymorphic nature of R in solid state form is one of the most important properties to be taken into account throughout the stages of development of the finished product. The different crystalline structures formed are dependent upon molecular interactions, such as hydrogen bridges, changes in conformation and ionization states, which cause molecular reorganisation, forming unitary cells and their repetition, which in turn produce a crystalline reticule that characterises the crystal. The crystalline structure adopted by the active substance causes changes in the properties of solid state formations to take place. These changes

tado sólido, como ser, la solubilidad, punto de fusión, densidad, velocidad de disolución, índice de refracción, volumen, dureza del cristal, higroscopicidad, velocidad de reacción, estabilidad, entalpía y diagramas de fase entre otros. Todas están determinadas por la naturaleza del estado cristalino. Para identificar un polimorfo es necesario utilizar métodos espectroscópicos y termales conjuntamente.

En 1977, Pelizza *et al.*⁹ demuestran que la compleja estructura de la molécula de R muestra polimorfismo. Caracterizan al polimorfo I, al polimorfo II y a la forma amorfa. Los métodos de análisis espectroscópicos utilizados fueron, espectroscopia infrarroja (FTIR) y Rayos X (XRPD) estableciendo los patrones de identidad para cada sustancia. Se correlacionan con los métodos termográficos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y termogravimetría (TG) que se tomaron como termogramas patrones para los estudios posteriores.

Resulta interesante destacar que los distintos tipos de interacciones vibracionales de los grupos funcionales de la molécula de R difieren en los diferentes polimorfos. La orientación espacial de los átomos adquiere una diferente conformación originando una estructura cristalina determinada en cada caso. En la R amorfa el grupo acetilo del C₃₅ adquiere dos conformaciones diferentes que impiden la formación de una forma cristalina.

En los estudios de Henwood *et al.*¹⁰ fueron aislados diferentes solvatos e hidratos por recristalización en varios sistemas de solventes a partir del polimorfo II que se considero como R patrón. Se obtuvo una rifampicina monohidrato, una rifampicina dihidrato, 1:1 rifampicina:acetona solvato, 1:2 rifampicina:2-pirrolidona solvato y dos formas amorfas. Todas las formas cristalinas fueron analizadas por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y caracterizadas por análisis térmicos, métodos espectroscópicos y medidas de la velocidad de disolución. Se observó que hidratos y solvatos pasan a la forma amorfa después de la desolvatación, con excepción de la 2-pirrolidona solvato. El caso de la formación de hidratos a partir de solventes como el etanol absoluto y el benceno, nos hace pensar que la R existe con moléculas de agua de cristalización que se ordenan dentro de la red cristalina. En cuanto a los amorfos, contrariamente a

can affect properties such as solubility, fusion points, density, dissolution velocity, refraction index, volume, crystal hardness, hygroscopicity, reaction speed, stability, enthalpy and phase diagrams among others, which are all determined by the nature of the crystalline state. In order to identify a polymorph, spectroscopic and thermal methods should be used jointly

In 1977, Pelizza *et al.*⁹ showed that the complex R molecule structure shows a polymorphic behaviour, characterising polymorph I, II and the amorphous form. The spectroscopic analysis methods used were infrared spectroscopy (FTIR) and X rays (XRPD), which allowed the identity patterns of each substance to be determined. These were subsequently correlated through differential scanning calorimetry (DSC) and thermo gravimetric analysis (TGA), from which thermo gram patterns were taken for use in subsequent studies.

It is of interest to note that the different types of vibrational interactions of the functional groups of the R molecule are different in different polymorphs. The spatial orientation of the atoms acquire a different conformation, which produce a determined crystalline structure in every case. In the amorphous R, the C35 acetyl group acquires two different conformations, which prevent the formation of crystalline forms.

In studies carried out by Henwood *et al.*¹⁰ different hydrates and solvates were isolated through re-crystallization in numerous solvent systems from polymorph II, which was considered as R pattern. A rifampicin monohydrated, a rifampicin dehydrate, 1:1 rifampicin acetone solvate, 1:2 rifampicin 2-pyrrolidone solvate and two amorphous forms were obtained. All crystalline forms were analysed through sweeping electronic microscopy (SEM), and characterized through thermal analysis, spectroscopy and dissolution velocity evaluation. Hydrates and solvates were seen to transform into amorphous forms, after desolvation, with the exception of 2- pyrrolidine solvate. The formation of hydrates from solvents, such as absolute ethanol and benzene, leads us to believe that R is present in conjunction with water of crystallisation, which are ordered within the crystal network. Contrary to what

lo esperado, presentan menor velocidad de disolución. Este comportamiento se puede explicar considerando que las partículas muy finas del amorfo se agregan por fuerzas electrostáticas formando los denominados «*lump*» que disminuyen la disolución del polvo. Los resultados muestran que la solubilidad en CIH 0,1 N, simulando las condiciones del estómago, es la siguiente: dihidrato \geq monohidrato $>$ acetona solvato $>$ polimorfo II $>$ amorfo I $>$ 2-pirrolidona solvato $>$ amorfo II. Este hecho indicaría que el dihidrato podría ser la forma cristalina con mayor performance *in vivo*.

En un trabajo reciente, Panchagnula *et al*¹¹ analizaron los polimorfos I y II, ambos suministrados por el Laboratorio Lupin Ltd (Mumbai, India), mientras que la forma amorfa fue desarrollada por los autores. Se estudiaron además muestras comerciales de R adquiridas del comercio internacional. La caracterización se realizó por los métodos espectroscópicos y termales ya mencionados además de mostrar una técnica termomicroscópica donde se observan los eventos térmicos bajo luz polarizada (Leitz 1350, Leica, Germany). El termograma DSC de los polimorfos y del amorfo muestra los eventos térmicos: en la forma I solo se observa una exoterma de descomposición a los 261°C. La forma II muestra una endoterma de fusión a 189°C seguida de una exoterma de recristalización a la forma I a 204°C, transición sólido-liquido-sólido, que finalmente se descompone a 258 °C. El amorfo presenta eventos exotérmicos con descomposición a 258°C. Estos comportamientos térmicos coinciden con las transiciones de los cristales observados con luz microscópica. Los termogramas por DSC descritos nos permite establecer la relación termodinámica entre los dos polimorfos, la formación de la forma cristalina I, después del calentamiento de la forma II, es un proceso irreversible, lo que indica que la forma I puede ser obtenida por calentamiento de la forma II y ambos polimorfos exhiben una relación monotrópica. En base a los datos de fusión obtenidos se puede establecer que la forma I es estable mientras que la forma II es metaestable. El termograma del amorfo sugiere buena estabilidad termodinámica con descomposición a 258°C.

Las diferencias en las uniones puentes de hidrogeno de la forma I, II y amorfo son dadas

was expected, amorphous forms presented low dissolution velocities. This behaviour may be explained by the fact that the very fine particles of the amorphous form are clustered together through electrostatic forces, forming so called «*lumps*», which reduce the dissolution speed of the powder. The results show that the solubility in CIH 0,1 N, which simulate conditions in the stomach, are as follows: dehydrate \geq monohydrate $>$ acetone solvate $>$ polymorph II $>$ amorphous I $>$ 2-pyrrolidone solvate $>$ amorphous II. This indicates that the dehydrate could be the crystalline form that yields the highest performance *in vivo*.

In a recent work, Panchagnula *et al*¹¹ analysed polymorphs I and II, both supplied by Lupin Laboratories Ltd (Mumbai, India), as well as the amorphous form, developed by the authors themselves. Commercial samples of R acquired from the international market were also studied, and characterisation was carried out through the previously mentioned thermal and spectroscopic methods. A thermo microscopic technique was also used in this study, which observed thermal events under polarised light (Leitz 1350, Leica, Germany). The thermo gram (DSC) of polymorphic and amorphous forms shows the thermal events that took place: Form I only demonstrates an exothermic decomposition at 261°C, form II, an endothermic fusion at 189°C, followed by an exotherm of re-crystallisation to form I at 204°C. The amorphous form presents exothermal events with decomposition taking place at 258°C. These thermal behaviour patterns coincide with the transition of crystals observed with microscopic light. The DSC thermo grams described, allow us to establish the existence of a dynamic thermal relationship between the two polymorphs. The formation of crystalline form I, after heating form II, is an irreversible process. This indicates that form I may be obtained through heating form II and that both polymorphs exhibit a monotropic relationship. On the basis of the fusion information obtained, it can be established that form I is stable, while form II is metastable. The thermo gram of the amorphous form suggests good thermodynamic stability with decomposition at 258°C.

Differences in the hydrogen bridge links between forms I and II and the amorphous

por espectroscopia FTIR y, en el difractograma por XRPD se observan los patrones característicos de difracción de ambos polimorfos. También, se realizaron los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) y se diseñaron los modelos moleculares. Los factores tales como tamaño de partícula, velocidad de disolución intrínseca a distintos valores de pH fueron analizados. Resulta relevante, que el tamaño de partícula de las muestras comerciales tuvo más impacto en la velocidad de disolución, que el polimorfismo. Muestras con tamaño de partícula por debajo de las 100 µm mostraron una alta velocidad de disolución independientemente del polimorfo involucrado, mientras que partículas por encima de las 100 µm muestran una baja disolución. Las muestras comerciales analizadas resultaron ser una mezcla de polimorfo I, polimorfo II y amorfo.

Interacciones con excipientes y otros fármacos

Los excipientes comúnmente usados en la industria farmacéutica como la bentonita, caolín y talco adsorben fuertemente la R y por lo tanto reducen su absorción gastrointestinal. El ácido aminosalicílico influye en la absorción de la R y no se logran concentraciones plasmáticas adecuadas¹². Si se emplean juntos ambos medicamentos, habrá que dejar un intervalo de 8 a 12 h entre el consumo de uno y el del otro.

Por otro lado, la R es un inductor enzimático y por lo tanto reduce las concentraciones plasmáticas de muchas drogas. Por ejemplo, reduce el efecto terapéutico de la warfarina (disminución de efecto anticoagulante)¹³, y de muchos otros fármacos, tales como: aminofilina, amobarbital, cloranfenicol, difenilhidantoina, diazepam, digoxina, fenilbutazona, nifedipina, ketoconazol, levonorgestrel + etinlestradiol, propranolol, sildenafil, verapamil, entre otros¹⁴

Propuestas para mejorar la formulación

En base a los parámetros mencionados anteriormente, es necesario desarrollar nuevas formulaciones FDC que mejoren la esta-

forms can be observed through FTIR spectroscopy, while the XRPD diffractogram reveals the characteristic diffraction patterns of both polymorphs. Additionally, analyses through Nuclear Magnetic Resonance spectra (NMR) were carried out and molecular models were designed. Factors such as particle size, and intrinsic dissolution rates at different pH values were analysed. It is relevant to mention at this stage, that particle sizes in commercial samples had a greater impact on dissolution rate than polymorphism. Samples with particle sizes of below 100 µm were found to present a higher dissolution rates independently of the polymorph concerned, while particles over 100 µm showed slower dissolution rates. Analysis of commercial samples revealed that these presented mixtures of polymorph I & II and the amorphous form.

Interactions with excipients and other drugs

Commonly used excipients in the pharmaceutical industry, such as bentonite, kaolin and talc, show a strong adsorption of R, and consequently reduce gastrointestinal absorption. Amino salicylic acid influences R absorption and appropriate plasmatic concentrations¹² cannot be achieved. Consequently, if both medicines are to be taken, it will be necessary to allow an interval of between 8 & 12 hrs between the intake of one medicine and the other.

On the other hand, R is an enzymatic inductor and therefore reduces plasmatic concentrations of many drugs. For example, it reduces the therapeutic effectiveness of Warfarin (decreases its anti-clotting properties)¹³, and that of many other drugs such as: aminophyllin, amobarbital, chloramphenicol, diphenylhydantoin, diazepam, digoxin, phenylbutazone, nifedipin, ketoconazole, levonorgestrel + ethinyl stradiol, propranolol, sildenafil, verapamil, and others.

Formulation improvement proposals

On the basis of the previously mentioned parameters, new FDC formulations that improve *in vivo* stability and bioavailability need

bilidad in vivo de la R como así también su biodisponibilidad. Se propone para tal fin:

1) Efectuar una microencapsulación gastroresistente de la R sola frente a los demás principios activos en el mismo producto terminado, para evitar la hidrólisis ácida y su interacción con la isoniazida. De esta manera se libera a nivel del TGI sin descomposición y permite una liberación segregada de ambas drogas con una diferencia de 3 a 4 horas. Es importante considerar el grado de entrapamiento de la rifampicina en las microcapsulas. Esta propuesta puede ser viable para aquellas formulaciones donde solo esta combinada la rifampicina con la isoniazida.

2) Singh *et al* propone entre otras sugerencias modificar el pH estomacal para disminuir la descomposición en medio ácido por medio de un álcali soluble, como el bicarbonato de sodio, suministrandolo al mismo tiempo que el FDC. La elección del antiácido debe ser cuidadosamente realizada por la presencia de absorbentes que modifican la biodisponibilidad de los activos¹⁵.

3) Hacer comprimidos con recubrimiento entérico que se liberen en medio alcalino y evitar la reacción de degradación.

4) Establecer los requerimientos de tamaño de partícula y polimorfismo que reúna las mejores condiciones de estabilidad y solubilidad de manera de lograr una absorción adecuada y uniformidad de lotes.

5) Procesos de manufactura validados (GMP) a fin de que en cada etapa de elaboración no haya cambios en el estado cristalino y obtener igual calidad del producto terminado.

6) En base a estudios recientes realizados sobre la permeabilidad de la R y la H¹⁶, se concluye que la R es permeable a nivel estomacal, mientras que la H no lo es y sí a nivel intestinal. Sobre esta base y considerando que la mayor solubilidad de la R es a pH 1-2, se puede considerar una formulación donde la R sea liberada a nivel estomacal y la H a nivel intestinal. Teniendo en cuenta que la degradación de la R sola en medio ácido es de 6.45% en 50 min⁶, la segregación de las drogas beneficia las absorciones de ambos activos

to be developed. As a means to achieving such an aim the following procedures are proposed:

1) The production of a gastro-resistant microencapsulation of R in the presence of the other active principles within the finished product, to prevent acid hydrolysis and its interaction with isoniazide. This will allow its release at TGI level without decomposition and a segregated release of both drugs within a time difference of 3 to 4 hours. However, it is important to take into account the rate of release of the rifampicin in the microcapsules. This proposal may be viable in formulations in which rifampicin is combined with isoniazide only.

2) Singh *et al* propose, among other suggestions, the modification of pH in the stomach, to decrease decomposition in the acid medium, using soluble alkali, such as sodium bicarbonate, administered concomitantly with FDC. The choice of the anti-acidic agent should be made carefully, due to the fact that the presence of absorbents can modify the bioavailability of principle actives¹⁵.

3) The production of enteric coated tablets, which release the active principle in an alkali medium, avoiding the decomposition reaction.

4) The establishment of particle size and polymorphic requirements, which guarantee better conditions of stability and solubility, adequate absorption and uniformity of tablet composition among batches.

5) The application of Good Manufacturing Practices (GMP) to guarantee that no change in crystalline state will occur at any stage of production, and to facilitate the attainment of homogeneousness of quality of the finished product.

6) On the basis of recent R & H permeability studies¹⁶, it can be concluded that R is permeable within the stomach, while H is not, but H is permeable in the intestine. Along these lines and considering that R is most soluble at pH 1-2, a formulation permitting the release of R in the stomach and H in the intestine may be considered. Considering that decomposition of R alone in acid medium is 6.45% in 50 mins⁶, the segregation of both drugs would aid the absorption of both actives.

CONCLUSIONES

Su condición de pertenecer a la clase II dentro del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica sumado a las variantes polimórficas, a la posible baja calidad del principio activo y, entre otras causas, a las reacciones de degradación que sufre en distintos medios, conduce a que la R es la droga con menor estabilidad y con mayor problemas de biodisponibilidad. Por esta razón es necesario efectuar los controles necesarios a fin de mantener la calidad del producto terminado. El polimorfismo y el tamaño de partícula son aspectos fundamentales en el estudio de fase sólida. La R se presenta en diferentes combinaciones de formas cristalinas. La forma II es la preferida y el contenido de amorfo debe ser monitoreado.

La validación de los procesos de manufactura resulta indispensable en todas las etapas de elaboración de los productos FDC. Es necesario garantizar la estabilidad de la R en el medio de liberación y la adecuada absorción en el TGI. Por lo tanto, se plantea realizar nuevos ensayos de desarrollo galénico que optimicen los aspectos biofarmacéuticos de nuevas formulaciones de productos FDC.

CONCLUSIONS

The fact that R is classified as a type II drug by the Biopharmaceutical Classification System, presents polymorphic variants, is possibly an active principle of poor quality and among other aspects presents decomposition reactions in different media, make this drug less stable and more problematic with regard to bioavailability. For this reason it is necessary to carry out appropriate production controls, in order to achieve a homogeneous quality of the final product. Polymorphism and particle size are fundamental aspects of solid phase study. R exists in different combinations of crystalline form. Form II is the best form, but amorphous content should be monitored.

The validation of manufacturing practices is essential throughout all stages of manufacture of FDC products. It is necessary to guarantee R stability in the release medium and its adequate absorption in the GIT. Consequently, new galenic development tests, aimed at optimising biopharmaceutical aspects of new FDC formulation products, should be carried out.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIGRAPHY

1. World Health Organization. Report on infectious diseases. Removing obstacles to healthy development. World Health Organization Document 1999;WHO/CDC/99.1:1-68.
2. Goodman y Gilman; Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Novena edición, 1996, Mc Graw-Hill. Interamericana, México; cap.48: 1225
3. Singh S., Mariappan T.T., Snakar R., Sarda N., Sing B., A Critical review of the probable reasons for the poor/variable bioavailability of rifampicina from anti-tubercular fixed-dose combination (FDC) products, and the likely solutions to the problem; *Int. J. Pharm* 2001, 228: 5-17
4. Gallo G.G, Radaelli P, 1976 Rifampicin In: Florey K (Ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances*, Academic Press, London, pp: 468-513
5. Connors K.A., Amidon G.L.; Stella V.J., *Chemical Stability of Pharmaceuticals*. Second Edition, p: 728-732
6. Sing S., Mariappan T.T., Sharda N., Kumar S., Chakraborti A.K., The Reason for an Increase in Decomposition of Rifampicin in the Presence of Isoniazid under Acid Conditions, *Pharm. Pharmacol. Commun.* 2000, 6: 405-410
7. Sing S., Mariappan T.T., Sharda N., Singh B., Degradation of Rifampicin, Isoniazid and Pyrazinamide from Prepared Mixtures and Marketed Single and Combination Products Under Acid Conditions, *Pharm. Pharmacol. Commun.* 2000, 6: 491-494.
8. Shishoo C. J., Shan S.A., Rathod I.S., Savale S.S., Vora M.J.; Impared Bioavailability of rifampicina in presence of isoniazida from fixed dose combination (FDC) formulation. *Int. J. Pharm* 2001, 228: 53-67
9. Pelizza G., Nebuloni M., Ferrari P., Gallo G.G, Polymorphism of Rifampicin; *Il Fármaco* 1977, 32:471-481
10. Henwood S.Q., Liebenberg W., Tiedt L.R., Lötter A.P, Villiers M.M; Characterization of the Solubility and Dissolution Properties of Several New Rifampicin Polymorphs, Solvates and Hydrates; *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2001, 27(10):1017-30
11. Agrawal S., Ashokraj Y., Bharatam P.V., Pillai O., Panchangnula R.; Solid-state characterization of rifampicina samples and its biopharmaceutic relevance; *European J. Pharm. Sci* 2004, 22: 127-144

12. Goodman y Gilman; Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Novena edición, 1996, Mc Graw-Hill. Interamericana, México; cap.48: 1230
13. M. H.Beers, M.D. y R. Berkow, M.D. El Manual Merk. Décima edición, 1999, Harcourt, España, cap.304: 2615.
14. L.R.Lépori P.R. Vademécum Décima edición, 2003, E.C.S.A. Buenos Aires, Sección III Índice de interacciones medicamentosas: 401.
15. Khalil S.A.H., El-Khordagui L.K., El-Gholmy Z.A., Effect of antacids on oral absorption of rifampicina; Int. J. Pharm. 1984, 20:99-106
16. Mariappan T.T., Singh S., Regional gastrointestinal permeability of rifampicin and isoniazid (alone and their combination) in the rat; Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2003, 7(8):797-803.